

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**LOKAL İLERİ MEME KANSERLİ HASTALARDA NEOADJUVAN
KEMOTERAPİ SONRASI PD-1, TIGIT, LAG-3, TIM-3 GİBİ
İMMÜN KONTROL MEKANİZMA RESEPTÖR
EKSPRESYONLARININ AKAN HÜCRE ÖLÇERLE ARAŞTIRILMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Aykhan ABBASOV

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Vahit Özmen

İstanbul - 2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**LOKAL İLERİ MEME KANSERLİ HASTALARDA NEOADJUVAN
KEMOTERAPİ SONRASI PD-1, TIGIT, LAG-3, TIM-3 GİBİ
İMMÜN KONTROL MEKANİZMA RESEPTÖR
EKSPRESYONLARININ AKAN HÜCRE ÖLÇERLE ARAŞTIRILMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Aykhan ABBASOV

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vahit Özmen

İstanbul - 2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde büyük emekleri bulunan, tezimi belirleyen, planlama, uygulama ve yazım süreçlerinde desteğini hiç esirgemedi beni yönlendiren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Vahit Özmen'e,

Başta Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Yaman Tekant olmak üzere, bilgi birikimi ve araştırmacı kimliği ile bu çalışmaya zaman ayıran, tavsiye ve yönlendirmeler yapan ilgi ve anlayışını hiç eksik etmeyen Prof. Dr. Neslihan Cabioglu'na,

Tezimin oluşmasındaki çok önemli katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Günnur Deniz ve Prof. Dr. Esin Aktaş'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Semen Önder'e ve diğer Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Bu tezi gerçekleştirmemde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Abdullah İğci'ye, Prof. Dr. Mahmut Müslümanoğlu'na, Doç. Dr. Mustafa Tükenmez'e, Op. Dr. Selman Emiroğlu'na,

Tez sürecinde bana yardımlarından dolayı sevgili meslektaşım Dr. Baran Mollavelioglu'na,

Yaşamımda ve eğitim hayatımda bana destek olan, beni yetiştirip maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına yetişen hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum sevgili aileme,

Ve son olarak da daima benim yanımda olan ve bundan sonra da yanımda olmasını istediğim değerli eşim Zümrüd Aliyeva'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
TABLolar DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	10
MEME KANSERİ.....	10
MEME KANSERİNİN EVRELENDİRİLMESİ	12
Klinik ve Patolojik TNM-Prognostik Evrelendirme.....	16
Lokal İleri Meme Kanseri	22
Tümör İmmunolojisi	23
İmmün Gözetim (İmmunosurveillance).....	24
İmmün Düzenleme (Cancer İmmunoediting).....	25
İmmün Kontrol Noktaları	26
PD-1 (Programlı Hücre Ölümü-1).....	26
TIGIT (Ig ve ITIM alanlarına sahip T hücresi immünoresptörü)	27
LAG-3 (Lenfosit Aktivasyon Geni-3)	28
TİM-3 (T-Hücre İmmünglobülin ve Mucin domain-3)	29
CTLA-4 (Sitotoksik T Lenfosit Antijeni-4).....	29
Kanser İmmünoterapisi.....	30
Meme Kanslerinde İmmünoterapi.....	31
GEREÇ VE YÖNTEM	32
BULGULAR	36
TARTIŞMA	57
SONUÇLAR	62
REFERANSLAR.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

PD-1	: Programlanmış hücre ölümü-1(Programmed cell death-1)
PDL-1	: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1(Programmed cell death-ligand-1)
LAG-3	: Lenfosit aktivasyon geni-3(Lymphocyte activation gene-3)
TİM-3	: T-Hücre İmmünglobülin ve Müsin domain-3(T-cell immunoglobulin and mucin domain-3)
TIGIT	: Ig ve ITIM alanlarına sahip T hücresi immünoresptörü(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)
CTLA-4	: Sitotoksik T lenfosit antijeni-4(Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4)
NK	: Doğal katil hücreler
ER	: Östrojen reseptör
PR	: Progesteron reseptörleri
HER-2	: İnsan büyüme faktör reseptör-2
Ki-67	: Proliferasyon indeksi
TILs	: Tümör infiltre eden lenfositler
DC	: Dendritik hücreler
APCs	: Antijen sunan hücreler
Treg	: Regülatör T Hücreleri(Düzenleyici T hücreleri)

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Meme kanserinin moleküler alt tipleri (St. Gallen Meme Kanseri Konsensus Toplantısı 2011)	11
Tablo 2. Primer Tümörün Sınıflaması (T) - Klinik ve Patolojik.....	13
Tablo 3. Bölgesel Lenf Nodlarının Sınıflaması (N)- Klinik	14
Tablo 4. Uzak Metastazın Sınıflaması (M)	14
Tablo 5. Bölgesel Lenf Nodlarının Sınıflaması (pN)- Patolojik	15
Tablo 6. Meme Kanserinin Anatomik Evrelemesi.....	16
Tablo 7. Klinik Prognostik Evre Tabloları.....	17
Tablo 8. Hastaların demografik , klinik ve patolojik özellikleri	37
Tablo 9. CD8+, CD16+ ve CD56+ tümör infiltrate eden lenfositlerin dağılımı.....	38
Tablo 10. CD8+ TLenfositlerinin Demografik , Klinik ve Patolojik Özelliklere Göre Değerlendirmesi	39
Tablo 11. CD16+NK Hücrelerinin Demografik , Klinik ve Patolojik Özelliklere Göre Değerlendirmeler.....	40
Tablo 12. CD56+NK Hücrelerinin Demografik , Klinik ve Patolojik Özelliklere Göre Değerlendirmeler.....	41
Tablo 13. Yaşa Göre Değerlendirmeler(*p<0.05).	42
Tablo 14. Hastaların Menopozal Durumlarına Göre Değerlendirmeler(*p<0.05).....	43
Tablo 15. Tablo 15. T Evrelerine Göre Değerlendirmeler (*p<0.05).	44
Tablo 16. N Evrelerine (N0/ N1-N2-N3) Göre Değerlendirmeler (*p<0,05).	45
Tablo 17. N Evrelerine (N0-N1/ N2-N3) Göre Değerlendirmeler(*p<0,05).	46
Tablo 18. Östrojen Reseptörü (ER) sonuçlarına göre Değerlendirmeler(*p<0,05).	47
Tablo 19. Ki-67 düzeylerine göre değerlendirme(*p<0,05)	48
Tablo 20. Lenfovasküler invazyona (LVİ) göre değerlendirme(*p<0.05).	48
Tablo 21. Yaygın İn Situ Komponent Varlığına Göre Değerlendirmeler(*p<0.05).....	49
Tablo 22. Tümör Regresyon Düzeylerine Göre Değerlendirmeler (*p<0.05).	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tümör immünoterapisinde immün kontrol noktalarına karşı geliştirilen inhibitörlerin rolü.	7
Şekil 2. Tümör immünoterapisinde immün kontrol noktalarına karşı geliştirilen inhibitörlerin rolü.	8
Şekil 3. Yaşa göre CD8 ⁺ CTLA-4 ölçümleri	42
Şekil 4. Menopozal durumlarına göre CD56 ⁺ TIGIT ölçümleri	43
Şekil 5. T evrelerine göre CD8 ⁺ ST T Lenfosit, CD8 ⁺ PD-1, CD8 ⁺ CTLA-4, CD56 ⁺ LAG-3 ölçümleri.....	45
Şekil 6. N evrelerine göre CD56 ⁺ PD-1 ölçümleri.....	46
Şekil 7. N evrelerine göre CD8 ⁺ TIM-3 ölçümleri.....	46
Şekil 8. HER-2 sonuçlarına göre CD8 ⁺ TIM-3 ölçümleri.....	47
Şekil 9. İn situ komponent varlığına göre CD16 ⁺ TIGIT, CD16 ⁺ LAG-3, CD56 ⁺ PD-1, CD56 ⁺ CTLA-4 ölçümleri.....	49
Şekil 10. Tümör Regresyon düzeylerine göre CD8 ⁺ TIGIT, CD56 ⁺ TIGIT ölçümleri	50
Şekil 11. CD8 Sitotoksik T lenfosit, CD56 ve CD16 NK hücrelerinde PD-1, CTLA-4, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 Ekspresyonlarının Akan Hücre Ölçer Analizleri	56

NOT: Bu tez, Prof.Dr.Vahit Özmen'nin yürütücülüğünü yaptığı BAP/TTU-2018-22168 sayılı “Lokal İleri Meme Kanseri Hastalarda Neoadjuvan Kemoterapi Sonrası PD-1, TIGIT, LAG-3, TIM-3 gibi İmmün Kontrol Mekanizma Reseptörlerinin Akan Hücre Ölçerle Ekspresyonunun Araştırılması” başlıklı proje ile ilişkili olmak üzere İstanbul Üniversitesi Bilimsel Proje Süreçleri Yönetim Sistemi ve İstanbul Meme Hastalıkları Derneği tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

GİRİŞ

Tümör ve immün sistem biyolojisinin anlaşılmasındaki son gelişmeler, antitümöral immün cevabı modüle eden immün kontrol noktalarının önemini ortaya koymuştur. Bu çalışmadaki amacımız, neo-adjuvan kemoterapi alan lokal ileri meme kanserli hastalarda PD-1, CTLA-4, TIGIT, LAG-3, TIM-3 gibi immün kontrol noktaları reseptörlerinin tümör infiltre eden lenfositlerdeki ekspresyonunu araştırmaktır. Ayrıca, bu bulguların diğer klinik ve prognostik faktörlerle ilişkisi ve immün kontrol nokta inhibitörleri ile hedefe yönelik tedavilerin etkinliği de değerlendirilecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Eylül 2018 ile Kasım 2019 arası İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Ünitesi'ne tanı ve tedavi amacıyla başvuran 18 yaş üstünde, lokal ileri meme kanseri tanısı ile neo-adjuvan kemoterapi alan ve tedaviye tam yanıt alınamayan 24 hasta dahil edildi. Ameliyat sırasında çıkarılan tümör dokusundan MACS tümör ayırım cihazı ve tümör ayırım kiti kullanılarak tümör infiltre eden lenfositler (TIL) izole edildi. Flowsitometri cihazı kullanılarak, CD8⁺ T Lenfositlerinde ve CD16⁺, CD56⁺ NK hücrelerinde eksprese edilen PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, CTLA-4 gibi immün kontrol mekanizmalarını regüle eden reseptörlerin tümör infiltre eden lenfositlerdeki ekspresyonları analiz edildi.

BULGULAR

Analizlerimiz sonucunda ≥ 50 yaş olguların CD8⁺ T lenfositlerindeki CTLA-4 ölçümlerinin, < 50 yaş olanlardan daha düşük olduğu saptandı ($p=0,004$). Post-menopozal hastaların CD56⁺NK hücrelerindeki TIGIT ekspresyonları, premenopozal hastalardan daha

yüksekti($p=0,014$). Ayrıca neo-adjuvan kemoterapi sonrası patolojik tümör çapı (pT3-T4) büyük olan hastaların CD8⁺ T hücrelerindeki PD-1, CTLA-4 ve CD56⁺NK hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonu, patolojik tümör çapı küçük olan (pT1-T2) hastalara göre daha fazlaydı(sırasıyla $p=0,014$, $p=0,018$, $p=0,042$). Ayrıca patolojik lenf nodu pozitif olan hastaların CD56⁺ NK hücrelerinde PD-1 ölçümleri, aksiller metastazı olmayan hastalara göre daha azdı($p=0,022$). Neoadjuvan tedavi sonrası $\geq 20\%$ regresyon görülen olguların CD8⁺ ve CD56⁺ T hücrelerindeki TIGIT ekspresyon düzeyi, diğer az cevaplı veya cevapsız hastalara göre daha fazlaydı(sırasıyla $p=0,014$, $p=0,030$). Yaygın in situ komponenti olan vakalarda ise CD16⁺ NK hücrelerinde TIGIT ve LAG-3 ve CD56⁺ NK hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu negatif yaygın in situ komponenti olmayanlara göre ilginç olarak daha yüksekti(sırasıyla $p=0,024$; $p=0,003$; $p=0,032$; $p=0,013$). Neo-adjuvan kemoterapi sonrası HER-2⁺ hastalarda negatif hastalara göre CD8⁺ T hücrelerindeki TIM-3 ekspresyonu düzeyi daha yüksekti($p=0,043$). Spearman korelasyon analizlerinde, patolojik regresyon skoru sadece CD16⁺ CTLA-4⁺ hücre varlığı ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p=0,031$).

SONUÇ

Sonuçlarımız, daha genç (<50 yaş) ve lokal ileri evre meme kanserli hastaların, immün kontrol noktası inhibitörleri kullanımı yoluyla immünoterapötik yaklaşımlardan daha fazla yararlanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, sistemik kemoterapinin immünoterapi ile kombinasyonu hastalardaki patolojik yanıt oranını artırabilir.

ABSTRACT

Differential Expressions of Immune Check Point Receptorson Tumor Infiltrating Lymphocytes after Neo-adjuvant Chemotherapy (NAC) in Patients with Locally Advanced Breast Cancer (LABC)

Background

Recent advances in tumor biology and immune system have identified check points modulating immune system to demonstrate the anti-tumoral immune response. This prospective study aimed to determine immune checkpoint expressions patients with locally advanced breast cancer to explore any associations between clinical and prognostic factors to show effectiveness of targeted therapies for these molecules.

Materials and Methods

This prospective study was carried out between September 2018 and November 2019 in the Department of General Surgery of Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine Breast Unit. Twenty-four patients with LABC with a partial response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) were included in the study. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) were isolated from the residual tumor burden separated from the surgical material with cell dissociation kit by using MACS tumor separation device. Expressions of immune checkpoints receptors including PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT and CTLA-4 on CD8 T lymphocytes and Natural Killer (NK) cell subsets obtained from TIL were analyzed by using flow cytometry.

Results

TILs of patients <50 years were more likely to express CTLA-4 on CD8T lymphocytes in compared to patients ≥ 50 years ($p= 0.004$). In addition, patients with an initially advanced clinical tumor stage pT3-T4 were more likely to have LAG 3 expression on CD56⁺ NK cells

and PD-1, CTLA-4 expression on CD8⁺ T cells in regards to pT1-T2 ($p = 0.014$, $p = 0.018$, $p = 0.042$; respectively). Contrarily, PD-1 expression on cytokine secreting CD56^{bright} NK cells were found to be decreased in patients with pN⁺ than those patients with pN⁻ ($p = 0.022$). Interestingly, increased TIGIT, LAG-3, PD-1 and CTLA-4 expressions in CD16⁺ NK cells were found in patients with extensive intra-ductal component ($p = 0.024$, $p = 0.003$, $p = 0.032$, $p = 0.013$; respectively). However, HER2⁺ patients were more likely to have increased TIM-3 expressions on cytotoxic CD8⁺ T cells compared to others ($p = 0.043$). Furthermore, TIGIT expressions in CD8⁺ T and CD56^{bright} NK cells were significantly higher in patients with higher response to NAC ($p = 0.014$, $p = 0.030$; respectively). Finally, there was a significant correlation between pathological regression scores and CTLA-4 expressions of cytotoxic NK cells in Pearson analyses ($p = 0.03$).

Conclusion

Our results suggest that patients with a younger age and advanced tumor burden are more likely to benefit from immunotherapeutical approaches using immune checkpoint inhibitors. Furthermore, combination of systemic chemotherapy with immunotherapy may increase the pathologic response rate in breast cancer patients.

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünyada ve Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, tüm kadın kanserlerinin yaklaşık %25’ini oluşturmaktadır. İstatistiklere göre gelişmiş ülkelerde 70 yaşına ulaşan her 8 kadından birinde meme kanseri görülmektedir. Hastalığın insidansı, mortalitesi ve sağkalım oranları, nüfus yapısı, yaşam tarzı, genetik ve çevre gibi birçok faktörden etkilenmekte ve dünyanın farklı bölgelerinde değişiklikler göstermektedir. Meme kanseri gelişmiş ülkelerde daha sık görülmesine rağmen, mortalite oranı yaygın tarama programları, eğitim, artan farkındalık ve etkili tedavi yöntemleri nedeniyle bu ülkelerde daha düşüktür (1). Türkiye’de kadınlar arasında saptanan kanserler içinde meme kanseri 43.8/100.000 oranı ile ilk sırada yer almakta olup, hastaların yaklaşık %20’si 40 yaşın altındadır (2). Güncel verilere göre Türkiye’de meme kanseri insidansının doğu bölgelerinde 20/100.000, batı bölgelerde ise 40-50/100.000 olduğu öngörülmektedir (3). Bu farkın batı bölgelerindeki hayat tarzının batı toplumlarına benzemesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ayrıca meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanserinden sona ikinci sırada gelmektedir (4).

Farklı klinik seyirler gösterebilen bir hastalık olan meme kanserinin prognozu ve uygulanacak tedavinin belirlenmesinde bazı faktörler önemli rol oynamaktadır. Günümüzde lenf nodu tutulumu, tümör boyutu, uzak metastaz durumu, tümörün hücresel diferansiyasyon derecesi, hastanın yaşı, tümördeki hormon reseptörlerinin durumu, HER2 ekspresyonu, tümörün proliferasyon indeksi, lenfovasküler invazyon (LVI), tümör histolojisi, neo-adjuvan kemoterapi ve hormonoterapiye yanıt durumu ve p53 mutasyonu gibi parametreler prognoz tahmin edilmesi ve tedavilerin kişiselleştirilmesinde kullanılmakta olsa da bu veriler her hastada yeterli olmamaktadır. Bu nedenle yeni prognostik faktörler ve bunlarla ilişkili farklı tedavi modaliteleri üzerinde araştırmalar yapılmaktadır.

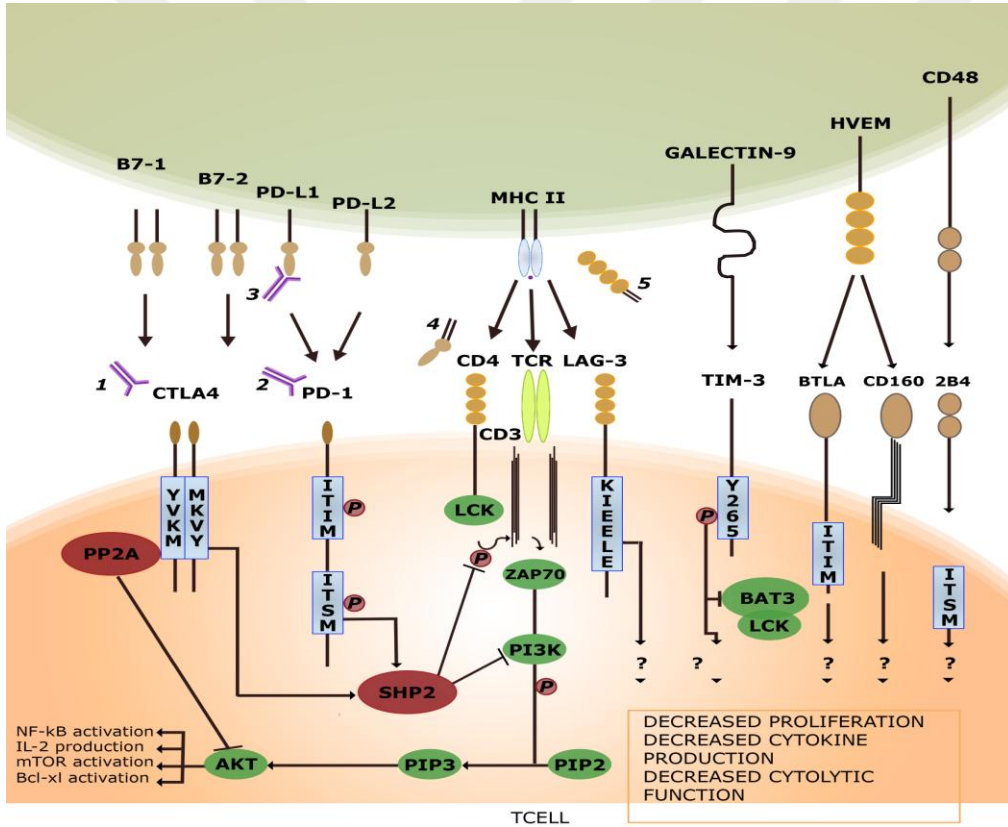
Meme kanserinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve endokrin tedavi gibi günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri, lokal ileri veya metastatik meme kanserli hastalar için yeterli olmamaktadır. Yeni tedavi seçeneklerinden biri olan immünoterapi diğer tedavi seçeneklerine göre daha özgündür ve daha düşük toksisiteye sahiptir. Bundan dolayı son yıllarda yapılan çalışmalar meme kanseri immünolojisi üzerine yoğunlaşmıştır.

Tekras Üniversitesi MD Anderson Kanser Merkezi'nden Prof. Dr. James P. Allison CTLA-4 yüzey proteini ile olarak yaptığı ve 30 yıl süren çalışmaları sonucunda CTLA-4'ün T hücrelerinin aktivitesinde inhibitör etki yarattığını ortaya koydu. Bunun sonucu olarak, CTLA-4'e spesifik olarak bağlanan ve onu bloke edebilen bir antikor geliştirerek 2010 yılında malign melanoma hastalarında T hücrelerinin CTLA-4 aracılığıyla inaktivasyonunu engelleyen hedefe yönelik tedaviyi uyguladı. Kyoto Üniversitesi'nde çalışan Prof. Dr. Tasuku Honjo 1992 yılında T hücre yüzeyinde eksprese olan başka bir protein olan PD-1'i buldu. Yaptığı hayvan deneylerinde PD-1'in inhibisyonunun T hücre aktivasyonunu ve anti-tümöral immüniteyi artırdığını gösterdi. Her iki bilim insanı 2018'de kanser immünoterapisi ile ilgili yöntemlerin geliştirilmesine yaptıkları katkılardan dolayı Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülünü aldılar.

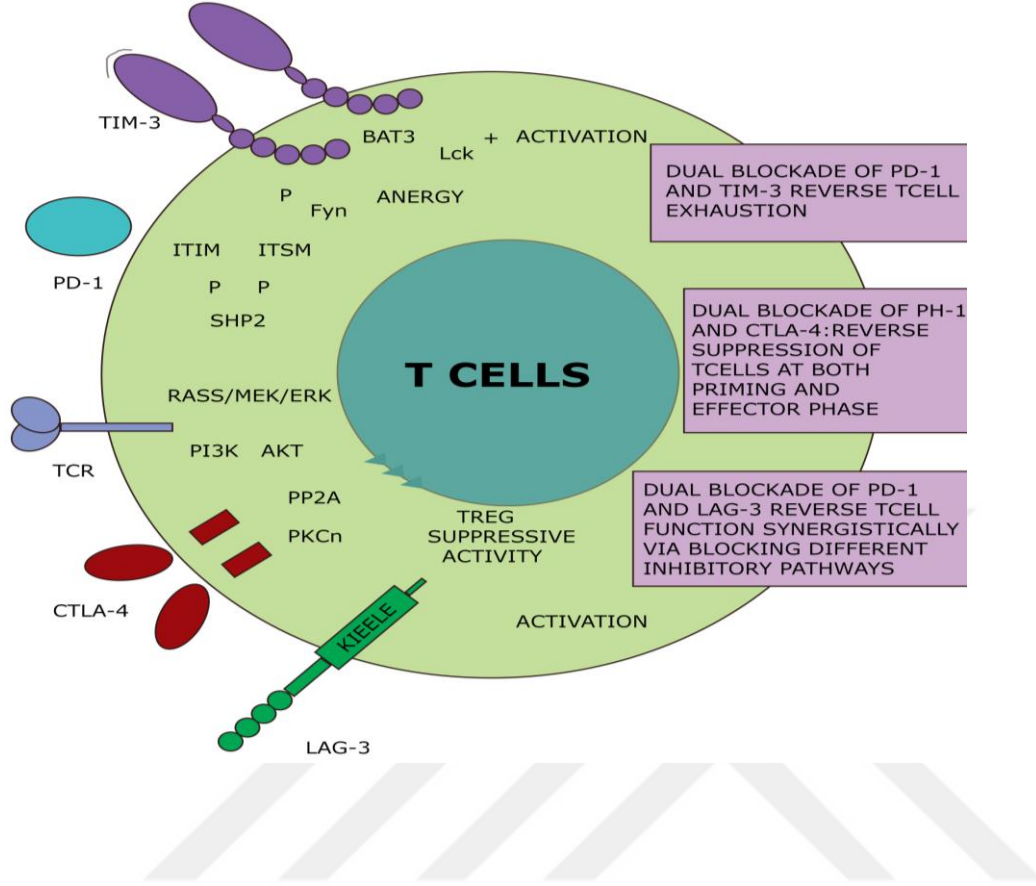
Akciğer kanseri ve malign melanomda etkinliği araştırılan immün kontrol noktalarını inhibe eden hedefe yönelik tedavinin meme kanserindeki etkinliği hala bilinmemektedir. İmmün kontrol noktalarından olan programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) / programlanmış hücre ölümü ligandı 1 (PDL-1) yolu, kanser immünoterapisinde çok önemli bir rol oynamaktadır (5,6). PDL-1 epitel hücreleri, vasküler endotel hücreleri, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, miyeloid dendritik hücreler ve B hücreleri üzerinde eksprese edilen 40 kDa'lık bir transmembran proteindir (7). Son zamanlarda, PD-1 / PDL-1 yol sinyalleri immün yanıtı süprese eden bir yolak olarak tanımlanmıştır. PDL-1'in reseptörüne (PD-1) bağlanması, T-hücresi aktivitesini düzenleyebilir ve kendi antijenlerine karşı immün tolerans geliştirebilir

(8,9). Benzer şekilde, kanser hücresi de PDL-1'i eksprese ederek immün sistemden kaçabilir. PDL-1'in çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak eksprese edildiği ve tümör büyümesini artırdığı kanıtlanmıştır (10). Bu nedenle PDL-1 blokajı antitümöral etki sağlayabilir. Meme kanserindeki bazı klinikopatolojik faktörler ile PDL-1 ekspresyonu arasında ilişki çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Bir meta-analiz, meme tümörlerinde yüksek PDL-1 ekspresyonunun, lenf nodu metastazı, düşük nükleer grad ve negatif östrojen reseptörü durumu ile ilişkili olan kötü bir prognostik faktör olduğunu ortaya koymuştur (11).

Şekil 1. Tümör immünoterapisinde immün kontrol noktalarına karşı geliştirilen inhibitörlerin rolü.



Şekil 2. Tümör immünoterapisinde immün kontrol noktalarına karşı geliştirilen inhibitörlerin rolü.



Yapılan en son araştırmalara göre diğer immün kontrol noktalarından olan TIGIT NK ve T hücrelerinde, Lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) ise lenfositlerde eksprese olmaktadır. T-hücre yüzey molekülü TIGIT, T-hücresi yanıtlarını inhibe eden bir bağışıklık kontrol noktası molekülüdür; ancak kanserdeki rolü çok fazla bilinmemektedir. CD28 ailesine ait olan TIGIT, CD226 ve CD155'e bağlanır (12). CD155'in TIGIT'e bağlanması, T-hücresi aktivasyonunu baskılar, oysa CD226'ya bağlanma T hücresi aktivasyonunu artırır (13,14). Elashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, meme kanserli hastalarda periferik kanda mononükleer hücrelerde TIGIT ekspresyonlarının sağlıklı insanlardakine kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (15).

LAG-3 Treg hücrelerinde ve anerjik T hücrelerinde yüksek oranda eksprese olan ve yakın zamanda tanımlanan bir inhibitör reseptördür (16). MHC sınıf II, bazı epitelyal

kanserlerde ekspresyonu artan LAG-3 için bilinen tek liganddır ve LAG-3 / MHC sınıf II etkileşimi T hücre yanıtlarını baskılar. LAG-3/MHC Sınıf II'nin etkileşiminin monoklonal antikorlarla engellenmesi, kanser hastalarında bir dizi klinik çalışmada değerlendirilmiş ve tümör spesifik CD8⁺ T hücre büyümesinin ve sitokin üretiminin arttığı görülmüştür.

TIM-3 Th1 hücrelerinde eksprese olan transmembran bir proteindir (17,18,19). Meme kanseri prognozu ile LAG-3 ekspresyonu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada, intra-tümoral LAG-3⁺ TIL, tümörlerin % 11'inde tespit edilmiş ve genç yaş, tümör büyüklüğü, yüksek proliferasyon hızı, HER-2 pozitiflik gibi klinikopatolojik parametrelerle anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (20). TIM3'ün özellikle interferon- γ üreten CD4⁺ Th1 hücreleri ve CD8⁺ sitotoksik T hücrelerinin yanı sıra Th17 hücreleri, DC'ler (dendritik hücreler), monositler, düzenleyici T hücreleri (Tregs), mast hücreleri, NK hücreleri ve tümör infiltre lenfositlerin üzerinde eksprese olduğu bulunmuştur (21,22). Meme kanserinde TIM-3 ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda ise, TIM-3'ün tümör hücrelerindeki yüksek ekspresyonu, cinsiyet, yaş, lenf nodu metastazı ve TNM evresi gibi klinikopatolojik özelliklerle anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (sırasıyla p=0,015; 0,001 ve 0,027) (23).

Bu çalışmadaki amacımız, kemoterapiye iyi cevap vermemiş lokal ileri meme kanserli hastalarda farklı immün kontrol mekanizmalarını regüle eden reseptörlerin (PD-1, TIGIT, TIM-3, LAG-3, CTLA-4) tümör infiltre eden lenfositlerdeki ekspresyonlarını akan hücre ölçerle (flow cytometry) değerlendirerek meme kanserinde immünitinin yerini daha ayrıntılı bir biçimde ortaya koymaktır.

GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİ

Meme kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır. Meme kanseri tarama yapılabilen ve belirti vermeden tanı konabilen bir kaç kanserden biridir. Meme kanserinin teşhis ve tedavisi multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Meme kanseri otuz yaşından önce nadir görülür ve bu yaştan sonra reproduktif yıllarda hızlı bir yükseliş gösterir. Bu yükseliş menopozda yavaş eğim ile artmaya devam etmektedir (24). Karmaşık heterojen bir karaktere sahip olan meme kanserinin 30'dan fazla histopatolojik alt tipi vardır. Meme kanserinin sınıflandırılması geleneksel olarak histopatolojik görünümüne göre yapılmakla birlikte, teknolojinin ilerleyişi ile moleküler özelliklerine göre kategorize edilmiştir. “Moleküler Sınıflama” terminolojisi, ilk kez 2000 yılında Perou ve Sorlie tarafından yürütülen gen ekspresyon farklılıklarını gösteren kapsamlı bir çalışma ile önerilmiştir (25). Bu çalışmada östrojen reseptörü (ER) ekspresyon durumuna göre meme kanserlerinin alt tiplerini tanımlamışlardır. Günümüzde de halen yürürlükte olan bu sınıflamaya göre: ER⁺ tümörler meme bezlerinin lümene bakan (luminal) hücrelerine benzer gen ekspresyonu ve diğer luminal hücrelerle ilişkili reseptörlere sahiptirler. HER-2 pozitif (ERBB2/HER-2 amplifikasyonu) olarak da bilinen diğer bir grupta ise ER negatif tümörlerin bir kısmı immünohistokimyasal olarak (İHK) HER-2 reseptörüne sahiptirler ya da HER-2 gen amplifikasyonu oluşturabilirler. Bundan başka HER-2 negatif olanlar ve memenin normal bazal/myoepitelial hücreleri tarafından eksprese edilen gen ekspresyonu gösteren grup ise non-luminal tümörler olarak adlandırılmıştır. Bu tümörlerde çoğunlukla ER ve PR negatif bulunduğundan dolayı bu grup basal-like ya da üçlü negatif meme kanseri olarak tanımlanmıştır (26-29).

Çok sayıda araştırmaya göre meme kanseri hücrelerinin yaklaşık %75’inde ER veya PR pozitif olup, bu yüzden büyük kısmının luminal grupta olduğu görülmektedir (30). Meme kanserinin moleküler sınıflamasında, ER, PR ve HER-2 den başka bir proliferasyon belirteci olarak Ki-67 kullanılmaktadır. Günümüzde Ki-67 değeri ile ilgili net bir konsensus oluşturulmamıştır. Farklı davranış biçimlerinden dolayı luminal gruptaki tümörler kendi içlerinde luminal A ve B olarak iki gruba bölünmektedir. Luminal tümörlerin sınıflandırılması genellikle Ki-67 skoruna, histolojik grad (HG) derecesine, progesteron reseptörü pozitiflik düzeyine ($<$ veya $\geq$ %20) ve HER-2 ekspresyonuna göre yapılmaktadır. Ki-67 skoru değerini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal kombine gen ekspresyon profillemesi çalışmasında sınır değeri %13,25 olarak saptanmıştır (31). Meme tümörleri içinde luminal A grubu yüksek bir prevalansa sahiptir. Bu grup mitoz oranı, proliferatif aktivitesi ve histolojik derecesi düşük, HER-2 negatif tümörleri içerir, prognozları iyi olup, genelde metastazları kemiklerle sınırlı kalmaktadır. Luminal B tümörler daha yüksek bir proliferasyon hızına sahip oldukları için daha kötü seyrederler.

Tablo 1. Meme kanserinin moleküler alt tipleri (St. Gallen Meme Kanseri Konsensus Toplantısı 2011)

Moleküller alt tipleri	ER	PR	HER-2	Ki-67
Lüminal A	+	+	-	<20
Lüminal B(HER-2 negatif)	+	+	-	≥ 20
Lüminal B(HER-2 pozitif)	+	+	+	+/-
HER-2 pozitif(Non-luminal)	-	-	+	+/-
Üçlü negatif	-	-	-	+/-

MEME KANSERİNİN EVRELENDİRİLMESİ

Evrelendirme, meme kanserli hastalarda sadece hastaya hangi tedavinin uygulanacağı ve prognozun nasıl olacağı hakkında bilgi vermekle kalmaz, eşzamanlı olarak farklı tedavi çeşitlerini karşılaştırmaya da olanak sağlar. Fizik muayene, çeşitli laboratuvar testleri ve görüntüleme yöntemlerine göre ayrılmış klinik evreleme sistemi prognoz hakkında her zaman en doğru bilgiyi sağlamaz. Bununla birlikte, cerrahiyle eksize edilen materyali inceleyerek yapılan patolojik evreleme prognozun belirlenmesinde daha önemlidir. T primer tümörün çapını, N bölgesel lenf nodu metastazını, M uzak metastazı gösterir. AJCC (American Joint Cancer Committee) tarafından 1959 yılında tanımlanan meme kanseri için TNM evrelendirme sistemi, yeni tanı konmuş meme kanserli hastalarda prognozunu değerlendirmek için standart bir sınıflama olarak tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. 2017 yılında, TNM sistemi 8.kez revize edilerek yayımlandı. Geleneksel anatomik prognostik evre tablolarına ek olarak, tümörün moleküler özellikleri ve genetik profilini içeren klinik ve patolojik evre tabloları dahil edildi.

Tablo 2. Primer Tümörün Sınıflaması (T) - Klinik ve Patolojik

T	Primer tümör
Tx	Primer tümör boyutu değerlendirilemiyor
T ₀	Primer tümör ile ilgili kanıt yok
Tis	Karsinoma in situ
Tis (DCIS)	Duktal karsinom in situ
Tis (Paget)	Tümör kitlesi olmayan meme başının Paget hastalığı
T1	Tümörün en geniş çapı 20 mm veya altında
T1mic	En geniş çapı 1 mm veya daha az olan mikroinvazyona sahip tümör
T1a	En geniş çapı ≤ 1 mm ama < 5 mm olmayan tümör
T1b	En geniş çapı > 5 mm ama ≤ 10 mm olmayan tümör
T1c	En geniş çapı > 10 mm ama ≤ 20 mm olmayan tümör
T2	En geniş çapı > 20 mm ama ≤ 50 mm olmayan tumor
T3	En geniş çapı > 50 mm tümör
T4	Boyutu ne olursa olsun: a) Toraks duvarı invazyonu: kotlar, interkostal kaslar, serratus kası. b) Cilt tutulumu.
T4a	Pektoralis major kası dahil toraks duvarı invazyonu
T4b	Meme cildinde ödem, portağal kabuğu görünümü, ülserasyon, satellit deri nodülleri
T4c	T4a ve T4b
T4d	İnflamatuvar meme kanseri

Not: Lobüler karsinoma in situ (LCIS) selim bir hastalık kabul edilerek AJCC Cancer Staging Manual,

8. Baskı'da TNM evrelemesinden çıkarılmıştır.

Tablo 3. Bölgesel Lenf Nodlarının Sınıflaması (N)- Klinik

cNx	Bölgesel LN'ları değerlendirilemiyor (örneğin daha önce alınmış)
cN0	Bölgesel LN metastazı yok
cN1	Aynı tarafta mobil aksiller level I-II lenf nodlarına metastaz
N2	Birbirlerine veya çevre yapılara sabitlenmiş aynı taraftaki aksiller LN veya aynı taraf internal mammaryan LN metastazı varlığı
cN2a	Birbirlerine veya çevre yapılara sabitlenmiş aynı tarafta level I-II lenf nodları metastazı
cN2b	Aksilla metastazı olmadan ipsilateral internal mammaryan lenf nodlarında görüntüleme yöntemleriyle tespit edilmiş metastaz (lenfosintigrafi hariç)
cN3	Aynı taraftaki infraklaviküler LN'ları metastaz veya hem aynı taraftaki internal mammaryal LN'larına hem de aksiller LN'larına metastaz ya da aynı taraftaki supraklaviküler LN'larına metastaz varlığı
cN3a	Aynı taraflı infraklaviküler LN'larına metastaz varlığı
cN3b	Hem aynı taraftaki internal mammaryal LN'larına hem de aksiller LN'larına metastaz varlığı
cN3c	Aynı taraftaki supraklaviküler LN'larına metastaz varlığı

Tablo 4. Uzak Metastazın Sınıflaması (M)

Mx	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
cM0	Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz kanıtı yok
cM0 (i+)	Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz kanıtı yok ancak kemik iliğinde, kanda veya diğer bölgesel olmayan lenf nodlarında, hastada metastaz belirtileri veya bulguları olmadan 0.2 mm'den büyük olmayan moleküler veya mikroskopik olarak tespit edilen tümör hücrelerinin olması
cM1	Klinik ve radyografik olarak saptanan ve /veya histolojik olarak 0.2 mm'den büyük olduğu kanıtlanan uzak metastaz saptanması
pM1	Uzak organlarda histolojik olarak kanıtlanmış herhangi bir metastaz veya bölgesel olmayan lenf nodlarında 0.2 mm'den büyük metastazlar

Tablo 5. Bölgesel Lenf Nodlarının Sınıflaması (pN)- Patolojik

pNx	Bölgesel LN'ları değerlendirilemiyor (örneğin daha önce alınmış yada patolojik değerlendirme için doku alınmamış)
pN0	Histolojik olarak değerlendirilen bölgesel LN'u metastazı yok
pN0 (i-)	Bölgesel LN'u metastazı yok, immünohistokimyasal (=İHK) (-)
pN0 (i+)	Bölgesel LN'larında malign hücreler 0.2 mm'den büyük olmamalıdır (H&E veya İHK yöntemiyle saptanmıştır).
pN0 (mol-)	Bölgesel LN'u metastazı yok, negatif moleküler bulgular: RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)(-)
pN0	(mol+) Pozitif moleküler bulgular: RT-PCR (+)
pN1	
pN1mic	Mikrometastaz (yaklaşık 200 hücre, 0,2 mm'den büyük fakat 2,0 mm' den küçük)
pN1a	1-3 aksiller LN'u metastazı, 2 mm'den büyük en az bir metastaz
pN1b	Sentinel LN'u biyopsisi ile tespit edilen ancak klinik veya görüntüleme bulgusu olmayan mikrometastaz veya makrometastazlı internal mammarian LN'larına metastaz
pN1c	Sentinel LN'u biyopsisi ile saptanan 1-3 aksiller LN'u metastazı ve internal mammarian LN'ında mikro veya makrometastaz (klinik / radyolojik olarak bulgu yok).
pN2	
pN2a	4-9 aksiller LN'u metastazı (en az bir tümör birikimi >2.0 mm)
pN2b	Aksiller LN'u metastazı yokluğunda klinik/radyolojik olarak tespit edilen internal meme LN'u metastazı (lenfosintigrafi hariç)
pN3	
pN3a	10 veya daha fazla aksiller LN'u metastazı (en az bir tümör boyutu > 2.0 mm) veya infraklaviküler LN'larına metastaz (level 3)
pN3b	Aynı taraftaki internal mammarian LN'larına + en az bir aksiller LN'una klinik / radyolojik olarak tespit edilen (lenfosintigrafi hariç) metastaz veya Sentinel LN'u biyopsisi ile saptanan 3'ten fazla aksiller LN'u metastazı ve internal mammarian LN'larına mikro veya makrometastaz (klinik / radyolojik olarak bulgu yok)
pN3c	Aynı taraftaki supraklaviküler LN'larına metastaz

Tablo 6. Meme Kanserinin Anatomik Evrelemesi

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T0-T1	N1mic	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 bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Klinik ve Patolojik TNM-Prognostik Evrelendirme

Klinik ve patolojik TNM-prognostik evrelendirme, klinik sınıflandırma ve evrelendirme için meme kanseri olan tüm hastalara uygulanır. Fizik muayene, yapılan herhangi bir görüntüleme (klinik evreleme için gerekli değildir) ve ilgili biyopsilere göre klinik tümör (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) bilgilerini kullanır. Genomik profil bilgileri klinik prognostik evreye dahil edilmemiştir, çünkü bu tetkikleri kullanarak prognozu belirlemek için ameliyattan patolojik bilgi alınması gerekir.

Bu sınıflamada ek olarak ER, PR, HER-2, Grade, Oncotype DX testi gibi hastanın nüks riskini belirleyen genomik testler göz önüne alınmıştır. Ancak bu sınıflamaya henüz hastaların patolojik incelemelerindeki tümörü infiltre eden lenfositlerin varlığı bir prognostik veya prediktif faktör olarak eklenmemiştir.

Tablo 7. Klinik Prognostik Evre Tabloları

TNM	Histolojik Grad (HG)	HER-2	ER	PR	Klinik Evre		
Tis N0M0	Herhangi bir	Herhangi bir	Herhangi bir	Herhangi bir	0		
T1N0M0 T0NmikM0 T1NmikM0	HG1	Pozitif	Pozitif	Positif	IA		
				Negatif	IA		
			Negatif	Positif	IA		
				Negatif	IA		
		Negatif	Pozitif	Positif	IA		
				Negatif	IA		
			Negatif	Positif	IA		
				Negatif	IB		
			G2	Pozitif	Positif	Positif	IA
					Negatif	IA	
	Negatif	Positif		IA			
		Negatif		IA			
	Negatif	Pozitif		Positif	IA		
				Negatif	IA		
		Negatif		Positif	IA		
				Negatif	IB		
	G3	Pozitif	Pozitif	Positif	IA		
				Negatif	IA		
			Negatif	Positif	IA		
				Negatif	IA		
		Negatif	Pozitif	Positif	IA		
				Negatif	IB		
			Negatif	Positif	IB		
				Negatif	IB		

TNM	Histolojik Grad (HG)	HER-2	ER	PR	Klinik Evre
T0N1M0 T1N1M0 T2N0M0	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
			Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IB
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIA
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IA
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIB

TNM	Histolojik Grad (HG)	HER-2	ER	PR	Klinik Evre
T2N1M0 T3N0M0	G1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIB
	G2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIA
			Negatif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIA
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIIB
	G3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	IB
				Negatif	IIB
			Negatif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIB
		Negatif	Pozitif	Pozitif	IIB
				Negatif	IIIA
			Negatif	Pozitif	IIIA
				Negatif	IIIB

TNM	Histolojik Grad (HG)	HER-2	ER	PR	Klinik Evre
T0N2M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N1M0 T3N2M0	G1	Positif	Positif	Positif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIA
		Negatif	Positif	Positif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIB
	G2	Positif	Positif	Positif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIA
		Negatif	Positif	Positif	IIA
				Negatif	IIIA
			Negatif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIB
	G3	Positif	Positif	Positif	IIB
				Negatif	IIIA
			Negatif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIA
		Negatif	Positif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIB
			Negatif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIC

TNM	Histolojik Grad (HG)	HER-2	ER	PR	Klinik Evre
Herhangi bir T N3M0	G1	Positif	Positif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIB
			Negatif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIB
		Negatif	Positif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIB
			Negatif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIC
	G2	Positif	Positif	Positif	IIIA
				Negatif	IIIB
			Negatif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIB
		Negatif	Positif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIB
			Negatif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIC
	G3	Positif	Positif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIB
			Negatif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIB
		Negatif	Positif	Positif	IIIB
				Negatif	IIIC
			Negatif	Positif	IIIC
				Negatif	IIIC

TNM	Histolojik Grad (HG)	HER-2	ER	PR	Klinik Evre
Herhangi bir T Herhangi bir N M1	Herhangi bir	Herhangi bir	Herhangi bir	Herhangi bir	IV

Lokal İleri Meme Kanseri

Meme kanseri farklı prognostik özellikleri sebebiyle; erken, lokal ileri ve metastatik olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Lokal İleri Meme Kanseri terimi genel olarak evre IIB ve evre III meme kanserlerini belirtir ve gelişmiş ülkelerde yeni tanı almış meme kanserlerinin %5-15'ini oluşturmaktadır (32,33). Düşük-orta gelirli ülkelerde bu oran %50'nin üzerindedir (32). Eğitim düzeyinin düşüklüğü, farkındalığın olmaması, etkin tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşamama ve tarama programlarının olmaması oranların bu kadar yüksek olmasının ana nedenleridir (32). Tanının ileri evrede konulması ve etkin tedavinin yapılamaması nedeniyle meme kanserine bağlı ölüm oranı da bu ülkelerde daha yüksektir.

Erken evre	Evre 0	Tis	N0	M0
	Evre I	T1	N0	M0
	Evre IIA	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
Lokal ileri evre	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
Metastatik	Evre IIIB	T4	N(herhangi)	M0
	Evre IIIC	T(herhangi)	N3	M0
	Evre IV	T(herhangi)	N(herhangi)	M1

Singletary SE et al. "Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer". J Clin Oncol 2002; 20:3628-36

Lokal İleri Meme Kanserin klinik evre olarak tanımlamak için; tümör çapının >5 cm olması (T3) ve aynı tarafta aksillada mobil lenf nodlarını palpe edilmesi, tümörün çapından

ilişkisiz olarak göğüs duvarına invazyon veya cilt tutulumu (T4a ve T4b), ipsilateral aksillada birbirlerine veya çevre dokulara yapışık konglomere aksiller lenf nodlarının bulunması (N2a), ipsilateral internal mamariyan lenf bezlerinde aksiller tutulum yapmadan metastaz (N2b), ipsilateral aksilla ve internal mamariyan lenf nodlarına yayılım (N3b) , ipsilateral infra veya supraklaviküler lenf nodlarına yayılım (N3a ve N3c), inflamatuvar meme kanseri (İMK) varlığı (meme cildinin 1/3'nden fazlasına yayılan eritem, ödem, portakal kabuğu görünümü (T4d)) veya bunlardan herhangi birinin varlığı yeterli olmaktadır (32-34). Son zamanlarda memeye oranla tümör çapı büyük olan ve mastektomi yapılması gereken evre II meme kanseri ve evre IIB meme kanseri de LİMK grubu içine dahil edilmektedir. Operabl LİMK Evre IIB ve evre T3N1M0-IIIA hastalardan, inoperabl LİMK ise evre T0-3N2M0-IIIA ve evre IIIB ve evre IIIC hastalardan oluşmaktadır (32,33).

Tümör İmmunolojisi

Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve endokrin tedavisi gibi geleneksel tedaviler, lokal ileri veya metastatik meme kanserli hastalar için etkili stratejiler olsa da, tedavi sürecinde direnç gelişen hastalarda yeni tedavi modalitelerine ihtiyaç bulunmaktadır. İmmünoterapinin bu süreçte direnci daha yüksek özgüllük ve daha düşük toksisite ile antitümöral etki göstermesi beklenmektedir. Bununla birlikte immünoterapilerin klinik etkinliği klinik uygulamalar için henüz tatmin edici değildir. Tümörler ve bağışıklık sistemi arasındaki dinamik etkileşimin açıklığa kavuşturulması, yeni bir kanser immünoterapisinin geliştirilmesinde kilit bir konudur. İmmün sistem tarafından tanınan tümör hücrelerinin büyük kısmı yok edilirken, immün sistemden kaçan tümör hücreleri canlı kalmakta ve mikroçevreye uyum sağlayarak immün sistem hücrelerine karşı dirençli hale gelirler.

Tümörü infiltre edenlen fositler (TIL'ler), tümörün mikroçevresindeki bağışıklık hücreleridir. TIL'lerin yüksek düzeyde infiltrasyonu, üçlü negatif ve HER-2 pozitif meme kanserinde iyi prognoz ve kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkilidir (35). TIL'ler tümör

mikroçevresinde önceden var olan anti-tümöral bağışıklığı temsil eder. Tümörler, immünolojik açıdan yeterli bireylerde bile, immün sistemden kaçmayı başardıklarında progrese olmakta ve immün sistemin fonksiyonlarını tümör kaynaklı faktörler aracılığıyla inhibe etmektedirler (36). Tümöre karşı gelişen bağışıklık yanıtının yetersiz kalmasının nedenlerini 3 başlık altında inceleyebiliriz.

1.İmmün Gözetim (İmmunosurveillance)

Edinsel immün sisteminin temel fonksiyonları arasında transforme olmuş hücrelerin büyümesini engellemek veya bunları yok etmek vardır. Bu süreç “kanserin immün gözetimi (cancer immunosurveillance)” olarak adlandırılır. 1909 yılında Paul Ehrlich “bağışıklık sisteminin potansiyel olarak büyük oranda bir tümör yükünü baskılayabileceğini” öngörmüş ve bunun tümör immünoşürveyans hipotezinde anahtar rol oynadığını göstermiştir. Yirminci yüzyılın ortalarında yapılan çalışmalar bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini yok ettiğini göstermiştir (37). Thomas Lewis 1959 yılında hücrel immünitinin asıl görevinin allograft reddi değil, konağı tümörden koruyarak organizmanın homeostazını sağlamak olduğunu ifade etmiştir. Aynı dönemde Burnett isimli araştırmacı immüngözetimin temel mekanizmalarını belirtmiş ve tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanındığı fikrini öne sürmüştür (37). Ancak 1990’lı yıllarda yapılan deneylerde bağışıklık sisteminin tümörlere karşı zayıf ve yetersiz kalabildiği görülmüştür (38). İmmün gözetimle ilgili güncel teoriler ise; konağın immün sistemin kanser hücrelerini saptama ve yok etme becerisine sahip olduğu üzerinde durur. Bundan başka, kanser hücrelerinin immün sistem için pasif hedefler olmadığı; kaçma ve konağın bağışıklık sistemini etkisiz bırakabilme becerisine de sahip olduğu düşünülmektedir. Tümörün immün gözetimine rağmen, işlevsel immün sistemin varlığında bile tümörler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, immün sistemin tümör gelişimindeki rolünün daha iyi açıklayan tümör immün düzenlenmesi teorisi önerilmiştir (39). Bu teoriye göre, tümör hücresi ile immün sistem hücreleri ya da bunların ürünlerinin birbirleri ile

etkileşimleri sonucunda sadece tümör hücrelerinin değil, immün sistem hücrelerinin de yok olduğu düşünülmektedir.

2. İmmün Düzenleme (Cancer Immunoediting)

Son yıllarda hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, bağışıklık sisteminin tümöre karşı konağı koruyucu etkisinin yanısıra kanser oluşumunu kolaylaştırıcı fonksiyonlarının da olduğu bildirilmiştir. Bunun sonucu olarak da “immunosurveillance” tanımıyla kastedilen fonksiyonların bağışıklık sistemin tümörle alakalı fonksiyonlarını tam olarak tanımlamadığı ve eksik kaldığı düşünülmektedir. Onun yerine “kanser immündüzenlenmesi (cancer immunoediting)” terimi kullanılması önerilmiştir. Kanser immündüzenlenmesi terimi; bağışıklık sisteminin hem tümör oluşumunu önleyici hem de neoplastik hastalığı biçimlendiren ikili fonksiyonlarını kapsamaktadır. Bağışıklık sistemi, bazı tümörlerin oluşumunu tamamen önlerken, bazı tümörlerde savunmasız kalmakta, immünolojik anergi veya tolerans oluşumuna neden olmaktadır (40).

Tümörün immün düzenlenmesi, kontrolü ve fonksiyonu, kanserin üç E'si olarak adlandırılan 3 aşamadan oluşan bir süreçtir ve bunlar; eliminasyon (elimination), denge (equilibrium) ve kaçış (escape) olarak tanımlanır.

- **Eliminasyon(elimination)**

Genel olarak immün gözetim kavramını temsil eder tümörler bu aşamada başarılı bir şekilde yok edilirse, daha fazla fazla ilerlemeden immün sistem regüle edilir.

- **Denge(equilibrium)**

Denge fazı, üç fazın en uzunudur, eliminasyon aşamasında tümörlerin immün sistem hücreleri tarafından tam olarak ortadan kaldırılamaması yani latent periyodu anlamına gelir (41).

- **Kaçış(escape)**

Kaçış fazı ise denge fazının immünolojik sınırlamalarına rağmen immünolojik bariyerleri geçebilen tümörlerin büyüüp çoğaldığı evredir (39). Kanseri immün düzenlenmesi sürekli bir işlemdir ve antijenik olarak farklı neoplastik hücreler ortaya çıktığı her seferde tekrarlanmaktadır. Dolayısıyla, bağışıklık sisteminin zayıfladığı yaşlı bireylerde kanser daha yaygın görülmektedir.

İmmün Kontrol Noktaları

İmmün kontrol noktaları, immün sistemin düzenleyicileridir. Bu yollar bağışıklık sisteminin rastgele hücrelere saldırmasını önleyen kendi kendine tolerans için çok önemlidir. Bundan dolayı immün cevap sıkı bir şekilde düzenlenir ve kendi proteinlerine otoimmün reaksiyonları önlemek için birçok mekanizma uygulanır. Bu mekanizmalar, immün kontrol noktaları molekülleri tarafından gerçekleştirilir. Sonuç olarak immün kontrol noktaları sitotoksik hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu düzenlemekle birlikte otoimmün hastalıkların da gelişmesine engel olmaktadır. İmmün kontrol noktası molekülleri PDL-1, PD-1, CTLA-4'ün yanısıra yeni nesil LAG-3, TIM-3, ve TIGIT'i içermektedir.

PD-1 (Programlı Hücre Ölümü-1)

PD-1(CD279) reseptörü, timik gelişim sırasında CD4 ve CD8 timositlerinde T hücrelerinin hücre yüzeyinde ve T hücresi reseptörü (TCR) sinyalizasyonu ve sitokin stimülasyonunu takiben çeşitli hematopoetik hücrelerde, periferik CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde, B hücrelerinde, monositlerde, doğal öldürücü (NK) T hücrelerinde ve bazı dendritik hücrelerde eksprese edilir (42,43). PD-1 inhibitör yolağı tümöre karşı T hücre yanıtının gelişmesini baskılar ve tümör mikroçevresinde T hücre fonksiyonlarını doğrudan inhibe eder (60). PD-1'in, PDL-1 (B7-H1, CD274) ve PDL-2 (B7-DC,

CD273) adlı iki farklı ligandı mevcuttur ve PDL-1 regulasyonunda en dominant olanıdır. PD-1'in ligandına bağlanması, TCR/CD3 sinyalizasyonu ve CD28 defosforilizasyonunu baskılayarak T hücre aktivasyonunu engeller (44,45). PDL-1, hücreye özgü stimülasyonun ardından hem hematopoetik hücrelerde hem de non-hematopoetik hücrelerde indüklenebilir şekilde eksprese edilir. IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinler, PDL-1'in T, B endotel ve epitel hücrelerinde ekspresyonunu yükseltir ve periferik toleransın korunmasındaki rolünü artırır (46). Son veriler, PDL-1'in PD-1 haricinde B7-1'e (CD80) de bağlandığını gösterir (47). PDL-1 ekspresyonu hem hematopoetik hem de nonhematopoetik hücrelerin geniş bir dizisinde eksprese olurken, PDL-2 ekspresyonu, IL-4'e ve IFN- γ 'ya yanıt olarak DC'lerde, makrofajlarda, mast hücrelerinde ve bazı B hücrelerinde eksprese edilir. PDL-2'nin PD-1 için afinitesi, PDL-1'inkinden üç kat daha büyüktür. Sonuç olarak PD-1 T hücre aracılı yanıtı azaltır ve NK hücreleri üzerinde inhibitör etki yapar, B hücrelerinin antikör üretimini azaltır (48).

TIGIT (Ig ve ITIM alanlarına sahip T hücresi immünoresptörü)

TIGIT, poliovirüs reseptörü (PVR) / nektin ailesine ait T hücresi fonksiyonlarını negatif olarak düzenlediği bilinen bir başka immün kontrol noktası reseptörüdür. TIGIT (WUCAM, Vstm3, VSIG9 olarak da bilinir), bir hücre dışı immünooglobulin, değişken set (IgV) alan, bir tip 1 transmembran alan, bir immünoresptör tirozin tabanlı inhibitör motifi (ITIM) ve bir immünooglobulin tirozin kuyruğu (ITT) motifine sahip bir hücre içi bölgeden oluşur (49). İlk defa Yu ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (50,51). TIGIT, özellikle NK hücreleri olmakla birlikte, lenfositler, CD4⁺, CD8⁺ ve regulator T hücrelerinde (Treg) eksprese olurlar (52). CTLA-4 / CD28'in ligandları ile antagonistik ilişkisine benzer şekilde, TIGIT bir uyarıcı reseptör CD226 (DNAM-1 olarak da bilinir) ile rekabet etmektedir.

DNAM-1 ve TIGIT CD155 ve CD112'i ligandından birine bağlanabilir, ancak TIGIT daha yüksek bir afiniteye sahiptir (53). TIGIT'in ayrıca CD112'e oranla CD155'e daha fazla bağlandığı gösterilmiştir (52). Güçsüz T hücrelerinde TIGIT ekspresyonu genellikle düşüktür, bununla birlikte aktivasyon sonrasında ve özellikle tümör mikroçevresinde tükenmişlik fenotipine sahip T hücrelerinde artış görülmektedir (54). TIGIT'in CD155'e bağlandığında T hücre proliferasyonunu ve aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir. TIGIT/CD155 birleşmesi, T hücre cevabını direkt olarak T hücresi reseptörünü (TCR) sinyal iletimini inhibe edebilmektedir (55). Diğer immün kontrol noktası ligandlarına benzer şekilde, TIGIT ligandları kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir. Ayrıca, sitotoksik T hücrelerinde yüksek TIGIT ekspresyonu, mide kanseri ve refrakter hematolojik kanser ve bunların nüksü gibi çeşitli malignitelerde yüksek bulunmuştur (56,57). Bu nedenle, TIGIT immünoterapötik müdahale için çekici bir hedef ajandır.

LAG-3 (Lenfosit Aktivasyon Geni-3)

LAG-3 reseptörü, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde, doğal öldürücü(NK) hücrelerde eksprese edilmektedir (58). LAG-3, temel olarak antijen sunan hücrelerin ve tümör hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen ana doku uyumluluk kompleksi sınıf II (MHC-II) molekülleri ile etkileşime girer (59). LAG-3 Treg'lere bağlandığında olgunlaşmalarını bloke ederek APC (DC) fonksiyonlarını da inhibe edebilir (60). CD8⁺ T ve NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu fonksiyonsuz bir profili sembolize eder çünkü bu yolu bloke etmek NK sitotoksitesini değiştirmez bundan dolayı NK hücreleri üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılması gereklidir (61,62). PD-1 ve LAG-3'ün üçlü negatif meme kanseri hastalarının yaklaşık % 15'inde eşzamanlı olarak eksprese edildiği ve başka bir çalışmada TIL varlığı ile pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (63). Alternatif olarak, yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre, yüksek LAG-3 ekspresyonu ile karakterize edilen ve özellikle PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olan ve neo-adjuvan kemoterapi sonrası rezidüel hastalığı olan

hastalar kötü prognozlu (63). Genel olarak bu çalışmalar, meme kanserlerindeki LAG-3 ekspresyonunun, geniş bir immün infiltrasyon ve diğer immün kontrol noktası molekülleriyle (özellikle PD-1 / PDL-1) ilişkili olduğunu göstermiştir.

TIM-3(T-Hücre İmmünglobülin ve Mucin domain-3)

TIM-3, TIM-1, TIM-3 ve TIM-4'ü içeren proteinleri kodlayan TIM gen ailesinin bir üyesidir (64). TIM-3, Tip 1 T yardımcı (Th1) hücreler, Th17 ve CD8⁺ T hücreler, TIL, Treg ve NK hücreleri gibi birçok immün hücrede eksprese edilir. TIM-3 ekspresyonu kronik enfeksiyonlar sırasında CD8⁺ T hücrelerinde, kanser varlığında ise TIL'lerde artmaktadır (65). CD4⁺ T hücrelerinde TIM-3 aşırı ekspresyonu ilerlemiş hastalık belirtici olabilmekte, benzer şekilde, kanser hücrelerinde görülen artmış ekspresyonun agresif bir klinik seyir ve zayıf sağkalım ile ilişkilendirilmektedir (66). TIM-3 ligandı olan galektin-9'a bağlandığında, TIM-3 eksprese eden T hücrelerinde hücre ölümünü tetikleyerek hücre aracılı immün yanıtı inhibe etmektedir (67). Buna ek olarak, TIM-3'ün bloke edilmesi, tümör antijenine spesifik T hücrelerinin çoğalmasını ve pro-enflamatuvar sitokin üretimini artırabilir (67-69). Tümör gelişiminin erken evrelerinde, çoğu TIL'ler PD-1 ve TIM-3'ü eksprese etmemesine rağmen daha ileri aşamalarda her iki protein de sıklıkla eksprese edilebilmektedir (70). Yapılan çalışmalar PD-1 veya TIM-3'ün bloke edilmesinin bu hücrelerde bağışıklık fonksiyonunun geri kazanılmasına imkan vererek, her iki hedefe yönelik tedavinin tümör büyümesini en iyi şekilde kontrol ettiğini göstermektedir (66).

CTLA-4 (Sitotoksik T Lenfosit Antijeni-4)

CD28 ailesinin üyesi olan CTLA-4 ekspresyonu ve fonksiyonu, T hücresi aktivasyonu ile bağlantılıdır. Tipik bir kanser immün döngüsünde, onkogeneze süreci sırasındaki kanser antijenleri, dendritik hücre gibi antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki MHC reseptörleri vasıtasıyla sunulur. Antijen sunumunda MHC reseptörleri T hücrelerinin yüzeyindeki T

hücresi reseptörü ile etkileşime girerek T hücresi aktivasyonunda birincil sinyalini başlatır (71,72). T hücrelerinin aktivasyonu ayrıca T hücreleri üzerinde eksprese edilen bir ana T hücresi ortak uyarıcısı (ko-stimulator) olan CD28 ve antijen sunan hücrelerde eksprese edilen CD80 (B7.1) veya CD 86 (B7.2) etkileşimi ile kolaylaştırılan ikincil (ko-stimulator) bir sinyal gerektirir (73). CTLA-4 yüksek bir duyarlılığa sahip olduğu B7 ligandları B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) için CD28 molekülü ile rekabet ederek TCR sinyalini azaltır (74). Çünkü hem B7-1 hem de B7-2, CD28 yoluyla pozitif ko-stimulatör sinyaller sağladığından, T lenfosit aktivasyonunu etkin bir şekilde azaltmak için her iki molekülün CTLA-4 ile rekabetçi inhibisyonu gereklidir. Sonuç olarak CTLA-4 ile etkileşim T hücre aktivitesini inhibe etmektedir.

Kanser İmmünoterapisi

Kanser immünoterapisi, kanserle savaşmak için immün sisteminin potansiyelini kullanmayı hedefleyen tedavi modalitesidir. Tümör ve immün sistemin biyolojisi üzerine son gelişmeler, immün sistemin güçlü bir antitümöral cevabı göstermesini modüle eden kontrol noktalarını belirlemiştir. Günümüzde kanserin tedavisinde tümörsüz normal dokularda da hasarlara yol açan kemoterapi ve radyoterapiye başvurulmaktadır. İmmün yanıtın son derece özgül olması nedeniyle, tümöre özgül bağışıklık, hastaya zarar vermeden seçici olarak tümörü hücrelerini yok eder. Sonuç olarak, bu immün kontrol noktaları, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi mevcut yaklaşımlara ek olarak kanserle savaşmak için çekici alternatif hedefler olarak kabul edilir. Kontrol noktası blokaj tedavileri, potansiyel olarak doğrudan tümör hücrelerine saldırmadıkları, aksine, bağışıklık sistemi inhibisyonunu hafifleterek tümöre spesifik immün yanıtı oluşturduğu için diğer tedavi yaklaşımlarından farklıdırlar. Böyle bir yaklaşım, aktive edilmiş T hücrelerinde eksprese edilen immün modulatorler olan CTLA-4, PDL-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT'i hedeflemektir.

Meme Kanserinde İmmünoterapi

İmmünoterapi güncel meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Meme kanserinde önemli bir prognostik parametre olarak kullanılan HER-2 reseptörüne karşı geliştirilen monoklonal antikorlar, bu reseptörü taşıyan tüm hastalara verilmektedir. Yapılan çalışmalar bu tedavi seçeneğinin hastaların prognozuna ve sürvisine pozitif katkısı olduğunu göstermektedir. Güncel literatürde meme kanseri için yeni prognostik parametreler arayışı devam etmektedir. Bu noktada en fazla ümit veren alanlardan biri de immün kontrol noktası reseptörleridir. Çalışmamızda da analizini yaptığımız PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT bunlardan başlıcalarıdır. Literatürde bu hedeflere yönelik monoklonal antikorlar ile ilgili pek çok klinik çalışmanın olduğu görülmektedir. Gelecekte yapılacak daha geniş çaplı randomize kontrollü çalışmalar sonucunda bu ilaçların prognoza ve sürviye olan katkıları daha iyi ortaya konulabilecektir. Hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçların başlıcaları şunlardır:

PD-1 HEDEF ALAN İLAÇLAR

- **Pembrolizumab**
- **Nivolumab**

Meme kanseri dahil bir çok kanserde PD-1'i hedef alan ilaçların faydalı olduğu görülmüştür. İleri evre üçlü negatif meme kanseri veya metastatik meme kanseri hastalarında pembrolizumab'ın birinci basamak tedavi olarak kullanıldığı KEYNOTE-086 isimli Faz II klinik çalışmanın ilk verilerine göre 52 hastanın %4'ünde tam cevap, %19'unda kısmi cevap alınırken,%17'sinde ise tedaviye cevap alınamamıştır (75).

CTLA-4'Ü HEDEF ALAN İLAÇLAR

- **Ipilimumab**
- **Tremelimumab**

Anti TIM-3, anti LAG-3, anti TIGIT monoklonal antikorları ile yapılan klinik çalışmalar devam etmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Hasta Grubu

Lokal ileri meme kanseri tanısı ile neo-adjuvan kemoterapi sonrası makroskopik rezidüel tümörü olan ve 18 yaş üzeri hastalar bu çalışmaya alınmıştır. Çalışma için İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınmış, çalışmaya katılımı kabul eden hastalara onam formu imzalatılmıştır. İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Hastalıkları Ünite'sinde ameliyatları gerçekleştirilen hastalara ait tümör materyali Fakültemiz Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenmiştir. Patolojik incelemede; tümörün histolojik tipi, histolojik gradı, tümör çevresi lenfosit infiltrasyonu oranı, lenf nodu metastazı varlığı, ER, PR, HER-2 ve Ki-67 gibi prognostik parametreler ve moleküler alt tipleri belirlenmiştir. Taze tümör materyalinden gerekli olan miktardaki fikse edilmemiş tümör dokusu Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde aşağıda belirtilen akan hücre ölçer (flow cytometry) yöntemiyle PD-1, TIGIT, LAG-3, TIM-3 ekspresyon varlığı açısından değerlendirilmiştir.

2. TÜMÖR DOKUSUNDAN TÜMÖR İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERİN (TIL) İZOLASYONU

Post-operatif tümör dokusundan yaklaşık 1 cm çaplı bir tümör parçası eksize edilerek RPMI (Roswell Park Memorial Institute) içine alınmış ve immünoloji laboratuvarında işleme alınıncaya kadar buz içerisinde korunmuştur. MACS tümör ayırma cihazı ve tümör ayırma kiti kullanılarak TIL izolasyon aşamaları aşağıdaki gibi özetlenmiştir

1. C tüpü içinde enzim mix hazırlandı (4,7 ml RPMI+200 µl Sol 1+100 µl Sol2+ 25 µl Sol 3).

2. Doku nekrotik alanlardan temizlenerek 2-4 mm çapında parçalara ayrıldı ve enzim mix içine konuldu.

3. C tüpü cihaza baş aşağı yerleştirilip oturtuldu ve program başlatıldı.
4. Program bitiminde C tüpü cihazdan çıkarılıp MACSmix tüp rotatöründe 37 C de 30 dk sürekli rotasyona maruz bırakıldı.
5. Süre bitiminde C tüpü tekrar MACS dissociator cihazına yerleştirildi ve program çalıştırıldı (2.tur).
6. Program bitiminde C tüpü cihazdan çıkarılıp MACSmix tüp rotatöründe tekrar 37 C de 30 dk sürekli rotasyona konuldu.
7. Daha sonra C tüpü tekrar MACS dissociator cihazına yerleştirildi ve program çalıştırıldı (3.tur).
8. Elde edilen doku süspansiyonu cell strainer dan geçirilip, PBS(Phosphate-Buffered Saline) ile yıkandı.
9. Elde edilen hücreler Ficoll+%75 Ficoll karışımı hazırlanmış tüpe alınarak santrifüj edildi. Böylece Ficoll gradient yöntemiyle iki adet bant oluşumu gerçekleştirildi. TIL bandı toplanarak hücre sayımı yapıldı ve bu hücreler kültür aşamalarında kullanıldı.

3. TÜMÖR İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERDE (TIL) PD-1, TİĞİT, LAG-3, CTLA-4 ve TİM-3 EKSPRESYONUNUN AKAN HÜCRE ÖLÇERLE (FLOW CYTOMETRY) BELİRLENMESİ

Tümör dokularından izole edilen TIL hücre süspansiyonunda araştırılacak olan antikorlar : anti-human CD223 (LAG-3)-FITC, anti-human CD366 (TIM-3)-PerCP/Cy5.5, anti-human CD279 (PD-1)-APC/Cy7, anti-human CD16-AlexaFluor700,anti-human CD56-PE/Cy7, anti-human TIGIT-PE, anti-human CD3Pacific blue, anti-human CD152 (CTLA-4)-APC, anti-human CD8aPE/Dazzle™ 30 dakika oda sıcaklığındakaranlıkta inkübe edildi. Otofloresan tüp, izotipik kontrol tüp olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerin yıkama aşamalarında PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tüpler 5 dk 2000 rpm’de 1 kez santrifüj edilerek üzerlerine %2 paraformaldehit içeren PBS ilave edilmiştir. Örnek analizi

FACS Aria II cihazında (Becton Dickinson San Jose, CA) yapılmıştır. Bu analiz sonrasında TIL total NK hücre alt grupları ve CD8⁺ sitotoksik T hücrelerinde PD-1, TIGIT, LAG-3, TIM-3 ve CTLA-4 oranları tayin edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların dosya kayıtlarından demografik, klinik ve patolojik özellikleri kaydedilmiştir.

KEMOTERAPİYE YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kemoterapi yanıtını ölçmede 2 değişik analizden faydalanılmıştır. İlk yöntemde patolojik olarak rezidüel tümörün regresyon yüzdesinin %20'den az olması kemoterapi az cevaplı ve $\geq$ %20'den fazla olması kemoterapiye cevaplı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca ek olarak kemoterapiye yanıtı değerlendirmede “MD Anderson Kanseri Merkezi Rezidüel Kanseri Yüklü İndeksi” kullanılmıştır. “MD Anderson Kanseri Merkezi Rezidüel Kanseri İndeksi” ile değerlendirme yapabilmek için aşağıdaki değişkenlerden faydalanılmıştır:

- rezidüel tümör yatağının en büyük iki boyutu (multisentrik olanlarda en büyük tümör yatağı hesaplama dahil edilir),
- invaziv tümör dokusu alanının yüzdesi,
- in-situ tümör dokusunun yüzdesi
- metastatik lenf nodu sayısı
- en büyük lenf nodu metastazının çapı

Bu değişkenler MD Anderson Rezidüel Kanseri Yüklü Hesaplayıcısı'na girilerek (www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3) “rezidüel kanser skoru” elde edilmiştir. Bu skor doğrultusunda rezidüel kanser sınıflandırması yapılmıştır. Bu sınıflamada 0=patolojik tam cevap ve 3=kemoterapiye dirençli olarak değerlendirilmektedir.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizlerde SPSS 17 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS, Inc, Chicago, IL) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişken verilerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi ve birbirleriyle korelasyonunda ise Spearman korelasyon testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.



BULGULAR

Hastaların Demografik, Klinik ve Patoloji Özellikleri

Çalışmaya Eylül 2018 ile Kasım 2019 arası İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Ünitesi'ne tanı ve tedavi amacıyla başvuran 18 yaş üstündeki neo-adjuvan tedaviye iyi yanıt alınamayan ve lokal ileri meme kanserli 24 hasta dahil edildi. Hastaların demografik ve klinikopatolojik özellikleri Tablo 8'de gösterilmiştir.

Olguların medyan yaşı 49 (29-69) olup, %54,2'si (n=13) 50 yaşın altında, %45,8'i (n=11) 50 yaş ve üzerindedir. Çalışmaya alınan vakaların %54,2'si (n=13) pre-menopozal, %45,8'i (n=11) post-menopozaldi. Olguların %45,8'inde kısmi regresyon ($\leq$ %20), %54,2'sinde belirgin regresyon ($>$ %20) vardı. T ve N evrelerine bakıldığında, %75'i T1-T2, %25'i T3-T4 evrelerinde, %29,2'si (n=7) pN0, %70,8'i (n=17) pN1- N2- N3 evrelerindedir. Yaygın in situ komponent oranı %50, LVI oranı ise %45,8'dir.

Hastaların %58,3'ünde ER pozitif, %54,2'sinde PR pozitif ve %20,8'inde HER-2 pozitif olup, ortalama Ki-67 değeri $39,29 \pm 28,20$ 'dir. Olguların %50'si luminal, %37,5'i üçlü negatif moleküler alt tipe sahiptir.

Tablo 8. Hastaların demografik, klinik ve patolojik özellikleri

		n (%)
Yaş (yıl)	<i>medyan (min-mak)</i>	49 (29-69)
	< 50 yaş	13 (54,2)
	≥ 50 yaş	11 (45,8)
Menopozal durum	Premenopoz	13 (54,2)
	Postmenopoz	11 (45,8)
Regresyon düzeyi	Kısmi regresyon (≤ %20)	11 (45,8)
	Belirgin regresyon (> %20)	13 (54,2)
T evresi	T1- T2	18 (75,0)
	T3- T4	6 (25,0)
N evresi	N0	7 (29,2)
	N1- N2- N3	17 (70,8)
	N0- N1	18 (75,0)
	N2- N3	6 (25,0)
Yaygın in situ komponent	Yok	12 (50,0)
	Var	12 (50,0)
LVI	Yok	13 (54,2)
	Var	11 (45,8)
Menopozal durum	Premenopoz	13 (54,2)
	Postmenopoz	11 (45,8)
ER	Negatif	10 (41,7)
	Pozitif	14 (58,3)
PR	Negatif	11 (45,8)
	Pozitif	13 (54,2)
Ki-67	<i>Medyan</i>	50 (2-80)
	≥ %20	9 (37,5)
	< %20	15 (62,5)
HER-2	Negatif	19 (79,2)
	Pozitif	5 (20,8)
Luminal/ non- luminal	Luminal	12 (50,0)
	Nonluminal	12 (50,0)
Üçlü negatif / diğer	Diğer	15 (62,5)
	Üçlü negatif	9 (37,5)

Hastaların Lenfosit Alt Gruplarının Analizi

Çalışmaya alınan hastaların CD8⁺ sitotoksik T lenfositleri, CD16⁺ ve CD56⁺ sitotoksik NK hücreleri ölçümleri ve bu alt gruplarda eksprese edilen immün kontrol nokta reseptör ekspresyon ölçümleri Tablo 9'da belirtilmiştir. CD8⁺ sitotoksik T lenfositleri, CD16⁺ ve CD56⁺ sitotoksik NK hücreleri alt gruplarındaki PD1, CTLA-4, TIGIT, TIM-3 ve LAG3 ekspresyonlarının hastaların demografik ve klinikopatolojik özellikleriyle karşılaştıran tüm analizler ise Tablo 10-12'de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı veya anlamlılığa yakın analizler ise her parameter için ayrı tablolarda özetlenmiştir.

Tablo 9. CD8⁺, CD16⁺ ve CD56⁺ tümör infiltrate eden lenfositlerin dağılımı

		Medyan (Min-Mak)	Ort±Ss
CD8	STLENFOSİT	13,5 (0,6-36)	14,51±11,12
	PD-1	3,2 (0,2-46)	8,61±11,41
	CTLA-4	6 (1-27)	8,10±7,95
	TIGIT	8,6(0-55)	15,80±17,03
	LAG-3	8,9 (0,6-50)	12,49±13,85
	TİM-3	6,4(1-58)	15,02±17,75
CD16	STNK	4 (0,6-22)	5,05±4,34
	PD-1	5,2 (0,3-52)	10,16±12,69
	CTLA-4	12,5 (0-45)	13,86±10,99
	TIGIT	6 (0-35)	9,56±9,95
	LAG-3	6,5 (0-35)	11,11±11,72
	TİM-3	13 (0,2-34)	14,62±11,00
CD56	STNK	2,6 (0,4-8)	2,97±1,92
	PD-1	5,2 (0-21)	7,70±6,31
	CTLA-4	10 (0-39)	11,85±10,85
	TIGIT	10 (0-75)	16,74±18,81
	LAG-3	10,3 (0-70)	13,68±14,47
	TİM-3	19,5 (0,2-70)	25,95±23,14

Tablo 10. CD8⁺ T Lenfositlerinin Demografik, Klinik ve Patolojik Özelliklere Göre Değerlendirmesi

		CD8 ⁺ PD1		CD8 ⁺ CTLA4		CD8 ⁺ TIGIT		CD8 ⁺ LAG3		CD8 ⁺ TIM3	
		M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Yaş	<50(n:13)	14.2	0.20	16.3	0.004	11.9	0.66	13.1	0.64	11.8	0.62
	≥ 50(n:11)	10.5		8.0		13.2		11.8		13.3	
Menopoz	Pre(n:13)	13.5	0.47	15.1	0.05	10.5	0.12	12.9	0.79	11.0	0.25
	Post(n:11)	11.4		9.5		14.9		12.1		14.3	
Reg	≤20(n:11)	10.7	0.24	12.3	0.88	8.64	0.01	10.4	0.18	9.55	0.06
	>20(n:13)	14.0		12.7		15.8		14.3		15.0	
T evresi	T1-2 (n:18)	10.5	0.01	10.5	0.02	12.8	0.69	12.0	0.48	12.4	0.89
	T3-4 (n:6)	18.6		18.4		11.5		14.2		12.8	
N evresi	N0(n:7)	14.1	0.48	14.4	0.39	14.29	0.43	16.1	0.11	15.0	0.27
	N1-2-3 (n:17)	11.8		11.7		11.8		11.0		11.5	
N evresi	N0-1(n=8)	13.7	0.16	13.2	0.37	13.1	0.50	13.9	0.09	14.2	0.04
	N2-3 (n:6)	9.0		10.2		10.8		8.33		7.42	
İn situ	-(n:12)	12.4	0.93	12.1	0.79	10.8	0.25	11.5	0.47	11.5	0.47
	+(n:12)	12.6		12.9		14.2		13.5		13.5	
LVİ	+(n:13)	12.7	0.86	12.4	0.95	14.1	0.21	13.8	0.31	14.1	0.22
	-(n:11)	12.2		12.6		10.6		10.9		10.6	
ER	-(n:10)	10.9	0.35	12.9	0.81	12.8	0.86	13.3	0.62	12.3	0.91
	+(n:14)	13.6		12.2		12.3		11.9		12.6	
PR	≤20(n:11)	10.7	0.26	12.7	0.88	12.2	0.84	12.2	0.86	12.0	0.77
	>20(n:13)	14.0		12.3		12.8		12.7		12.9	
Ki-67	≤20(n:9)	12.6	0.98	12.2	0.86	14.9	0.12	10.6	0.31	11.4	0.57
	>20(n:15)	12.5		12.7		11.1		13.6		13.1	
HER-2	-(n:19)	12.4	0.89	12.5	0.97	12.2	0.69	11.2	0.07	11.0	0.04
	+(n:5)	12.9		12.6		13.6		17.5		18.2	
Üçlü Negatif	-(n:15)	12.3	0.86	11.9	0.59	12.3	0.88	12.7	0.83	13.6	0.31
	+(n:9)	12.8		13.5		12.8		12.1		10.6	
Luminal	-(n:12)	12.5	1.00	14.0	0.28	12.2	0.82	13.4	0.54	11.9	0.66
	+(n:12)	12.5		10.9		12.8		11.6		13.1	

Tablo 11. CD16⁺ NK Hücrelerinin Demografik, Klinik ve Patolojik Özelliklere Göre Değerlendirmeler

		CD16 ⁺ PD1		CD16 ⁺ CTLA4		CD16 ⁺ TIGIT		CD16 ⁺ LAG3		CD16 ⁺ TIM3	
		M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Yaş	<50(n:13)	13.0	0.71	14.6	0.12	12.4	0.95	12.9	0.75	12.6	0.95
	≥ 50(n:11)	11.9		10.0		12.6		12.0		12.4	
Menopoz	Pre(n:13)	12.5	0.98	14.2	0.19	10.9	0.23	11.5	0.47	11.1	0.31
	Post(n:11)	12.4		10.4		14.4		13.6		14.1	
Reg	≤20(n:11)	11.9	0.73	14.4	0.23	10.5	0.21	12.2	0.84	9.86	0.09
	>20(n:13)	13.0		10.9		14.1		12.8		14.7	
T evresi	T1-2 (n:18)	11.7	0.32	11.6	0.30	12.3	0.81	11.4	0.19	12.2	0.71
	T3-4 (n:6)	15.0		15.1		13.1		15.7		13.4	
N evresi	N0(n:7)	13.1	0.77	11.4	0.63	13.0	0.82	13.1	0.77	16.1	0.11
	N1-2-3 (n:17)	12.2		12.9		12.3		12.2		11.0	
N evresi	N0-1(n:18)	12.9	0.59	11.8	0.39	13.0	0.55	12.8	0.69	13.7	0.14
	N2-3 (n:6)	11.2		14.7		11.0		11.5		8.8	
İn situ	-(n:12)	10.7	0.20	10.0	0.09	9.2	0.02	8.3	0.003	10.1	0.09
	+(n:12)	14.3		15.0		15.7		16.7		14.9	
LVİ	+(n:13)	12.8	0.82	12.3	0.91	10.6	0.16	11.4	0.40	13.8	0.32
	-(n:11)	12.1		12.7		14.7		13.8		10.9	
ER	-(n:10)	11.7	0.66	10.9	0.35	11.5	0.56	11.5	0.56	12.1	0.81
	+(n:14)	13.0		13.6		13.2		13.2		12.8	
PR	≤20(n:11)	10.9	0.32	11.6	0.58	10.6	0.24	10.9	0.31	11.3	0.43
	>20(n:13)	13.8		13.2		14.1		13.8		13.5	
Ki-67	≤20(n:9)	12.4	0.98	13.8	0.47	16.0	0.06	13.7	0.53	13.7	0.51
	>20(n:15)	12.5		11.7		10.4		11.8		11.8	
HER-2	-(n:19)	12.6	0.91	13.3	0.25	12.4	0.86	12.9	0.62	12.5	0.97
	+(n:5)	12.2		9.3		13.0		11.1		12.4	
Üçlü Negatif	-(n:15)	12.5	0.98	11.6	0.40	14.0	0.19	12.3	0.86	13.0	0.63
	+(n:9)	12.4		14.1		10.1		12.8		11.6	
Luminal	-(n:12)	12.3	0.91	12.8	0.84	10.8	0.25	12.5	1.00	11.9	0.69
	+(n:12)	12.7		12.2		14.2		12.5		13.1	

Tablo 12. CD56⁺ NK Hücrelerinin Demografik , Klinik ve Patolojik Özelliklere Göre Değerlendirmeler

		CD56 ⁺ PD1		CD56 ⁺ CTLA4		CD56 ⁺ TIGIT		CD56 ⁺ LAG3		CD5 ⁺ TİM3	
		M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Yaş	<50(n:13)	14.0	0.27	13.12	0.64	10.5	0.12	12.8	0.82	11.2	0.32
	≥ 50(n:11)	10.8		11.77		14.9		12.1		14.0	
Menopoz	Pre(n:13)	13.6	0.40	11.65	0.52	9.2	0.01	11.3	0.38	10.1	0.08
	Post(n:11)	11.2		13.50		16.4		13.9		15.3	
Reg	≤20(n:11)	11.7	0.62	12.82	0.84	9.1	0.003	12.1	0.79	10.4	0.17
	>20(n:13)	13.1		12.23		15.4		12.8		14.3	
T evresi	T1-2 (n:18)	10.9	0.057	11.75	0.37	12.7	0.84	10.8	0.04	11.7	0.37
	T3-4 (n:6)	17.2		14.75		12.0		17.6		14.7	
N evresi	N0(n:7)	17.6	0.02	14.50	0.37	16.0	0.12	16.2	0.10	14.6	0.34
	N1-2-3 (n:17)	10.4		11.68		11.1		11.0		11.6	
N evresi	N0-1(n:18)	12.9	0.59	12.92	0.62	13.6	0.20	13.5	0.22	13.6	0.17
	N2-3 (n:6)	11.2		11.25		9.3		9.4		9.1	
İn situ	-(n:12)	9.4	0.03	8.92	0.01	10.2	0.11	9.9	0.07	10.6	0.19
	+(n:12)	15.6		16.08		14.8		15.1		14.4	
LVİ	+(n:13)	11.4	0.40	12.69	0.88	12.8	0.84	12.2	0.84	14.7	0.10
	-(n:11)	13.8		12.27		12.2		12.8		9.9	
ER	-(n:10)	10.7	0.30	12.60	0.95	11.1	0.41	12.9	0.81	9.2	0.06
	+(n:14)	13.7		12.43		13.5		12.2		14.8	
PR	≤20(n:11)	10.4	0.18	12.77	0.86	11.28	0.43	12.6	0.95	10.4	0.18
	>20(n:13)	14.3		12.27		13.5		12.4		14.3	
Ki-67	≤20(n:9)	13.2	0.72	13.50	0.59	14.5	0.28	11.1	0.44	12.1	0.81
	>20(n:15)	12.1		11.90		11.3		13.4		12.8	
HER-2	-(n:19)	13.1	0.39	13.08	0.43	12.3	0.83	12.5	0.94	12.6	0.91
	+(n:5)	10.1		10.30		13.1		12.3		12.2	
Üçlü Negatif	-(n:15)	11.7	0.49	11.47	0.35	12.7	0.83	10.8	0.12	11.6	0.40
	+(n:9)	13.8		14.22		12.1		15.4		14.1	
Luminal	-(n:12)	12.6	0.95	13.75	0.39	11.6	0.52	14.5	0.16	12.4	0.93
	+(n:12)	12.4		11.25		13.4		10.5		12.6	

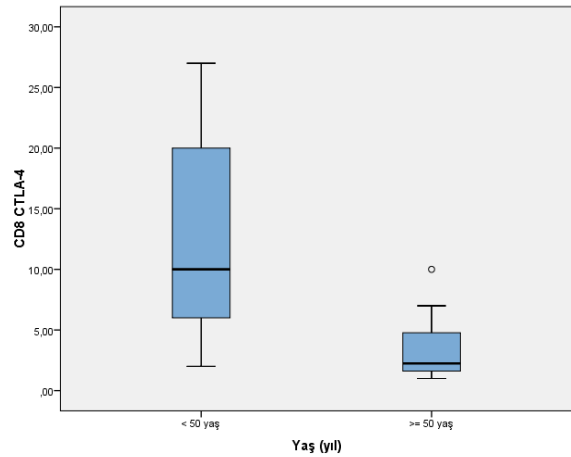
Hastaların Yaş ve Menopoz durumuna göre Değerlendirmeler:

CD8⁺T lenfositlerinde CTLA-4 ölçümleri ≥ 50 yaştaki hastalarda daha genç olanlara kıyasla daha düşük olarak saptanmıştır (p=0,004; Tablo 10-13). Olguların menopozal durumlarına göre karşılaştırılmasında postmenopozal olguların CD56⁺ NK hücrelerindeki TIGIT ölçümleri premenopozal hastalara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (p=0,014; Tablo 10-12 ve Tablo 14).

Tablo 13. Yaşa Göre Değerlendirmeler(*p<0.05).

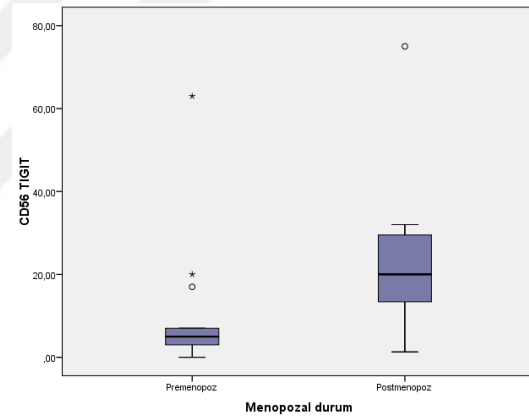
		Yaş (yıl)		Test Değeri	p
		< 50 yaş (n=13)	$\geq$ 50 yaş(n=11)		
CD16 ⁺ STNK	medyan (min-mak)	5(1-22)	3,1(0,6-11)	-1,342	0,180
CD8 ⁺ CTLA-4	medyan (min-mak)	10(2-27)	2,2(1-10)	-2,873	0,004**
CD16 ⁺ CTLA-4	medyan (min-mak)	16(0,1-45)	11(0-20)	-1,565	0,118
CD56 ⁺ TIGIT	medyan (min-mak)	5(0-63)	18(1,3-75)	-1,538	0,124

Şekil 3. Yaşa göre CD8⁺ CTLA-4 ölçümleri



Tablo 14. Hastaların Menopozal Durumlarına Göre Değerlendirmeler(*p<0.05).

		Menopozal durum		Test Değeri	p
		Premenopoz (n=13)	Postmenopoz (n=11)		
CD8⁺ CTLA-4	<i>medyan (min-mak)</i>	9(1,9-27)	2,4(1-20)	-1,944	0,052
CD8⁺ TIGIT	<i>medyan (min-mak)</i>	2(0-54)	20(0,4-55)	-1,539	0,124
CD56⁺ TIGIT	<i>medyan (min-mak)</i>	5(0-63)	20(1,3-75)	-2,466	0,014*
CD56⁺ TIM-3	<i>medyan (min-mak)</i>	14(0,2-70)	40(1-65)	-1,770	0,077

Şekil 4. Menopozal durumlarına göre CD56⁺ TIGIT ölçümleri

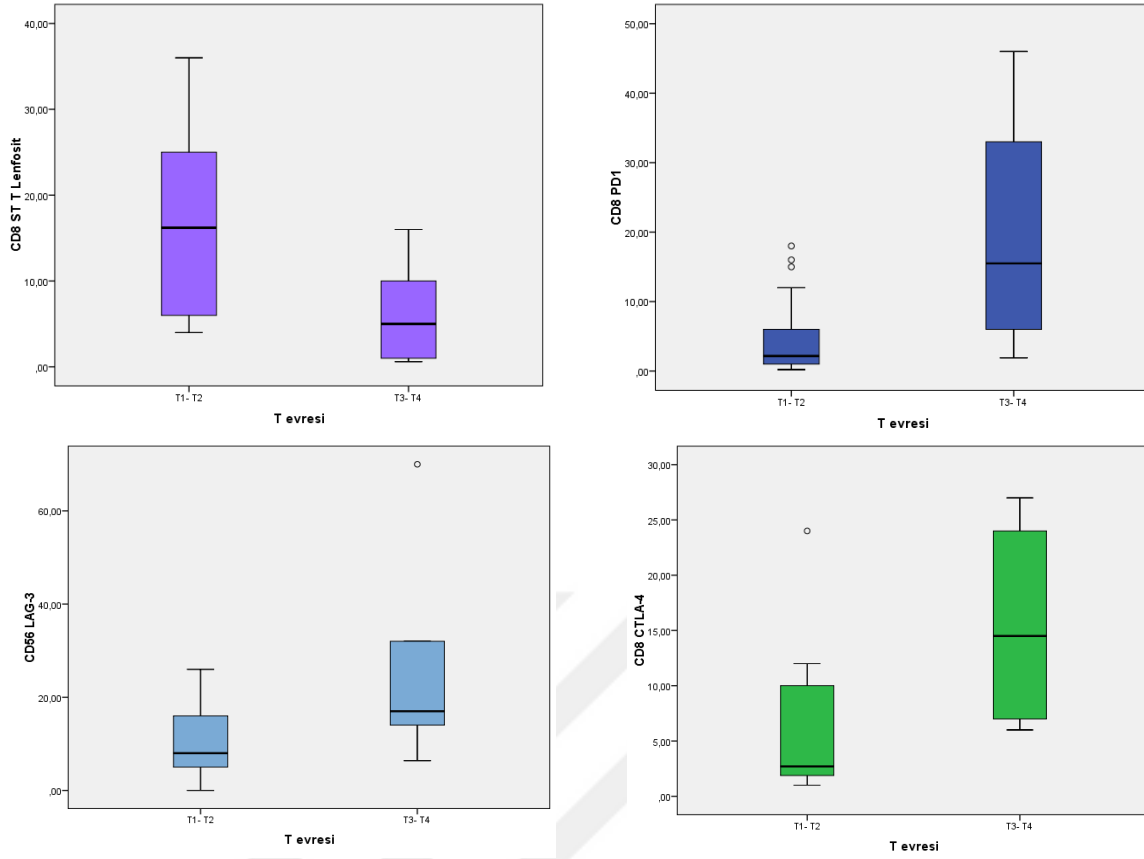
Hastaların T ve N evrelerine göre değerlendirmeler:

T evrelerine göre analiz yapıldığında CD8⁺ T lenfosit oranları T1-T2 olgularda T3-T4 olanlara göre artmış olarak bulunmuştur (p=0,028; Tablo 12 ve Tablo 20-22). Aksine CD8⁺ lenfositlerdeki PD-1 ekspresyonları, T3-T4 olgularda T1-2 olgulara göre daha fazladır (p=0,014; Tablo 10-12 ve Tablo 15). Benzer şekilde T3-T4 evresindeki olguların CD8⁺ CTLA-4 ve CD56⁺ NK hücrelerindeki LAG-3 ekspresyonları, T1-T2 evresinde olanlardan daha yüksektir (sırasıyla p=0,018, p=0,042; Tablo 10-12 ve Tablo 15).

Olguların patolojik N evrelerine(pN) göre değerlendirmede ise, N1-N2-N3 evresinde olan olguların CD56⁺ PD-1 ölçümleri, N0 evresinde olanlardan daha düşüktür (p=0,022; Tablo 10-12 ve Tablo 16). Benzer olarak N2-N3 evresinde olan olguların CD8⁺ TİM-3 ölçümleri, N0- N1 evresinde olanlara göre daha fazla azalmıştır (p=0,042; Tablo 10-12 ve Tablo 17).

Tablo 15. Tablo 15. T Evrelerine Göre Değerlendirmeler (*p<0.05).

		T evresi		Test Değeri	p
		T1- T2 (n=18)	T3- T4(n=6)		
CD8⁺ ST T LENFOSİT	<i>medyan (min-mak)</i>	16,2(4-36)	5(0,6-16)	-2,201	0,028*
CD8⁺ PD-1	<i>medyan (min-mak)</i>	2,2(0,2-18)	15,5(1,9-46)	-2,446	0,014*
CD8⁺ CTLA-4	<i>medyan (min-mak)</i>	2,7(1-24)	14,5(6-27)	-2,371	0,018*
CD16⁺ LAG-3	<i>medyan (min-mak)</i>	5,2(0-30)	17(0-35)	-1,302	0,193
CD56⁺ PD-1	<i>medyan (min-mak)</i>	4,5(0-21)	13(4-15)	-1,904	0,057
CD56⁺ LAG-3	<i>medyan (min-mak)</i>	8(0-26)	17(6,4-70)	-2,036	0,042*

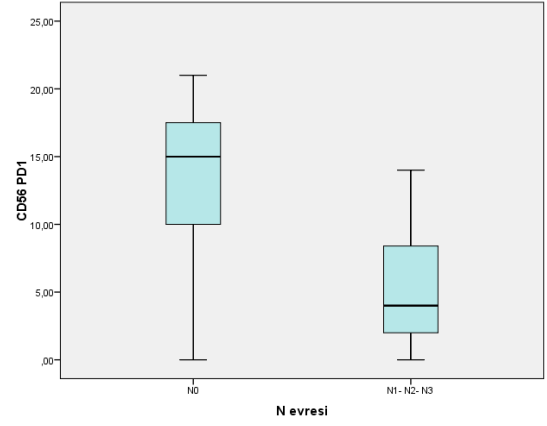


Şekil 5. T evrelerine göre CD8⁺ ST T Lenfosit, CD8⁺ PD-1, CD8⁺ CTLA-4, CD56⁺ LAG-3 ölçümleri

Tablo 16. N Evrelerine (N0/ N1-N2-N3) Göre Değerlendirmeler (*p<0,05).

		N evresi		Test	
		N0	N1- N2- N3	Değeri	p
		(n=7)	(n=17)		
CD8 ⁺ LAG-3	medyan (min-mak)	11,2(4-45)	5(0,6-50)	-1,589	0,112
CD16 ⁺ TIM-3	medyan (min-mak)	22(10-30)	10(0,2-34)	-1,59	0,112
CD56 ⁺ PD-1	medyan (min-mak)	15(0-21)	4(0-14)	-2,291	0,022*
CD56 ⁺ TIGIT	medyan (min-mak)	18(5-63)	6(0-75)	-1,558	0,119
CD56 ⁺ LAG-3	medyan (min-mak)	16(5-26)	7(0-70)	-1,653	0,098

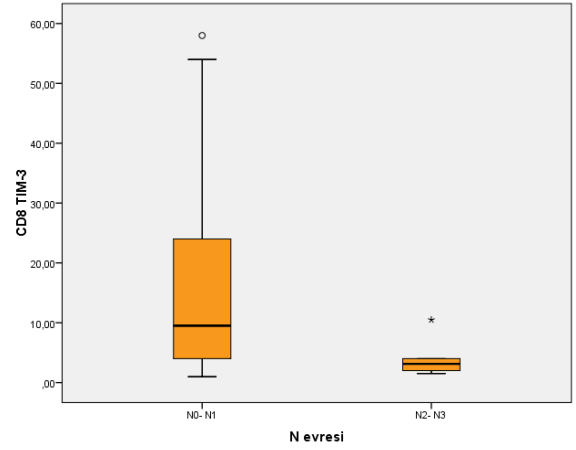
Şekil 6. N evrelerine göre CD56⁺ PD-1 ölçümleri



Tablo 17. N Evrelerine (N0-N1/ N2-N3) Göre Değerlendirmeler(*p<0,05).

			N evresi		Test Değeri	p
			N0- N1 (n=18)	N2- N3 (n=6)		
CD16 ⁺ ST NK	medyan (min-mak)		4,5(0,6-22)	3,2(1-5)	-1,577	0,115
CD8 ⁺ LAG-3	medyan (min-mak)		10(0,6-50)	3,3(1-10)	-1,668	0,095
CD8 ⁺ TİM-3	medyan (min-mak)		9,5(1-58)	3,1(1,5-10,5)	-2,036	0,042*

Şekil 7. N evrelerine göre CD8⁺ TİM-3 ölçümleri



Hastaların reseptör durumuna göre değerlendirmeler:

Olguların ER ve PR durumuna göre yapılan analizinde, CD56⁺ TIM-3 ekspresyonu ER pozitif hastalarda daha yüksek olarak saptanmış ancak bu yüksek istatistiksel anlamlılık sınırının altında kalmıştır (p=0,057, Tablo 10-12 ve Tablo 18). Ancak HER-2 pozitif olan olguların CD8⁺ TIM-3 ölçümleri, HER-2 negatif olanlardan daha yüksektir (p=0,043; p<0,05, Tablo 10-12 ve Tablo 19). Ki-67 düzeylerine göre yapılan karşılaştırmada ise, Ki-67 skoru %20'nin üstünde olanlarda CD16⁺ TIGIT düzeyi daha yüksek görülmüş, fakat istatistiksel anlamlılık kazanmamıştır (p<0,05, Tablo 10-12 ve Tablo 20).

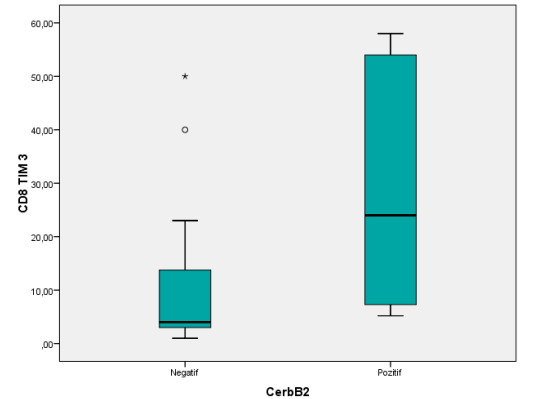
Tablo 18. Östrojen Reseptörü (ER) Sonuçlarına Göre Değerlendirmeler(*p<0,05).

		ER		Test Değeri	p
		Negatif (n=10)	Pozitif (n=14)		
CD56 ⁺ TIM-3	medyan (min-mak)	7,4(0,2-55)	33(2-70)	-1,906	0,057

Tablo 19. HER-2 Sonuçlarına Göre Değerlendirmeler(*p<0,05).

		HER-2		Test Değeri	p
		Negatif (n=19)	Pozitif (n=5)		
CD8 ⁺ LAG-3	medyan (min-mak))	5(0,6-45)	11(5-50)	-1,779	0,075
CD8 ⁺ TIM-3	medyan (min-mak)	4(1-50)	24(5,2-58)	-2,028	0,043*

Şekil 8. HER-2 sonuçlarına göre CD8⁺ TIM-3 ölçümleri



Tablo 19. Ki-67 Düzeylerine Göre Değerlendirmeler(*p<0,05)

		Ki-67		Test Değeri	p
		≥%20(n=13)	<%20 (n=11)		
CD16 ⁺ TIGIT	medyan (min-mak)	11,6(1-35)	3(0-23)	-1,883	0,060

Hastaların lenfovasküler invazyon (LVİ), yaygın intra-duktral komponent ve tümör regresyon düzeylerine göre değerlendirilmeleri:

Hastaların LVİ durumuna göre yapılan karşılaştırmada CD56⁺ TIM-3 ölçümleri LVİ göstermeyen hastalarda daha yüksekti (p=0,098, Tablo 10-12 ve Tablo 21). Yaygın intra-duktral komponent görülen vakaların CD16⁺ TIGIT, CD16⁺ LAG-3, CD56⁺ PD-1 ve CD56⁺ CTLA-4 ölçümleri, in situ komponent görülmeyenlerden anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla p=0,024; p=0,003; p=0,032; p=0,013, Tablo 10-12 ve Tablo 22).

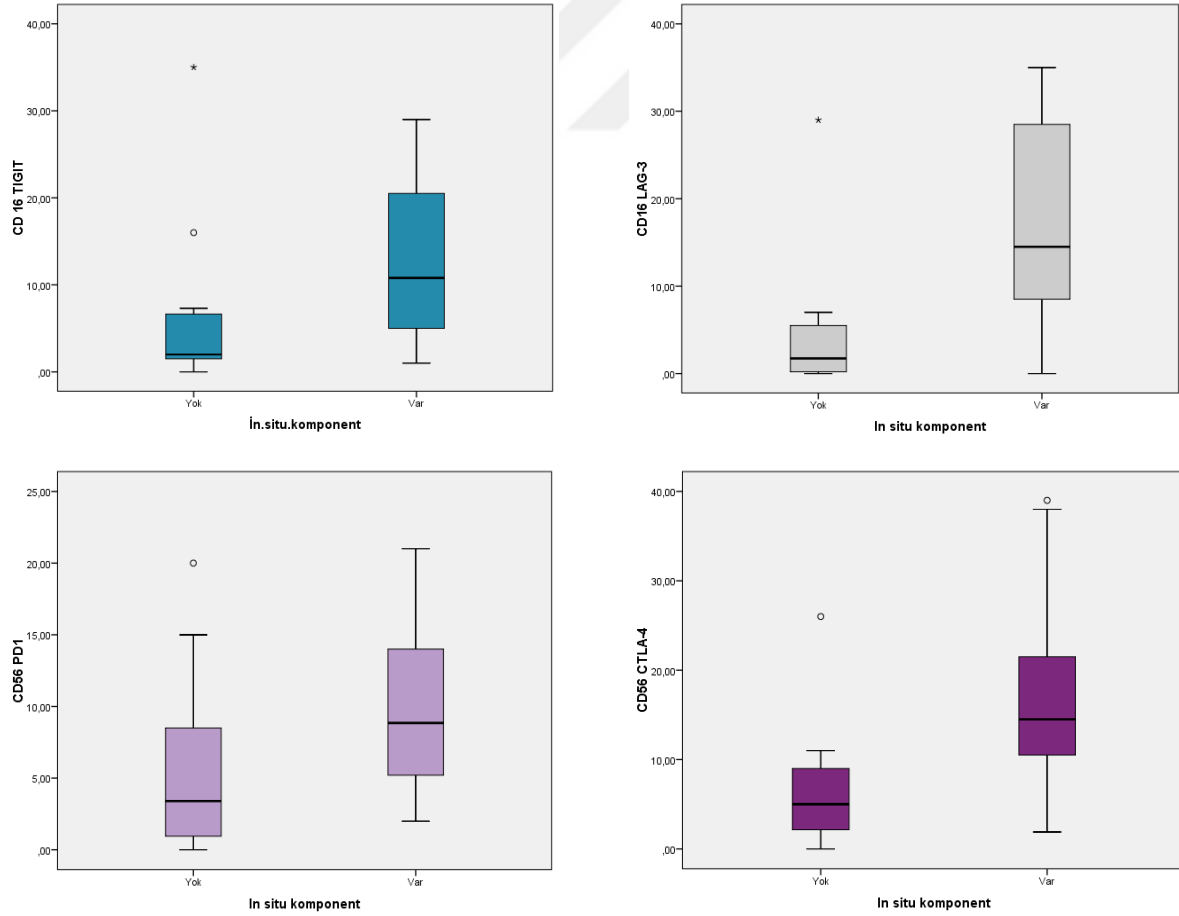
Belirgin regresyon görülen hastaların CD8⁺ ve CD56⁺TIGIT ekspresyonu, kısmi regresyon görülenlerden daha fazla bulundu (sırasıyla p=0,014, p=0,030; Tablo 10-12 ve Tablo 23). Spearman korelasyon testi kullanılarak yapılan analizlerde, patolojik regresyon skoru ile sadece CD16⁺ CTLA-4 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon göstermiştir (p=0,031).

Tablo 20. Lenfovasküler İnvazyona (LVİ) Göre Değerlendirmeler(*p<0.05).

		LVİ		Test Değeri	p
		Yok (n=13)	Var (n=11)		
CD56 ⁺ TIM-3	medyan (min-mak)	35(4-65)	14(0,2-70)	-1,654	0,098

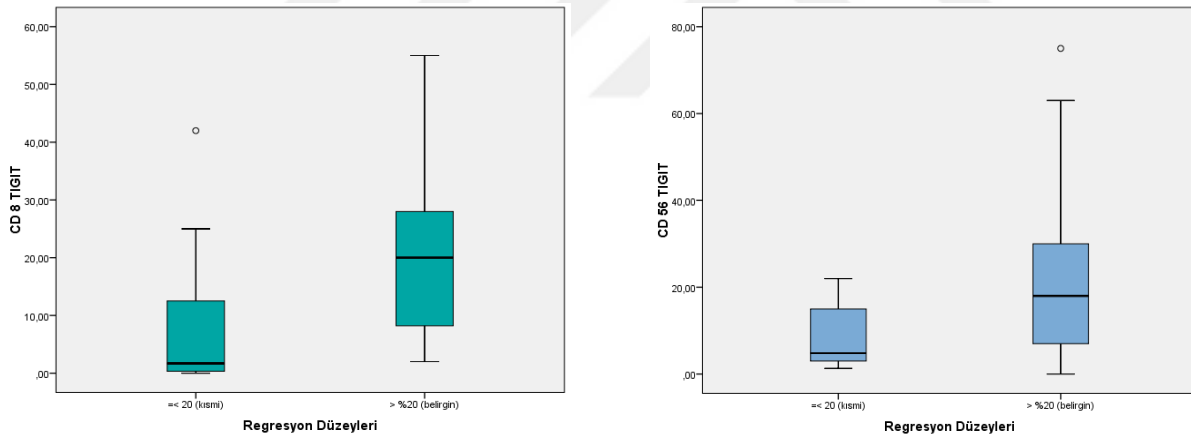
Tablo 21. Yaygın İn Situ Komponent Varlığına Göre Değerlendirmeler(*p<0.05)

		İn situ komponent		Test Değeri	p
		Yok (n=12)	Var (n=12)		
CD16⁺ CTLA-4	<i>medyan (min-mak)</i>	7(0-31)	15,3(2-45)	-1,704	0,088
CD16⁺ TIGIT	<i>medyan (min-mak)</i>	2(0-35)	10,8(1-29)	-2,258	0,024*
CD16⁺ LAG-3	<i>medyan (min-mak)</i>	1.7(0-29)	14,5(0-35)	-2,920	0,003**
CD16⁺ TIM-3	<i>medyan (min-mak)</i>	10(0,2-26)	17,5(1,5-34)	-1,677	0,094
CD56⁺ PD-1	<i>medyan (min-mak)</i>	3,4(0-20)	8,9(2-21)	-2,141	0,032*
CD56⁺ CTLA-4	<i>medyan (min-mak)</i>	5(0-26)	14,5(1,9-39)	-2,484	0,013*
CD56⁺ TIGIT	<i>medyan (min-mak)</i>	6,5(0-30)	19(3-75)	-1,590	0,112
CD56⁺ LAG-3	<i>medyan (min-mak)</i>	8(0-26)	16,4(2,4-70)	-1,821	0,069

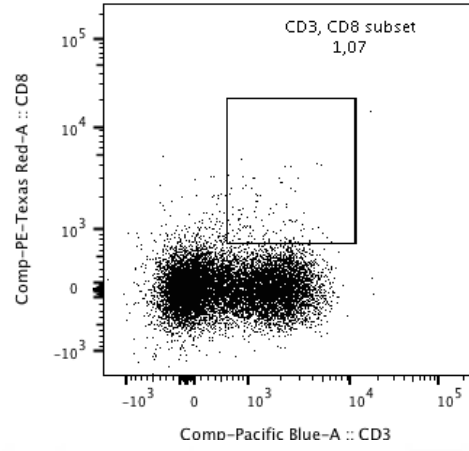
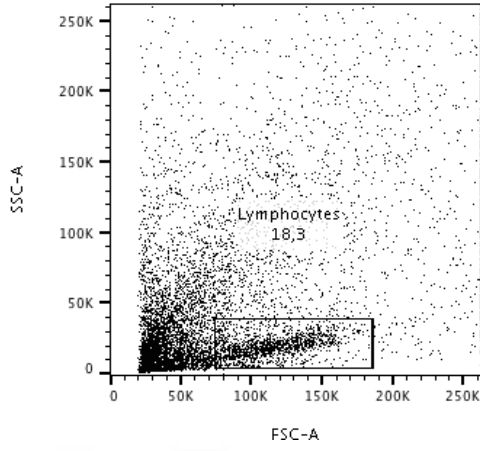
**Şekil 9. İn situ komponent varlığına göre CD16⁺ TIGIT, CD16⁺ LAG-3, CD56⁺ PD-1, CD56⁺ CTLA-4 ölçümleri**

Tablo 22. Tümör Regresyon Düzeylerine Göre Değerlendirmeler (*p<0.05).

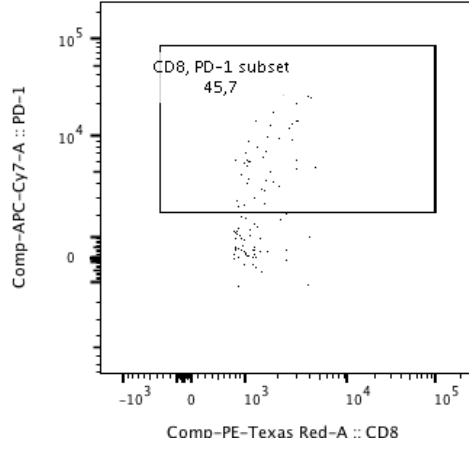
		Regresyon düzeyi		Test Değeri	p
		Kısmi regresyon ($\leq$ %20) (n=11)	Belirgin regresyon ($>$ %20) (n=13)		
CD8⁺ ST T LENFOSİT	<i>medyan (min-mak)</i>	16(0,6-36)	7(1-27)	-1,826	0,068
CD8⁺ TIGIT	<i>medyan (min-mak)</i>	1,7(0-42)	20(2-55)	-2,469	0,014*
CD8⁺ LAG-3	<i>medyan (min-mak)</i>	3,4(0,6-50)	10(1,6-45)	-1,334	0,182
CD8⁺ TİM-3	<i>medyan (min-mak)</i>	4(1,5-54)	17(1-58)	-1,885	0,059
CD16⁺ TİM-3	<i>medyan (min-mak)</i>	7(0,2-34)	15(1,7-30)	-1,683	0,092
CD56⁺ TIGIT	<i>medyan (min-mak)</i>	4,8(1,3-22)	18(0-75)	-2,176	0,030*
CD56⁺ TİM-3	<i>medyan (min-mak)</i>	14(0,2-70)	35(2-65)	-1,364	0,173

**Şekil 10. Tümör Regresyon düzeylerine göre CD8⁺ TIGIT, CD56⁺ TIGIT ölçümleri**

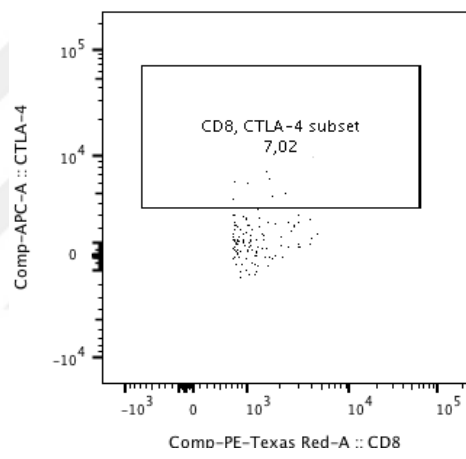
CD3⁺CD8⁺ Sitotoksik T lenfosit İmmün Kontrol Noktası Reseptör Analizi



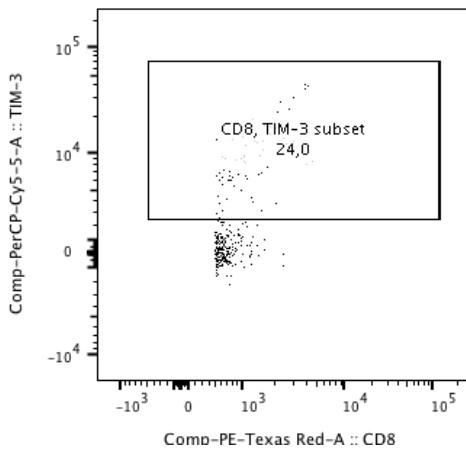
PD-1 ekspresyonu



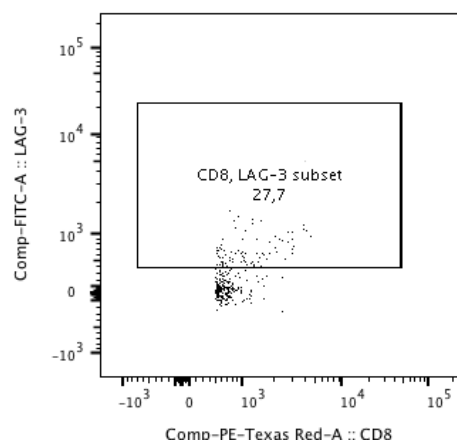
CTLA-4 ekspresyonu



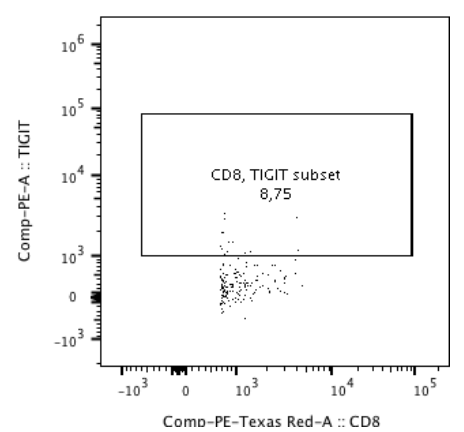
Tim-3 ekspresyonu



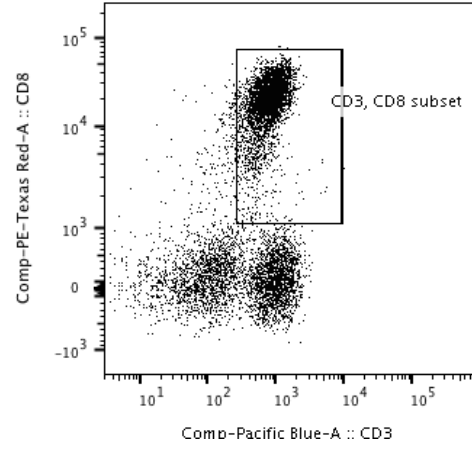
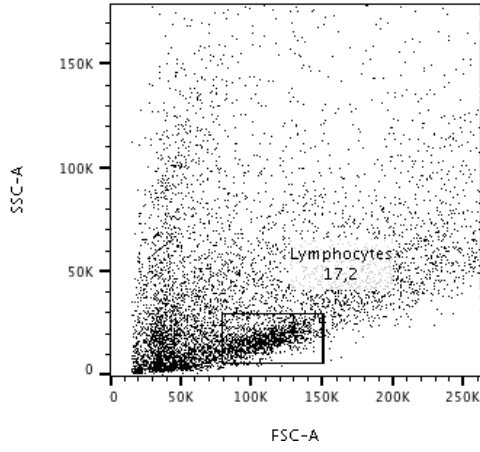
LAG-3 ekspresyonu



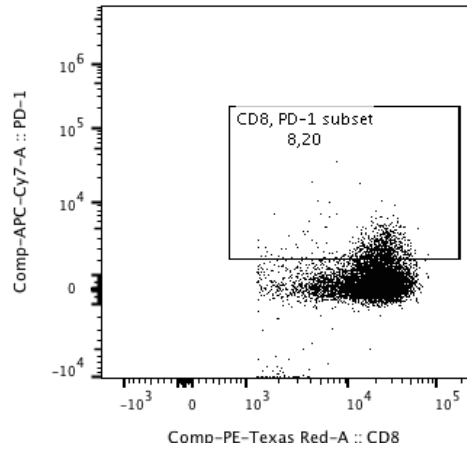
TIGIT ekspresyonu



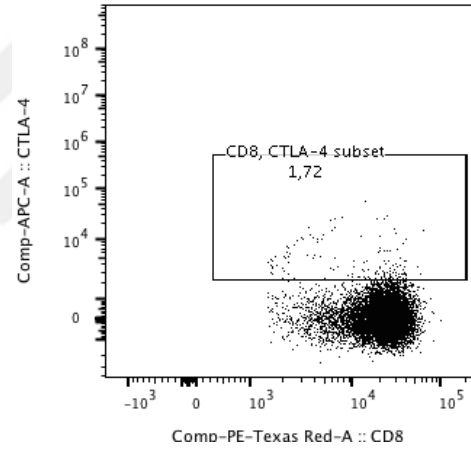
CD56^{parlak} CD16⁻ sitokin salgılayan NK hücre alt grubu



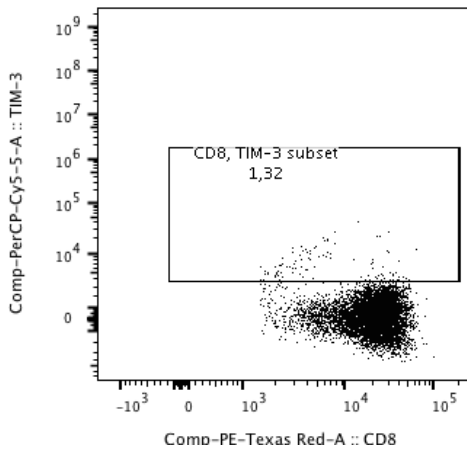
PD-1 ekspresyonu



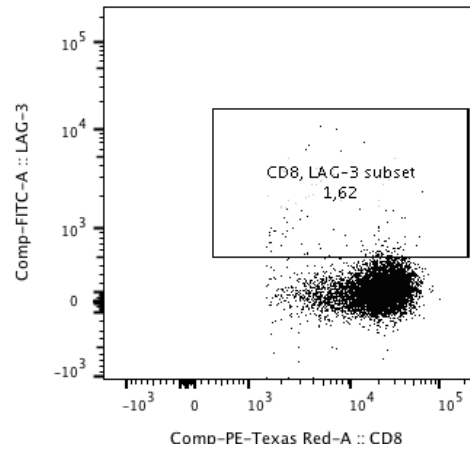
CTLA-4 ekspresyonu



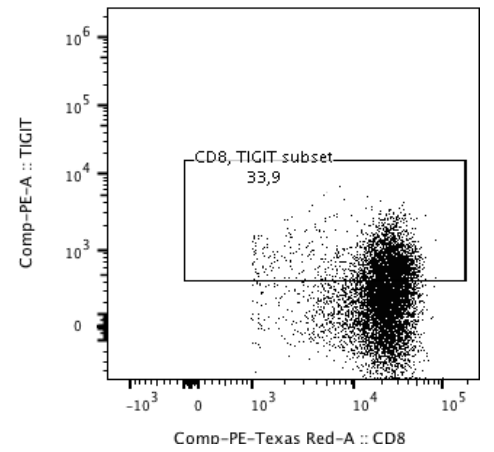
Tim-3 ekspresyonu



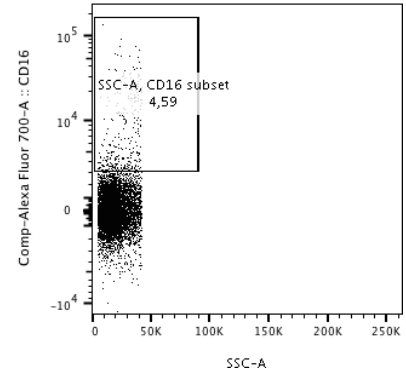
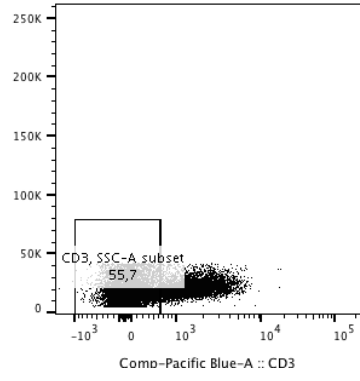
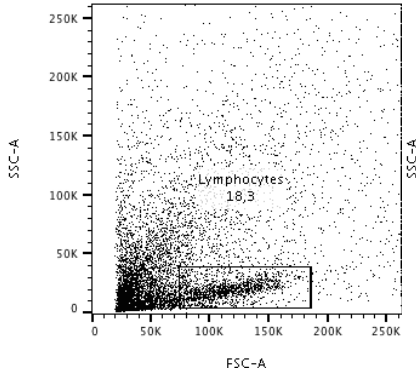
LAG-3 ekspresyonu



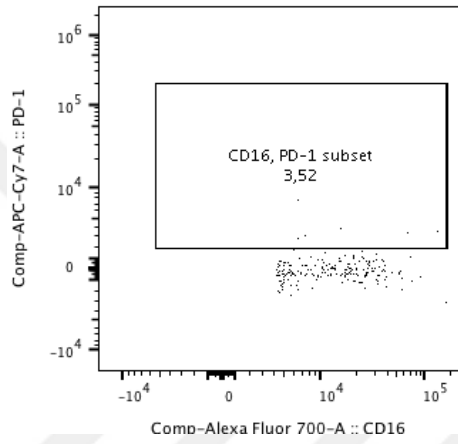
TIGIT ekspresyonu



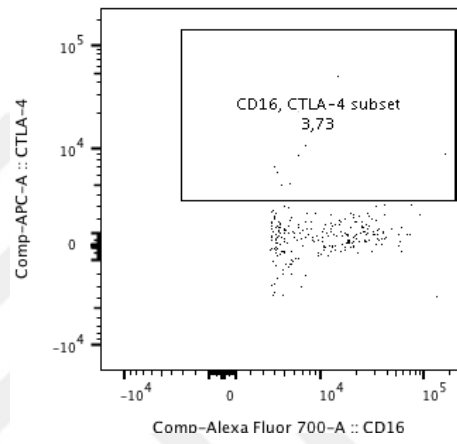
soluk/- parlak
CD56 CD16 sitotoksik NK hücre alt grubu



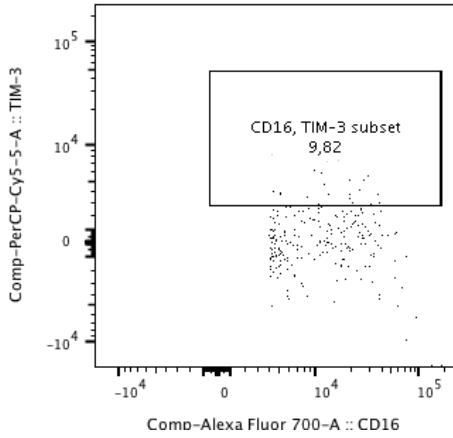
PD-1 ekspresyonu



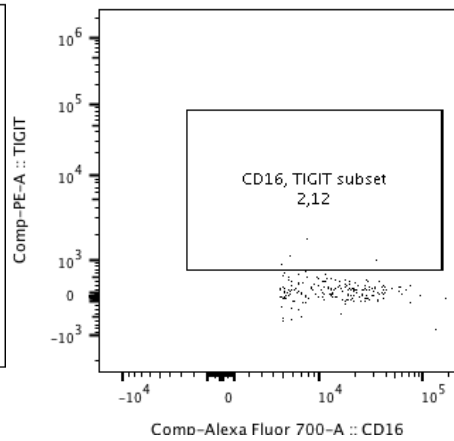
CTLA-4 ekspresyonu



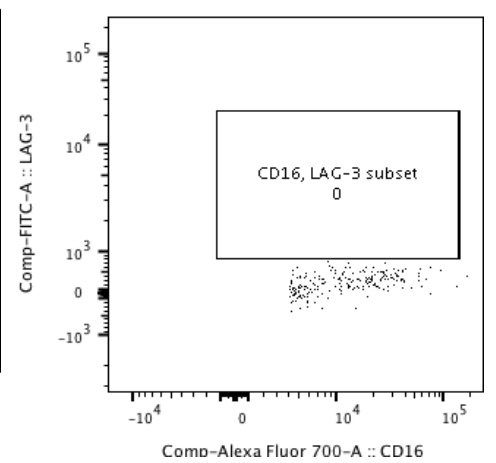
Tim-3 ekspresyonu



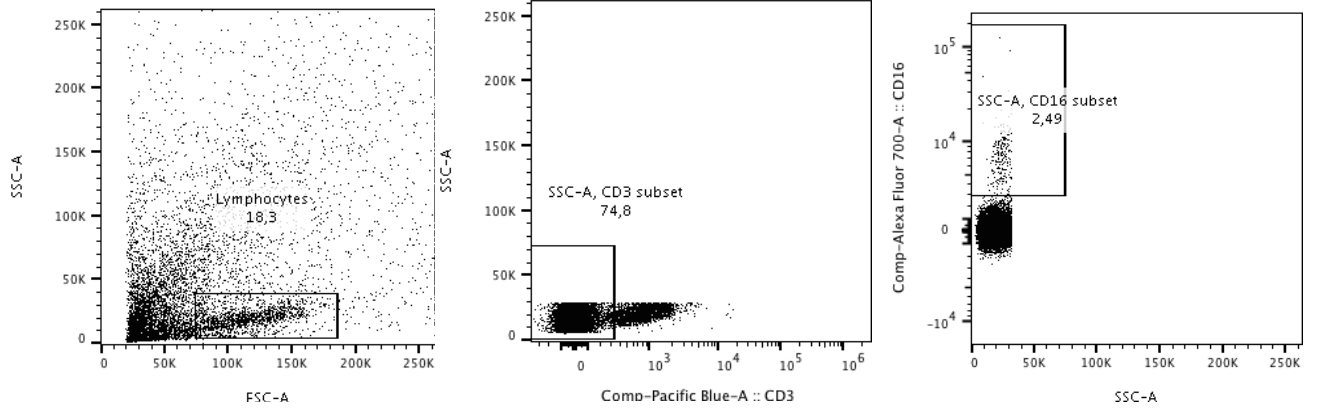
TIGIT ekspresyonu



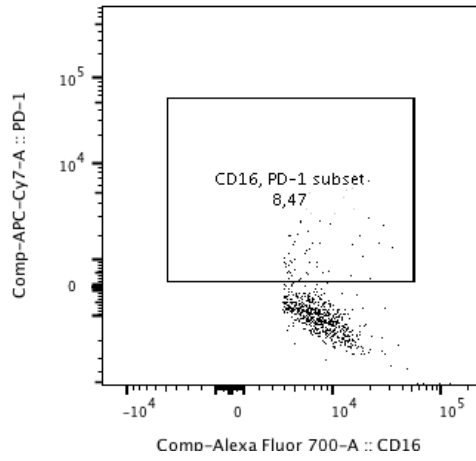
LAG-3 ekspresyonu



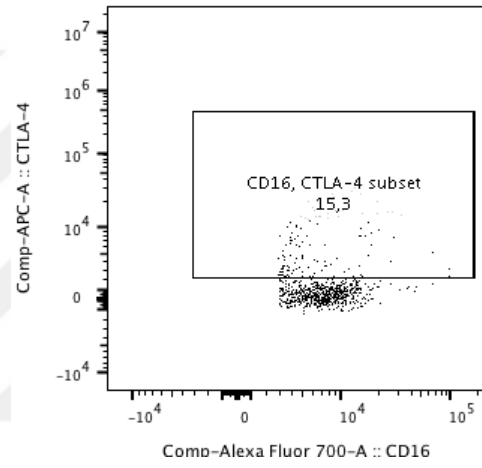
soluk/- parlak
CD56 CD16 sitotoksik NK hücre alt grubu



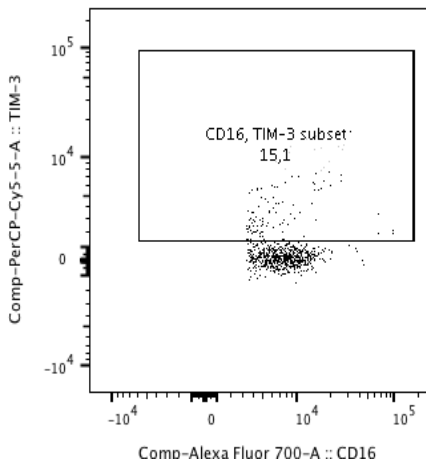
CTLA-4 ekspresyonu



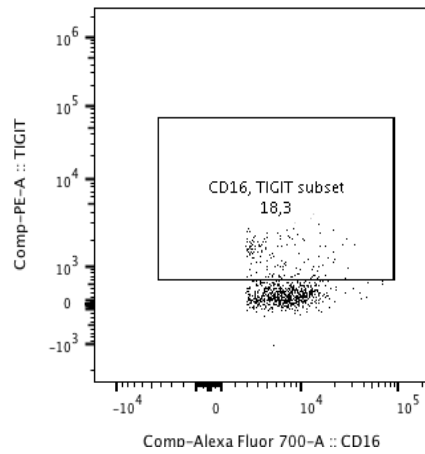
PD-1 ekspresyonu



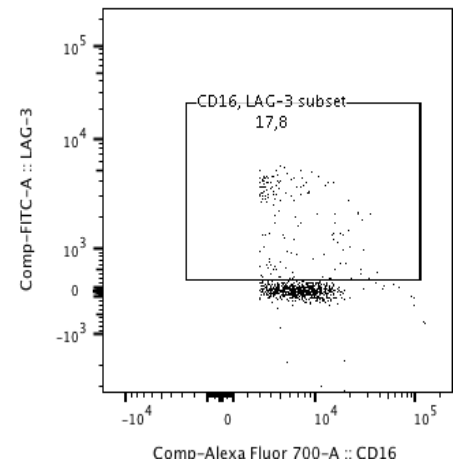
TIM-3 ekspresyonu



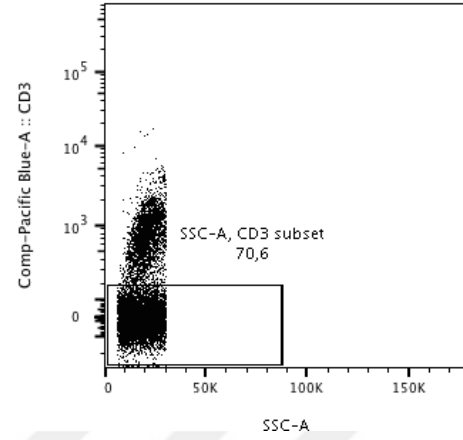
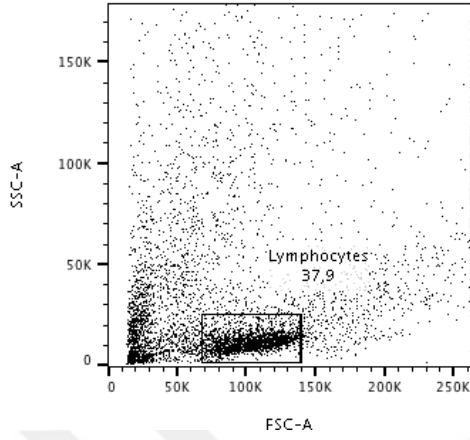
TIGIT ekspresyonu



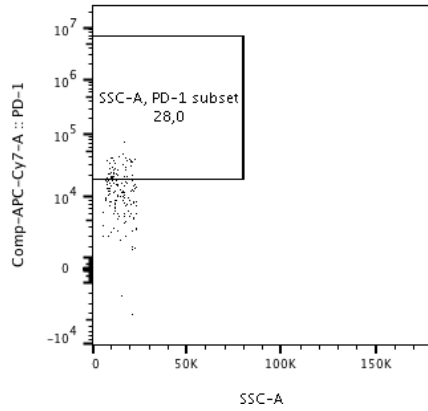
LAG-3 ekspresyonu



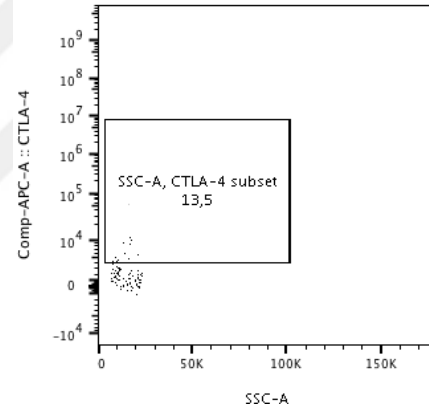
CD56^{parlak} CD16⁻ sitokin salgılayan NK hücre alt grubu



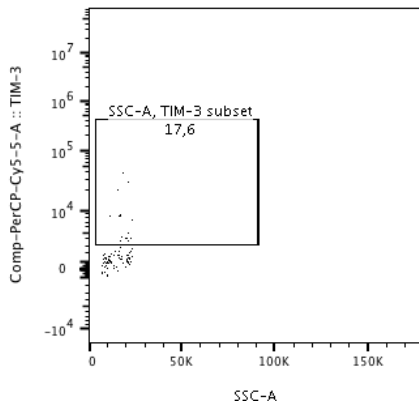
CTLA-4 ekspresyonu



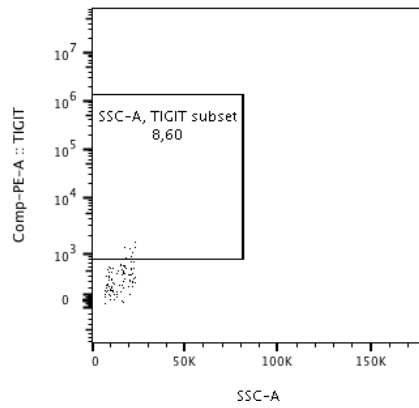
PD-1 ekspresyonu



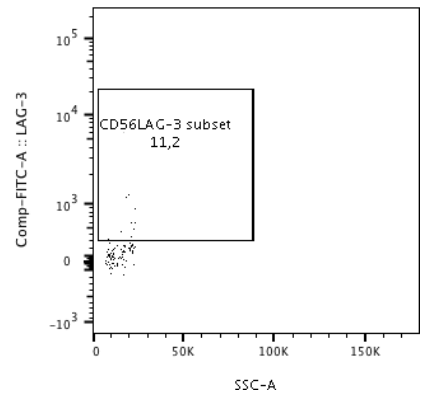
TIM-3 ekspresyonu



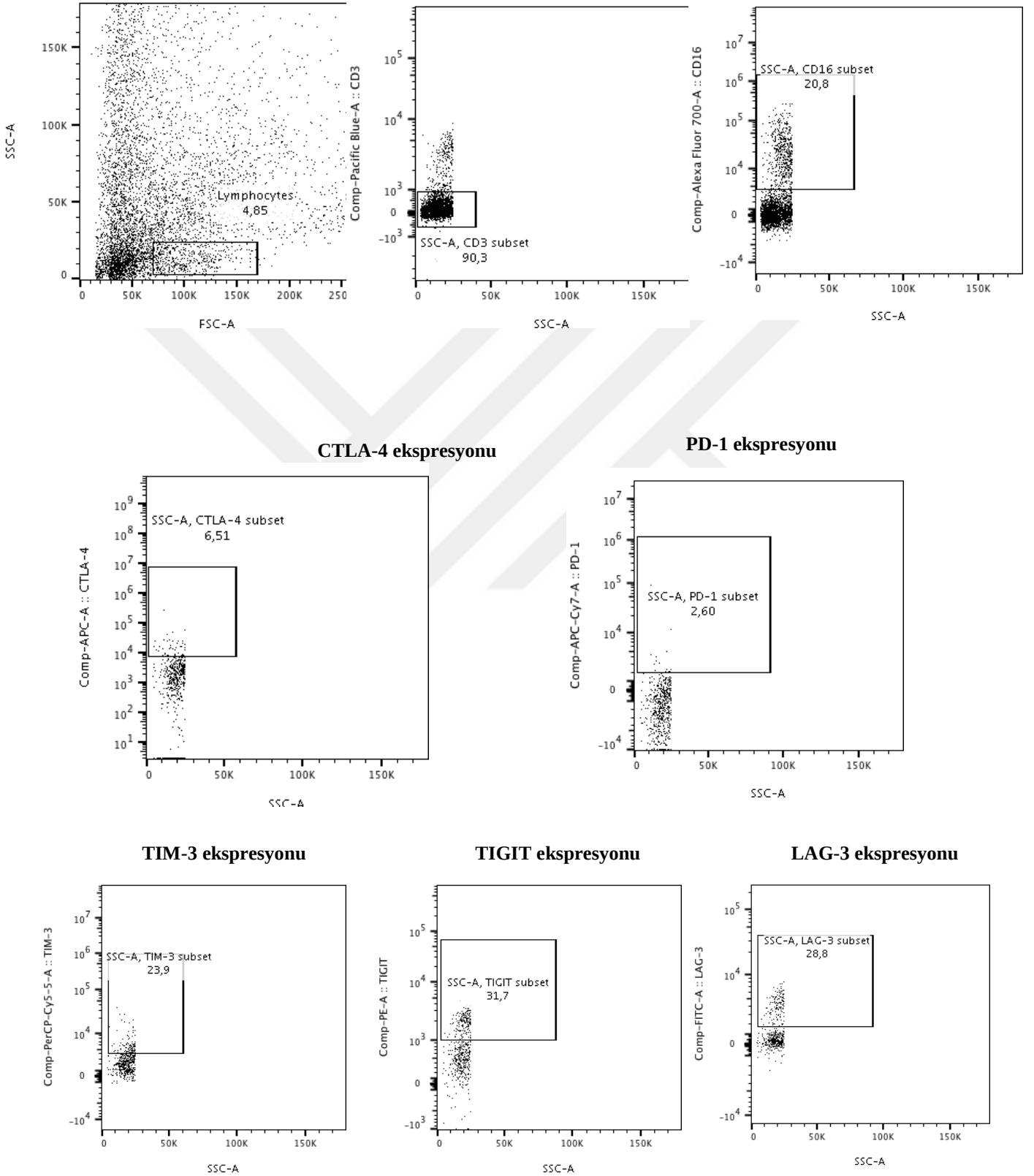
TIGIT ekspresyonu



LAG-3 ekspresyonu



soluk/-parlak
CD56 CD16 sitotoksik NK hücre alt grubu



Şekil 11. CD8 Sitotoksik T lenfosit, CD56 ve CD16 NK hücrelerinde PD-1, CTLA-4, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 Ekspresyonlarının Akan Hücre Ölçer Analizleri

TARTIŞMA

Çalışmamızda neo-adjuvan sistemik tedavi sonrası hastaların demografik, klinik ve patolojik bulguları ile tümörü infiltre eden lenfositlerdeki (TIL) immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Meme kanserinde bazı klinikopatolojik faktörler ile PDL-1 ekspresyonu arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiştir (11,76,77). Bir meta-analizde, meme tümörlerinde PDL-1 ekspresyonunun, lenf nodu metastazı, düşük nükleer grad ve negatif östrojen reseptörü durumu ile ilişkili olduğu için kötü bir prognostik faktör olduğu ortaya konulmuştur (11). Bizim çalışmamızda da benzer olarak kemoterapi sonrası T3-T4 evresinde olan olguların sitotoksik T lenfositlerinden PD-1 ekspresyonunun, T1-T2 evresinde olanlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak lenf nodu metastazı olan olguların CD56⁺ NK hücrelerinin PD-1 ölçümlerinin lenf nodu metastazı olmayanlardan daha düşük olması ilginç bir sonuç olarak ortaya çıkmıştır.

Atsuko Kitano ve arkadaşlarının immünohistokimyasal yöntem ile 1999 ve 2007 yılları arasında evre II – III invaziv meme karsinomu nedeniyle neo-adjuvan kemoterapi alan ve daha sonra ameliyat edilen 180 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada yüksek gradlı tümörlerde PDL-1 ekspresyonu yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$) (76). Ayrıca bu çalışmada, PD-1 ve PDL-1 ekspresyon seviyeleri, yüksek TIL oranı ($p < 0.0001$), tümör moleküler alt tipi ve üçlü negatif tümörler ile ilişkili bulunmuştur ($p < 0.0001$).

Laurence Buisseret ve arkadaşlarının 125 neo-adjuvan kemoterapi almamış primer meme kanserli ve 56 meme küçültme ameliyatı geçiren hastayı karşılaştıran çalışmasında; akan hücre ölçeği ve immünohistokimyasal değerlendirme ile TIL yoğunluğu, PD-1, PDL-1 düzeyleri incelenmiştir (77). Bu çalışmada yüksek PD-1/PDL-1 ekspresyonu, yüksek TIL yoğunluğu ve artmış CD4⁺ T ve B hücresi infiltrasyonu, daha agresif tümör karakteristiği (Ki-67 yüksekliği, hormon reseptör negatifliği) ile ilişkili olarak bulunmuştur. Literatürdeki

benzer çalışmalar, kötü prognostik parametrelerle immün kontrol noktası reseptörlerinin korele olduğunu, yüksek seviyelerde ekspresyon olan hastalarda prognozun kötü olabileceğini ön görmektedir. Changjun Wang ve arkadaşlarının yaptıkları meta-analizde, meme kanseri hastalarının %25.8'inde PDL-1 aşırı ekspresyonu bulunmuştur (78). Ayrıca PDL-1 pozitifliği, inazivduktal kanser ($p=0.037$), yüksek tümör derecesi ($p=0.000$), ER negatifliği ($p=0.000$), PR negatifliği ($p=0.000$), HER-2 pozitifliği ($p=0.001$), ve agresif moleküler alt tipler (HER-2 pozitif ve bazal benzeri ($p=0.000$)) gibi yüksek riskli prognostik faktörlerle ilişkilidir. Bu konunun açıklığa kavuşabilmesi için farklı hasta gruplarının uzun süreli takipli sağkalım bilgileri ile yapılmış klinik ve deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır

Cinzia Solinas ve arkadaşlarının meme kanserli hastalarda gen ekspresyonu, immünohistokimya ve akan hücre ölçer kullanılarak yapmış oldukları çalışmanın sonuçlarına göre, LAG-3 bazal tip meme kanserlerinde diğer alt tiplere oranla, HER-2 pozitif meme kanserli hastalarda lüminal alt gruplara oranla ve son olarak lüminal B hastalarda lüminal A'ya oranla daha fazla ekspresyon edilmektedir (79). Aynı çalışmada LAG-3 CD4⁺ ve CD8⁺ TIL'de düşük oranda tespit edilmiş olup, CD4⁺ veya CD8⁺ TIL'deki LAG-3 pozitiflik oranları, Ki-67, stromal TIL, global TIL, CD4⁺, CD8⁺ ve CD20⁺ yüzdesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bizim çalışmamızda yaptığımız akan hücre ölçer analizlerinde ise CD16⁺ lenfositlerde LAG-3 ekspresyonu patolojik değerlendirmede tümörün in situ komponenti pozitif olan olgularda, in situ komponenti negatif olanlardan daha fazla saptandı.

Huan Zhang ve arkadaşlarının 150 meme kanserli hasta tümörlerinde immünohistokimyasal olarak yaptıkları çalışmada ise, başka yeni bir immün kontrol noktası reseptörü olan TIM-3'ün ekspresyonu 45 yaş üstü, lenf nodu tutulumu olan ve TNM evresi yüksek olan hastalarda daha fazla bulunmuştur (sırasıyla $p=0,015$, $0,001$ ve $0,027$) (23). Bu

çalışmada, tümör infiltre eden CD8⁺ T hücre oranı lenf nodu metastazı olan, TNM evresi ve Ki-67 düzeyi yüksek olan grupta daha yüksektir (23). Bizim çalışmamızda ise bahsedilen çalışmadan farklı olarak N2-N3 evresinde olan olguların sitotoksik T lenfositlerindeki TİM-3 düzeyleri, N0-N1 evresinde olanlardan daha düşük saptandı. Ayrıca HER-2 pozitif olan hastaların TİM-3 ekspresyonu, HER-2 negatif olanlardan daha yüksekti.

Asma A. Elashi ve arkadaşlarının periferik kanda mononükleer hücrelerde PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT ve PDL-1 düzeylerini inceledikleri çalışmada, meme kanserli hastalarının (n=31) periferik kan mononükleer hücrelerinde TIM-3, TIGIT ve PDL-1 ekspresyonları sağlıklı insanlara (n=32) kıyasla anlamlı derecede yüksek ve LAG-3 ise aksine anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur (15). Ayrıca Varun Sasidharan Nair ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği genetik çalışmada meme tümörlü dokularla normal meme dokusunun karşılaştırınca PD-1, CTLA-4, TIM-3 ve LAG-3'ün meme kanserli hastalarda daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (80).

İmmün kontrol noktası reseptörleri immünoterapi için önemli bir hedef olduğundan meme kanseri dışında pek çok malignite için bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda da kanser immünolojisi hakkında literatüre yön verebilecek ve hangi noktalara odaklanılmasının yarar getireceğini aydınlayabilecek veriler ortaya konmaktadır. Örneğin Xian G Guo Duan ve arkadaşları 77 hepato-selüler kanserli (HCC) hastanın tümör dokusu ile komşu sağlam doku örneklerini incelemiş, sonuç olarak TIGIT ve CD155'in kanserli dokudaki ekspresyonu belirgin bir şekilde yüksek bulmuştur (81).

Literatürde neo-adjuvan tedavi ve tedaviye yanıtın ön görülmesinde immün kontrol noktası reseptörlerinin herhangi bir şekilde etkili olup olmadığı konusunda yapılmış çalışma sayısı çok azdır. Çalışmamızda neo-adjuvan tedavi sonrası belirgin regresyon (>%20) görülen olguların CD8⁺ ve CD56⁺ hücrelerinde TIGIT ekspresyonu, kısmi regresyon (≤%20)

görülenlerden daha yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,014$, $p=0,03$). Bu açıdan bakıldığında TIGIT düzeyi yüksek olan tümörlerde neo-adjuvan tedaviye yanıtın daha iyi olabileceği yorumu yapılabilir. Diğer bir açıdan neo-adjuvan tedavi kendi başına tümör mikroçevresinde değişikliklere yol açıp immün yanıtı da etkilediğinden kemoterapiye daha duyarlı tümörlerde TIGIT reseptörü taşıyan tümör infiltre eden hücrelerin oranının artabileceği ve bu doğrultuda bu reseptörlere karşı geliştirilen hedefe yönelik tedavilerin kemoterapi ile kombine edilerek neo-adjuvan tedaviye tam yanıt oranlarını artırabileceği de düşünülebilir. Bu konuyu netleştirmek ve soru işaretlerini gidermek için daha fazla hasta sayısı ile yapılmış prospektif klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Patolojik incelemede ilginç olarak yaygın in situ komponenti bulunan hastalarımızda CD16⁺ NK hücrelerinde CTLA-4, TIGIT, LAG-3, TIM-3 ve CD56⁺ NK hücrelerinde ise PD-1, CTLA4, TIGIT ve LAG-3 ölçümleri in situ komponent görülmeyenlerden daha yüksek tespit edildi. Bu bulguya paralel olarak Carlos R. Gil Del Alcazar ve arkadaşları meme kanserinde in situ duktal karsinomdan invaziv duktal karsinoma dönüşüm sürecinde immün kaçış mekanizmasının etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada TIGIT ekspresyonunun üçlü negatif in situ olgularda invaziv duktal kanser grubuna oranla bizim bulgularımıza benzer olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (82). TIGIT'in aksine PDL-1 ekspresyonu invaziv duktal karsinomda in situ kansere göre belirgin olarak yüksek saptanmıştır. Bu sonuçlar invaziv tümör gelişiminde önemli bir basamak olan immün kaçışın değişik immün kontrol noktası reseptörleri ile doğrudan bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (82).

Hastalarımızın menopozal durumuna göre yapılan karşılaştırmalarda CD56⁺ T lenfositlerde TIGIT ölçümleri postmenopozal olgularda daha yüksek bulundu. Ayrıca yüksek Ki-67 skorlu hastalarda CD16⁺ TIGIT düzeyleri istatistiksel anlamlılığa yakın daha yüksek değerdedir.

Feng Xu ve arkadaşlarının hücre kültüründe yaptığı çalışmada, meme kanserli hastalarda CD112R ve TIGIT blokajının trastuzumabla kombine edildiğinde NK hücre aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir (83). İleride bu tip hedefe yönelik tedavi kombinasyonlarının sıklaşacağı tahmin edilmektedir. Çalışmamızda da CD56+ ve CD16+ NK hücrelerinin immün kontrol noktası reseptörü ekspresyonları detaylı olarak incelenmiştir. Bu noktada hangi hastaların bu tip kombine tedavilerden yarar görebileceği sorusunun cevabı aranmıştır. Ji-Yeon Kim ve arkadaşları tarafından Samsung Medikal Merkezi'nde kemoterapiye tam yanıtı evre IV ve nüks meme kanseri tanılı hasta üzerinde yapılan prospektif gen analizi çalışmasında: HER-2 yüksek ekspresyonu ve daha önce taksan tedavisi öyküsü olan hastalarda, PDCD1 (PD-1), CD274 (PDL-1), CD276 (B7-H3), CTLA-4, IDO1, LAG-3, VTCN1, HAVCR2 ve TNFRSF4 (OX40) CD274(PDL*1), CTLA-4, IDO1, LAG-3 ve HAVCR2 gibi immün kontrol noktası gen ekspresyonları yüksek olarak saptanmıştır.

Hormon reseptör durumunun ve meme kanseri moleküler alt tiplerinin immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonunu etkilemediği görüldü (84). Bu sonuca göre taksan tedavisinin kanser immün çevresini modifiye edebileceği görülmüştür. Aynı zamanda HER-2 ekspresyon düzeyinin metastatik meme kanserli hastalarda immün kontrol noktası reseptörlerinin düzeyi ile pozitif korele olduğu saptanmıştır (84). Çalışmalar yeni nesil immün kontrol noktası reseptörlerinin PDL-1 ve CTLA-4 gibi uzun yıllardır bilinen ve monoklonal antikorlarının tedavide kullanıldığı immün kontrol noktası reseptörleri ile korele olduğunu göstermektedir (84). Bu sonuç anti-PDL-1 ve anti CTLA-4 tedavileri ile beraber kullanılacak yeni nesil immün kontrol noktası reseptörlerine yönelik monoklonal antikorların tedavi yanıtlarını artırabileceği umudunu doğurmaktadır.

SONUÇLAR

Bu prospektif klinik çalışmamızda ileri evre ve genç (<50 yaş) meme kanserli hastaların yanısıra kemoterapiye daha iyi cevaplı ve yaygın in situ komponentli olgularda immün kontrol nokta ekspresyonları daha yüksek düzeyde bulunduğundan, immün kontrol noktası inhibitörleri kullanımı yoluyla immünoterapötik yaklaşımlardan daha fazla yararlanabileceği görülmektedir.

Ayrıca neo-adjuvan kemoterapi, tedaviye alınan yanıtla ilişkili olarak tümör infiltre eden lenfositleri indüklemektedir. Bu mekanizma nedeniyle kemoterapiyle kombine immünoterapi modalitelerinin tek başına kemoterapiye kıyasla sistemik tedavi cevabını artırarak daha etkin bir terapötik etki yarattığı düşünülmektedir.

REFERANSLAR

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108. (PMID: 15761078)
2. T.C. Sağlık Bakanlığı sağlık istatistikleri yılı 2015.ss.40. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/31096,turkcesiydijiv1pdf.pdf?0>
3. Ozmen V, Ozmen T, Dogru V. Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. *Eur J Breast Health*. 2019 Jul 1;15(3):141-146. doi: 10.5152/ejbh.2019.4890. eCollection 2019 Jul. *Eur J Breast Health*. 2019 Oct 01;15(4):276.PMID: 31312788
4. Muss HB. Breast Cancer and Differential Diagnosis of Benign Lesions, “Cecil Medicine International Edition” (Ed: Goldman L, Ausiello D). Saunders Elsevier. Philadelphia. 2008;208:1501-9.
5. Muenst, S.; Schaerli, A.R.; Gao, F.; Däster, S.; Trella, E.; Droeser, R.A.; Muraro, M.G.; Zajac, P.; Zanetti, R.; Gillanders, W.E.; et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014, 146, 15–24. [CrossRef] [PubMed]
6. Cimino-Mathews, A.; Thompson, E.; Taube, J.M.; Ye, X.; Lu, Y.; Meeker, A.; Xu, H.; Sharma, R.; Lecksell, K.; Cornish, T.C.; et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum. Pathol.* 2016, 47, 52–63. [CrossRef] [PubMed]
7. Butte, M.J.; Peña-Cruz, V.; Kim, M.J.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol. Immunol.* 2008, 45, 3567–3572. [CrossRef] [PubMed]
8. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027–34. 5. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007;19:813–24.
9. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800.
10. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2014;2:361–70.
11. Guo Y, Yu P, Liu Z, et al. Prognostic and clinicopathological value of programmed death ligand-1 in breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2016;11:e0156323.
12. Feng Xu^{1,2} · Alexander Sunderland¹ · Yue Zhou^{1,3} · Richard D. Schulick¹ · Barish H. Edil¹ · Yuwen Zhu¹ Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol Immunother* (2017) 66:1367–1375

13. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, Tom I, Ivelja S, Refino CJ, Clark H, Eaton D, Grogan JL (2009) The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 10(1):48–57. doi:10.1038/ni.1674
14. Johnston RJ, Yu X, Grogan JL (2015) The checkpoint inhibitor TIGIT limits antitumor and antiviral CD8⁺ T cell responses. *Oncoimmunology* 4(9):e1036214. doi:10.1080/2162402x.2015.1036214
15. Asma A. Elashi , Varun Sasidharan Nair , Rowaida Z. Taha , Hibah Shaath , and Eyad Elkord , DNA methylation of immune checkpoints in the peripheral blood of breast and colorectal cancer patients : *ONCOIMMUNOLOGY* 2019, VOL. 8, NO. 2, e1542918 (9 pages) <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1542918>
16. Woo, S. R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., et al. (2012). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 72, 917–927.
17. References Anderson, A.C., 2014. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. *Cancer Immunol. Res.* 2, 393–398, <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0039>.
18. Hastings, W.D., Anderson, D.E., Kassam, N., Koguchi, K., Greenfield, E.A., Kent, S.C., Xin, X.Z., Strom, T.B., Hafler, D.A., Kuchroo, V.K., 2009. TIM-3 is expressed on activated human CD4⁺ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 39, 2492–2501, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200939274>.
19. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., Anderson, A.C., 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207, 2187–2194, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20100643>.
20. Burugu, S.; Gao, D.; Leung, S.; Chia, S.K.; Nielsen, T.O. LAG-3⁺ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: Clinical correlates and association with PD-1/PD-L1⁺ tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med Oncol.* 2017, 28, 2977–2984. [CrossRef]
21. Anderson AC: Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 24: 213-216, 2012.
22. Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar R, Karman J, Su EW, Hirashima M, *et al*: Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 318: 1141-1143, 2007.
23. Huan Z, Rong X, Bin W, Jinlong L, Guilin L, T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in invasive ductal breast carcinoma: Clinicopathological correlations and association with tumor infiltration by cytotoxic lymphocytes . *MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY* 7: 557-563, 2017

24. Hoover R. Breast Cancer :Geographic,Migrant ,And Time –Trend Patterns.In :Fortner JSP,ed.Accomplishments in cancer research .New York :Lippincott –Raven; 403-25:1996.
25. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Polack 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)
26. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752.
27. Ignatiadis M, Bedard P, HaibeKains B, Singhal S, Loi S, Criscitiello C, et al. A meta analysis of gene expression profiling studies identifies clinically relevant oncogenic pathways in basal like breast cancer. *Cancer Res* 2009;69:106.
28. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Res* 2011;13:221.
29. Fu X, Osborne CK, Schiff R. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer.
30. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 2014;5(3):412-24
31. 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)
32. Silva OE, Zurida S. Stage III disease In Breast Cancer. A Practical Guide 3rd edition, Elsevier Saunders, Toronto,2005:230-237.
33. Burstein HJ, Harris JR, Morrow M. Malignant Tumors of the Breast. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008:1606-1645
34. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FI, Trotti A (Eds). *Breast in AJCC Cancer Staging Manual*. Seventh Edition. Springer, Chicago, IL 2010:345-377.
35. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an international TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26:259–71.
36. Finn OJ. Human tumor antigens, immunosurveillance, and cancer vaccines. *Immunol Res* 2006;36:73-82
37. Burnett FM, Wiad Lek. Nobel prize for F.M Burnett and P. B Medavar in 1960 for discovery of acquired immunological tolerance 1969 Mar 1; 22(5): 505-506
38. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *J Immunol*, 2007 ; 121; 1-14

39. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-8.
40. Srivastava P.K. Kansere Karşı İmmünite. In: Male D, Brostoff J, Roth D.B, Roitt I (Ed.). İmir T. (Çeviri Ed.). İmmünoloji. İstanbul: Palme Yayıncılık, 2008; 401-419.
41. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-9.
42. Keir, M.E. et al. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704
43. Ishida, Y. et al. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895
44. Latchman, Y. et al. (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268
45. Tseng, S.Y. et al. (2001) B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193, 839–846
46. Butte, M.J. et al. (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111–122
47. Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma cells control anti-melanoma CTL responses via interaction between TIGIT and CD155 in the effector phase. *J Invest Dermatol.* 2016;136:255–63.
48. Thibult, M.L. et al. (2013) PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int. Immunol.* 25, 129–137
49. Yu, X. et al. (2009) The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 48–57
50. Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. TIGIT: a key inhibitor of the Cancer immunity cycle. *Trends Immunol.* 2017;38:20–8.
51. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 2003;198:557–67.
52. Liu XG, Hou M, Liu Y. TIGIT, A Novel therapeutic target for tumor immunotherapy. *Immunol Investig.* 2017;46:172–82.
53. Hofmeyer, K.A. et al. (2011) The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 451694
54. He W, Zhang H, Han F, Chen X, Lin R, Wang W, et al. CD155/TIGIT signaling regulates CD8(+) T-cell metabolism and promotes tumor progression in human gastric Cancer. *Cancer Res.* 2017;77:6375–88.

55. Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma cells control anti-melanoma CTL responses via interaction between TIGIT and CD155 in the effector phase. *J Invest Dermatol.* 2016;136:255–63.
56. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2015;125:2046–58.
57. Guillerey C, Harjunpaa H, Carrie N, Kassem S, Teo T, Miles K, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood.* 2018;132:1689–94.
58. Workman, C.J.; Rice, D.S.; Dugger, K.J.; Kurschner, C.; Vignali, D.A. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur. J. Immunol.* 2002, 32, 2255–2263. [CrossRef]
59. Maruhashi, T.; Okazaki, I.M.; Sugiura, D.; Takahashi, S.; Maeda, T.K.; Shimizu, K.; Okazaki, T. LAG-3 inhibits the activation of CD4(+) T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat. Immunol.* 2018, 19, 1415–1426. [CrossRef] [PubMed]
60. Liang, B.; Workman, C.; Lee, J.; Chew, C.; Dale, B.M.; Colonna, L.; Flores, M.; Li, N.; Schweighoffer, E.; Greenberg, S.; et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* 2008, 180, 5916–5926. [CrossRef] [PubMed]
61. Huard, B.; Tournier, M.; Triebel, F. LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human. *Immunol. Lett.* 1998, 61, 109–112. [CrossRef]
62. Graydon, C.G.; Balasko, A.L.; Fowke, K.R. Roles, function and relevance of LAG3 in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2019, 15, e1007429. [CrossRef] [PubMed]
63. Wang, Y.; Dong, T.; Xuan, Q.; Zhao, H.; Qin, L.; Zhang, Q. Lymphocyte-Activation Gene-3 Expression and Prognostic Value in Neoadjuvant-Treated Triple-Negative Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 2018, 21, 124–133. [CrossRef]
64. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536–41.
65. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010;207:2187–94.
66. Gao X, Zhu Y, Li G, et al. Tim-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One* 2012;7:e30676.
67. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2003;4:1102–10.

68. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008;205:2763–79.
69. Ngiow SF, von Scheidt B, Akiba H, *et al.* Anti-TIM3 Antibody Promotes T Cell IFN- γ -Mediated Antitumor Immunity and Suppresses Established Tumors. *Cancer Research* 2011;71:3540–51.
70. Koyama S, Akbay EA, Li YY, *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016;7.
71. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010;207:2187–94.
72. Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer- immunity cycle. *Immunity* 39(1): 1-10.
73. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, *et al.* (1991) Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 co stimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 173(3): 721-730
74. Salamon B, Bluestone JA: Complexities of CD28/B7: CTLA4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Ann Rev Immunol* 2001;19:225-252.
75. Adams S, Schmid P, Rugo HS, *et al.* Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A. *J Clin Oncol.* 2017; 35 [suppl; abstr 1008].
76. Kitano A, Ono M, Yoshida M, *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open* 2017;2:e000150. doi:10.1136/esmoopen-2016-000150
77. Laurence Buisseret, Soizic Garaud, Alexandre de Wind, Gert Van den Eynden, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer , *ONCOIMMUNOLOGY* 2017, VOL. 6, NO. 1, e1257452 (13 pages) <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1257452>
78. Changjun Wang, Hanjiang Zhu, Yidong zhou, Feng Mao, Yan Lin *et al.* Prognostic Value of PD-L1 in Breast Cancer: A Meta-Analysis ; 2017 Wiley Periodicals, Inc., 1075-122X/17 The Breast Journal, 2016 1–8
79. Cinzia Solinas, Edoardo Migliori , Pushpamali De Silva and Karen Willard-Gallo. LAG3: The Biological Processes That Motivate Targeting This Immune Checkpoint Molecule in Human Cancer 2019 Aug
80. Varun Sasidharan Nair, Haytham El Salhat, Rowaida Z. Taha, Anne John, Bassam R. Ali and Eyad Elkord, DNA methylation and repressive H3K9 and H3K27 trimethylation in the promoter regions of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, and PD-L1 genes in human primary breast cancer : Sasidharan Nair *et al.* *Clinical Epigenetics* (2018) 10:78 <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0512-1>

81. XianGGuo D1uan, JuanXi liu, JianJian cui, BIN MA, QIUNAN ZHOU, XiaoJuan YanG, ZHENHUI LU, YonG du and CHUNXIA SU, Expression of TIGIT/CD155 and correlations with clinical pathological features in human hepatocellular carcinoma : Molecular Medicine rePorTS 20: 3773-3781, 2019 , DOI: 10.3892/mmr.2019.10641
82. Carlos R. Gil Del Alcazar, Sung Jin Huh, Muhammad B. Ekram, et al. *Cancer Discov* 2017;7:1098-1115. Published OnlineFirst June 26, 2017.
83. Feng Xu, Alexander Sunderland, Yue Zhou, Richard D. Schulick, Barish H. Edil, Yuwen Zhu, Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions; *Cancer Immunol Immunother* (2017) 66:1367–1375 DOI 10.1007/s00262-017-2031-x
84. Ji-Yeon Kim, Eunjin Lee, Kyunghee Park, Woong-Yang Park, Hae Hyun Jung, Jin Seok Ahn, Young-Hyuck Im and Yeon Hee Park, Immune signature of metastatic breast cancer; Identifying predictive markers of immunotherapy response; www.impactjournals.com/oncotarget ,2017, Vol.8, (No. 29), pp:47400-47411

EK 1 : Etik Kurul Onay Formu.

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1539

Tarih : 28.12.2017

Konu: Prof. Dr. Vahit ÖZMEN hk.

**Sayın Prof. Dr. Vahit ÖZMEN
Genel Cerrahi Anabilim Dalı**

İlgi : Genel Cerrahi Anabilim Dalının 01/12/2017 gün ve 451433 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Aykhan Abbasov' un yürüteceği 2017/1483 dosya numaralı "Lokal ileri meme kanserli hastalarda neoadjuvan kemoterapi sonrası PDL-1, TIGIT, LAG-3, TIM-3 gibi immun kontrol mekanizma reseptörlerinin akan hücre ölçerle ekspresyonunun araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 22/12/2017 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

**İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Aykhan Abbasov

Doğum Tarihi/ Doğum yeri: 27.07.1990 Azerbaycan

E-mail : Dr.ayxan.abbasov@gmail.com

Telefon : 05073967917

Bölümü: Genel Cerrahi

Medeni Durum: Evli

Yabancı Dil: İngilizce, Rusca

Eğitimi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi (2009-2014), İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı (2014-2019)

Çalıştığı Kurumlar: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi-, İstanbul, 2014-2019