

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı



**Meme Karsinomlarında CTLA-4, PD-1 ve LAG-3
Ekspresyonları ile Tümör İçi Lenfosit Skorunun
Prognosta Etkisi**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sidar BAĞBUDAR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Semen ÖNDER

İSTANBUL

2020

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakóltesi
Patoloji Anabilim Dalı

Meme Karsinomlarında CTLA-4, PD-1 ve LAG-3
Ekspresyonları ile Tümör İçi Lenfosit Skorunun
Prognosa Etkisi

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sidar BAĞBUDAR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Semen ÖNDER

İSTANBUL
2020

Bu tez alışması İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No: 35065)

TEŞEKKÜR

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde ilgi, destek ve deneyimlerinden yararlandığım, başta Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sn. Prof. Dr. Bilge BİLGİÇ olmak üzere, bilgi ve tecrübelerini aktaran tüm hocalarım ve uzmanlarıma,

Tezimin ve eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocam, tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Semen ÖNDER'e,

Gölgesinin ışığı bile minnettar olmamı sağlayacakken tezimin tüm aşamalarında kutup yıldızı olup yolumu aydınlatan, değerli hocam Sn. Prof. Dr. Ekrem YAVUZ'a,

Klinik bilgilere ulaşmamda bana yol gösteren İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde görevli Sn. Prof. Dr. Hasan KARANLIK, istatistiksel değerlendirmeye kıymetli katkıları ve klinik bilgilere ulaşmamda yardımlarından dolayı İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda görevli Sn. Prof. Dr. Neslihan CABIÖĞLU, çalışmamın istatistik danışmanlığını yapan Sn. Atilla BOZDOĞAN ve istatistiksel değerlendirmeye kıymetli katkılarından ötürü İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda görevli Sn. Prof. Dr. M. Yasemin ÖZLÜK'e,

Tez sürecimin her anında bana dayanak olup tezimin her cümlesinde emeği olan Sn. Uz. Dr. Hüseyin KARATAY, Sn. Uz. Dr. Ecem SÜNNETÇİOĞLU ve Sn. Dr. Ali Yılmaz ALTAY'a,

Önerileriyle tezime katkıda bulunan, Sn. Uz. Dr. Çağla Şafak KARAOĞLAN ve Sn. Dr. Özge HÜRDOĞAN'a,

Teknik çalışmalarındaki yardımlarından ötürü Sn. Mehmet Ali DOĞAN, Sn. Jülide HOCAOĞLU, Sn. Derya ŞAHİN ve Sn. Ergin CANTÜRK'e,

Arşiv çalışmalarındaki katkılarından dolayı Sn. Balabey KALAÇA ve Sn. Necati ÜZÜM'e,

Düşleyemeyeceğim kadar güzel bir ortamda asistanlık yapmamı sağlayan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan, başta hayattaki en değerli varlığım annem olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
GRAFİK LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
RESİM LİSTESİ	xi
BÖLÜM I.....	xii
I. ÖZET	xii
II. ABSTRACT	xv
BÖLÜM II.....	1
I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
MEME VE İMMÜNİTE	3
A. Meme Embriyolojisi ve Pubertede Meme Gelişimi	3
B. Memenin Anatomik Özellikleri, İşlevsel ve Yapısal Histolojik Özellikleri	4
C. İmmün Sistemin Genel Özellikleri ve Normal Meme Dokusunda İmmün Sistem	4
D. Meme Karsinomlarının Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Meme Karsinomu ile İlişkili Sendromlar	5
E. Meme Karsinomlarında Gradlama.....	7
F. Meme Karsinomlarında Evreleme	8
G. Meme Karsinomlarında Moleküler Özellikler ve Gen Ekspresyon Profili	12
H. Meme Tümörleri Sınıflaması	13
İ. Meme Karsinomlarında İmmünite	15
İ1. Doğal Lenfoid Hücreler	16
İ2. Miyeloid Hücreler	17

İ3. Efektör Moleküller.....	18
İ4. B Hücreleri.....	19
İ5. T Hücreleri	19
İ6. Meme Karsinomlarında İmmüitenin Değerlendirilmesi	20
J. Çalışmada Kullanılan İmmühistokimyasal Belirteçler ile İlgili Genel Bilgiler	21
J1. CTLA-4.....	21
J2. PD-1	22
J3. LAG-3.....	23
BÖLÜM III	26
GEREÇ VE YÖNTEM	26
I. Çalışma Olgularının Belirlenmesi ve Hazırlanması	26
II. Doku Microarray Yöntemi İçin Blokların Hazırlanması.....	26
III. İmmühistokimyasal Yöntem	27
III.A. CTLA-4 ile immühistokimyasal boyama	27
III.B. PD-1 ile immühistokimyasal boyama.....	28
III.C. LAG-3 ile immühistokimyasal boyama	28
IV. İmmühistokimyasal Değerlendirme	29
IV.A. CTLA-4	29
IV.B. PD-1.....	29
IV.C. LAG-3	29
V. Biyoistatistiksel analiz.....	30
BÖLÜM IV	31
BULGULAR	31
I. Demografik, Klinik ve Histopatolojik Özellikler	31
II. Hastalıksız Sağ Kalım, Hastalık Spesifik Sağ Kalım ve Genel Sağ Kalım Özellikleri...	34
III. Histomorfolojik ve İmmühistokimyasal İnceleme Bulguları.....	37
III.A. Histomorfolojik inceleme bulguları	37

III.B. İmmünohistokimyasal inceleme bulguları.....	40
III.B.1. CTLA-4 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları	40
III.B.1.A. Lenfositlerde CTLA-4 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları.....	40
III.B.1.A.1. Lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi.....	41
III.B.1.A.2. Lenfositlerde CTLA-4 boyanma şiddeti	41
III.B.1.A.3. Lenfositlerde CTLA-4 boyanma yüzdesi	41
III.B.1.B. Tümör hücrelerinde CTLA-4 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları	44
III.B.2. Lenfositlerde PD-1 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları	44
III.B.2.A. Lenfositlerde PD-1 pozitivitesi.....	45
III.B.2.B. Lenfositlerde PD-1 boyanma şiddeti	46
III.B.2.C. Lenfositlerde PD-1 boyanma yüzdesi	47
III.B.3. Lenfositlerde LAG-3 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları	48
III.B.3.A. Lenfositlerde LAG-3 pozitivitesi.....	49
III.B.3.B. Lenfositlerde LAG-3 boyanma şiddeti	50
III.B.3.C. Lenfositlerde LAG-3 boyanma yüzdesi	50
III.B.4. CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 immünohistokimyasal boyanmalarının birbirleri ile ve tümör içi lenfosit yüzdesi ile ilişkisi	52
III.C. Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları	52
BÖLÜM V.....	54
TARTIŞMA	54
BÖLÜM VI	62
SONUÇLAR	62
BÖLÜM VII.....	64
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ	77

KISALTMALAR

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ALND: Aksiller lenf nodu disseksiyonu

ASH: Antijen sunan hücre

Breg: Regülatör B hücreleri

BŞT: Başka bir şekilde tanımlanmamış

CTLA-4: Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4

DLH: Doğal lenfoid hücreler

DMA: Doku microarray

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)

GS: Genel sağ kalım

HDF: Host defans faktör

HE: Hematoksilen-eozin

HER2/cerbB2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HS: Hastalıksız sağ kalım

HSS: Hastalık spesifik sağ kalım

İSDK: İn situ duktal karsinom

İSLK: İn situ lobüler karsinom

LAG-3: Lenfosit aktivasyon geni 3

LNS: Lokal nüksüz sağ kalım

LVİ: Lenfovasküler invazyon

MHC: Majör histokompatibilite kompleksi

MKC: Meme koruyucu cerrahi

ÖR: Östrojen reseptörü

PD-1: Programlı hücre ölüm proteini-1

PD-L1: Programlı hücre ölüm proteini ligandı-1

PD-L2: Programlı hücre ölüm proteini ligandı-2

PR: Progesteron reseptörü

qPCR: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

SLNB: Sentinel lenf nodu biyopsisi

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TİL: Tümör içi lenfosit

TDLU: Terminal duktal lobüler ünite

TGF- α : Transforming growth factor alfa

TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1

THR: T hücre reseptörü

Treg: Regülatör T hücreleri



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Histolojik gradlama.....	7
Tablo 2: Mitoz sayısı için belirlenen eşik değerler	8
Tablo 3: Primer Tümör Sınıflaması (T) – Klinik ve Patolojik	8
Tablo 4: Bölgesel lenf nodu sınıflaması – Klinik (cN)	9
Tablo 5: Bölgesel lenf nodu sınıflaması – Patolojik (pN).....	10
Tablo 6: Uzak metastaz sınıflaması – (M)	11
Tablo 7: Evreleme grupları.....	11
Tablo 8: Meme karsinomu moleküler sınıflaması.....	13
Tablo 9: DSÖ-2019 Meme Tümörleri Sınıflaması.....	14
Tablo 10: Meme Karsinomunda TİL Değerlendirmesi - ‘International TILs Working Group 2014’ Önerileri	20
Tablo 11: Çalışmada kullanılan immünohistokimyasal belirteçlere ait ayrıntılı bilgiler	29
Tablo 12: Hastaların demografik, klinik ve histopatolojik özellikleri	32
Tablo 13: İmmünohistokimyasal boyanma yüzdelerinin birbirleriyle ve tümör içi lenfosit yüzdesiyle olan ilişkisi	52
Tablo 14: Lokal nüksüz sağ kalıma etki eden faktörler (Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları).....	53
Tablo 15: Hastalıksız sağ kalıma etki eden faktörler (Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları).....	53
Tablo 16: Hastalık spesifik sağ kalıma etki eden faktörler (Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları).....	53

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Olgularda evre ve hastalıksız sağ kalım ilişkisi	36
Grafik 2: Olgularda evre ve hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi	36
Grafik 3: Olgularda tümör içi lenfosit yüzdesi ve hastalıksız sağ kalım ilişkisi	39
Grafik 4: Olgularda tümör içi lenfosit yüzdesi ve hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi	39
Grafik 5: Nüks/metastaz varlığında en uygun lenfosit CTLA-4 pozitif eşik değeri (ROC analiz sonuçları).....	42
Grafik 6: Olgularda lenfositlerde CTLA-4 yüzdesi ve hastalıksız sağ kalım ilişkisi	43
Grafik 7: Olgularda lenfositlerde CTLA-4 yüzdesi ve hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi	43
Grafik 8: PD-1 boyanma şiddeti ile hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi	47
Grafik 9: Nüks/metastaz varlığında en uygun lenfosit PD-1 pozitif eşik değeri (ROC analiz sonuçları).....	48
Grafik 10: LAG-3 yüzdesi ile hastalıksız sağ kalım ilişkisi	51
Grafik 11: LAG-3 yüzdesi ile hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Host defans faktör ile tümör içi lenfosit skoru ilişkisi 37



RESİM LİSTESİ

Resim 1: Doku microarray yöntemi	27
Resim 2: A. Nöroendokrin diferansiyasyon gösteren invaziv duktal karsinom (İTF Patoloji AD 14164-12) B. Pleomorfik tipte invaziv lobüler karsinom (İTF Patoloji AD 14545-13) C. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom (İTF Patoloji AD 21193-13) D. Metaplastik karsinom (İTF Patoloji AD 32841-13) E. Apokrin karsinom (İTF Patoloji AD 34331-10) F. Medüller karsinom (İTF Patoloji AD 36176-10) (A-F, HE x200)	33
Resim 3: CTLA-4 immünohistokimyasal incelemesi A. Tümörde ve lenfositlerde boyanma yok (İTF Patoloji AD 11193-09) B. Lenfositlerin %1'inde zayıf boyanma (İTF Patoloji AD 3862-09) C. Lenfositlerin %3'ünde orta şiddette boyanma (İTF Patoloji AD 16333-13) D. Lenfositlerin %10'unda kuvvetli boyanma (İTF Patoloji AD 36176-10) (A-D, CTLA-4 x400)	40
Resim 4: PD-1 immünohistokimyasal incelemesi A. Lenfositlerde boyanma yok (İTF Patoloji AD 4757-09) B. Lenfositlerin %2'sinde zayıf boyanma (İTF Patoloji AD 36813-11) C. Lenfositlerin %8'inde orta şiddette boyanma (İTF Patoloji AD 31417-12) D. Lenfositlerin %30'unda kuvvetli boyanma (İTF Patoloji AD 22851-13) (A-D, PD-1 x400)	45
Resim 5: LAG-3 immünohistokimyasal incelemesi A. Lenfositlerde boyanma yok (İTF Patoloji AD 17718-12) B. Lenfositlerin %2'sinde zayıf boyanma (İTF Patoloji AD 20570-09) C. Lenfositlerin %5'inde orta şiddette boyanma (İTF Patoloji AD 2542-10) D. Lenfositlerin %50'sinde kuvvetli boyanma (İTF Patoloji AD 33417-11) (A-D, LAG-3 x400)	49

BÖLÜM I

I. ÖZET

Amaç: İnvaziv meme karsinomu tüm dünyada kadınlarda en sık görülen kanser olup kansere bağlı ölümlerde 4. sırada yer almaktadır. Bu sebeple hastalığın klinik gidişinin belirlenmesi son derece önemlidir. Klinik gidişin ve hastaya uygun tedavinin belirlenmesi amacıyla her meme karsinomu olgusunda histolojik grad, hastalık evresi, histolojik ve moleküler alt tip tayini yapılmaktadır. Günümüzde tedaviye yön verecek alternatif seçenekler aranmaya çalışılmaktadır. Bu seçeneklerden biri de tümöre yanıt olabilecek immün sistem üzerinden yürümektedir. İmmün yanıtı oluşturan elemanlar -tümör içi lenfositler (TİL) başta olmak üzere- hastalık prognozunu ve immünoterapi için hasta uygunluğunu belirlemede önemli biyobelirteçlerdir. Bu sebeple TİL skorlaması, rutin histopatolojik raporlamanın bir parçası olmalıdır. İmmün kontrol noktası moleküllerinden biri olan sitotoksik T lenfosit antijen 4'ün (CTLA-4) meme kanserinde ekspresyonunun fazla olması kötü prognoz belirteci olarak tespit edilmiştir. Tümör mikroçevresindeki lenfositlerde CTLA-4 ekspresyonunun fazla olması ise, eğer tümörde ekspresyon düşükse iyi prognozla ilişkili bulunmuştur. B7/CD28 ko-faktör ailesinin üyesi bir transmembran proteini olan programlı hücre ölüm proteini-1 (PD-1), ligandları PD-L1 ve PD-L2 ile etkileşime geçtiğinde anti-tümör T hücre aktivitesini baskılar ve tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştırır. Yapılan çalışmaların çoğunda meme kanserinde lenfositlerdeki PD-1 pozitivitesi -bazı çelişkili çalışmalar olmakla birlikte- iyi klinik gidiş ile ilişkilendirilmiştir. Hatta bazı çalışmalarda lenfositlerdeki PD-1 pozitivitesinin bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Diğer bir immün kontrol noktası moleküllerinden biri olan lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) eksprese eden hücreleri azaltmayı hedefleyen anti-LAG-3 antagonistleri, otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra sonraki klinik gelişmeler kanser immünoterapisinde de kullanılabileceğinin anlaşılmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda meme kanserindeki LAG-3 pozitivitesinin genel ve hastalıksız sağ kalımı arttırdığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda geçmişte host defans faktörü (HDF) pozitif bulunmuş olgularda TİL skoru oluşturarak, TİL skoru, CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 ekspresyonlarının prognoz ile ilişkisini belirlemeyi ve bu belirteçleri kullanarak prognozu öngörmeyi amaçlamaktayız.

Gereç ve Yöntem: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Genel Cerrahi servisi arşiv kayıtlarından, Ocak

2009-Aralık 2013 tarihleri arasında meme tümörü nedeniyle opere olmuş hasta kayıtlarına ulaşıldı. Oluşturulan listeler İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na ait bilgisayar ortamında oluşturulmuş arşiv kayıtları ile karşılaştırıldı. Bu kayıtlar içerisinde düzenli klinik takipleri olan ve HDF'si 1, 2 ve 3 pozitif bulunmuş olgular seçilerek çalışma grubu oluşturuldu ve bu olgularda TİL skoru belirlendi. Bloklarına ulaşılan 238 adet hastaya ait tümörden elde edilen dokulardan 62 adet doku microarray bloğu oluşturuldu. Bu bloklardan hazırlanan kesitler üzerinde CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 antikoru ile immünohistokimyasal incelemeler gerçekleştirildi. Çalışma grubuna dahil edilen olgulara ait klinikopatolojik özellikler, arşiv kayıtları üzerinden kaydedildi. Hastaların şikayetleri, evreleri, nüks ve metastaz durumları, aldıkları tedaviler ve sağ kalımlarıyla ilgili güncel bilgiler elde edildi.

Bulgular: Takip süresi minimum 7 ay, maksimum 130 ay olup ortalama takip süresi $75,44 \pm 31,86$ (medyan 79) ay olan hasta grubunda, hastaların 200'ünün (%84) sağ, 38'inin (%16) ölü olduğu belirlendi. Takip süresinde 36 (%15,1) hastada meme kanserine bağlı ölüm görüldü. Kırk (%16,8) olguda lokal nüks ya da sistemik metastaz ile prezante olan hastalık nüksü saptandı. Tüm olgularda 5 ve 10 yıllık genel sağ kalım (GS) oranı ve standart hatası sırasıyla, $90,1 \pm 0,02$ ve $79,2 \pm 0,03$ olarak hesaplandı. Olguların 5 ve 10 yıllık hastalıksız sağ kalım (HS) oranı ve standart hatası sırasıyla, $83,3 \pm 0,03$ ve $79,3 \pm 0,03$ olarak hesaplandı. Olguların 12'sinde (%5) lokal nüks görülmüş olup lokal nüksüz sağ kalım (LNS) oranı %94,4 ve standart hatası 0,16'ydı. LNS, HS ve hastalık spesifik sağ kalım (HSS) değerleri multifokal tümörlerde, tek odaklı tümörlere göre daha düşük saptandı. LNS, HS ve HSS değerleri lenf nodu metastazı saptanan olgularda, saptanmayanlara göre daha düşük olarak belirlendi. TNM evresi sağ kalımla ilişkili bulundu, evre arttıkça sağ kalımın azaldığı tespit edildi. TİL yüksekliği, kötü prognostik belirteçlerle (reseptör negatifliği, grad III tümörler, yüksek proliferatif kapasite) ilintili bulunmakla birlikte, HS ve HSS değerleri, TİL skoru yüksek olgularda, düşük olgulara göre daha yüksek olarak belirlendi. Çok değişkenli analizde TİL yüzdesinin LNS ve HS'yi belirlemede bağımsız prognostik faktör olduğu gösterildi. Tümör hücrelerinde CTLA-4 pozitifliğinin demografik, klinik ve histopatolojik özellikler ile ilişkisi saptanmadı. CTLA-4 ile boyanan lenfositlerin oranı ile lenfovasküler invazyon (LVİ) arasında istatistiksel olarak anlamlı ters ilinti bulundu. Proliferatif kapasitesi yüksek olan tümörlerde, lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesinin daha fazla olduğu saptandı. Lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesinin fazla oluşunun LNS, HS ve HSS'yi azalttığı tespit edildi. Çok değişkenli analizde lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesinin HS ve HSS'yi öngörmeye bağımsız faktör olduğu belirlendi. Lenfositlerde PD-1 pozitivitesinin kötü prognostik belirteçlerle (östrojen

reseptörü negatifliği, grad III tümörler, yüksek proliferatif kapasite) doğru ilintili olduğu saptandı. Lenfositlerde şiddetli PD-1 boyanması olan olguların HSS değeri diğerlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu. LAG-3 pozitivitesinin tümör çapı ile doğru ilintili, LVİ ile ters ilintili olduğu saptandı. LAG-3 pozitivitesinin, grad III, progesteron reseptörü negatif veya proliferatif kapasitesi yüksek tümörlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlendi. LAG-3 yüzdesi %20 ve üzerinde olan olgularda HS ve HSS değerleri, %20'nin altında olan olgulara göre anlamlı derecede daha yüksek saptandı. TİL yüzdesi ile lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde doğru ilinti bulundu. Lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesinin birbirleri ile olan ilişkisine bakıldığında, her birinin diğeri ile doğru ilintide olduğu tespit edildi.

Sonuç: HDF'si pozitif olgulardan oluşan çalışma grubumuzda genel anlamda sağ kalım yüksektir. Hem LNS hem de HS'yi öngörmeye bağımsız prognostik faktör olması nedeniyle TİL skorlamasının HDF skorlamasına göre daha belirleyici olduğu ve rutin histopatolojik raporlamanın bir parçası olması gerektiği düşünülmektedir. Lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesi HS ve HSS'yi öngörmeye bağımsız prognostik faktör saptanmasına karşın literatür verilerinin aksine sağ kalımı azalttığı ortaya çıkmıştır. Lenfositlerde şiddetli PD-1 boyanması olan olguların HSS değerinin diğerlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmektedir. LAG-3 yüzdesi %20 ve üzerinde olan olgularda HS ve HSS değerlerinin, %20'nin altında olan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 ekspresyonları birbirleriyle ve TİL yüzdesiyle doğru ilintili olduğu görülmektedir. Meme kansinomlarında TİL skoru yüksek olgularda, hem sağ kalıma etkilerinin olması hem de tedavide antagonistlerinin bir seçenek olması nedeniyle bu üç immün belirtecin kullanılabileceğini öne sürebiliriz.

II. ABSTRACT

Objective: Invasive breast carcinoma is the most frequent malignancy in women and it is also the 4th cause of cancer-related deaths worldwide. Therefore, determining the course of the disease is extremely important. Routine histopathologic reporting of breast carcinomas includes histological grade, stage, histological and molecular subtype so as to predict the clinical course and determine a properly personalized treatment. Based on current genetic studies and emerging molecular classification, new biomarkers that are both expressed in tumor cells and tumor microenvironment and have a potential role in prognosis and treatment, have been identified, and targeted therapies have been suggested. The assessment of immune infiltrate in tumors, most commonly referred to as tumor infiltrating lymphocytes (TILs), is also gaining importance in the current quest for optimal biomarkers to select patients with the highest likelihood of responding to immunotherapeutic agents. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) that is one of the immune checkpoint molecules, has a possible poor prognostic value in breast carcinomas. High CTLA-4 positive lymphocyte density was significantly correlated with good prognosis only when tumor CTLA-4 expression was low. Programmed death protein 1 (PD-1), as a member of B7/CD28 co-regulatory factor family, interacts with its ligands -programmed death ligand 1 (PD-L1) and 2 (PD-L2)- which leads to suppression of anti-tumor T cell activity and immune escape of tumor cells. PD-1 expression in TILs -there were some conflicting studies- was associated with better outcome in breast carcinomas. Even some studies showed that PD-1 positivity in TILs was an independent prognostic factor. Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) represents another example of a new immune checkpoint target. LAG-3 inhibitors were intended as a treatment for autoimmune diseases but its clinical development has more recently been re-focused on its use as anti-cancer therapeutics. In some studies, LAG-3 had significantly improved breast cancer-specific survival.

In our study, we aimed to determine the relationship between expression of CTLA-4, PD-1 and LAG-3 and prognosis in a group of host defense factor (HDF) positive breast carcinomas and tried to predict prognosis using these biomarkers.

Materials and Methods: Archive records between January 2009-December 2013 were retrieved from Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine Department of General Surgery and Istanbul University Oncology Institute. The records were compared to computer-based archive records in Department of Pathology, Istanbul Faculty of Medicine. HDF-positive breast

carcinoma cases were chosen among these records to constitute the study group. Tumor blocks of 238 patients were available and 62 tissue microarray blocks were prepared. Immunohistochemical analyses were performed on these blocks using antibodies against CTLA-4, PD-1 and LAG-3. Clinicopathological characteristics of the study group were retrieved from archive records. Some patient records were completed over telephone calls. Information on the patients' medical history, tumor stage, recurrence or metastasis, treatment regimens and survival data were updated.

Results: Average follow-up time was 75.44 (7-130, median: 79) months. A total of 36 (15.1%) patients died of disease, whereas 200 (84%) patients were alive. Forty patients (16.8%) showed progression, either as local recurrence or systemic metastasis. The 10-year-local recurrence free survival (LRFS) was 94.4%; 5-year-disease free survival (DFS) and 10-year-DFS were 83.3% and 79.3%; 5-year-overall survival (OS) and 10-year-OS were 90.1% and 79.2%, respectively. LRFS, DFS and disease-specific survival (DSS) rates were lower in multifocal tumors compared to unifocal tumors. LRFS, DFS, and DSS were also lower in cases with lymph node metastases compared to those without. TNM-stage were correlated with survival and survival rates decreased as TNM-stages increased. Although high TIL expression was significantly associated with hormone receptor negativity, high proliferation rate and histological grade 3 tumors, the increase in TILs was also associated with longer survival. Multivariate analysis confirmed that high TIL score was an independent prognostic marker for LRFS and DFS. HDF scoring system, that is based on ordinal scale (1+, 2+, 3+), was an independent prognostic marker for only DFS. No correlation was shown between CTLA-4 expression in tumor cells and demographic, clinical and histopathological features. Patients with CTLA-4 immunoexpression in immune cells exhibited significantly less lymphovascular invasion. Tumors with high proliferation rate showed significantly more CTLA-4 positivity in immune cells. LRFS, DFS and DSS rates were lower in cases with high rates of CTLA-4 positivity in TILs that was shown to be an independent factor in predicting DFS and DSS, in multivariate analysis. PD-1 positivity in TILs were more likely to appear in estrogen receptor-negative tumors, tumors with higher Ki-67 index, and histological grade 3 tumors. Cases with strong PD-1 immunolabeling in TILs showed statistically longer DSS. LAG-3 positivity in TILs were inversely correlated with lymphovascular invasion but positively correlated with tumor size. LAG-3 positive TILs were significantly associated with negative prognostic factors: progesterone receptor-negative tumors, high proliferation, and histological grade 3 tumors. DFS and DSS rates were higher in cases that had $\geq 20\%$ lymphocytes expressing LAG-3. Correlation

between percentage of TILs and percentages of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 were investigated and statistically significant relationship was shown. Also these immunomarkers were significantly associated with each other.

Conclusion: For the percentage of TILs predicts survival better than HDF scoring system, the assessment of TILs is preferable for evaluation of the immune microenvironment and should be a routine parameter in pathology reports with regard to breast carcinoma. Based on the results of our study, we may suggest that high rates of CTLA-4 positivity in TILs adversely affects rates of LRFS, DFS, and DSS, while no correlation exists between CTLA-4 expression in tumor cells and survival rates. We think that further studies are needed to confirm our result about strong PD-1 immunolabeling in TILs is related to longer DSS, due to well-known variation in the strength of immunostaining depending on the method used. We also suggest that high expression of LAG-3 ($\geq 20\%$ lymphocytes) is related to high rates of DFS and DSS. Furthermore, expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 are strongly associated with each other and also with the percentage of TILs. Finally, these three immune markers can not only predict prognosis but may also be used in determination of proper treatment. Therefore, immunohistochemical analysis of CTLA-4, LAG-3, and PD-1 can be conceivable, notably in tumors with high levels of TILs.

BÖLÜM II

I. GİRİŞ

İnvaziv meme karsinomu tüm dünyada kadınlarda en sık görülen kanser olup kansere bağlı ölümlerde 4. sırada yer almaktadır¹. Bu sebeple hastalığın klinik gidişinin belirlenmesi son derece önemlidir. Klinik gidişin ve hastaya uygun tedavinin belirlenmesi amacıyla her meme karsinomu olgusunda histolojik grad, hastalık evresi, histolojik ve moleküler alt tip tayini yapılmaktadır^{2,3}.

Günümüzde tedaviye yön verecek alternatif seçenekler aranmaya çalışılmaktadır. Bu seçeneklerden biri de tümöre yanıt olabilecek immün sistem üzerinden yürümektedir. İmmün yanıt oluşturan elemanlar -tümör içi lenfositler (TİL) başta olmak üzere- hastalık prognozunu ve immünoterapi için hasta uygunluğunu belirlemede önemli biyobelirteçlerdir^{4,5}. Bu sebeple TİL skorlaması, rutin histopatolojik raporlamanın bir parçası olmalıdır^{6,7}.

İmmün kontrol noktası moleküllerinden biri olan sitotoksik T lenfosit antijen 4'ün (CTLA-4) meme kanserinde ekspresyonunun fazla olması kötü prognoz belirteci olarak tespit edilmiştir. Tümör mikroçevresindeki lenfositlerde CTLA-4 ekspresyonunun fazla olması ise, eğer tümörde ekspresyon düşükse iyi prognozla ilişkili bulunmuştur⁸. Ayrıca bir çalışmada invaziv duktal karsinomlarda grad arttıkça tümördeki CTLA-4 pozitivitesinin azaldığı belirlenmiştir⁹.

B7/CD28 ko-faktör ailesinin üyesi bir transmembran proteini olan programlı hücre ölüm proteini-1 (PD-1), ligandları PD-L1 ve PD-L2 ile etkileşime geçtiğinde anti-tümör T hücre aktivitesini baskılar ve tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştırır¹⁰. Yapılan çalışmaların çoğunda meme kanserinde lenfositlerdeki PD-1 pozitivitesi -bazı çelişkili çalışmalar olmakla birlikte- iyi klinik gidiş ile ilişkilendirilmiştir. Hatta bazı çalışmalarda lenfositlerdeki PD-1 pozitivitesinin bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir¹¹.

Diğer bir immün kontrol noktası moleküllerinden biri olan lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) eksprese eden hücreleri azaltmayı hedefleyen anti-LAG-3 antagonistleri, otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra sonraki klinik gelişmeler kanser immünoterapisinde de kullanılabileceğinin anlaşılmasını sağlamıştır^{12,13}. Yapılan çalışmalarda meme kanserindeki LAG-3 pozitivitesinin genel ve hastalıksız sağ kalımı arttırdığı tespit edilmiştir^{14,15}.

Çalışmamızda geçmişte host defans faktörü (HDF) pozitif olgularda TİL skoru oluşturarak, TİL skoru, CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 ekspresyonlarının prognoz ile ilişkisini belirlemeyi ve bu belirteçleri kullanarak prognozu öngörmeyi amaçlamaktayız.



II. GENEL BİLGİLER

MEME VE İMMÜNİTE

A. Meme Embriyolojisi ve Pubertede Meme Gelişimi

Embriyolojik olarak memenin gelişimi 5. gestasyonel haftada ventral yüzde gelişen süt çizgileri ile başlar. Bu çizgiler aksilladan başlayıp kasık üst-ortasına kadar devam eder. Göğüs duvarında yoğunlaşan epitelyal elemanların etrafında mezenkimal elemanların gelişmesi 15. gestasyonel haftada olur. Mezenkimal bölgelere epitelyal elemanların girişleri, lobül yapılarının oluşmasını sağlar. Fetal dermisin papiller tabakası, bu büyüyen epitelyal kordonları örter ve sonunda tüm duktus ve dallarını çevreleyen vaskülarize fibröz dokuya dönüşür ve memenin lobülüsleri oluşur¹⁶. Fetal memede epitelyal hücreler meme gelişiminde önemli bir mitojen ve diferansiyasyon faktörü olan transforming growth factor alfa (TGF- α) ekprese ederler. Stromal hücreler ise hücre-matriks bağlantısında rol oynayan transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) sentezi yapar^{17,18}. Erken fetal dönemde proliferatif kapasitesi en fazla olan bölge, meme tomurcuğunun boyun bölgesidir. Meme taslağının bazal tabaka hücreleri arasında tip IV kollajen mevcuttur. Bazal hücrelerden gelişen miyoepitelyal hücrelerin gelişimi 23 ile 28. gestasyon haftasına tekabül eder¹⁹. Kollajenöz stromada mezenkimalin yağa diferansiyasyonu 20 ile 32. hafta arasında gerçekleşir. Gestasyonun son 2 haftasında epitelyal kordonların kanalizasyonu ve dallanan lobüloalveolar glandüler yapının gelişimi meydana gelir²⁰.

Fetal meme gland oluşumunun erken aşamaları steroid hormonundan bağımsızdır. On beşinci haftadan sonra testosteron başta olmak üzere hormonal maruziyet başlar. Gestasyonun son haftasında fetal meme, maternal ve plasental steroid hormonu ve prolaktine cevap vererek sekretuar aktiviteye girer. Doğumdan sonraki 1-2 ay kadar infantın kan dolaşımında bulunan maternal hormonlar sekretuar aktivitenin devamını sağlar. Daha sonra glandlar küçülür, progresif glandüler diferansiyasyon olmaksızın dallanan laktifer duktuslar ve persiste eden lobüler arşitektürden oluşan inaktif duruma geçer²¹.

Pubertede siklik östrojen ve progesteron sekresyonuyla birlikte meme gelişimi başlar. Duktusların büyüüp uzaması ve kalın epitel kazanması östrojen bağımlı olmakla birlikte büyüme hormonu ve glikokortikoidler de duktus gelişimine katkı sağlar. Terminal duktolobüler diferansiyasyon temel olarak insülin, progesteron ve büyüme hormonu ile olur. Memenin

glandüler diferansiyasyonu en fazla pubertede olur ama bir dekad kadar daha bu büyüme devam edip gebelikte de artış gösterir^{21,22}.

B. Memenin Anatomik Özellikleri, İşlevsel ve Yapısal Histolojik Özellikleri

Erişkin bir kadında meme, aksiller bölgeye de uzanacak şekilde, esas olarak pektoral kas üzerinde, göğüs duvarına diagonal şekilde yayılır. Büyüklüğü, şekli ve ağırlığı her kadında farklılık göstermekle birlikte, sınırları kabaca şöyledir: Lateralinde serratus anterior kası, medialinde sternum, inferiorunda eksternal oblik kas ve superior rektus kılıfı. Üstte servikal fasya, altta da Cooper'in yüzeysel abdominal fasyası olarak devam eden 'süperfisyal fasya' içindeki boşlukta bulunan meme dokusu, derinde pektoral fasyaya kadar iner. Makroskopik sınırları belirlenmiş olmakla birlikte glandüler dokunun mikroskopik olarak daha yaygın olduğu bilinmektedir²³.

Erişkin bir kadındaki meme dokusu, değişken miktarlarda fibröz ve adipöz doku bulunan stroma içine gömülü duktuslardan, duktuler ve lobüler asiner ünitelerden meydana gelmektedir. Memenin duktal-lobüler sistemi, her biri ağaç dalları gibi dallanan, yaklaşık 15-20 adet 'segment' veya 'lob' adı verilen yapılardan oluşur. Lobüller, duktüler ve duktal yapılara, onlar da toplayıcı duktuslara boşalarak meme yüzeyine açılır. Yüzeye açılmadan hemen önce koni şeklinde ampullada sonlanan laktifer sinüslere genişler. Kendi terminal duktusuyla birlikte bir lobül, memenin yapısal ve fonksiyonel ünitesi olan 'terminal duktal lobüler üniteyi (TDLU)' oluşturur. İn situ ve invaziv karsinomlar da dahil, memedeki lezyonların büyük çoğunluğu TDLU'dan çıkar²⁴.

Duktal ve lobüler sistem, iç epitelyal (luminal) hücre tabakası ve dış miyoepitelyal (bazal) hücre tabakası olmak üzere iki tabakadan oluşur. Bu hücrelerin arasına düzensiz bir şekilde dağılan üçüncü hücre tipi ise luminal ve bazal hücrelere diferansiye olma yeteneğine sahip progenitor (kök) hücrelerdir. Bu kök hücreler hem memenin gelişiminde hem de karsinogeneizde önemli rol oynar^{24,25}.

C. İmmün Sistemin Genel Özellikleri ve Normal Meme Dokusunda İmmün Sistem

Temel görevi kendinden olan ile kendinden olmayana ayırt etmek olan immün sistemin gereksinim duyduğu bazı süreçler vardır. Süreçlerin merkezinde ise antijen sunan hücrelerin (ASH) yüzeyinde bulunan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülünde görülen antijen ile T hücre reseptörünün (THR) bağlanması ve tanınması bulunur. Bu bağlanma

sonucunda T hücreleri aktive de olabilir, anergi de meydana gelebilir. Hayatı timusta başlayarak proliferasyon ve seleksiyon gibi süreçlerden geçen T hücreleri, naive T hücreleri olarak kan dolaşımına, dalağa ve lenfoid organlara yerleşir. Buralarda enfeksiyon ve malignite gibi durumlarda profesyonel ASH'lere maruz kalır. Fakat enfeksiyon, malignite gibi "gerçek" tehdit olmayan durumlara karşı (kendinden olana karşı) vücudu saldırıdan kurtaracak bir mekanizma da gereklidir. Bu anlamda sayısız kontrol noktası mevcuttur. T hücre aktivasyonunu birçok basamakta regüle eden immün kontrol noktası yolları "periferik tolerans" adı verilen sürece hizmet eder^{26,27}.

Memedeki epitelyal ve mezenkimal elemanların yapısı, fonksiyonları ve karsinogenezdeki rolü uzun zamandır etraflica araştırılan konular olmasına rağmen, immün sistem nispeten daha az araştırılmıştır. Normal meme dokusunda ağırlıklı olarak lobüllerde lokalize olan immün sistem hücreleri B ve T lenfositleri, monosit/makrofaj grubu hücreler ve dendritik hücrelerdir. Bu hücreler lobülit olmaksızın da meme lobüllerinde bulunur. Degnim ve ark.²⁸'nin immünhistokimyasal boyalar kullanarak bu immün hücreleri ortaya koyan çalışmasında, lobüllerde normalde ağırlıklı olarak CD8 (+) T lenfositler ve CD68 (+) makrofajların bulunduğu tespit edilmiştir. Lobülit durumunda CD4 (+) T lenfositleri ve CD20 (+) B lenfositlerinin de sayıca arttığı görülmüştür. Lobülit durumunda monosit/makrofajların ve CD11c ile boyanan dendritik hücre grubunda normale göre anlamlı artış saptanmamıştır. Memedeki immün hücreler memenin morfogenezinde, laktasyonel dönemde ve post laktasyonel involüsyonda anahtar rol oynar. Örneğin, pubertede proliferasyonun yüksek olduğu bölgeler olan 'son uç tomurcuğu' bölgelerinde duktal uzama ve dallanma eozinofil, mast hücreleri ve makrofajlara bağlıdır. Laktasyonel dönemde sütte bulunan IgA, ilk birkaç haftasında infanti enfeksiyonlardan koruduğu gibi memeyi de mukozal immünite yaratarak mastitten korur. Post laktasyonel involüsyonda ise mast hücreleri ve makrofajlar glandüler regresyondaki anahtar mediyatörlerdir^{29,30}.

D. Meme Karsinomlarının Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Meme Karsinomu ile İlişkili Sendromlar

İnvaziv meme karsinomu, kadınlarda görülen kanserler arasında %24'lük dilimi oluşturarak ilk sırada yer almaktadır^{1,2}. Tüm kanserler içinde ikinci sıklıkta olan bu kanser, dünyada kansere bağlı ölüm nedenleri arasında 4. sıradadır¹.

Meme karsinomu gelişimi multifaktöryeldir. Önemli risk faktörleri arasında ileri yaş, aile öyküsü, östrojen maruziyeti, eksojen hormon kullanımı, nulliparite, yüksek kalorili diyet, sedanter yaşam, alkol kullanımı ve radyasyon maruziyeti bulunur³¹.

Meme karsinomu ile ilişkili çok sayıda kalıtsal kanser sendromu bilinmektedir. Klinik olarak en önemli olan ve yıllardır bilinen *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ek olarak son yıllarda *PALB2* geni de önemli bir predispozan gen olarak dikkat çekmektedir³². Bunların dışında birçok farklı gen (*PTEN*, *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *CDH1*, *STK11*, *NF1*) saptanmış olmakla birlikte; etnik farklılıklar, popülasyondaki sıklık ve penetrans hakkında sınırlı veri olduğundan genetik testlerde rutin kullanımı kısıtlılık arz etmektedir³³.

Klinik, morfolojik ve immünohistokimyasal olarak patolog tarafından tanımlanabilen bazı özellikler, tümörün herediter sendromlarla ilişkili olabileceğini öngörebilir. Örneğin *BRCA1* sendromundaki tümörler, ekspansif sınırlı, lenfositik infiltrasyon içeren, yüksek mitotik indekse sahip, medüller benzeri yüksek gradlı tümörlerdir^{33,34}. *BRCA2* sendromunda, *BRCA1* sendromunda görüldüğü gibi spesifik bulgular izlenmemekle birlikte her iki sendromda da genç yaş, bilateralite gibi klinik bulgular uyarıcı ve yol gösterici olabilmektedir³⁵. Çok değişkenli analizlerde *BRCA2* sendromunda izlenen tümörlerin de ekspansif sınırlı, tubul içermeyen, yüksek gradlı tümörler olduğu saptanmıştır³⁶.

BRCA1 ilişkili tümörler çoğunlukla (%70-90) östrojen reseptörü (ÖR), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (*HER2/cerbB2*) negatiftir (triple negatif). Büyük bir çoğunluğu bazal fenotiptedir^{37,38}. *BRCA2* ilişkili tümörlerde reseptör ekspresyonu sporadik tümörlere göre belirgin farklılık göstermez. *TP53* mutasyonu ve ekspresyonu, *BRCA1* ilişkili tümörlerde sıklıkla görülürken; *BRCA2* ilişkili tümörlerde izlenmemektedir^{39,40}.

Kalıtsal kanser sendromları arasında en sık görülenlerden biri olan Li-Fraumeni sendromu, birçok kansere predispozan, otozomal dominant geçişli bir sendromdur⁴¹. Yumuşak doku ve kemik sarkomları, meme karsinomları, beyin tümörleri ve adrenokortikal karsinomlar ile ilişkili olan bu sendromda en sık meme tümörleri görülmekte olup meme tümörleri içerisinde de en sık invaziv karsinom, başka bir şekilde tanımlanmamış (BŞT) görülmektedir^{41,42}. Meme karsinomu tanısı alan Li-Fraumeni sendromlu hastaların yaklaşık %30'u 30 yaşın altındadır^{42,43,44}. *TP53* geninde germline mutasyon ile ilişkili vakalarda yüksek oranda *cerbB2* amplifikasyonu saptanmıştır⁴⁵.

E. Meme Karsinomlarında Gradlama

İnvaziv meme karsinomu, temel olarak tubul/gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısına dayanan semikantitatif bir gradlama sistemi olan Nottingham histolojik gradlama (Modifiye Bloom&Richardson) sistemi kullanılarak gradlanır. İlk defa Patey&Scarf⁴⁶ tarafından yayınlanan orijinal sistem ile objektif hale gelen histolojik gradlama sistemi, Bloom&Richardson⁴⁷ tarafından geliştirilmiş olup Elston&Ellis⁴⁸ tarafından modifiye edilerek günümüzde yaygın olarak kullanılan halini almıştır. Histolojik gradlama sistemi Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1: Histolojik gradlama

Bulgu	Skor
<i>Tubul ve gland formasyonu</i>	
Tümörün çoğunluğunda mevcut (>%75)	1
Orta derecede mevcut (%10-75)	2
Az/yok (<%10)	3
<i>Nükleer pleomorfizm</i>	
Küçük, düzenli, uniform hücreler	1
Hücreler arası boyut farklılıkları ve değişkenlik orta derecede artmış	2
Belirgin değişkenlik	3
<i>Mitoz sayısı</i>	
Mikroskop görme alanı çaplarına göre değişkenlik göstermektedir (Bakınız Tablo 2)	
Toplam skor 3-5	Grad 1
Toplam skor 6,7	Grad 2
Toplam skor 8,9	Grad 3

Mitoz sayısı 10 büyük büyütme alanı için verilmektedir. Eşik değerler mikroskop görme alanı çaplarına göre değişkenlik göstermekte olup 0,58 mm ve 0,59 mm’lik görme alanı çapları için belirlenen eşik değerler Tablo 2’de gösterilmiştir^{49,48}.

Tablo 2: Mitoz sayısı için belirlenen eşik değerler

Görme alanı çapı (mm)	Mitoz sayısı		
	1	2	3
0,58-0,59	≤ 9	10-19	≥20

F. Meme Karsinomlarında Evreleme

American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından 2017 yılında 8. baskısı yayınlanan TNM sınıflama kategori ve kriterleri Tablo 3, 4, 5 ve 6’da, evreleme grupları Tablo 7’de özetlenmiştir^{50,51}.

Tablo 3: Primer Tümör Sınıflaması (T) – Klinik ve Patolojik

T kategorisi	T kriteri
Tx	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör bulgusu yok
Tis (İSDK)*	İn situ duktal karsinom
Tis (Paget)	Memenin Paget hastalığı (Meme parankiminde invaziv ya da in situ karsinom olmaksızın)
T1	En geniş tümör çapı ≤20 mm
T1mi**	En geniş tümör çapı ≤1 mm
T1a	En geniş tümör çapı >1 mm, ≤5 mm
T1b	En geniş tümör çapı >5 mm, ≤10 mm
T1c	En geniş tümör çapı >10 mm, ≤20 mm
T2	En geniş tümör çapı >20 mm, ≤50 mm
T3	En geniş tümör çapı >50 mm
T4	Tümör boyutundan bağımsız göğüs duvarı ve/veya deri invazyonu
T4a	Göğüs duvarına yayılım***
T4b	Meme derisinde ülserasyon ve/veya ipsilateral makroskopik satellit nodüller ve/veya ödem (peau d’orange dahil)****
T4c	T4a + T4b
T4d	İnflamatuvar karsinom

* İn situ lobüler karsinom (İSLK) benign olarak kabul edilerek 8. baskıda TNM sınıflamasından kaldırılmıştır.

**Multipl mikroinvaziv odak varlığında en geniş odağın çapı ölçülür, tüm odakların boyutu toplanmaz.

*** Göğüs duvarı yapılarına invazyon olmadan pektoral kas invazyonu veya yapışıklığı T4 olarak değerlendirilmemelidir.

**** Klinik bulgular olmaksızın tek başına dermis invazyonu T4 olarak değerlendirilmemelidir.

Tablo 4: Bölgesel lenf nodu sınıflaması – Klinik (cN)

cN kategorisi	cN kriteri
cNx	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
cN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
cN1	İpsilateral düzey I, II aksiller lenf nodu metastazı, hareketli
cN1mi*	Mikrometastaz (yaklaşık 200 hücre, >0,2 mm <2,0 mm)
cN2	-İpsilateral düzey I, II aksiller lenf nodu metastazı, fiks veya konglomere; -Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın ipsilateral mamma interna lenf nodu metastazı
cN2a	İpsilateral düzey I, II aksiller lenf nodu metastazı, fiks veya konglomere
cN2b	Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın ipsilateral mamma interna lenf nodu metastazı
cN3	-İpsilateral infraklavikular (aksiller düzey III) lenf nodu metastazı; -Düzy I, II aksiller lenf noduna ek olarak ipsilateral mamma interna lenf nodu metastazı; -İpsilateral supraklavikular lenf nodu metastazı
cN3a	İpsilateral infraklavikular lenf nodu metastazı
cN3b	İpsilateral mamma interna lenf nodu ve aksiller lenf nodu metastazı
cN3c	İpsilateral supraklavikular lenf nodu metastazı

* cN1mi tümör rezeksiyonundan önce sentinel lenf nodu örnekleme yapılmış vakalarda kullanılabilir.

Tablo 5: Bölgesel lenf nodu sınıflaması – Patolojik (pN)

pN kategorisi	pN kriteri
pNx	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
pN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok veya yalnızca izole tümör hücresi
pN0 (i+)	Yalnızca izole tümör hücresi (<0,2 mm malign tümör grupları ya da bir kesitte saptanan 200'den az neoplastik hücre varlığı)
pN0 (mol+)	Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanmış pozitif moleküler bulgular, morfolojik izole tümör hücresi yok
pN1	-Mikrometastaz; 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz; -Klinik olarak negatif mamma interna lenf nodunda sentinel lenf nodu ile saptanmış mikrometastaz veya makrometastaz
pN1mi	Mikrometastaz (Bir kesitte 200 hücreden fazla neoplastik hücre varlığı ya da >0,2 mm, <2,0 mm ölçümünde metastaz)
pN1a	1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz, en azından bir metastaz >2,0 mm
pN1b	İpsilateral mamma interna sentinel lenf nodu metastazı
pN1c	pN1a + pN1b
pN2	-4-9 adet aksiller lenf nodunda metastaz; -Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın klinik/radyolojik olarak saptanmış ipsilateral mamma interna lenf nodu metastazı
pN2a	4-9 adet aksiller lenf nodunda metastaz (en azından bir metastaz >2,0 mm)
pN2b	Patolojik olarak aksiller lenf nodu metastazı yok, mikroskopik olarak doğrulanmış veya doğrulanmamış, klinik/radyolojik olarak saptanmış mamma interna lenf nodu metastazı
pN3	-≥ 10 adet aksiller lenf nodu metastazı; -İnfraklavikular (düzey III) lenf nodu metastazı; -Klinik/radyolojik olarak saptanmış ipsilateral mamma interna lenf nodu metastazına ek olarak ≥1 adet düzey I, II aksiller lenf nodu metastazı; -Klinik olarak negatif ipsilateral mamma interna lenf nodunda sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanmış mikrometastaz/makrometastaza ek olarak >3 adet aksiller lenf nodu metastazı; -İpsilateral supraklavikular lenf nodu metastazı
pN3a	-≥ 10 adet aksiller lenf nodu metastazı (en az biri >2,0 mm); -İnfraklavikular (düzey III aksiller) lenf nodu metastazı
pN3b	-Klinik/radyolojik olarak saptanmış ipsilateral mamma interna lenf nodu metastazına ek olarak 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz, en azından bir metastaz >2,0 mm veya 4-9 adet aksiller lenf nodunda metastaz (en azından bir metastaz >2,0 mm) (cN2b + pN1a/pN2a); -İpsilateral mamma interna sentinel lenf nodu metastazına ek olarak 4-9 adet aksiller lenf nodunda metastaz (en azından bir metastaz >2,0 mm) (pN1b + pN2a)
pN3c	İpsilateral supraklavikular lenf nodu metastazı

Tablo 6: Uzak metastaz sınıflaması – (M)

M kategorisi	M kriteri
M0	Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz bulgusu yok
cM0(i+)	Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz bulgusu olmayan, asemptomatik hastada, dolaşan kanda, kemik iliğinde veya diğer bölgesel olmayan lenf nodlarında, moleküler tekniklerle veya mikroskopik olarak saptanmış, <2,0 mm tümör hücreleri veya grupları
M1	Klinik ve radyolojik saptanmış metastaz (cM) ve/veya >0,2 mm, histolojik olarak kanıtlanmış metastaz (pM)

Tablo 7: Evreleme grupları

T	N	M	Evreleme grubu
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Herhangi bir T	N3	M0	IIIC
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	IV

G. Meme Karsinomlarında Moleküler Özellikler ve Gen Ekspresyon Profili

Meme karsinomu, boyutu, gradı, metastaz potansiyeli ve prognozu değişken olan çok sayıda alt tip içeren heterojen bir hastalık grubudur². Standart histopatolojik inceleme hastalığın sınıflaması ve tedavisi için hala etkili olan bir yöntemdir. Patolojik alt tip, grad, boyut, damar invazyonu, lenf nodlarının durumu, hastalığın prognozu ve tedavisi hakkında fikir vericidir⁵². Son yıllarda kanser gelişimi ve progresyonunun hücresel ve moleküler temelini anlaşılmaması ve yeni gelişmelerin ortaya çıkması ile meme kanserinin sınıflama ve tedavisinde de yeniliklerin önü açılmıştır⁵³. Microarray yöntemi kullanılarak yapılan genetik çalışmalarda saptanan binlerce gen ile tedaviye yanıt ya da prognoz ile ilişkili genetik imzalar ve alt tipler belirlenmiştir⁵⁴.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve microarray bazlı genomik hibridizasyon çalışmalarında meme karsinomlarının genomik düzeyde oldukça heterojen olduğu belirlenmiştir. Gen kopya sayısındaki değişiklikler, histolojik grad ve ÖR ekspresyonu arasında korelasyon saptanmıştır^{55,56}.

Grad 1 karsinomlar genellikle diploid ya da diploide yakın saptanmış olup bu tümörlerde tekrarlayan 16q delesyonları, 1p ve 16p kazanımları belirlenmiştir^{57,58}. Grad 3 karsinomlar belirgin derecede heterojen bir grup olup sıklıkla anöploiddir. Çok sayıda ve kompleks kopya sayısı değişikliği içermektedir. Yaklaşık %30 vakada 16q delesyonu saptanmıştır ve bu vakaların tamamı neredeyse ÖR negatif gruptadır. ÖR pozitif grad 3 tümörlerin %50'sinde grad 1 tümörlerdekine benzer paternde gen kopya sayısı değişiklikleri saptanmıştır⁵⁸.

Meme karsinomlarına yönelik yapılan, tüm genom sekanslama çalışmalarında, meme karsinomlarının heterojen mutasyonlar, strüktürel varyasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri içerdiği saptanmıştır^{59,60}. *TP53*, *PIK3CA* ve *PTEN* gibi bazı mutasyonlar daha yüksek oranda saptanmıştır^{59,61,62}.

Gen ekspresyon dizi analizleriyle belirlenmiş intrinsik alt tiplerde de farklı paternlerde genetik değişiklikler görülmüştür. Her alt tip kendi içinde heterojen bir grubu temsil etmektedir^{63,64}.

İnvaziv meme karsinomlu hastaların klinik yönetiminde rutin olarak ÖR, PR ve cerbB2 reseptörlerinin durumu ile Ki-67 proliferasyon skorlaması kullanılmaktadır. Hedefe yönelik tedaviler için bu belirteçlerin doğru değerlendirilmesi gereklidir³. Denetimsiz hiyerarşik küme analizleri sonucu meme karsinomları, ÖR pozitif ve ÖR negatif gruplara ayrılmıştır^{53,65}. ÖR

pozitif grup memenin luminal hücrelerine özgü genleri, ÖR negatif grup ise myoepitelyal hücrelere özgü genleri eksprese eder. Genomik analizlerle yapılan gruplandırmada meme tümörleri 4 kategoriye ayrılmıştır: Luminal, HER2 benzeri, bazal benzeri, normal meme benzeri⁵³. Gen ekspresyon profillemesi çalışmalarında da saptanan intrinsik alt tipler de benzerdir: Luminal A, luminal B, HER2 benzeri, bazal benzeri⁶⁶. Elde edilen gruplar, hormon reseptörü, cerbB2 ekspresyon durumu ve Ki-67 skoru ile örtüşmektedir. Rutin kullanımda immünohistokimyasal analizin daha ucuz ve pratik olması nedeniyle bu grupları ayırmada immünohistokimyasal özelliklerden faydalanılmaktadır. Meme kanserinin moleküler sınıflaması Tablo 8’de özetlenmiştir^{50,53,66}. Luminal benzeri A ve luminal benzeri B grupları arasında Ki-67 proliferasyon skoruna ait eşik değeri 2013 ‘Saint Gallen’ konsensusunda %20 olarak önerilmiş, 2015 konsensusunda ise eşik değerin %20-29 arasında olması gerektiği tartışılmıştır^{67,68,69}.

Tablo 8: Meme kanseri moleküler sınıflaması

Luminal benzeri A	Hormon reseptörü (+), cerbB2 (-), hormon reseptör ekspresyonu yüksek, proliferasyon skoru düşük, genellikle grad 1 ya da 2 tümörler
Luminal benzeri B	Hormon reseptörü (+), cerbB2 (-), hormon reseptör ekspresyonu Luminal-A’ya göre daha düşük, proliferasyon skoru yüksek genellikle grad 3 tümörler ya da Hormon reseptörü (+) ve cerbB2 (+) olan tümörler
HER2 benzeri	Hormon reseptörü (±), cerbB2 (+), genellikle grad 3 tümörler
Bazal benzeri	ÖR, PR, cerbB2 (-) (Triple negatif), genellikle grad 3 tümörler
Normal meme benzeri	Bazal epitelyal hücreler ve adipöz hücrelere özgü genleri yüksek oranda, luminal hücrelere özgü genleri düşük oranda eksprese eden tümörler

H. Meme Tümörleri Sınıflaması

Meme kanserleri ve prekürsör lezyonlar, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 sınıflamasına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (Tablo 9)².

Tablo 9: DSÖ-2019 Meme Tümörleri Sınıflaması*

Prekürsör lezyonlar
İn situ duktal karsinom
-Düşük nükleer gradlı in situ duktal karsinom
-İntermediyer nükleer gradlı in situ duktal karsinom
-Yüksek nükleer gradlı in situ duktal karsinom
Lobüler neoplazi
İn situ lobüler karsinom
-Klasik in situ lobüler karsinom
-Florid in situ lobüler karsinom
-Pleomorfik in situ lobüler karsinom
Atipik lobüler hiperplazi
Papiller neoplaziler
Papiller in situ duktal karsinom
İnvaziv papiller karsinom (İnvazyon içeren intraduktal papiller adenokarsinom)
Enkapsüle papiller karsinom
-İnvazyon içeren enkapsüle papiller karsinom
Solid papiller karsinom
-İn situ
-İnvaziv
İnvaziv meme karsinomları
Mikroinvaziv karsinom
İnvaziv karsinom, başka bir şekilde tanımlanmamış
Pleomorfik patern
Osteoklast benzeri stromal dev hücreler içeren karsinom
Koryokarsinomatöz patern
Melanositik patern
Medüller patern
Onkositik patern
Lipidden zengin patern
Glikojenden zengin berrak hücreli patern
Sebaseöz patern
İnvaziv lobüler karsinom
Klasik lobüler karsinom
Solid lobüler karsinom
Alveoler tipte lobüler karsinom
Pleomorfik lobüler karsinom
Tubulolobüler karsinom
Mikst lobüler karsinom
Tubuler karsinom
Kribriform karsinom
Müsinöz karsinom

Müsinöz kistadenokarsinom
İnvaziv mikropapiller karsinom
Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom
Metaplastik karsinom
Düşük gradlı adenoskuamöz karsinom
Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom
Skuamöz hücreli karsinom
İğsi hücreli karsinom
Heterolog mezenkimal diferansiyasyon gösteren metaplastik karsinom
Mikst metaplastik karsinom
Nadir ve tükrük bezi tipi tümörler
Asinik hücreli karsinom
Adenoid kistik karsinom
Klasik tip
Solid-bazaloid tip
Yüksek gradlı transformasyon gösteren tip
Sekretuar karsinom
Mukoepidermoid karsinom
Polimorfik adenokarsinom
Ters polarizasyon gösteren tall cell karsinom (Tall cell carcinoma with reversed polarity)
Nöroendokrin neoplaziler
Nöroendokrin tümör, başka bir şekilde tanımlanmamış
Nöroendokrin tümör, Grad 1
Nöroendokrin tümör, Grad 2
Nöroendokrin karsinom, başka bir şekilde tanımlanmamış
Nöroendokrin karsinom, küçük hücreli
Nöroendokrin karsinom, büyük hücreli

*Tabloda yalnızca meme karsinomları ve prekürsör lezyonlar gösterilmiştir.

İ. Meme Karsinomlarında İmmünite

Malign melanom, akciğer karsinomu gibi immünoterapiye yanıtı malignitelere karşı meme karsinomu daha az mutasyon yüküne ve daha az lenfosit infiltrasyonuna sahip olması neticesinde immünolojik açıdan "soğuk" karsinomlar kategorisine girmektedir⁴. Meme karsinomlarının immün profili dinamik ve heterojen olup hastalar, subtipler gibi parametrelere göre değişkendir. Thorsson ve ark.⁷⁰'nin 'The Cancer Genome Atlas (TCGA)' veri tabanından yararlanarak yaptıkları çalışmada immünolojik açıdan alt gruplar belirlenmiştir. Bu gruplar 'yara iyileşmesi', 'IFN-gamma baskın', 'inflamatuvar', 'lenfositten fakir', 'immünolojik sessiz', 'TGF-beta baskın' olmak üzere altı tanedir. Dokuz yüz kırk dört meme kanseri arasında en yaygın immünolojik alt grup 'IFN-gamma baskın'dır ve bunu 'yara iyileşmesi' ve 'inflamatuvar'

alt grupları takip eder. Bazal benzeri meme karsinomlarının %60,5'i, HER2 benzeri meme karsinomlarının %49,3'ü, Luminal B'lerin ise %46,6'sı IFN-gamma baskın immün alt tiptedir. IFN-gamma baskın alt tip en yüksek CD8 (+) T hücresi ve M1 makrofaj yoğunluğuna ve yüksek THR çeşitliliğine sahiptir. Bu çalışmada hiçbir meme kanseri tipi 'immünolojik sessiz' alt grubunda tanımlanmamıştır. Bu bulgu da tümör mikroçevresindeki diğer elemanların meme kanserine karşı yanıtın düzenlenmesindeki önemini vurgulamaktadır⁷⁰.

Tümördeki immün hücre infiltrasyonu bazı meme karsinomu alt tipleri için prediktif ve prognostik olmaktadır. Tümörü infiltre eden immün hücrelerin bileşiminin önemli olduğu bilinmekle birlikte genel olarak yüksek TİL oranına sahip meme tümörlerinin tedaviye (kemoterapi, radyoterapi veya immünoterapi) cevabı da yüksek olmaktadır. İmmün mikroçevresi az olan tümörlerde ise çeşitli metodlarla immün sistemi harekete geçirmeye yönelik çalışmalar mevcuttur⁴.

Meme kanserinde lenfosit infiltrasyonunun ve bölgesel lenf nodlarındaki immün aktivasyonun iyi klinik gidişi öngörebildiği, 40 yıldan daha uzun bir süre önce Di Paola ve ark.⁵'nin yayınladıkları makalede bilinmekteydi. Yeni teknolojiler kanserlerdeki immün mikroçevrenin kompleksliğini daha iyi anlamamızı sağladı.

İmmün sistem, birçok organ, doku, hücre ve bunlardan üretilen biyoaktif moleküllerden oluşan, yabancı protein veya antijenleri tanıyıp doğal ve adaptif olmak üzere iki koldan konağı savunan bir sistemdir. Doğal ve adaptif immün sisteme ait elemanlar olmakla birlikte bunların her ikisine de hizmet eden ve arada köprü görevi olan elemanlar da mevcuttur. Meme kanserinin oluşum, gelişim ve ilerleme evrelerinde doğal ve adaptif immün sistem hücrelerinin bazıları bu durumu önlemeye çalışırken (anti-tümör) bazıları da kolaylaştırıcı (pro-tümör) etkilerde bulunur⁴.

Meme kanseri immüsitesinde rol alan doğal immün sistem elemanları doğal lenfoid hücreler (innate lymphoid cells), miyeloid hücreler ve efektör moleküller; adaptif immün sistem elemanları ise B ve T hücreleridir⁷¹.

İ1. Doğal Lenfoid Hücreler

Doğal lenfoid hücreler (DLH), lenfoid progenitörlerden köken alan, spesifik B veya T hücre reseptörüne sahip olmayan doğal immün sistem hücreleridir⁷². Eksprese ettikleri sitokin ve transkripsiyon faktörlerine göre grup 1, 2, 3 olarak alt gruplara ayrılırlar.

NK hücrelerini de içeren grup 1 DLH, T-bet transkripsiyon faktörünü eksprese eder⁷³. Bu grup IL-12, IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak IFN- γ ve TNF- α gibi tip 1 sitokin üretiminden sorumludur.

IL-5, IL-9 ve IL-13 üretebilmek için Gata3 ve ROR α gibi transkripsiyon faktörlerinin gerektiği grup 2 DLH, tip 2 immün yanıtta sorumlu olup anti-tümör yanıtın inhibisyonuna yol açar⁷⁴.

Grup 3 DLH ise ROR γ t eksprese eder, IL-22 ve IL-17A üretir ve hem anti-tümör hem de pro-tümör yollarda görev alır. Kısaca DLH1, 2 ve 3, adaptif immün yanıtta CD4 (+) T hücreleri olan Th1, Th2 ve Th17 ile; NK hücreleri ise CD8 (+) T hücreleri ile benzerlik göstermektedir⁷⁵.

Doğal lenfoid hücrelerin meme tümöröenezindeki rolü özellikle son dekada araştırılmaya başlanmıştır. Örneğin DLH1 üretimi için gerekli olan IL-15'in baskılandığı hayvanlarda tümör büyümesinin ivmelendiği görülmüştür. Yine benzer bir çalışmada *NFIL3* geni baskılanan ve bu sebeple NK hücreleri olmayan farelerde tümör büyümesinin hızlanması, DLH1'in erken tümör immünoşürveyansında önemli rol oynadığını göstermiştir⁷⁶.

DLH2'yi tip 2 immün yanıt oluşturma için stimüle eden IL-33'ün rekombine formunun farelere uygulanması ile meme tümöründe büyüme ve metastazda artış tespit edilmiştir⁷⁷. IL-33, DLH2'den IL-13 salgılanmasını artırır; IL-13 de miyeloid-kökenli baskılayıcı hücre aktivasyonunu ve makrofajların M2 makrofajlara (pro-tümör etkili makrofaj alt tipi) dönüşümünü sağlar^{78,79}. Bu özellikler tümörün immün sistemden kaçışına DLH2'nin nasıl kolaylık sağladığını anlamaya örnek teşkil etmektedir.

Daha çok intestinal sistemdeki etkileri araştırılmış olan DLH3'ün karsinogenezdeki rolüne kanıt teşkil edecek veriler mevcuttur. Örneğin IL-23, DLH3'ten anjiyogenez ve miyeloid-kökenli baskılayıcı hücrelerin tümör sahasına toplanmasını sağlayan IL-17A üretimini stimüle eder. Ayrıca DLH3, IL-22 üreterek meme tümörünün büyümesini inhibe eder. Bu da DLH3'lerin hem pro hem anti-tümör etkisi olduğunu göstermektedir^{72,80,81}.

İ2. Miyeloid Hücreler

Hematopoietik hücreler arasında en çok bulunan grup olan miyeloid hücreler granülosit, makrofaj ve dendritik hücreler olarak üçe ayrılır⁸². Son yıllarda anjiyogenez, invazyon ve

metastazdaki rolleri göz önüne alındığında miyeloid hücrelerin tümör mikroçevresinde immünsüpresif hücrelere dönüştüğü anlaşılmaktadır^{83,84,85}.

Tümörü infiltre eden miyeloid hücreler granülositler (bazofil, eozinofil, nötrofil), Tie2 eksprese eden monositler, dendritik hücreler, tümör asosiye makrofajlar, immatür miyeloid hücreler ve miyelod-kökenli baskılayıcı hücrelerden oluşmaktadır⁸⁶. Yapılan bir çalışma meme tümörünün proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 α ürettiğini, bunun da nötrofil ve monositlerden ‘timik stromal lenfopoietin’ üretimini indüklediğini göstermektedir. Timik stromal lenfopoietin, anti-apoptotik protein bcl-2 ekspresyonunu arttırarak tümör hücresinin yaşamasını sağlamaktadır⁸⁷.

Nötrofillerin CD8 (+) T lenfositleri baskılayarak metastaza önayak olduğunu destekleyen çalışmanın⁸⁸ yanı sıra, reaktif oksijen türleri üretip metastazı inhibe ettiği sonucuna ulaşan çalışma da mevcuttur⁸⁹.

Makrofajlar kanser hücreleri tarafından sekrete edilen moleküllerden etkilenir. Bu etkileşim sonucu IL-10 üreterek, regülatör T hücreleri (Treg) tümör sahasına toplayarak, CD8 (+) T hücrelerin apoptozuna yol açarak tümör büyümesi ve immün kaçışını sağlar⁸².

Granülosit, makrofaj, dendritik hücre ve diğer miyeloid hücrelerin prekürsörü olan miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler monositik ve polimorfonükleer (granülositik) olmak üzere iki ana gruba ayrılır⁹⁰. Bu iki gruptaki hücreler Treg aktivitesini arttırarak, anti-tümör immün yanıtı baskılayan TGF- β salgılayarak, NK, T ve dendritik hücre fonksiyonlarını inhibe ederek meme tümörögenezinde destekleyici rol oynar^{90,91}. Çalışmalar periferik kanda miyeloid-kökenli baskılayıcı hücre seviyesinin hastalık yüküyle ilintili olduğunu, düşük seviyelerin kemoterapi etkinliğini yansıtabileceğini göstermiştir^{90,92}.

İ3. Efektör Moleküller

Doğal immün sistemin efektör molekülleri esas olarak kompleman sistem olup bunlar bazı yönleriyle tümör destekçisi, bazı yönleriyle ise tümör karşıtı rollere bürünürler⁹³. Örneğin C1q anjiyogenezi ve immünolojik toleransı sağlamasına rağmen çelişkili şekilde monoklonal antikor temelli kanser tedavisinde etkin rol oynamaktadır. C5a da anjiyogenezi sağlar ve miyeloid-kökenli baskılayıcı hücrelerin tümör sahasına toplanmasına neden olur. Diğer yandan Th1 hücrelerin diferansiyasyonunu ve tümör sahasına toplanmasını kolaylaştırarak anti-tümör etki yapar. Kompleman sisteminin son ürünü olan membran atak kompleksi de tümör hücresinin direkt ölümünü sağlar^{94,95}.

Efektör moleküllerden bir diğeri, antimikrobiyal etkisi bilinen, anti-tümöral etkisi yeni anlaşılan ‘host defans peptidler’dir. Kanser hücrelerinin genellikle dış membranında bulunan fosfatidilserin bölgesiyle elektrostatik etkileşime girerek plazma membran hasarı ve sonuç olarak kanser hücre apoptozuna neden olur⁹⁶.

İ4. B Hücreleri

Adaptif immün sistem elemanı olan B hücreleri antikor üretimi ve diğer immün hücrelerle etkileşimi sağlayarak immün yanıtta görev alırlar⁹⁷. Fareler üzerinde yapılan 2016 yılındaki bir deneyde, farelere meme karsinomu hücre kültürü inokülasyonundan sonra tümörü drene eden lenf nodundaki B hücrelerinde immünglobülin G (IgG) sentezi görülmüş ve bunun in vitro ortamda da kanser hücrelerini öldürdüğü tespit edilmiştir. Bu aktive B hücrelerinin in vivo transferinin metastaz inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca B hücrelerine IL-2 de eklenildiği takdirde IgG üretiminin daha fazla olduğu, CXCR4/CXCL12 bağımlı Fas/FasL yolağıyla tümör hücrelerinin lizisinin sağlandığı saptanmıştır⁹⁸.

Meme tümörü mikroçevresindeki regülatör B hücreleri (Breg) IL-10 ve TGFβ üreterek anti-tümör yanıtı inhibe eder. Ayrıca Breg PD-L1 eksprese ederek tümör spesifik T hücrelerinin proliferasyon ve aktivasyonunu baskılar⁹⁹.

Tümörü infiltre eden B hücrelerin meme kanserindeki prognozunda pozitif, negatif ve nötr etkide olduğunu söyleyen çelişkili çalışmalar mevcuttur. Bu hususta yapılan bir metaanaliz çalışmasında meme kanserinde CD20 (+) B hücrelerin artması daha iyi hastalıksız sağ kalım ve meme kanseri spesifik sağ kalım ile ilişkilendirilmiş olup¹⁰⁰ başka bir çalışmada ise CD19 (+) B hücrelerinin kötü prognostik faktörlerle (reseptör negatifliği, lenf nodu metastazı, histolojik grad III tümörler, T4 evresi) ilişkili olduğu saptanmıştır¹⁰¹.

İ5. T Hücreleri

Adaptif immün sistemin diğer elemanı olan T hücrelerinin hem αβ hem de γδ alt tipi anti-tümör immünitede kritik önem teşkil eder. Tümörde alt tipten bağımsız olarak T hücrelerinin varlığı, non-immünojenik tümörlere göre pozitif prognostik belirteç olarak kabul edilir⁷¹.

Meme kanserine karşı majör efektör hücre olan CD8 (+) T hücreleri (sitotoksik T lenfositleri), MHC sınıf I aracılığıyla sunulan spesifik antijenleri tanıyıp perforin ve granzim salgılayarak tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahiptirler^{102,103}.

CD4 (+) T hücreleri Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerine diferansiye olurlar. Th1 hücreler IL-2, IFN- γ ve TNF- α salgılayarak anti-tümör aktivitede görev alır. Th2 hücreler ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılayarak T hücre anejisinden sorumludur¹⁰⁴. Th17 ve ürettiği IL-17A ile ilgili yapılan bir çalışmada, IL-17A'nın metastaz yapmamış tümör hücrelerinde gen ekspresyon profilinde ve davranışında değişiklik yaparak tümör büyümesine yol açtığı saptanmış, yüksek IL-17A seviyelerinin invaziv duktal karsinomda kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur¹⁰⁵. Treg, sitotoksik T lenfositlerinin ve Th1 hücrelerin aktivitelerini baskılayarak meme kanserinde progresyondan sorumlu tutulmaktadır¹⁰⁶. Treg belirteci olan FOXP3 ekspresyonu tümör boyutu, invazyon ve vaskülarizasyon ile doğru ilişkili bulunmuştur¹⁰⁶.

İ6. Meme Karsinomlarında İmmünitenin Değerlendirilmesi

Gerek tedavi gerek prognoz öngörüsünde kullanılan immün mikroçevrenin önemli bir bileşeni olan lenfositleri değerlendirmek için standardizasyon gereklidir. Her malignite için farklı değerlendirmeleri olan bu antitenin meme karsinomlarındaki TİL skorunu değerlendirmek için Salgado ve ark.⁶ tarafından 'International TILs Working Group' önerilerinin ışığında derlenmiş yayını kılavuz teşkil etmektedir⁷.

Tablo 10: Meme Karsinomunda TİL Değerlendirmesi - 'International TILs Working Group 2014' Önerileri^{6,7}

1. TİL stromal kompartmanda değerlendirilmelidir. Yüzde verirken payda, stromal hücrelerin sayısı değil, stromal dokunun alanı olmalıdır.
2. TİL invaziv tümör sınırları içinde değerlendirilmelidir.
3. Tümör sınırları dışında kalan, in situ karsinom ve normal meme parankim çevresi değerlendirme dışında tutulmalıdır.
4. Ezilme artefaktı, nekroz, regresyonel hiyalinizasyon, biyopsi traktı gibi alanlar değerlendirme dışında tutulmalıdır.
5. Tüm mononükleer hücreler (lenfositler, plazma hücreleri) sayılmalı; polimorfonükleer lökositler sayılmamalıdır.
6. Tek kesit (4-5 μ m, x200 - x400 büyütme) bir hasta için yeterlidir.
7. Biyopsi materyallerinde eğer mümkünse tüm kesitler değerlendirilmelidir. Korlar tedavi öncesi dönemde değerlendirme amacıyla kullanılmaktadır; neoadjuvan tedavi sonrasında TİL değerlendirmesi ile ilgili şu anki koşullarda geçerli yöntem mevcut değildir.
8. Yüzde hesaplanırken en yüksek yerlerde değil tüm alanlarda değerlendirme yapıp ortalama yüzde verilmelidir.
9. TİL sürekli değişken olarak skorlandığı takdirde biyolojik davranışı daha doğru bir şekilde öngörmeyi sağlayacaktır.
10. Yüzde hesaplanırken lenfositlerin solid agregatlar oluşturmaması yani disosiye yapıda olması akılda tutulmalıdır.
11. Şu an için klinik açıdan uygun TİL eşik değeri bulunmamaktadır. Şu an için değerlendirme aşamasında geçerli yöntem belirlemek, eşik değer bulmaktan daha önceliklidir.

J. Çalışmada Kullanılan İmmünohistokimyasal Belirteçler ile İlgili Genel Bilgiler

J1. CTLA-4

Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve endokrin tedavi yöntemleri bulunan meme kanserlerinde geleneksel olarak üç ana biyobelirteç durumuna bakılır. Ancak yeni gelişmeler immün sistem farkındalığının artmasına ve immün sistem üzerinden etki edecek yeni biyobelirteçlerin terapötik etkisine ışık tutmuştur. Anti-tümör immünitesindeki anahtar elemanlar sitokinler ve immün kontrol noktası molekül ve yolaklarıdır⁹. İmmün kontrol noktası moleküllerinden biri olan CTLA-4 (CD152) ilk olarak 1987'de immünglobülin süper ailesi üyesi olarak ortaya çıkmıştır¹⁰⁷.

CTLA-4, tipik olarak lenf nodlarında naive T hücre aktivasyonunun başlangıç aşamasında T hücrelerinin otoreaktivite kazanmasını engeller²⁷. Kanser immünoterapisinin özünde periferik toleransı fırsat olarak kullanıp immün sistemden kaçan tümör hücrelerinin bu fırsatı kullanmalarını önlemek vardır¹⁰⁸.

T hücre aktivasyonu en az birden fazla sinyal gerektiren kompleks bir süreçtir. THR'nin MHC'ye bağlanması, T hücre aktivasyonuna spesifite katar. Ancak bu bağlanma kostimülatör sinyaller gerektirir. ASH üzerindeki B7-1 (CD80) veya B7-2 (CD86) molekülünün, T hücre üzerindeki CD28 ile bağlanması T hücre içinde bir sinyal iletimine sebebiyet verir. CD28:B7-1/2 bağlanmasının yeterli seviyelere gelmesi T hücre proliferasyonunu, T hücre sağ kalımının artmasını, IL-2 gibi sitokinlerin artmasını, hücre sağ kalım genlerinin upregülasyonunu sağlar¹⁰⁸. CD28'in homologu olan CTLA-4, B7 molekülüne daha yüksek bir afinite ile bağlanır^{109,110}. Ancak CTLA-4'ün bağlanması stimülatör sinyal üretimine yol açmaz. CD28:B7 bağlanma miktarı ile CTLA-4:B7 bağlanma miktarı savaşının galibi T hücrelerinin aktivasyona veya anergiye gitmesini belirler¹¹¹. CTLA-4'ün inhibisyon yapma mekanizmaları CD28 veya onun sinyal yolağında inhibisyon, T hücrelerinin ASH'lere karşı etkileşimini azaltmak, THR immün sinapsında direkt inhibisyon şeklinde özetlenebilir^{112,113}.

CTLA-4 hücre içi kompartmanlarda yerleşir. Örneğin dinlenme halindeki naive T hücrelerinde esas olarak intrasellüler kompartmanda yerleşir. THR'nin ve CD28:B7 bağlanmasının artışı ile meydana gelen stimülatör sinyaller, CTLA-4 içeren veziküllerin hücre yüzeyinden ekzositozunu indükler. Bu indükleme THR üzerindeki CTLA-4 moleküllerinin pozitif feedback mekanizmasıyla daha da artmasını sağlar ve CTLA-4:B7 bağlanmasına neden olup T hücrelerinin sürekli aktive olmasını önler¹¹⁴.

Treg, efektör T hücrelerinin kontrolörü olarak periferik toleransın sürdürülebilirliğini sağlar. Treg sürekli olarak CTLA-4 eksprese ederek baskılayıcı fonksiyon görür¹¹⁵.

Kassardjian ve ark.⁹'nın 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada, meme kanserinde CTLA-4 ekspresyonu araştırılmış ve CTLA-4'ün sistematik değerlendirilebilmesi için bir skorlama sistemi yapılmıştır. Doku microarray (DMA) yöntemi ile normal ve neoplastik meme dokusundan 102 kor elde edilerek immünohistokimyasal analiz yapılmış, neoplastik korlar 4 gruba ayrılmıştır: İn situ duktal karsinom, invaziv duktal karsinom, invaziv lobüler karsinom ve invaziv tubuler karsinom. Mouse anti-human CTLA-4 monoklonal antikor (F8 klonu) 1:100 dilüsyonda kullanılarak yapılan immünohistokimyasal çalışmada kontrol olarak tonsil dokusu kullanılmıştır. Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma şiddetine göre 0 (reaksiyon yok), 1+ (düşük şiddette boyanma), 2+ (orta şiddette boyanma), 3+ (kuvvetli boyanma) şeklinde derecelendirme yapılmıştır. Kontrol dokusu olan tonsildeki T hücreleri (özellikle germinal merkezde yoğunlaşan) dağınık, kuvvetli boyanma; kriptlerdeki skuamöz epitel ise zayıf (1+) boyanma göstermiştir. Contardi ve ark.¹¹⁶'nın da yaptığı çalışmada tavsiye ettiği gibi görüş birliği ile 2+ ve 3+ boyanmalar pozitif sayılmış çünkü normal meme dokusunda da 1+ boyanma meydana gelmiştir. Sonuç olarak invaziv duktal karsinomlarda grad arttıkça CTLA-4 pozitivitesi azalmış ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da invaziv duktal karsinomda CTLA-4 pozitivitesi, in situ duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinoma göre daha fazla bulunmuştur. Bu çalışmanın ana fikri, düşük gradlı tümörlerde CTLA-4 ekspresyonunun daha fazla olduğu ve meme kanserlerinde CTLA-4 ekspresyonu, PD-L1 ekspresyonundan daha fazla olduğu için tedavi seçeneği olarak anti-CTLA-4 tedavi modalitelerinin daha mantıklı olduğu şeklinde özetlenebilir⁹.

Yu ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada ise meme karsinomlarında, tümörde CTLA-4 ekspresyonunun fazlalığı kötü prognoz ile, tümörde azken lenfositlerde fazla olması iyi prognoz ile ilişkili bulunmuştur⁸. Meme kanseri dışında da birçok malignitede çalışmaları olan bu immün kontrol noktası molekülüne karşı geliştirilmiş antikorlar (anti-CTLA-4 antikorları) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır¹¹⁷.

J2. PD-1

B7/CD28 ko-faktör ailesinin üyesi bir transmembran proteini olan PD-1, ligandları PD-L1 ve PD-L2 ile etkileşime geçtiğinde anti-tümör T hücre aktivitesini baskılar ve tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştırır. PD-1 T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri,

makrofajlar ve bazı dendritik hücrelerde immün aktivasyon ve kronik inflamasyon sırasında eksprese edilen moleküllerdir. Ligandları PD-L1 ve PD-L2'ye bağlanması, T hücre aktivasyonunu önler ve periferik dokuların tümör hücresine karşı immün toleransını sağlar.

PD-1 ve PD-L1 ile ilgili yapılan çalışmalar, tümör ve TİL'lerde saptanan ekspresyonun farklı ve zaman zaman çelişkili sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir. Örneğin Uhercik ve ark.¹⁰'nın yaptığı bir çalışmada, primer meme karsinomuna ait 127 mastektomi materyalindeki tümör dokusu ve çevre dokudan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle PD-1 transkript seviyelerine bakılmış, PD-1 seviyesi ile evre, grad ve reseptör durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmada anlamlı saptanan bulgu, tümör dokusunda çevre dokuya göre belirgin olarak daha fazla PD-1 transkript ekspresyon seviyesi bulunduğu olmuştur. Prognoz ve sağ kalım ile PD-1 seviyeleri arasında da istatistiksel olarak anlam teşkil edecek fark görülmemiş ancak nüks/metastatik hastalığı olanlarda PD-1 seviyesi daha düşük bulunmuştur. Medyan takip süresinin 120 ay olduğu bu çalışmada PD-1 ekspresyonunun tümör hücreleri ve TİL'lerde ayrı ayrı bakılmaması çalışmaya kısıtlılık getirmektedir¹⁰.

PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunun prognostik değeri genellikle mRNA seviyelerine dayandırılır ve sonuçlar meme karsinomunda tartışmalıdır. Ren ve ark.¹¹'nin yaptıkları çalışmada PD-1 ve PD-L1'in hem tümör hücrelerinde hem TİL'lerde protein ve mRNA düzeyleri analiz edilmiştir. Triple negatif meme karsinomu olgularında bakılan bu veriler klinikopatolojik parametreler ve prognoz ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yüz doksan beş triple negatif meme karsinomu olgusunda klinikopatolojik olarak yaş, tümör boyutu, histopatolojik tip, adjuvan tedavi varlığı, bazal-benzeri subtip, grad, evre, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve sağ kalım gibi veriler ele alınmıştır. Çalışmada lenfositlerde PD-1 protein pozitifliği, bazal-benzeri subtip, TİL yüzdesinin fazlalığı (%30 veya daha fazla), hastalıksız sağ kalım (HS) ve genel sağ kalım (GS) ile ilişkili bulunmuş; çok değişkenli analizde PD-1 (+) lenfositlerin varlığı bağımsız prognostik faktör saptanmıştır¹¹.

Sonuç olarak yapılan çalışmaların çoğunda meme karsinomunda lenfositlerdeki PD-1 pozitivitesi -bazı çelişkili çalışmalar olmakla birlikte- iyi klinik gidiş ile ilişkilendirilmiştir.

J3. LAG-3

CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 bazlı tedavilere rağmen hala cevapsız olan birçok meme karsinomu tipi mevcuttur. Bu sebeple alternatif inhibitör reseptörler ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

LAG-3 (CD223) 1990 yılında Triebel ve ark.¹¹⁸ tarafından 498 aminoasitlik tip I transmembran proteini olarak tanımlandı. İnsan NK ve T hücrelerinde aktive olan bu protein, insanda 12. kromozomda, CD4'ü kodlayan bölgenin hemen yakınında yer alır. Yapısal olarak birbirlerine neredeyse homolog olan LAG-3 ve CD4, 4 adet ekstraselüler immünglobülin süper aile benzeri bölge (domain) içerir (D1-4)^{119,120}. İntron/ekzon organizasyonları bakımından da aynı olan bu iki molekül sadece %20 oranında aminoasit sekans benzerliği gösterir¹¹⁸. LAG-3'ün D1 bölgesinde, CD4'te olmayan ekstra 30 aminoasitlik bölge vardır. Bu durum LAG-3'ün MHC sınıf II'ye, CD4'e göre daha yüksek afiniteyle bağlanmasını sağlar¹¹⁹. Ana ligandı MHC II olan LAG-3'ün bilinen diğer ligandları galectin-3 ve LSECTin'dir. Galectin-3 tümör mikroçevresi tarafından eksprese edilirken, karaciğer sinüzoidal endotelial hücre lektini olarak bilinen LSECTin ise tümör hücreleri tarafından eksprese edilir. Bu iki alternatif potansiyel ligand ile LAG-3, CD8 (+) sitotoksik T hücreleri üzerinde de etki oluşturur^{121,122}.

Daha eski geçmişe sahip olan CTLA-4 ve PD-1'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların yanı sıra LAG-3'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların da etkisi yavaş yavaş açığa çıkmaya başlamıştır. Hatta son klinik çalışmalar psöriazis gibi otoimmün hastalıklarda LAG-3 eksprese eden hücreleri azaltmayı hedefleyen anti-LAG-3 antagonistleri hakkında olsa da¹²³, ilk LAG-3 temelli klinik çalışmalar IgG1'in Fc kısmına bağlanabilen dört LAG-3 ekstraselüler bölgesinden oluşan, çözünebilir, dimerik, rekombinant protein (LAG-3-Ig) üzerinedir¹². Bu füzyon proteini LAG-3 antagonisti olarak tasarlanmış olmakla birlikte, sonraki klinik gelişmeler bunun antijen sunan hücreleri aktive etmeye yarayan bir immün destekçi olarak iş gördüğünün anlaşılmasını sağlamıştır. LAG-3-Ig kompleksinin immatür dendritik hücre üzerindeki MHC II ile etkileşimi sonucu bazı sitokin (IL-12, TNF α) ve kemokinlerin (CCL22, CCL17) salgılanmasının arttığı, kemotaksis ve migrasyon gibi mekanizmaların tetiklendiği belirlenmiştir^{13,124,125}.

Burugu ve ark.¹⁴ tarafından 4322 primer meme karsinomu eksizyon materyaline DMA yöntemi uygulanarak immünohistokimyasal analiz yapılmış, karsinom hücrelerinde PD-L1; lenfositlerde PD-1 ve LAG-3 yüzdesi değerlendirilmiştir. Lenfositlerde LAG-3 pozitifliği, kötü prognostik belirteçlerle (genç yaş, büyük tümör boyutu, yüksek proliferatif kapasite, HER2 ve bazal-benzeri subtipler) ilintili bulunmuş, ayrıca çok değişkenli analizde LAG-3 pozitifliğinin meme karsinomu spesifik sağ kalımı arttırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada PD-L1 pozitif olguların %53'ünün, PD-1 pozitif olguların ise %61'inin LAG-3 pozitif olduğunun saptanması da LAG-3 temelli tedavi seçeneklerinin birçok hastada kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca

LAG3 ve CD8 (+) TİL'lerin varlığı, reseptör negatif meme kansinonlarında daha uzun hastalıksız sağ kalımla ilişkili bulunmuştur.

On beş çalışmanın değerdendirildiğı bir metaanaliz çalışmasında çeşitli malign neoplazileri içeren 6,306 olgunun 1,868'inde (%31) LAG-3 pozitivitesi saptanmıştır. On dört çalışmada LAG-3'ün erişkin hastalardaki prognostik etkisine, bir çalışmada ise pediatrik gruptaki prognostik etkisine bakılmıştır. Meme kansinonları, over kansinonları, gastrik-kolorektal kansinonlar, küçük hücreli dışı akciğer kansinonları, nöroblastomu da içeren renal kansinonlar ve lenfoma gibi malign neoplazilerin yer aldığı bu çalışmada meme kansinonlarındaki LAG-3 pozitivitesinin genel ve hastalıksız sağ kalımı arttırdığı tespit edilmiştir¹⁵.

Metastatik meme kansinomunda kemoterapiye ek LAG-3-Ig füzyon proteininin kullanılması ile ilgili 2006 yılında başlayıp, 2010 yılında sonlanan bir klinik çalışmada, paklitaksel ile kombine olarak LAG-3-Ig füzyon proteininin kullanılması, tek başına paklitaksel alan hastalara göre iki kat daha fazla objektif yanıt oranı sağlamıştır¹²⁶. Yürütölen bir diğer randomize çift kör çalışmada ise HER2 temelli tedaviye uygun olmayan, hormon reseptörü pozitif metastatik meme kansinomlu hastalarda sadece paklitaksel tedavisine karşı paklitaksel ile kombine LAG-3-Ig füzyon proteininin kullanılmasının etkinliği ve güvenilirliği araştırılmaktadır. Ana hedefi progresyonsuz sağ kalıma katkıyı değerdendirmek olan bu çalışma halen devam etmektedir¹²⁷.

BÖLÜM III

GEREÇ VE YÖNTEM

I. Çalışma Olgularının Belirlenmesi ve Hazırlanması

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Genel Cerrahi servisi arşiv kayıtlarından, Ocak 2009-Aralık 2013 tarihleri arasında meme tümörü nedeniyle opere olmuş hasta kayıtlarına ulaşıldı. Oluşturulan listeler İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na ait bilgisayar ortamında oluşturulmuş arşiv kayıtları ile karşılaştırıldı.

Neoadjuvan kemoterapi görmüş lokal ileri meme kanserli hastalar çalışma dışı bırakılarak baştan cerrahi uygulanmış erken evre meme kanserleri çalışmaya alındı. Bu kayıtlar içerisinde düzenli klinik takipleri olduğu bilinen HDF'si pozitif (TİL skoru yüksek) grupta yer alan olgular seçilerek toplam 264 adet olgu belirlendi.

Bu olgular içerisinde blokları arşivimizde mevcut olanların tamamı çalışmaya alındı. Blokları temin edilemeyen ve meme kanseri dışı sebepli öldüğü tespit edilen olgular çalışma dışı bırakıldı. Toplam 238 hastaya ait tümörden oluşan çalışma grubu oluşturuldu. Çalışma grubuna dahil edilen olgulara ait klinikopatolojik özelliklere, ilgili kliniklerdeki arşiv kayıtları üzerinden ulaşıldı. Rutin olarak operasyon sonrası ilk iki yıl için 3 ay, 2-5 yıl için 6 ay, 5 yıldan sonra ise 1 yıl aralıklarla takip edilen hastalardan, uzun süredir muayeneye gelmediği belirlenen hastalara telefon ile ulaşıldı. Hastaların şikayetleri, evreleri, nüks ve metastaz durumları, aldıkları tedaviler ve sağ kalımlarıyla ilgili güncel bilgiler elde edildi.

Seçilen olgulara ait arşiv materyalini oluşturan tüm preparatlar tekrar değerlendirildi ve DMA yöntemi uygulanmak üzere, immünohistokimyasal inceleme için uygun özellikte 5 mm çaplı tümör alanları preparatlar üzerinde işaretlendi.

II. Doku Microarray Yöntemi İçin Blokların Hazırlanması

Preparatlar üzerinde işaretlenmiş tümör alanlarına parafin blokta karşılık gelen bölgeler, dermatoloji kliniklerinde kullanılan, 5 mm çaplı punch biyopsi aparatı (Kai Medical) ile parafin bloktan ayrıldı. Ayrılan dokular, bir blokta sekiz doku olacak şekilde sistematik olarak parafine gömülerek yeni parafin bloklar oluşturuldu. Değerlendirme alanını arttırmak amaçlı her hasta

için ikişer adet doku belirlendi. Toplam 238 adet tümörden elde edilen dokular, 62 adet parafin blokta bloklandı (Resim 1).



Resim 1: Doku microarray yöntemi

III. İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi adına antikorlar için normal tonsil dokusuna ait parafin blok kontrol bloğu olarak seçildi. Bu kontrol bloğu kullanılarak antikorlar için ideal yöntem ile dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri belirlendi.

Bir gece etüvde bekletilen lamalar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH Staining modüle yerleştirildi ve aşağıdaki prosedürler uygulandı:

III.A. CTLA-4 ile immünohistokimyasal boyama

1. 15 dakika deparafinizasyon
2. EDTA ile pH 8'de antijen geri kazanım yöntemi
3. Yüz yirmi dakika boyunca 37°C'de primer antikor inkübasyonu
4. Dört dakika boyunca asetat buffer içinde bakır sülfat çözeltisi
5. Hematoksilen ile zıt boyama

III.B. PD-1 ile immünhistokimyasal boyama

1. 15 dakika deparafinizasyon
2. EDTA ile pH 8’de antijen geri kazanım yöntemi
3. Yüz yirmi dakika boyunca 37°C’de primer antikor inkübasyonu
4. İki kez 8 dakika boyunca amplifier A ve B
5. Dört dakika boyunca asetat buffer içinde bakır sülfat çözeltisi
6. Hematoksilen ile zıt boyama

III.C. LAG-3 ile immünhistokimyasal boyama

1. 15 dakika deparafinizasyon
2. EDTA ile pH 8’de antijen geri kazanım yöntemi
3. Yüz yirmi dakika boyunca 37°C’de primer antikor inkübasyonu
4. Dört dakika boyunca asetat buffer içinde bakır sülfat çözeltisi
5. Hematoksilen ile zıt boyama

Makineden çıkarılan preparatlar deterjanlı suyla çalkalanıp saf alkolde üç kez üçer dakika boyunca bekletildi. Ardından ksilen içerisinde de üç kez üçer dakika bekletildikten sonra ‘Safe Mount’ kapatma maddesi ile kapatıldı. Çalışmada kullanılan immunhistokimyasal belirteçlere ait teknik özellikler Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11: Çalışmada kullanılan immünohistokimyasal belirteçlere ait ayrıntılı bilgiler

Antikor ve Klon	Üretici	Sulandırma oranı	İnkübasyon süresi ve sıcaklığı
CTLA-4 – Human Specific Mouse Antibody (Monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology	1/100	120 dakika/37°C
PD-1 – Rabbit Antibody (Monoclonal)	Cell Marque Epitomics	1/200	120 dakika/37°C
LAG-3 – Rabbit Antibody (Monoclonal)	Cell Marque Epitomics	1/200	120 dakika/37°C

IV. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

IV.A. CTLA-4

Tümör hücrelerinde ve lenfositlerde membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma esas alınarak değerlendirme yapıldı. Boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma şiddeti belirlendi. Hücrelerin boyanma şiddetine göre bir değer verildi (0, boyanma yok; 1, zayıf boyanma; 2, orta şiddette boyanma; 3, kuvvetli boyanma). Boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti kullanılarak istatistiksel olarak farklı analizler yapıldı. Ayrıca %1 ve üzeri tüm boyanmalar ‘pozitif’ kabul edilerek, buna göre de istatistiksel analizler yapıldı.

IV.B. PD-1

Lenfositlerde membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma şiddeti belirlendi. Hücrelerin boyanma şiddetine göre bir değer verildi (0, boyanma yok; 1, zayıf boyanma; 2, orta şiddette boyanma; 3, kuvvetli boyanma). Boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı.

IV.C. LAG-3

Lenfositlerde membranöz boyanma pozitif kabul edildi. Boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma şiddeti belirlendi. Hücrelerin boyanma şiddetine göre bir değer verildi (0, boyanma yok; 1, zayıf boyanma; 2, orta şiddette boyanma; 3, kuvvetli boyanma). Boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı.

V. Biyoistatistiksel analiz

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemelerinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS Sürüm: 22.0) paket programı kullanıldı. Kategorik değişkenlerin kıyaslanmasında Ki-kare testi kullanıldı. Gruplar arasında sayısal verilerin karşılaştırılmasında uygunluklarına göre Student t-test veya Mann Whitney U testi kullanıldı. Kümülatif sağ kalım eğrileri Kaplan-Meier metoduyla oluşturuldu, hastanın son muayene veya ölüm tarihine kadar hesaplandı. Sağ kalımı etkileyen faktörlerin karşılaştırılması log-rank testi ile yapıldı. Tek değişkenli analizde anlamlı bulunan faktörler Cox regresyon analiz testine tabi tutularak, bağımsız olup olmadıkları araştırıldı. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık sınırı $p \leq 0,05$ olarak alındı.



BÖLÜM IV

BULGULAR

I. Demografik, Klinik ve Histopatolojik Özellikler

Hastaların tanı aldıkları andaki medyan yaş 51 olup yaşları 27-88 arasında değişmekte idi. Olguların hepsi kadındı. Olguların 188 tanesinde (%79) meme koruyucu cerrahi (MKC), 50 tanesinde (%21) mastektomi uygulanmıştı. Ortalama tümör boyutu $25,1 \pm 10,67$ mm (medyan 25 mm) idi. Yalnızca 46 (%19,3) olguda multifokalite saptandı. Nottingham gradlama sistemi kullanılarak yapılan gradlamada olguların 5'i (%2,1) grad 1, 38'i (%16) grad 2, 195'i (%81,9) grad 3 olarak belirlendi.

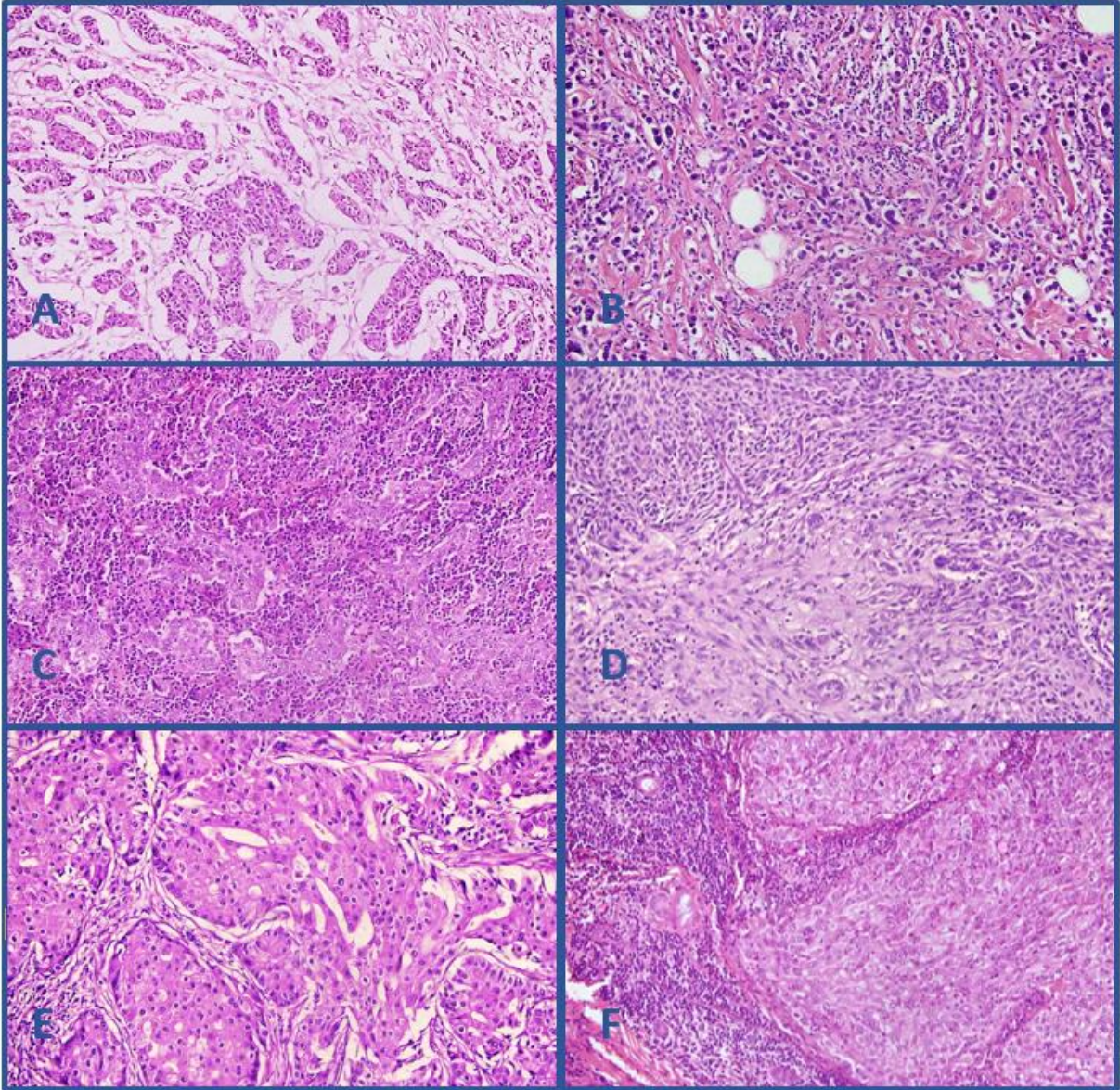
Çalışmaya dahil edilen tümörlerin 205'i (%86,1) invaziv duktal karsinom tanısı almış olup tümörlerin 33'ü (%13,9) diğer tanıları almıştı. Lenf nodu örnekleme tüm olgularda yapılmıştı. Olguların 128'inde (%53,8) en az bir lenf nodunda metastaz saptanmış olup 110'unda (%46,2) metastaz izlenmemişti.

Hastalardan 51'i (%21,4) evre IA, 3'ü (%1,3) evre IB, 89'u (%37,4) evre IIA, 54'ü (%22,7) evre IIB, 28'i (%11,7) evre IIIA ve 13'ü (%5,5) evre IIIC olarak belirlendi. Bu hastalara ait demografik, klinik ve histopatolojik özellikleri Tablo 12'de özetlendi.

Tablo 12: Hastaların demografik, klinik ve histopatolojik özellikleri

Özellikler	Olgu sayısı (n)	Sıklık (%)
Yaş		
>50	126	%52,9
≤50	112	%47,1
Meme Cerrahisi		
MKC	188	%79
Mastektomi	50	%21
Aksilla Cerrahisi		
SLNB	117	%49,2
ALND	121	%50,8
Histopatolojik alt tip		
İnvaziv duktal karsinom	205	%86,1
Diğerleri	33	%13,9
Histolojik Grad		
Grad 1 (düşük)	5	%2,1
Grad 2 (orta)	38	%16
Grad 3 (yüksek)	195	%81,9
Lenfovasküler invazyon		
Negatif	117	%49,2
Pozitif	121	%50,8
Patolojik T		
T1	84	%35,3
T2	151	%63,4
T3	3	%1,3
Patolojik N		
N0	118	%49,6
N1 (1-3)	79	%33,2
N2 (4-9)	28	%11,8
N3 (>9)	13	%5,4
Tümörün yaygınlığı		
Unifokal	192	%80,7
Multifokal/multisentrik	46	%19,3
Patolojik Evre (TNM)		
IA	51	%21,4
IB	3	%1,3
IIA	89	%37,4
IIB	54	%22,7
IIIA	28	%11,7
IIIB	0	%0
IIIC	13	%5,5

Olgularımızdan altısına ait hematoksilin-eozin (HE) kesitler Resim 2’de gösterildi.



Resim 2: A. Nöroendokrin diferansiyasyon gösteren invaziv duktal karsinom (İTF Patoloji AD 14164-12) B. Pleomorfik tipte invaziv lobüler karsinom (İTF Patoloji AD 14545-13) C. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom (İTF Patoloji AD 21193-13) D. Metaplastik karsinom (İTF Patoloji AD 32841-13) E. Apokrin karsinom (İTF Patoloji AD 34331-10) F. Medüller karsinom (İTF Patoloji AD 36176-10) (A-F, HE x200)

II. Hastaliksız Sağ Kalım, Hastalık Spesifik Sağ Kalım ve Genel Sağ Kalım Özellikleri

Tüm hastaların sağ kalım bilgilerine ulaşıldı. Hastaların 200'ünün (%84) sağ, 38'inin (%16) ölü olduğu belirlendi. Takip süresi minimum 7 ay, maksimum 130 ay olup ortalama takip süresi $75,44 \pm 31,86$ (medyan 79) aydı.

Kırk (%16,8) olguda lokal nüks ya da sistemik metastaz ile prezante olan hastalık nüksü saptandı. Olgulardan 10'unda (%4,2) yalnızca lokal nüks, 28'inde (%11,8) sadece sistemik metastaz, 2'sinde (%0,8) hem lokal nüks hem sistemik metastaz saptandı. En son lokal nüks/metastaz görülme zamanı 107. aydı. Hastaların 5 ve 10 yıllık HS oranı ve standart hatası sırasıyla, $83,3 \pm 0,03$ ve $79,3 \pm 0,03$ olarak hesaplandı.

Çalışmaya dahil edilen 238 hastanın 12'sinde (%5) lokal nüks görülmüş olup, en son lokal nüks görülme zamanı 46. aydı. Bu zamana karşılık gelen lokal nüksüz sağ kalım (LNS) oranı %94,4 ve standart hatası 0,16'ydı.

Takip süresinde 36 (%15,1) hastada meme kanserine bağlı ölüm görüldü. En son ölüm görülme zamanı 94. aydı. Hastaların 5 ve 10 yıllık GS oranı ve standart hatası sırasıyla, $90,1 \pm 0,02$ ve $79,2 \pm 0,03$ olarak hesaplandı.

Olgularda tümör boyutu ortalamasının (25,1 mm) altında ve üstünde kalan olgular iki gruba ayrıldı. Tümör boyutu ile GS ve HS ilişkisi değerlendirildi. Beş ve 10 yıllık GS değerleri, ortalamanın altında kalan olgularda sırasıyla %90,1 ve %81,4; ortalamanın üzerindeki olgularda ise sırasıyla %89,3 ve %74,3 olarak saptandı ($p=0,201$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri, ortalamanın altında kalan olgularda sırasıyla %85,3 ve %80,3; ortalamanın üzerindeki olgularda ise sırasıyla %80,5 ve %78,5 idi ($p=0,422$). Sonuç olarak tümör boyutu ile GS ve HS açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

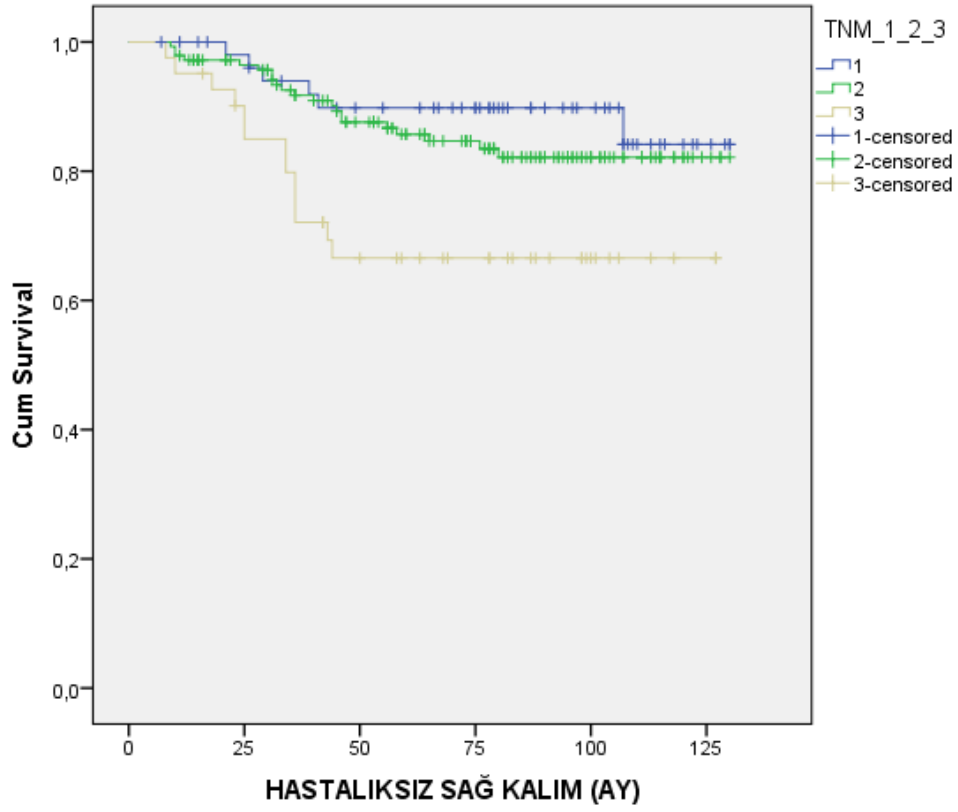
Multifokalite ile sağ kalım ilişkisi değerlendirildiğinde, 10 yıllık LNS değeri tek odaklı tümörde %96,4, multifokal tümörde ise %86,5 olarak saptandı ($p=0,006$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri tek odaklı tümörde sırasıyla %85,5 ve %81,6; multifokal tümörde sırasıyla %74,2 ve %70,9 idi ($p=0,055$). Beş ve 10 yıllık hastalık spesifik sağ kalım (HSS) değerleri ise tek odaklı tümörde sırasıyla %92,9 ve %82; multifokal tümörde sırasıyla %80,5 ve %63 olarak belirlendi ($p=0,032$).

Uygulanan cerrahinin şekli ile sağ kalım ilişkisi değerlendirildiğinde, 10 yıllık LNS değeri MKC yapılan olgularda %97,6, mastektomi yapılan olgularda %82,3 olarak saptandı

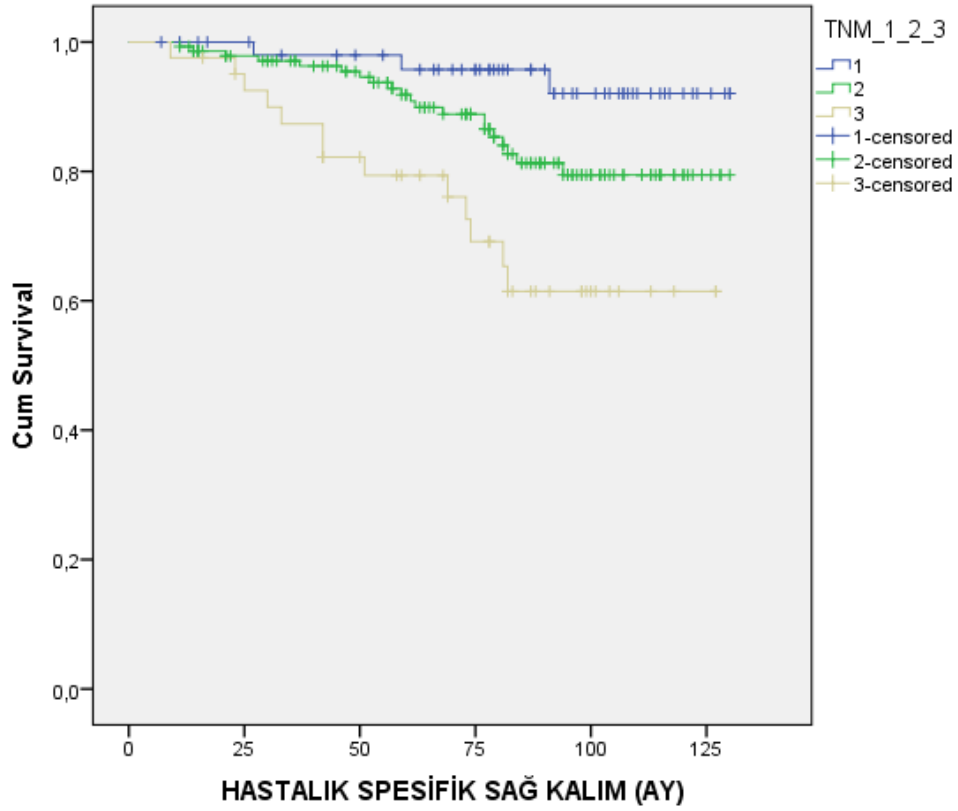
($p<0,001$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri MKC yapılan olgularda sırasıyla %85,9 ve %84,1; mastektomi yapılan olgularda sırasıyla %73,5 ve %62,6 idi ($p=0,014$). Beş ve 10 yıllık HSS değerleri ise MKC yapılan olgularda sırasıyla %92,1 ve %82,5; mastektomi yapılan olgularda sırasıyla %84,4 ve %65,4 olarak belirlendi ($p=0,027$).

Olgularda lenf nodu metastazı ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. On yıllık LNS değeri, lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda %98,1; lenf nodu metastazı saptanan olgularda ise %90,8 olarak belirlendi ($p=0,021$). Beş yıllık ve 10 yıllık HS değerleri lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda sırasıyla %90,6 ve %87,8; lenf nodu metastazı saptanan olgularda ise sırasıyla %76,3 ve %71,2 olarak belirlendi ($p=0,008$). Beş yıllık ve 10 yıllık HSS değerleri lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda sırasıyla %95,2 ve %87,9; lenf nodu metastazı saptanan olgularda ise sırasıyla %86 ve %70,6 olarak belirlendi ($p=0,003$).

Olgularda evre ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. Evre I, evre II ve evre III olarak yapılan gruplandırmada 10 yıllık LNS değerleri sırasıyla %97,9, %96,2 ve %83,6 olarak belirlendi ($p=0,006$). Bu olgularda 5 yıllık HS değerleri sırasıyla %89,8, %85,7 ve %66,5; 10 yıllık HS değerleri sırasıyla %84,2, %82,1 ve %66,5 olarak saptandı ($p=0,011$) (Grafik 1). Bu olgularda 5 yıllık HSS değerleri ise sırasıyla %95,7, %91,8 ve %79,4; 10 yıllık HSS değerleri sırasıyla %92,1, %79,4 ve %61,5 olarak belirlendi ($p=0,001$) (Grafik 2).



Grafik 1: Olgularda evre ve hastalıksız sağ kalım ilişkisi



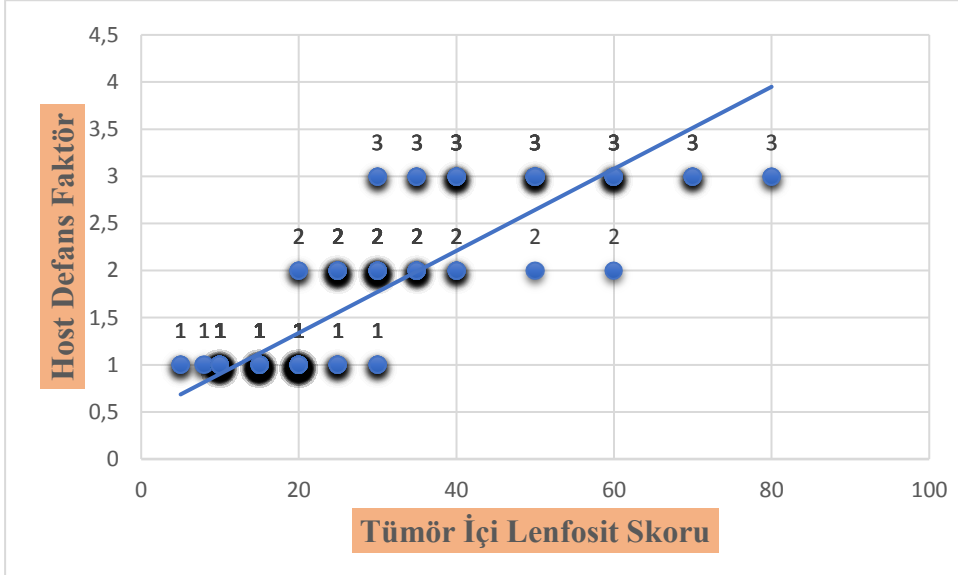
Grafik 2: Olgularda evre ve hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi

III. Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları

III.A. Histomorfolojik inceleme bulguları

Olgulara ait arşivimizde yer alan tüm preparatlar tekrar değerlendirildi. HDF 1+, 2+ ve 3+ olarak belirlenen 238 olguya, 'International TILs Working Group' önerilerinin ışığında Salgado ve ark.⁶ tarafından derlenmiş kılavuz esas alınarak TİL skoru verildi.

HDF 1+ olarak belirlenen 146 olgunun TİL skoru %5-%30 arasında değişmekte olup ortalama $15,9 \pm 5,2$ (medyan 15) idi. HDF 2+ olarak belirlenen 54 olgunun TİL skoru %20-%60 arasında değişmekte olup ortalama $31,02 \pm 7,1$ (medyan 30) idi. HDF 3+ olarak belirlenen 38 olgunun TİL skoru %30-%80 arasında değişmekte olup ortalama $50,26 \pm 13,95$ (medyan 50) idi (Şekil 1).



Şekil 1: Host defans faktör ile tümör içi lenfosit skoru ilişkisi

TİL yüzdesi ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırıldı. Yaş, tümör tipi, tümör boyutu ve multifokalite ile TİL yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,653$, $p=0,589$, $p=0,469$, $p=0,094$).

Histolojik grad I-II tümörlerde ($n=43$) ortalama TİL yüzdesi %17,58 iken, grad III tümörlerde ($n=195$) %26,36 olarak belirlendi. Histolojik grad arttıkça TİL yüzdesinin arttığı saptandı ($p<0,001$).

Lenfovasküler invazyon (LVİ) görülen olgularda (n=121) ortalama TİL yüzdesi %21,87 iken, LVİ görülmeyen olgularda (n=117) %27,78 idi. LVİ ile TİL yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ters ilinti bulundu ($p=0,003$).

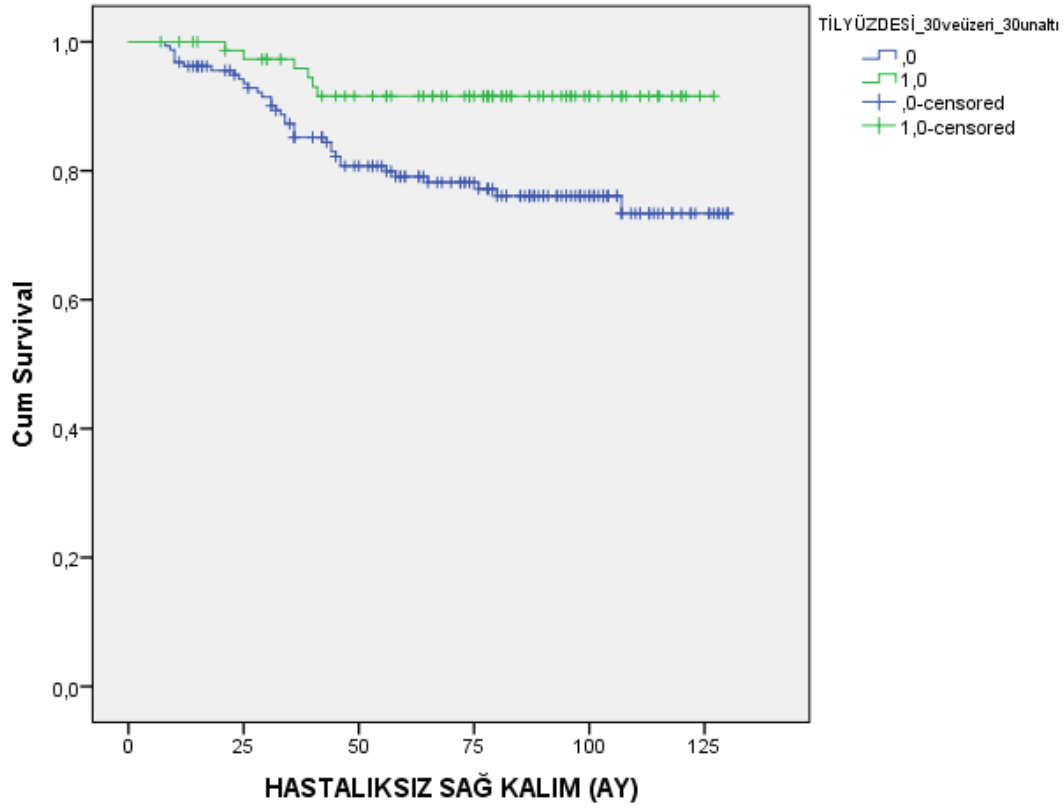
Reseptör durumu ile ilgili yapılan değerlendirmede, ÖR pozitif olgularda (n=131) ortalama TİL yüzdesi %21,08 iken, ÖR negatif olgularda (n=107) %29,30 olarak saptandı ($p<0,001$). PR pozitif olgularda (n=103) ortalama TİL yüzdesi %21,47 iken, PR negatif olgularda (n=135) %27,30 idi ($p=0,004$). Reseptör negatif grupta TİL yüzdesinin daha yüksek olduğu belirlendi.

TİL yüzdesi ile proliferatif kapasite açısından yapılan karşılaştırmada, Ki-67 için %20 ve %35 olarak iki eşik değeri belirlendi. Ki-67 proliferasyon indeksi %20'nin altında olan olgularda (n=13) TİL yüzdesi ortalama %13,31 iken, %20 ve üzerinde olan olgularda (n=225) %25,44 olarak saptandı ($p<0,001$). Eşik değeri %35 olarak alındığı durumda da benzer sonuçlar tespit edildi. Ortalama TİL yüzdesi Ki-67 indeksi %35'in altında olan olgularda (n=75) %21,55, %35 ve üzeri olan olgularda (n=163) %26,26 idi ($p=0,003$). Sonuç olarak yüksek proliferatif kapasiteye sahip tümörlerde TİL yüzdesinin de yüksek olduğu tespit edildi.

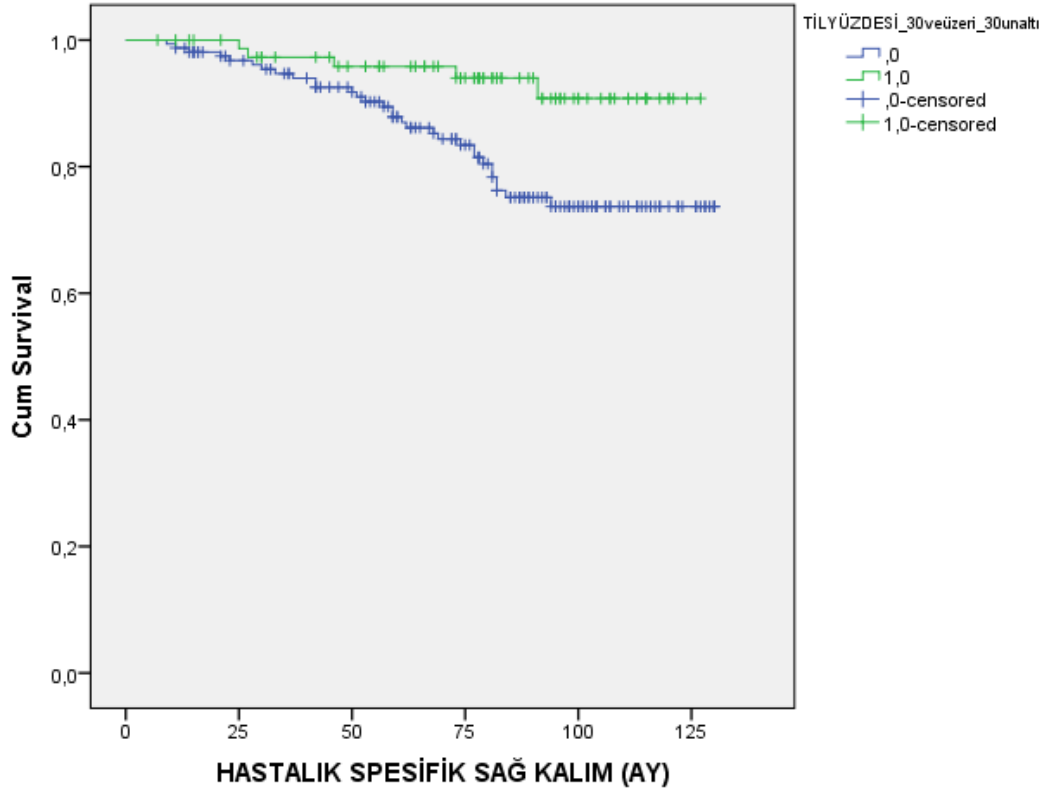
Moleküler alt tip 'luminal' ve 'non-luminal' olarak ayrıldığında, luminal olan grupta (n=132) ortalama TİL yüzdesi %20,99 iken, non-luminal grupta (n=106) %29,48 olarak saptandı. Luminal grupta TİL yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,001$).

TİL yüzdesi için eşik değeri Schalper ve ark.¹²⁸'nin da 2014 yılında yaptıkları çalışmada tavsiye ettiği üzere %30 olarak alındı ve olgular $<\%30$ (n=159) ve $\geq\%30$ (n=79) olmak üzere iki gruba ayrıldı.

TİL yüzdesi %30'un altındaki olgularda 10 yıllık LNS %92,3 iken, %30 ve üzerindeki olgularda %98,5 olarak saptandı. Beş ve 10 yıllık HS oranları TİL yüzdesi %30'un altındaki olgularda sırasıyla %79,1 ve %73,4; %30 ve üzerindeki olgularda sırasıyla %91,6 ve %91,6 olarak saptandı ($p=0,008$) (Grafik 3). Beş ve 10 yıllık HSS oranları ise TİL yüzdesi %30'un altındaki olgularda sırasıyla %87,8 ve %73,7; %30 ve üzerindeki olgularda sırasıyla %95,8 ve %90,8 olarak saptandı ($p=0,010$) (Grafik 4).



Grafik 3: Olgularda tümör içi lenfosit yüzdesi ve hastalıksız sağ kalım ilişkisi



Grafik 4: Olgularda tümör içi lenfosit yüzdesi ve hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi

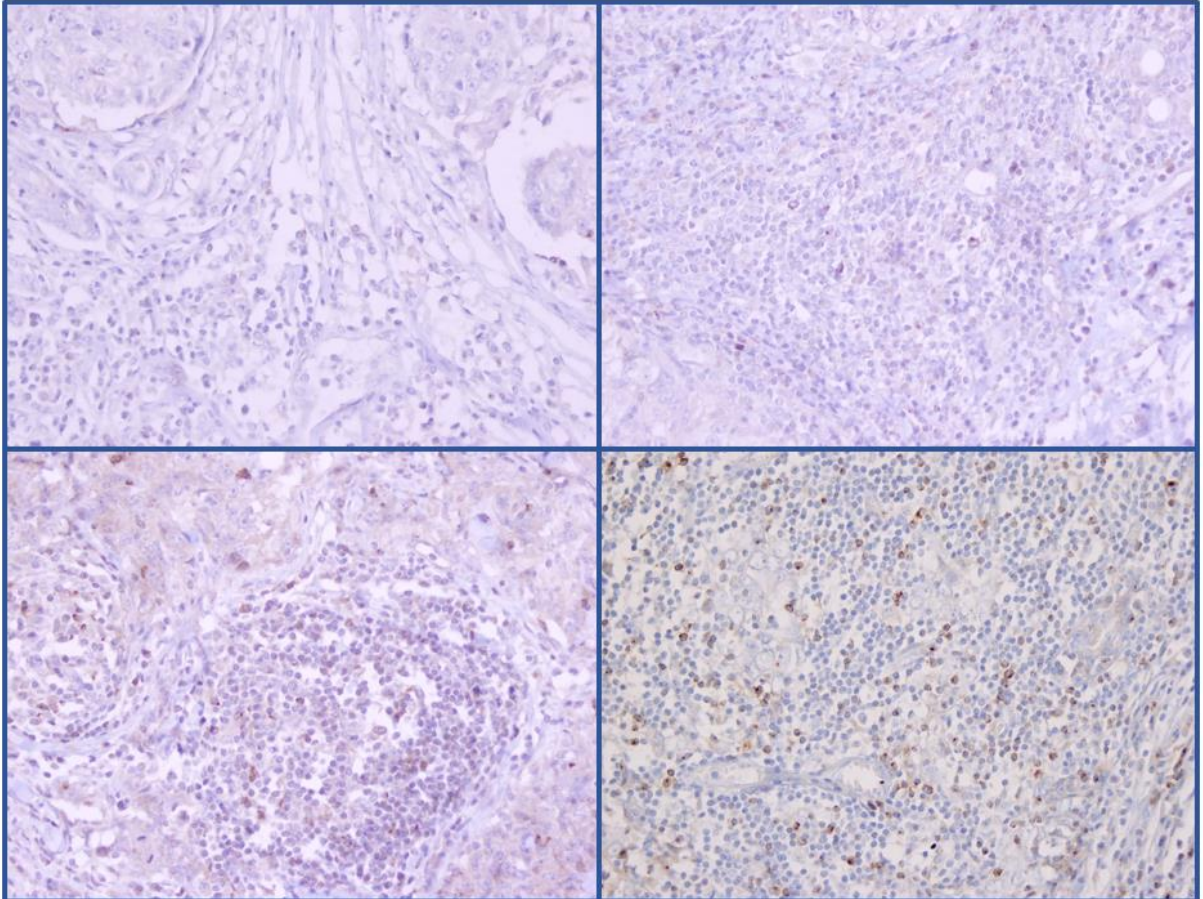
III.B. İmmünohistokimyasal inceleme bulguları

Tüm olgular immünohistokimyasal olarak CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 antikorları çalışılarak değerlendirildi.

III.B.1. CTLA-4 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları

III.B.1.A. Lenfositlerde CTLA-4 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları

CTLA-4 antikoru ile yapılan değerlendirmede 63 olguda (%26,5) lenfositlerde boyanma izlenmezken, kalan 175 olguda (%73,5) %0-20 arasında değişen oranlarda zayıf, orta şiddette ya da kuvvetli boyanmalar izlendi. Boyanma şiddeti, boyanma izlenen olguların 41'inde (%23,4) zayıf, 112'sinde (%64) orta şiddette, 22'sinde (%12,6) kuvvetli olarak belirlendi (Resim 3).



Resim 3: CTLA-4 immünohistokimyasal incelemesi A. Tümörde ve lenfositlerde boyanma yok (İTF Patoloji AD 11193-09) B. Lenfositlerin %1'inde zayıf boyanma (İTF Patoloji AD 3862-09) C. Lenfositlerin %3'ünde orta şiddette boyanma (İTF Patoloji AD 16333-13) D. Lenfositlerin %10'unda kuvvetli boyanma (İTF Patoloji AD 36176-10) (A-D, CTLA-4 x400)

III.B.1.A.1. Lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi

Lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, evre, LVİ, ÖR, PR, HER2 durumu ve moleküler alt tip arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,978$, $p=0,920$, $p=0,160$, $p=0,269$, $p=0,062$, $p=0,057$, $p=0,493$, $p=0,607$, $p=0,898$, $p=0,543$).

Lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi ile proliferatif kapasite ilişkisi değerlendirildi. Ki-67 proliferasyon indeksi %35'in altında olan olguların ($n=75$) %62,7'sinde lenfositlerde CTLA-4 pozitif iken %35 ve üzeri olan olguların ($n=163$) %78,5'inde lenfositlerde CTLA-4 pozitif bulundu. Proliferatif kapasitesi yüksek olan tümörlerde, lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesinin daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0,010$).

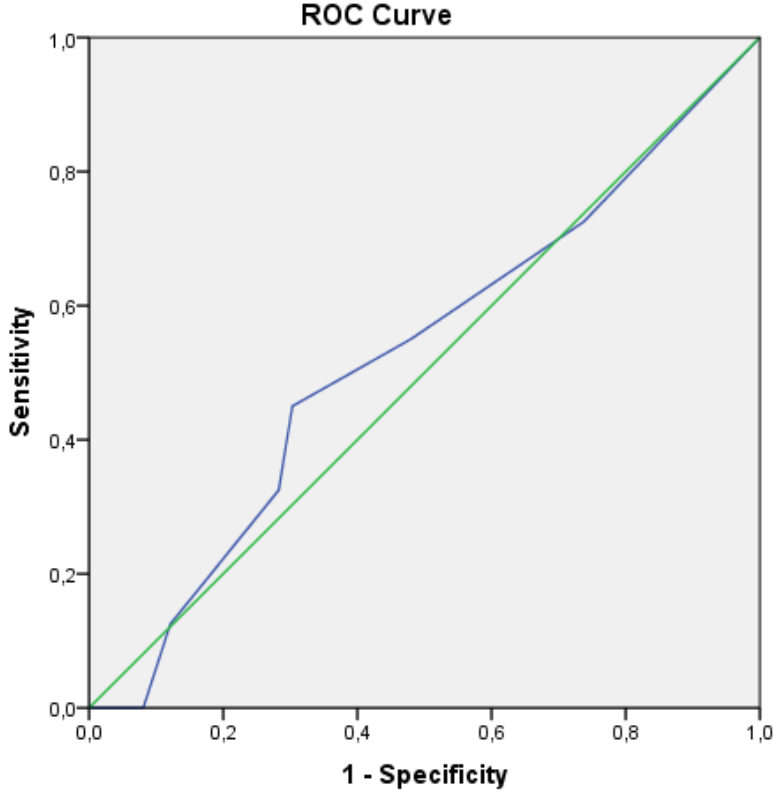
III.B.1.A.2. Lenfositlerde CTLA-4 boyanma şiddeti

Lenfositlerdeki CTLA-4 immün boyanma şiddeti ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz, GS ve HS ilişkileri değerlendirildi, boyanma şiddeti ile bu veriler açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,357$, $p=0,492$, $p=0,278$, $p=0,500$, $p=0,168$, $p=0,524$).

III.B.1.A.3. Lenfositlerde CTLA-4 boyanma yüzdesi

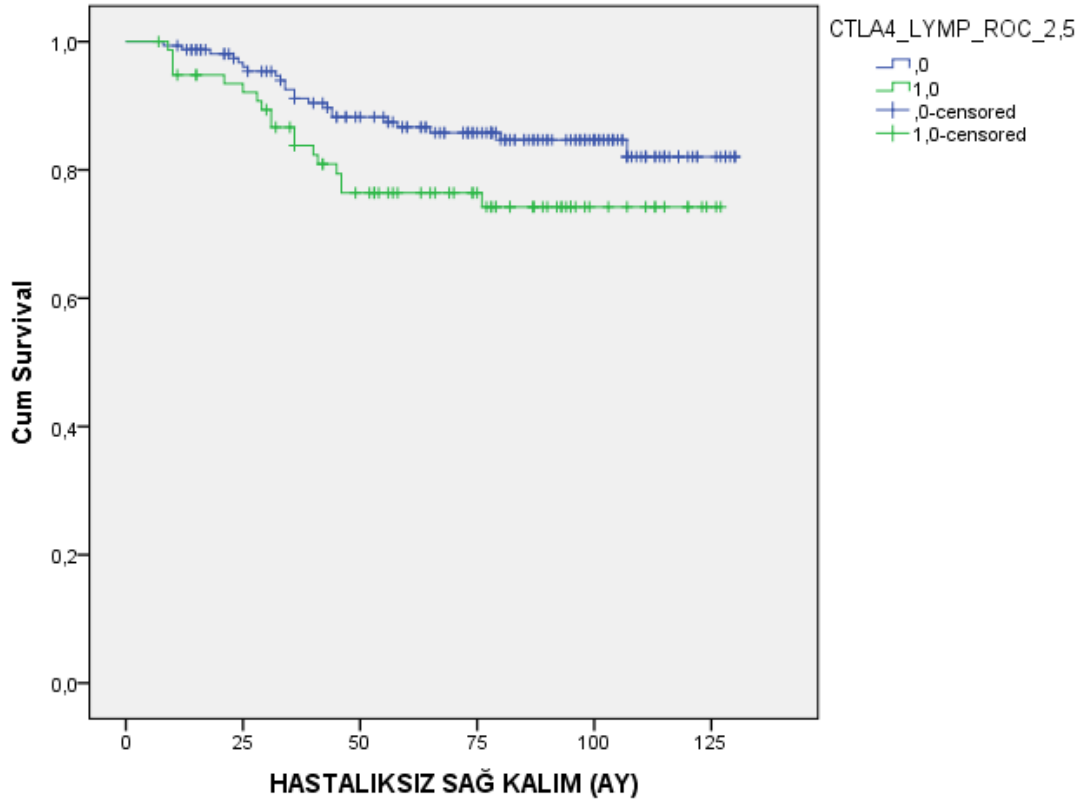
Lenfositlerdeki CTLA-4 immün boyanma yüzdesi ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz ilişkileri değerlendirildi. CTLA-4 immünohistokimyasal incelemesinde, boyanan lenfositlerin oranı ile LVİ arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ters ilinti bulundu ($p=0,001$).

Lenfosit CTLA-4 yüzdesinin hangi eşik değerde pozitif kabul edilmesi gerektiğinin tespiti için yapılan ROC eğrisinde, eğri altında kalan alan $0,546 \pm 0,052$ (%95 CI:0,444-0,649) olarak saptandı (Grafik 5). Buna göre meme kanseri nüks/metastaz varlığını belirlemede en uygun lenfosit CTLA-4 pozitif eşik değerinin %2,5 olduğu mevcut verilerden bulundu (Duyarlılık: 0,472; özgüllük: 0,698). Olguların 160'ının bu eşiğin altında, 78'inin bu eşiğin üzerinde olduğu saptandı.

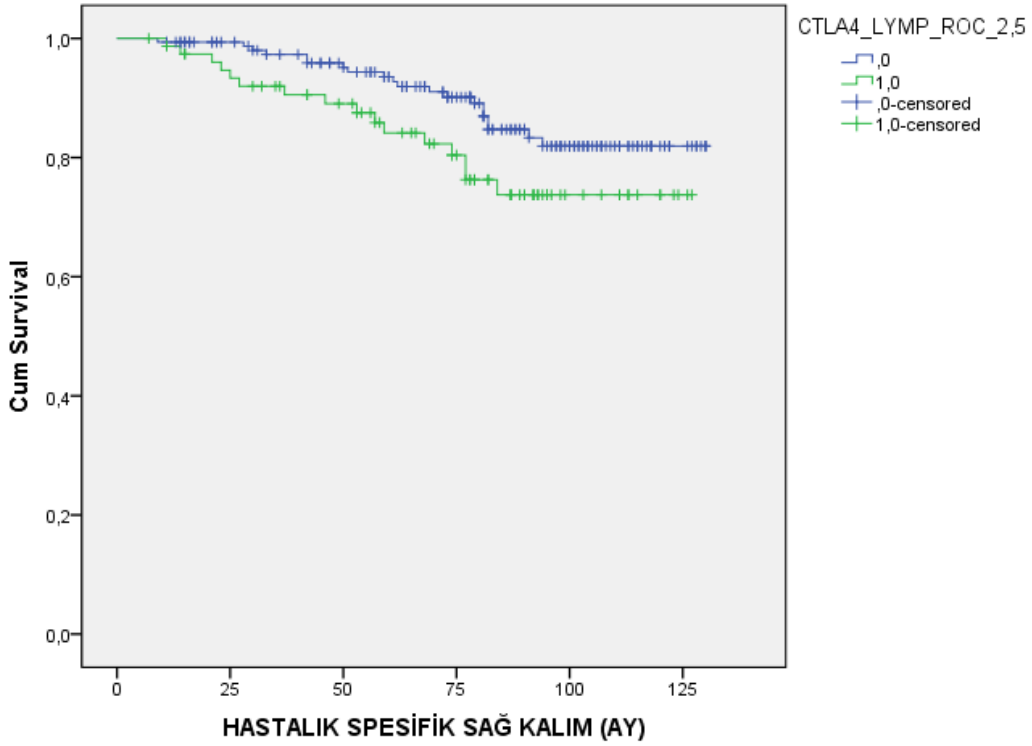


Grafik 5: Nüks/metastaz varlığında en uygun lenfosit CTLA-4 pozitif eşik değeri (ROC analiz sonuçları)

Lenfosit CTLA-4 pozitif eşik değeri ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. On yıllık LNS değeri, lenfositlerdeki CTLA-4 yüzdesi eşik altında kalan olgularda %97,2; eşik üzerindeki olgularda ise %88,6 olarak belirlendi ($p=0,009$). Beş yıllık ve 10 yıllık HS değerleri eşik altında kalan olgularda sırasıyla %86,7 ve %82; eşik üzerindeki olgularda ise sırasıyla %76,4 ve %74,2 olarak belirlendi ($p=0,044$) (Grafik 6). Beş ve 10 yıllık HSS değerleri eşik altında kalan olgularda sırasıyla %93,6 ve %81,9; eşik üzerindeki olgularda ise sırasıyla %84,1 ve %73,7 olarak belirlendi ($p=0,026$) (Grafik 7). Sonuç olarak lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesi arttıkça LNS, HS ve HSS'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi.



Grafik 6: Olgularda lenfositlerde CTLA-4 yüzdesi ve hastalıksız sağ kalım ilişkisi



Grafik 7: Olgularda lenfositlerde CTLA-4 yüzdesi ve hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi

III.B.1.B. Tümör hücrelerinde CTLA-4 ile immünhistokimyasal inceleme bulguları

CTLA-4 ile olguların 184'ünde (%77,3) tümör hücrelerinde boyanma tespit edildi.

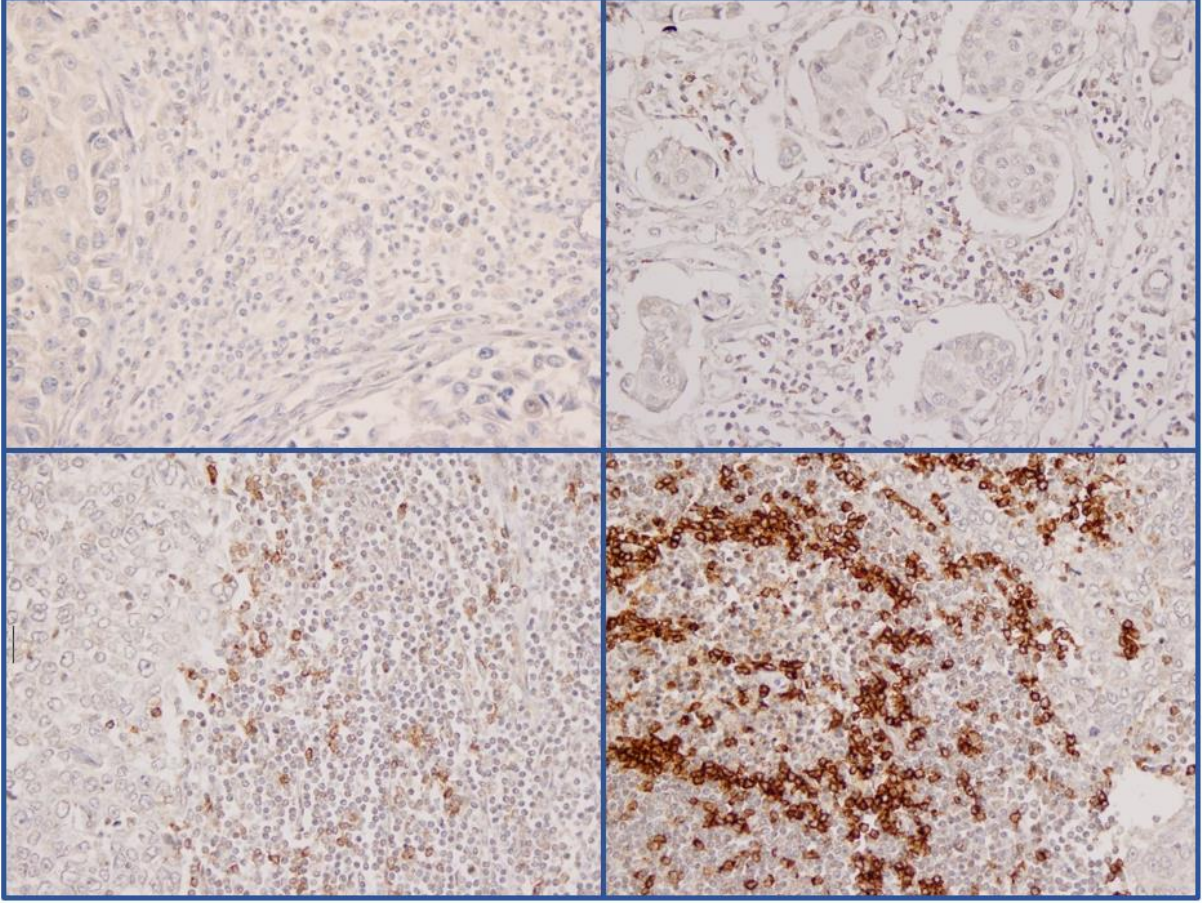
Boyanan tümör hücrelerinin yüzdesi 0-100 arasında değişmekteydi. Ortalama boyanma yüzdesi $40,19 \pm 28,03$ (medyan 50) idi. Tümör hücrelerinde CTLA-4 immün boyanma yüzdesi ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz, GS ve HS ilişkileri değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,110$, $p=0,220$, $p=0,470$, $p=0,809$, $p=0,471$, $p=0,472$).

Tümörde CTLA-4 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, tümör boyutu, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, LVİ, ÖR, PR ve HER2 durumu, proliferatif kapasite, moleküler alt tip ve tümör mikroçevresinde plazma hücre varlığı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,295$, $p=0,658$, $p=0,354$, $p=0,713$, $p=0,583$, $p=0,782$, $p=0,210$, $p=0,388$, $p=0,411$, $p=0,260$, $p=0,621$, $p=0,427$, $p=0,517$).

III.B.2. Lenfositlerde PD-1 ile immünhistokimyasal inceleme bulguları

PD-1 ile olguların 129'unda (%54,2) lenfositlerde boyanma tespit edildi. Boyanan lenfositik hücrelerin yüzdesi 0-30 arasında değişmekteydi. Ortalama boyanma yüzdesi $3,86 \pm 6,71$ (medyan 1) idi.

Lenfositlerde PD-1 boyanma şiddeti, boyanma izlenen olguların 7'sinde (%5,4) zayıf, 9'unda (%7) orta şiddette, 113'ünde (%87,6) kuvvetli olarak belirlendi (Resim 4).



Resim 4: PD-1 immünohistokimyasal incelemesi A. Lenfositlerde boyanma yok (İTF Patoloji AD 4757-09) B. Lenfositlerin %2'sinde zayıf boyanma (İTF Patoloji AD 36813-11) C. Lenfositlerin %8'inde orta şiddette boyanma (İTF Patoloji AD 31417-12) D. Lenfositlerin %30'unda kuvvetli boyanma (İTF Patoloji AD 22851-13) (A-D, PD-1 x400)

III.B.2.A. Lenfositlerde PD-1 pozitivitesi

Lenfositlerde PD-1 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, tümör boyutu, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, LVİ, HER2 durumu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,635$, $p=0,369$, $p=0,883$, $p=0,258$, $p=0,803$, $p=0,776$, $p=0,713$, $p=0,960$).

Histolojik gradı I ve II olan toplam 43 olgunun %39,5'inde PD-1 pozitif iken, grad III 195 olgunun %57,4'ünde PD-1 pozitif saptandı. Histolojik gradı III olan tümörlerde PD-1 pozitivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlendi ($p=0,049$).

Reseptör durumu ile PD-1 ilişkisi değerlendirildiğinde, ÖR pozitif grupta ($n=131$) %45,8 PD-1 pozitifliği var iken ÖR negatif grupta ($n=107$) bu oran %64,5 olarak bulundu. ÖR negatif tümörlerde PD-1 pozitivitesinin daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0,004$). PR negatif

tümörlerde de PD-1 pozitivitesi artmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p=0,126$).

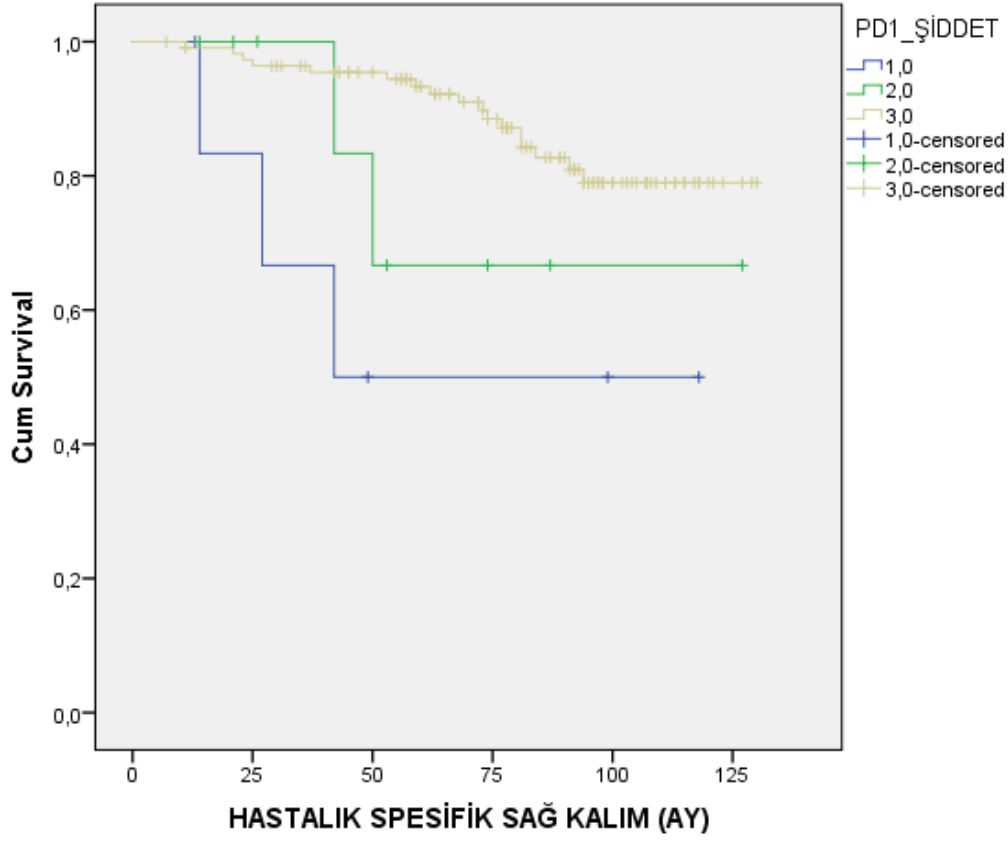
PD-1 pozitivitesi ile proliferatif kapasite ilişkisi değerlendirildi. Ki-67 proliferasyon indeksi %35'in altında olan olguların ($n=75$) %38,7'sinde PD-1 pozitif iken, %35 ve üzeri olan olguların ($n=163$) %61,3'ünde PD-1 pozitif bulundu. Proliferatif kapasitesi yüksek olan tümörlerde, PD-1 pozitivitesinin daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0,001$).

Moleküler alt tip ile PD-1 ilişkisi değerlendirildi. Luminal grupta ($n=132$) %46,2 olguda, non-luminal grupta ($n=106$) ise %64,2 olguda PD-1 pozitif saptandı. Luminal grupta PD-1 pozitivitesinin azaldığı tespit edildi ($p=0,006$).

III.B.2.B. Lenfositlerde PD-1 boyanma şiddeti

Lenfositlerde PD-1 immün boyanma şiddeti ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz ve HS ilişkileri değerlendirildiğinde boyanma şiddeti ile bu veriler açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,762$, $p=0,967$, $p=0,180$, $p=0,659$, $p=0,216$).

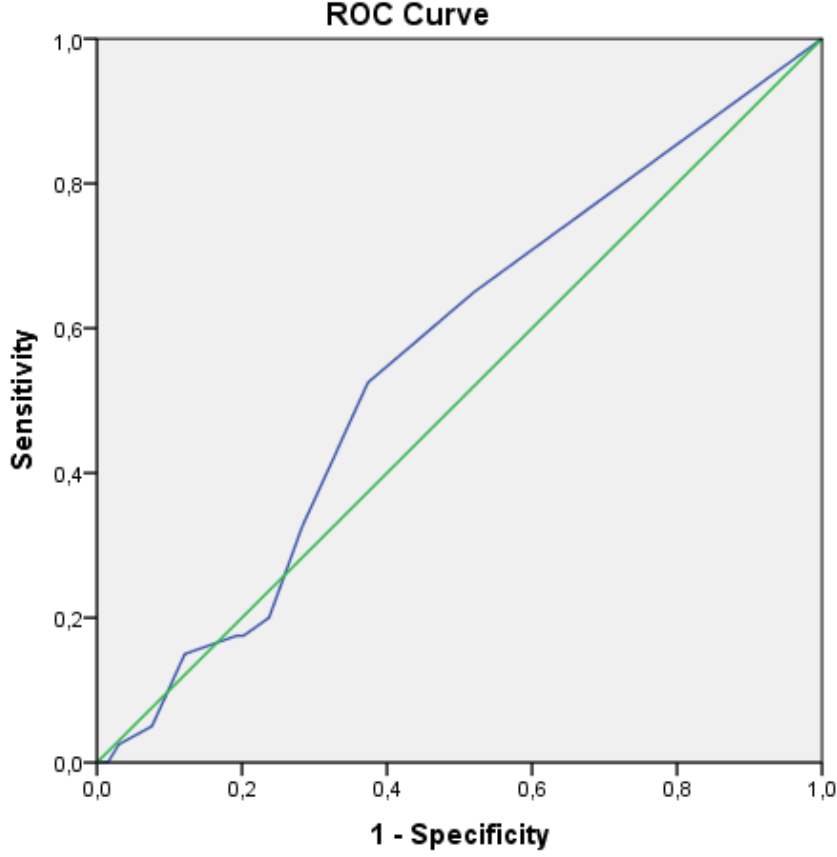
Lenfositlerde PD-1 boyanma şiddeti ile HSS ilişkisinin değerlendirilmesinde; zayıf, orta şiddette ve kuvvetli boyanan olgularda 5 yıllık HSS değerleri sırasıyla %50, %66,7 ve %93,3 olarak belirlendi ($p=0,015$) (Grafik 8). Sonuç olarak lenfositlerde şiddetli PD-1 boyanması olan olguların HSS değeri diğerlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptandı.



Grafik 8: PD-1 boyanma şiddeti ile hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi

III.B.2.C. Lenfositlerde PD-1 boyanma yüzdesi

PD-1 yüzdesinin hangi eşik değerde pozitif kabul edilmesi gerektiğinin tespiti için yapılan ROC eğrisinde, eğri altında kalan alan $0,559 \pm 0,048$ (%95 CI: 0,465-0,653) olarak saptandı (Grafik 9). Buna göre meme kanserinde nüks/metastaz varlığını belirlemede en uygun PD-1 pozitif eşik değerinin %1,5 olduğu mevcut verilerden bulundu (Duyarlılık: 0,525; özgüllük: 0,626). Olguların 143'ünün bu eşiğin altında, 95'inin bu eşiğin üzerinde olduğu saptandı.

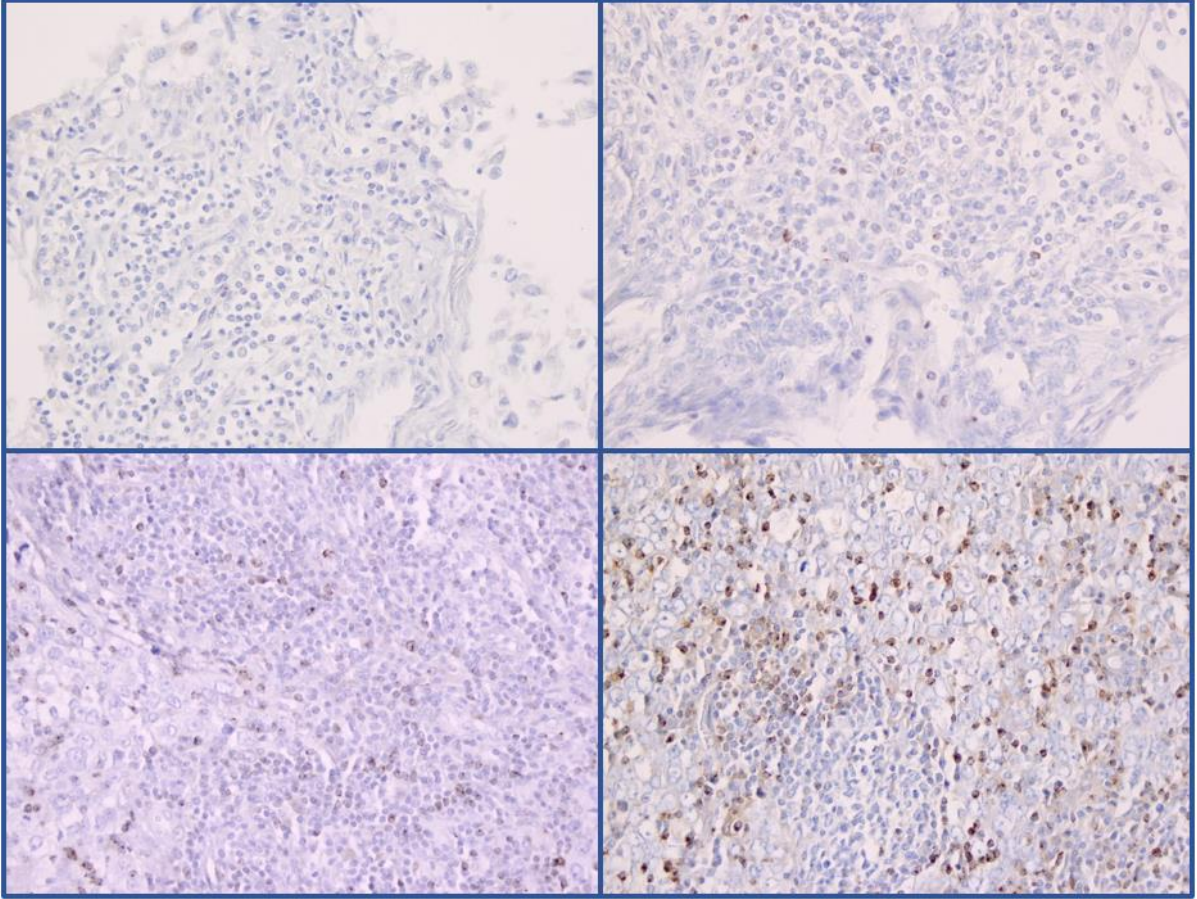


Grafik 9: Nüks/metastaz varlığında en uygun lenfosit PD-1 pozitif eşik değeri (ROC analiz sonuçları)

Lenfositlerde PD-1 pozitif eşik değeri ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. PD-1 pozitiflik yüzdesinin fazlalığı LNS, HS ve HSS'yi azaltmakla birlikte, bu durumun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı saptandı (sırasıyla $p=0,899$, $p=0,096$, $p=0,361$).

III.B.3. Lenfositlerde LAG-3 ile immünohistokimyasal inceleme bulguları

LAG-3 antikoruna ile yapılan değerlendirmede 56 olguda (%23,5) immün boyanma izlenmezken, kalan 182 olguda (%76,5) %0-50 arasında değişen oranlarda zayıf, orta şiddette ya da kuvvetli boyanmalar izlendi. Boyanma şiddeti, boyanma izlenen olguların 11'inde (%6,1) zayıf, 146'sında (%80,2) orta şiddette, 25'inde (%13,7) kuvvetli olarak belirlendi (Resim 5).



Resim 5: LAG-3 immünohistokimyasal incelemesi A. Lenfositlerde boyanma yok (İTF Patoloji AD 17718-12) B. Lenfositlerin %2'sinde zayıf boyanma (İTF Patoloji AD 20570-09) C. Lenfositlerin %5'inde orta şiddette boyanma (İTF Patoloji AD 2542-10) D. Lenfositlerin %50'sinde kuvvetli boyanma (İTF Patoloji AD 33417-11) (A-D, LAG-3 x400)

III.B.3.A. Lenfositlerde LAG-3 pozitivitesi

Lenfositlerde LAG-3 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, HER2 durumu ve moleküler alt tip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,989$, $p=0,226$, $p=0,300$, $p=0,706$, $p=0,052$, $p=0,724$, $p=0,094$).

LAG-3 pozitivitesinin tümör çapı ile doğru ilintili, LVİ ile ters ilintili olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,030$, $p=0,014$).

Histolojik gradı I ve II olan toplam 43 olgunun %60,5'inde LAG-3 pozitif iken, grad III 195 olgunun %80'inde LAG-3 pozitif saptandı. Histolojik gradı III olan tümörlerde LAG-3 pozitivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlendi ($p=0,011$).

Reseptör durumu ile LAG-3 ilişkisi değerlendirildiğinde, PR pozitif grupta ($n=103$) %68,9 LAG-3 pozitifliği var iken PR negatif grupta ($n=135$) bu oran %82,2 olarak bulundu. PR

negatif tümörlerde LAG-3 pozitivitesinin daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0,025$). Ör negatif tümörlerde de LAG-3 pozitivitesi artmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p=0,081$).

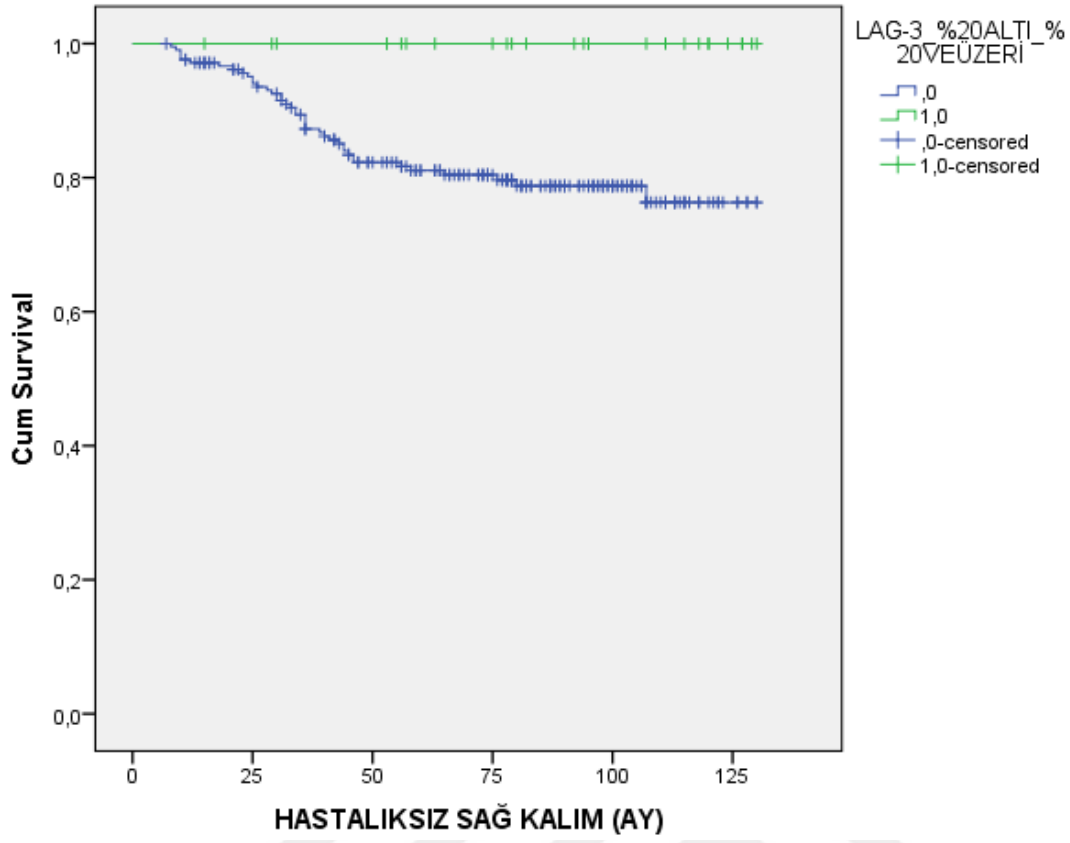
LAG-3 pozitivitesi ile proliferatif kapasite ilişkisi değerlendirildi. Ki-67 proliferatif indeksi %35'in altında olan olguların ($n=75$) %60'ında LAG-3 pozitif iken %35 ve üzeri olan olguların ($n=163$) %84'ünde LAG-3 pozitif bulundu. Proliferatif kapasitesi yüksek olan tümörlerde, LAG-3 pozitivitesinin daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0,001$).

III.B.3.B. Lenfositlerde LAG-3 boyanma şiddeti

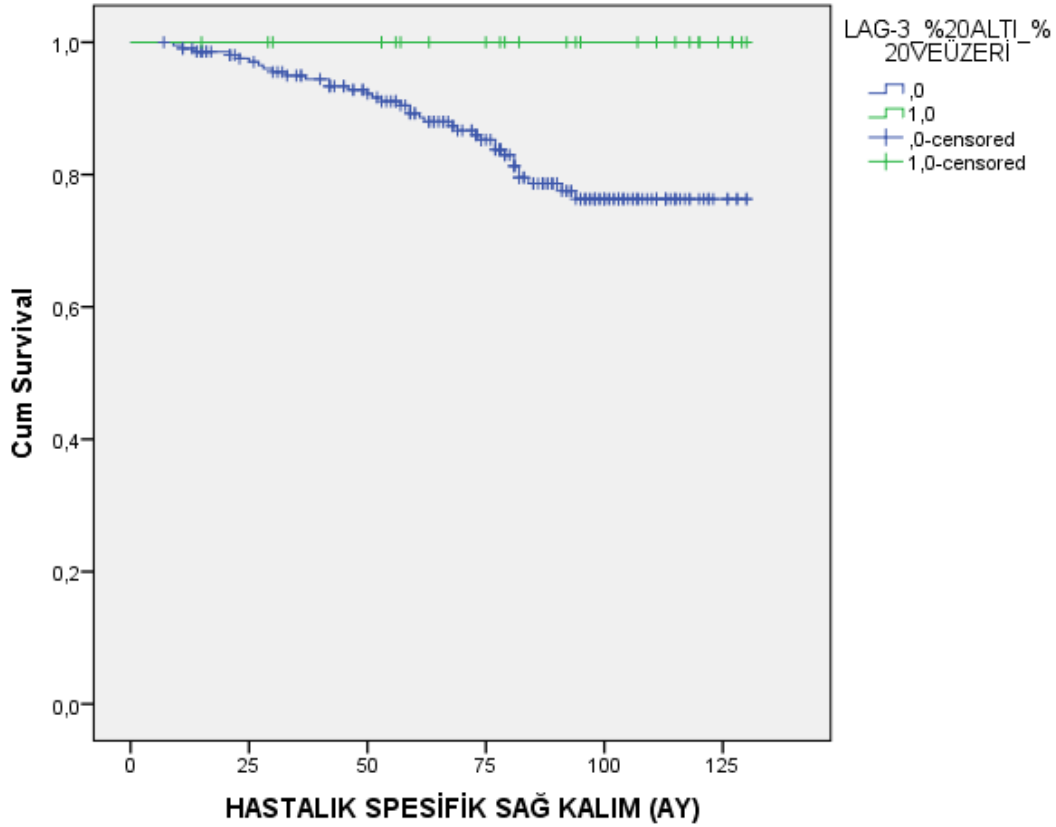
Lenfositlerde LAG-3 immün boyanma şiddeti ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz, HS ve HSS ilişkileri değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,142$, $p=0,595$, $p=0,834$, $p=0,682$, $p=0,527$, $p=0,319$).

III.B.3.C. Lenfositlerde LAG-3 boyanma yüzdesi

LAG-3 yüzdesi ile LNS arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. LAG-3 yüzdesi %20'nin altında olan 211 olguda 5 ve 10 yıllık HS değerleri sırasıyla %81,1 ve %76,3 iken, %20 ve üzerinde olan 27 olguda 5 ve 10 yıllık HS değerleri sırasıyla %100 ve %100 olarak saptandı ($p=0,014$) (Grafik 10). Beş ve 10 yıllık HSS değerleri ise %20'nin altındaki olgularda sırasıyla %89,2 ve %76,3 iken, %20 ve üzerindeki olgularda sırasıyla %100 ve %100 olarak belirlendi ($p=0,020$) (Grafik 11).



Grafik 10: LAG-3 yüzdesi ile hastalıksız sağ kalım ilişkisi



Grafik 11: LAG-3 yüzdesi ile hastalık spesifik sağ kalım ilişkisi

III.B.4. CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 immünohistokimyasal boyanmalarının birbirleri ile ve tümör içi lenfosit yüzdesi ile ilişkisi

Tümör hücrelerindeki CTLA-4 boyanma yüzdesi ile TİL yüzdesi, lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilinti saptanmadı (sırasıyla $p=0,968$, $p=0,176$, $p=0,310$, $p=0,521$).

TİL yüzdesi ile lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde doğru ilinti bulundu ($p<0,001$).

Lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesinin birbirleri ile olan ilişkisine bakıldığında, her birinin diğeri ile doğru ilintide olduğu tespit edildi (CTLA-4 ile LAG-3: $p<0,001$; CTLA-4 ile PD-1: $p=0,036$; LAG-3 ile PD-1: $p=0,005$) (Tablo 13).

Tablo 13: İmmünohistokimyasal boyanma yüzdelерinin birbirleriyle ve tümör içi lenfosit yüzdesiyle olan ilişkisi

%		TİL	Tümör CTLA-4	Lenfosit CTLA-4	LAG-3
Tümör CTLA-4	r	-0,003			
	p	0,968			
Lenfosit CTLA-4	r	0,266**	0,088		
	p	<0,001	0,176		
LAG-3	r	0,440**	0,066	0,575**	
	p	<0,001	0,310	<0,001	
PD-1	r	0,256**	-0,042	0,136*	0,182**
	p	<0,001	0,521	0,036	0,005

*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; Pearson Korelasyon

III.C. Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları

Multifokalite, cerrahi operasyonun tipi, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi, lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi ve LAG-3 pozitivitesi çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde, sadece TİL yüzdesinin LNS'yi öngörmeye bağımsız prognostik faktör olduğu saptandı (Tablo 14).

Tablo 14: Lokal nüksüz sağ kalıma etki eden faktörler (Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları)

Faktörler	Referans	HR	95%CI	p
Tümör odağı (Tek odak vs çok odak)	Tek odak (1)	2,492	0,672-9,252	0,172
Cerrahi tip (MKC vs mastektomi)	MKC (1)	3,325	0,775-14,270	0,106
pN evresi (pN0 vs pN+)	pN0 (1)	3,524	0,681-18,246	0,133
HDF (+ vs ++&+++)	HDF++&+++ (1)	2,573	0,682-9,707	0,163
TİL (<%30 vs ≥%30)	≥%30 (1)	11,944	1,244-114,652	0,032
Lenfosit CTLA-4 (<%3 vs ≥%3)	<%3 (1)	3,375	0,896-12,717	0,072
LAG-3 (<%5 vs ≥%5)	<%5 (1)	2,443	0,557-10,726	0,237

HS'yi öngörmedeki bağımsız faktörleri tespit etmek amacıyla yapılan çok değişkenli analizde multifokalite, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi ve lenfositlerde CTLA-4 pozitifliği HS'yi öngörmede bağımsız prognostik faktör olarak belirlendi (Tablo 15).

Tablo 15: Hastalıksız sağ kalıma etki eden faktörler (Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları)

Faktörler	Referans	HR	95%CI	p
Tümör odağı (Tek odak vs çok odak)	Tek odak (1)	2,464	1,206-5,035	0,013
pN evresi (pN0 vs pN+)	pN0 (1)	2,349	1,186-4,653	0,014
HDF (+ vs ++&+++)	HDF++&+++ (1)	2,675	1,190-6,015	0,017
TİL (<%30 vs ≥%30)	≥%30 (1)	7,154	2,367-21,627	0,000
Lenfosit CTLA-4 (<%3 vs ≥%3)	<%3 (1)	2,423	1,222-4,805	0,011
LAG-3 (<%10 vs ≥%10)	≥%10 (1)	1,675	0,658-4,259	0,279
PD-1 (<%1 vs ≥%1)	<%1 (1)	1,718	0,878-3,361	0,114

HSS'yi öngörmedeki bağımsız faktörleri tespit etmek amacıyla da çok değişkenli analiz yapıldı. Multifokalite, lenf nodu metastazı ve lenfositlerde CTLA-4 pozitifliği HSS'yi öngörmede bağımsız prognostik faktör olarak belirlendi (Tablo 16).

Tablo 16: Hastalık spesifik sağ kalıma etki eden faktörler (Çok değişkenli Cox regresyon analiz sonuçları)

Faktörler	Referans	HR	95%CI	p
Tümör odağı (Tek odak vs çok odak)	Tek odak (1)	2,132	1,036-4,387	0,040
pN evresi (pN0 vs pN+)	pN0 (1)	2,779	1,334-5,790	0,006
TİL (<%30 vs ≥%30)	≥%30 (1)	2,648	0,956-7,336	0,061
Lenfosit CTLA-4 (<%3 vs ≥%3)	<%3 (1)	3,385	1,671-6,856	0,001
LAG-3 (<%10 vs ≥%10)	≥%10 (1)	2,682	0,920-7,821	0,071

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Çalışmamızda, seçilmiş HDF'si pozitif meme karsinomu olgularını TİL skoru açısından yeniden değerlendirdik. Bu olgularda DMA yöntemi ile hazırlanan kesitlerde CTLA-4, PD-1, LAG-3 immünohistokimyasal belirteçlerini uygulayıp elde edilen sonuçların klinik değişkenlerle ilişkisini saptamayı ve prognostik değerlerini ölçmeyi hedefledik. Bununla birlikte tümör boyutu, multifokalite, LVİ, lenf nodu durumu, TİL yüzdesi ve evre gibi diğer önemli klinik ve histolojik parametrelerin de çeşitli değişkenlerle ilişkilerini saptadık.

Çalışmamızda tüm olgularda, 5 ve 10 yıllık HS oranı ve standart hatası sırasıyla, $83,3 \pm 0,03$ ve $79,3 \pm 0,03$ iken, LNS oranı $94,4$ ve standart hatası $0,16$ idi. Beş ve 10 yıllık GS oranı ve standart hatası ise sırasıyla, $90,1 \pm 0,02$ ve $79,2 \pm 0,03$ olarak hesaplandı. Bilindiği üzere meme karsinomlarında grad arttıkça sağ kalım azalmaktadır⁵². Çalışmamızda grad III tümörler çoğunlukta ($81,9$) olmasına rağmen sağ kalımın bu denli yüksek olması, çalışma grubumuzun HDF (+) olguları içermesiyle açıklanabilir.

Literatürde birçok çalışma tümör boyutunun sağ kalım açısından bağımsız prognostik faktör olduğunu göstermiştir^{129,130}. Örneğin 2012 yapılan bir çalışmada, lenf nodu metastazı yapmış ve yapmamış toplam 1,894 meme tümöründe, tümör boyutunun 15 yıllık sağ kalıma nasıl katkı yaptığı araştırılmış; tümör boyutundaki 1,5 cm'lik azalmanın, lenf nodu pozitif ve negatif grupta, sağ kalıma sırasıyla 23 'lük ve $10,8$ 'lik artışlar sağladığı saptanmıştır¹³¹.

Çalışmamızda da olgular, tümör boyutu ortalamasının ($25,1$ mm) altında ve üstünde kalan olgular olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tümör boyutu ile GS ve HS ilişkisi değerlendirildi. Beş ve 10 yıllık GS değerleri, ortalamanın altında kalan olgularda sırasıyla $90,1$ ve $81,4$; ortalamanın üzerindeki olgularda ise sırasıyla $89,3$ ve $74,3$ olarak saptandı ($p=0,201$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri, ortalamanın altında kalan olgularda sırasıyla $85,3$ ve $80,3$; ortalamanın üzerindeki olgularda ise sırasıyla $80,5$ ve $78,5$ idi ($p=0,422$). Sonuç olarak tümör boyutu ile GS ve HS açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Birçok çalışma ile tümör boyutunun sağ kalım açısından bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmesine karşın, çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamaması, çalışma grubumuzun HDF (+) olguları içermesi ile açıklanabilir.

Yapılan çalışmalarda multifokalite ileri evre, geniş tümör çapı, LVİ gibi kötü prognostik belirteçlerle ilişkili bulunmuştur¹³². Ayrıca multifokalitenin GS ve HS'yi azalttığı ve sağ kalımı öngörmeye bağımsız prognostik belirteç olduğu yine farklı çalışmalarca gösterilmiştir^{132,133}.

Çalışmamızda multifokalite ile sağ kalım ilişkisi değerlendirildiğinde, 10 yıllık LNS değeri tek odaklı tümörlerde %96,4, multifokal tümörlerde ise %86,5 olarak saptandı ($p=0,006$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri tek odaklı tümörlerde sırasıyla %85,5 ve %81,6; multifokal tümörlerde sırasıyla %74,2 ve %70,9 idi ($p=0,055$). Beş ve 10 yıllık HSS değerleri ise tek odaklı tümörlerde sırasıyla %92,9 ve %82; multifokal tümörlerde sırasıyla %80,5 ve %63 olarak belirlendi ($p=0,032$). Çalışmamızda multifokalite varlığının gerek 10 yıllık LNS değeri gerekse 5 ve 10 yıllık HS ve HSS değerleri ile ters orantılı olduğu tespit edilmiş olup elde ettiğimiz bu bulgular literatür ile uyumludur.

Bilindiği üzere, tümör boyutu ve multifokalite gibi lenf nodu tutulumu da prognozu öngörmeye önemli faktörlerden biridir¹²⁹. Carter ve ark.¹³⁰'nın yaptığı 24740 meme karsinomu olgusunu içeren çalışmada, tümör boyutu ve lenf nodu metastazı varlığının sağ kalım açısından bağımsız prognostik faktörler olduğu saptanmıştır.

Olgularımızda lenf nodu metastazı ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. On yıllık LNS değeri, lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda %98,1; lenf nodu metastazı saptanan olgularda ise %90,8 olarak belirlendi ($p=0,021$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda sırasıyla %90,6 ve %87,8; lenf nodu metastazı saptanan olgularda ise sırasıyla %76,3 ve %71,2 olarak saptandı ($p=0,008$). Beş ve 10 yıllık HSS değerleri lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda sırasıyla %95,2 ve %87,9; lenf nodu metastazı saptanan olgularda ise sırasıyla %86 ve %70,6 olarak belirlendi ($p=0,003$). Çalışmamızda da literatür ile uyumlu bir şekilde, lenf nodu metastazının sağ kalıma olumsuz etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızdaki olgularda evre I, evre II ve evre III olarak yapılan gruplandırmada, 5 yıllık HS değerleri sırasıyla %89,8, %85,7 ve %66,5; 10 yıllık HS değerleri sırasıyla %84,2, %82,1 ve %66,5 olarak saptandı ($p=0,011$). Bu olgularda 5 yıllık HSS değerleri ise sırasıyla %95,7, %91,8 ve %79,4; 10 yıllık HSS değerleri sırasıyla %92,1, %79,4 ve %61,5 olarak belirlendi ($p=0,001$). Bu bulgularımız evrenin sağ kalımla doğrudan ilişkili olduğu gösteren literatür verileriyle^{50,129} uyumludur.

Tümördeki immün hücre infiltrasyonu bazı meme karsinomu alt tipleri için prediktif ve prognostik olmaktadır. İnflamatuar hücre içeren meme karsinomlarında bu ‘‘host defans’’ın sağ

kalıma olumlu katkı yaptığı, 1992 yılında Aaltomaa ve ark.¹³⁴ tarafından yapılan öncü çalışma ve devamında yapılan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır^{135,136,137}. Loi ve ark.¹³⁸'nin 2019 yılında yaptığı bir çalışmada ise yüksek gradlı tümörlerde TİL yüzdesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada kötü prognostik belirteçlerle doğru ilintide olmasına rağmen TİL yüksekliğinin sağ kalımı arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda TİL yüzdesi ile kötü prognostik belirteçler (reseptör negatifliği, grad III tümörler, yüksek proliferatif kapasite) arasında doğru ilinti saptandı ($p<0,001$). İstatistiksel anlamlılık gösteren bu bulgu, literatürdeki bulgularla uyumludur.

Çalışmamızda TİL yüzdesi için eşik değer Schalper ve ark.¹²⁸'nin da 2014 yılında yaptıkları çalışmada tavsiye ettiği üzere %30 olarak alınıp, buna göre olgular iki gruba ayrıldı. TİL yüzdesi %30'un altındaki olgularda 10 yıllık LNS %92,3 iken, %30 ve üzerindeki olgularda %98,5 olarak saptandı. Beş ve 10 yıllık HS oranları TİL yüzdesi %30'un altındaki olgularda sırasıyla %79,1 ve %73,4; %30 ve üzerindeki olgularda ise %91,6 ve %91,6 olarak belirlendi ($p=0,008$). Beş ve 10 yıllık HSS oranları ise TİL yüzdesi %30'un altındaki olgularda sırasıyla %87,8 ve %73,7; %30 ve üzerindeki olgularda ise sırasıyla %95,8 ve %90,8 olarak saptandı ($p=0,010$). Belirlediğimiz TİL yüzdesinin sağ kalıma olan olumlu katkıları literatür verileri ile uyumludur.

HS'yi öngörmek için yapılan çok değişkenli analizde (multifokalite, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi, lenfositlerde CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 pozitivitesi) TİL yüzdesi ve HDF'nin HS'yi öngörmeye bağımsız prognostik faktör oldukları gösterildi (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,017$). LNS'yi öngörmek için yapılan çok değişkenli analizde (multifokalite, cerrahi operasyonun tipi, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi, lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi ve LAG-3 pozitivitesi) TİL yüzdesinin bağımsız prognostik faktör olduğu bulundu ($p=0,032$). Ancak HDF'nin LNS'yi öngörmeye bağımsız bir prognostik faktör olmadığı dikkati çekti. Bu sebeple tümör mikroçevresindeki immün hücreleri değerlendirmede, TİL skorlamasının HDF skorlamasına kıyasla daha belirleyici ve prognostik olduğunu söyleyebiliriz.

İmmün kontrol noktası moleküllerinden biri olan CTLA-4, Kassardjian ve ark.⁹'nin yaptığı çalışmada normal meme dokusunda saptanmazken, neoplastik dokuda olguların yarısında pozitif bulunmuş; ayrıca CTLA-4'ün düşük gradlı meme tümörlerinde çok daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır. Kim ve ark.¹³⁹'nin yaptığı çalışmada ise yüksek gradlı tümörlerde CTLA-4 ekspresyonunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

CTLA-4'ün sağ kalıma katkısının farklı tümörlerde farklı yönde olabileceği, sınırlı sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Salvi ve ark.¹⁴⁰'nın küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında yaptığı bir çalışmada, tümör hücrelerinde CTLA-4 ekspresyonunun fazlalığı iyi prognostik faktör; Zhang ve ark.¹⁴¹'nin özofagus karsinomlarında yaptığı çalışmada ise, tümör hücrelerinde ve interstisyel lenfositlerde CTLA-4 ekspresyonunun fazlalığı kötü prognostik faktör olarak saptanmıştır. Yu ve ark.⁸'nin yaptığı çalışmada ise meme karsinomlarında, tümörde CTLA-4 ekspresyonunun fazlalığı kötü prognoz ile, tümörde ekspresyonu düşükken lenfositlerde fazla olması ise iyi prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda CTLA-4 immünohistokimyasal incelemesi hem tümör hücrelerinde hem de lenfositlerde değerlendirildi. Tümör hücrelerinde CTLA-4 immün boyanma yüzdesi ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz, GS ve HS ilişkileri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Tümörde CTLA-4 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, tümör boyutu, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, LVİ, ÖR, PR ve HER2 durumu, proliferatif kapasite, moleküler alt tip ve tümör mikroçevresinde plazma hücre varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Sınırlı sayıdaki literatür verisinin aksine, çalışmamızda meme karsinomlarında, tümör hücrelerindeki CTLA-4 ekspresyonu ile sağ kalım arasında ilişki olmadığı görülmektedir.

Çalışmamızda lenfositlerdeki CTLA-4 immün boyanma yüzdesi ile LVİ ilişkisi değerlendirildiğinde, CTLA-4 ile boyanan lenfositlerin oranı ile LVİ arasında ters bir ilinti bulundu ($p=0,001$). Lenfositlerdeki CTLA-4 ile LVİ arasında bulunan bu anlamlı istatistiksel veriye literatürde meme karsinomu özelinde rastlanmamıştır. Bizim bulgumuza benzer bir şekilde, Lobo ve ark.¹⁴²'nin 2019 yılında germ hücreli testis tümörlerinde yaptığı bir çalışmada, tümör çevresi immün hücrelerde CTLA-4 yüzdesi için eşik değer %50 olarak alındığında, bu eşik değer üzerindeki olgularda LVİ sıklığının azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi ile tümörün proliferasyon kapasitesi ilişkisi değerlendirildiğinde, proliferatif kapasitesi yüksek olan tümörlerde, lenfositlerde CTLA-4 ekspresyonunun daha yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,010$). İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu bulguya da literatürde yer alan meme karsinomu çalışmalarında rastlanmamıştır.

Meme kanseri nüks/metastaz varlığını belirlemede en uygun lenfosit CTLA-4 pozitif eşik değerinin %2,5 olduğu ROC eğrisi analizi ile bulundu (Duyarlılık: 0,472; özgüllük: 0,698). Olguların 160'ının bu eşik altında, 78'inin bu eşik üzerinde olduğu saptandı. Bu eşik değer

ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. On yıllık LNS değeri, lenfositlerdeki CTLA-4 yüzdesi eşğin altında kalan olgularda %97,2; eşğin üzerindeki olgularda ise %88,6 olarak belirlendi ($p=0,009$). Beş ve 10 yıllık HS değerleri eşğin altında kalan olgularda sırasıyla %86,7 ve %82; eşğin üzerindeki olgularda ise sırasıyla %76,4 ve %74,2 olarak saptandı ($p=0,044$). Beş ve 10 yıllık HSS değerleri eşğin altında kalan olgularda sırasıyla %93,6 ve %81,9; eşğin üzerindeki olgularda ise sırasıyla %84,1 ve %73,7 olarak belirlendi ($p=0,026$).

Sonuç olarak çalışmamızda lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesi artışının LNS, HS ve HSS'yi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi. Ayrıca hem HS'yi hem de HSS'yi öngörmede lenfositlerdeki CTLA-4 pozitiflik yüzdesinin çok değişkenli analizde (multifokalite, lenf nodu metastazı ve lenfositlerdeki CTLA-4 pozitivitesi) bağımsız faktör olduğu saptandı. Çalışmamızda tespit edilen bu bulgular literatürdeki sınırlı sayıdaki veriyle^{8,140} çelişmektedir.

Tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştıran transmembran proteini PD-1 T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, makrofajlar ve bazı dendritik hücrelerde immün aktivasyon ve kronik inflamasyon sırasında eksprese edilen moleküllerdir. Uhercik ve ark.¹⁰'nın yaptığı çalışmada, primer meme karsinomuna ait 127 mastektomi materyalindeki tümörlü ve çevre dokudan qPCR yöntemiyle PD-1 transkript seviyelerine bakılmış, PD-1 seviyesi ile evre, grad ve reseptör durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmada anlamlı saptanan bulgu, tümör dokusunda çevre dokuya göre belirgin olarak daha fazla PD-1 transkript ekspresyon seviyesi bulunduğu olmuştur. Reseptör negatifliği ve yüksek proliferatif kapasite gibi kötü prognostik faktörlerle PD-1 pozitifliğinin ilintili olduğu da, Buisseret ve ark.¹⁴³'nin yaptığı çalışmada gösterilmiştir.

Meme karsinomlarında PD-1 ekspresyonunun prognostik önemi ile ilgili çalışmalardan biri, Ren ve ark.¹¹'nin triple negatif meme karsinomlarında PD-1 ve PD-L1'in protein ve mRNA düzeylerini analiz ettikleri çalışmadır. Bu çalışmada PD-1'in lenfositlerde pozitifliği HS ve GS ile ilişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda lenfositlerdeki PD-1 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, tümör boyutu, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, LVI ve HER2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Çalışmamızda lenfositlerde PD-1 pozitivitesinin kötü prognostik belirteçlerle (ÖR negatifliği, grad III tümörler, yüksek proliferatif kapasite) ilişkili olduğu saptandı (sırasıyla

$p=0,004$, $p=0,049$, $p=0,001$). İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu bulgular literatürle de uyumludur.

Meme kanserinde nüks/metastaz varlığını belirlemede en uygun PD-1 pozitif eşik değerin %1,5 olduğu ROC eğrisi analizi kullanılarak bulundu (Duyarlılık: 0,525; özgüllük: 0,626). Olguların 143'ünün bu eşğin altında, 95'inin bu eşğin üzerinde olduğu saptandı. Bu eşik değeri ile LNS, HS ve HSS ilişkisi değerlendirildi. PD-1 pozitiflik yüzdesinin fazlalığı LNS, HS ve HSS'yi azaltmakla birlikte, bu durumun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı saptandı ($p>0,05$).

Lenfositlerde PD-1 boyanma şiddeti ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz ve HS ilişkileri değerlendirildiğinde boyanma şiddeti ile bu veriler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Lenfositlerde PD-1 boyanma şiddeti ile HSS ilişkisinin değerlendirilmesinde; zayıf, orta şiddette ve kuvvetli boyanan olgularda 5 yıllık HSS değerleri sırasıyla %50, %66,7 ve %93,3 olarak belirlendi ($p=0,015$).

Sonuç olarak lenfositlerde şiddetli PD-1 boyanması olan olguların HSS değerlerinin diğerlerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla PD-1 boyanma şiddeti ile sağ kalım arasında ilişkiye dikkat çeken ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Ancak, immünohistokimyasal çalışmalarda boyanma şiddetinin birçok sebeple değiştiği de dikkate alınmalıdır. Bu nedenle bu bulgunun ileride başka çalışmalarla desteklenip desteklenmeyeceğinin görülmesi gereklidir.

İlk olarak Triebel ve ark.¹¹⁸ tarafından 1990 yılında tanımlanan transmembran proteinini LAG-3, ana ligandı olan MHC II'ye CD4'ten daha yüksek afiniteyle bağlanır. LAG-3 ekspresyen hücreleri azaltmayı hedefleyen anti-LAG-3 antagonistlerinin otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, sonraki klinik gelişmeler ışığında aynı zamanda antijen sunan hücreleri aktive etmeye yarayan bir immün destekçi olduğu anlaşılmıştır. LAG-3-Ig kompleksinin immatür dendritik hücre üzerindeki MHC II ile etkileşimi sonucu bazı sitokin (IL-12, TNF α) ve kemokinlerin (CCL22, CCL17) salgılanmasının arttığı, kemotaksis ve migrasyon gibi mekanizmaların tetiklendiği belirlenmiştir^{13,124,125}.

Meme kanserlerinde LAG-3 pozitifitesi Burugu ve ark.¹⁴'ün 2017 yılında yaptığı çalışmada kötü prognostik belirteçlerle (geniş tümör çapı, yüksek proliferatif kapasite, reseptör negatifliği) ilintili bulunmasına rağmen, hem bu çalışmada hem de birçok malign neoplazinin

yer aldığı 2019 yılında Saleh ve ark.¹⁵ tarafından yapılan metaanaliz çalışmasında, meme kanserindeki LAG-3 pozitivitesinin GS ve HS'yi arttırdığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda lenfositlerde LAG-3 immün boyanma şiddeti ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz, HS ve HSS ilişkileri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Lenfositlerde LAG-3 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, HER2 durumu ve moleküler alt tip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

LAG-3 pozitivitesinin tümör çapı ile doğru ilintili, LVİ ile ters ilintili olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,030$, $p=0,014$). Ayrıca LAG-3 pozitivitesinin, grad III, PR negatif veya proliferatif kapasitesi yüksek tümörlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,011$, $p=0,025$, $p<0,001$). Bu bulgular literatür verilerini destekler niteliktedir.

LAG-3 yüzdesi ile LNS arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. LAG-3 yüzdesi %20'nin altında olan 211 olguda 5 ve 10 yıllık HS oranları sırasıyla %81,1 ve %76,3 iken, %20 ve üzerinde olan 27 olguda ise 5 ve 10 yıllık sağ kalım oranları sırasıyla %100 ve %100 olarak saptandı ($p=0,014$). Beş ve 10 yıllık HSS oranları %20'nin altındaki olgularda sırasıyla %89,2 ve %76,3 iken, %20 ve üzerindeki olgularda ise sırasıyla %100 ve %100 olarak belirlendi ($p=0,020$). Yapılan çok değişkenli analizde LAG-3 yüzdesi, bağımsız prognostik faktör olarak saptanmasa da sağ kalıma yaptığı olumlu katkı literatür verileri^{14,15} ile uyumludur.

Çeşitli malignitelere CTLA-4 ve PD-1 antagonistlerinin kombine olarak kullanılmasının hastaya yarar sağlayabileceğini öngören yeni çalışmalar^{144,145}, dolaylı yoldan bu iki biyobelirtecine ekspresyonlarının birbirleriyle ilintili olabileceğini düşündürmektedir. Meme kansinomlarında LAG-3 ve PD-1 ekspresyonlarının ilintili olduğu Burugu ve ark.¹⁴⁷'nin yaptığı çalışmada gösterilmiştir.

Çalışmamızda lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesinin birbirleri ile olan ilişkisine bakıldığında, her birinin diğeri ile doğru ilintide olduğu tespit edildi (CTLA-4 ile LAG-3: $p<0,001$; CTLA-4 ile PD-1: $p=0,036$; LAG-3 ile PD-1: $p=0,005$). Ayrıca TİL yüzdesi ile lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde doğru ilinti bulundu ($p<0,001$). Çalışmamızda, literatürdeki verilerle uyumlu olarak, üç biyobelirtecine de birbirleriyle ilintili olduğu gösterildi.

Bir referans merkezi olan kurumumuzun arşiv materyalleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmamızın üstün özelliği, sadece HDF'si pozitif olgulardan oluşan bir çalışma grubu belirlememize rağmen olgu sayımızın fazlalığıdır. Çalışmamızın zayıf yönü ise yüzde olarak değerlendirdiğimiz verilerin DMA yöntemi üzerinde bakılması ve bu yöntemin kısıtlı bir alanı yansıtırıyor olması sebebiyle fokal boyanmaların tespit edilememiş olması ihtimali olabilir.

Sonuç olarak HDF'si pozitif olgulardan oluşan çalışma grubumuzda genel anlamda sağ kalım yüksektir. Hem LNS hem de HS'yi öngörmede bağımsız prognostik faktör olması nedeniyle TİL skorlamasının HDF skorlamasına göre daha belirleyici olduğu ve rutin histopatolojik raporlamanın bir parçası olması gerektiği düşünülmektedir. Lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesi HS ve HSS'yi öngörmede bağımsız prognostik faktör saptanmasına karşın literatür verilerinin aksine sağ kalımı azalttığı ortaya çıkmıştır. Lenfositlerde şiddetli PD-1 boyanması olan olguların HSS değerinin diğerlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir. LAG-3 yüzdesi %20 ve üzerinde olan olgularda HS ve HSS değerlerinin, %20'nin altında olan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 ekspresyonları birbirleriyle ve TİL yüzdesiyle doğru ilintili olduğu görülmektedir. Meme kansinomlarında TİL skoru yüksek olgularda, hem sağ kalıma etkilerinin olması hem de tedavide antagonistlerinin bir seçenek olması nedeniyle bu üç immün belirtecin kullanılabileceğini öne sürebiliriz.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR

- Çalışmamızda 238 olgu yer almaktadır.
- Olgularda Nottingham gradlama sistemi kullanılarak yapılan gradlamada, olguların 5'i (%2,1) grad 1, 38'i (%16) grad 2, 195'i (%81,9) grad 3 olarak belirlendi.
- LNS, HS ve HSS değerleri multifokal tümörlerde, tek odaklı tümörlere göre daha düşük saptandı (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,055$, $p=0,032$).
- LNS, HS ve HSS değerleri lenf nodu metastazı saptanan olgularda saptanmayanlara göre daha düşük olarak belirlendi (sırasıyla $p=0,021$, $p=0,008$, $p=0,003$).
- TNM evresi sağ kalımla ilişkili bulundu. Evre arttıkça HS ve HSS'nin azaldığı saptandı (sırasıyla $p=0,011$, $p=0,001$).
- Çalışmamızda TİL yüksekliğinin, kötü prognostik belirteçlerle (reseptör negatifliği, grad III tümörler, yüksek proliferatif kapasite) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili olduğu saptandı ($p<0,001$).
- TİL yüksekliğinin kötü prognostik belirteçlerle doğru orantılı olmasına rağmen prognozu olumlu açıdan etkilediği görüldü. HS ve HSS değerleri TİL skoru yüksek (≥ 30) olgularda, düşük olgulara göre daha yüksek olarak belirlendi (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,010$).
- Multifokalite, cerrahi operasyon tipi, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi, lenfositlerde CTLA-4 pozitivitesi ve LAG-3 pozitivitesi parametreleri kullanılarak yapılan çok değişkenli analizde, TİL yüzdesinin LNS'yi belirlemede bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterildi ($p=0,032$).
- Multifokalite, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi, lenfositlerde CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 pozitivitesi parametreleri kullanılarak yapılan çok değişkenli analizde, TİL yüzdesinin HS'yi belirlemede bağımsız prognostik faktör olduğu gösterildi ($p<0,001$).
- Tümör hücrelerinde CTLA-4 immün boyanma yüzdesi ile LVİ, lenf nodu metastazı, lokal nüks, sistemik metastaz, GS ve HS ilişkileri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki saptanmadı.
- Tümörde CTLA-4 pozitivitesi ile yaş, tümör tipi, tümör boyutu, multifokalite, lenf nodu metastazı, evre, LVİ, ÖR, PR ve HER2 durumu, proliferatif kapasite, moleküler alt tip ve tümör mikroçevresinde plazma hücre varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki saptanmadı.

- Proliferatif kapasitesi yüksek olan tümörlerin içerdiği lenfositlerin CTLA-4 pozitivitesinin düşük proliferatif kapasiteli tümörlere kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0,010$).
- CTLA-4 ile boyanan lenfositlerin oranı ile LVİ arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ters ilinti bulundu ($p=0,001$).
- Lenfositlerde saptanan CTLA-4 pozitiflik yüzdesi arttıkça LNS, HS ve HSS'nin azaldığı tespit edildi (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,044$, $p=0,026$).
- Multifokalite, lenf nodu metastazı, HDF, TİL yüzdesi, lenfositlerde CTLA-4, PD-1 ve LAG-3 pozitivitesi parametreleri kullanılarak yapılan çok değişkenli analizde, lenfositlerde CTLA-4 pozitiflik yüzdesinin HS ve HSS'yi öngörmeye bağımsız faktör olduğu saptandı ($p=0,011$, $p=0,001$).
- Lenfositlerde PD-1 pozitivitesinin kötü prognostik belirteçlerle (ÖR negatifliği, grad III tümörler, yüksek proliferatif kapasite) doğru ilintili olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,049$, $p=0,001$).
- Lenfositlerde şiddetli PD-1 boyanması olan olguların HSS değeri diğerlerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek saptandı ($p=0,015$).
- LAG-3 pozitivitesinin tümör çapı ile doğru ilintili, LVİ varlığı ile ters ilintili olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,030$, $p=0,014$).
- LAG-3 pozitivitesinin, grad III, PR negatif veya proliferatif kapasitesi yüksek tümörlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,011$, $p=0,025$, $p<0,001$).
- LAG-3 boyanma yüzdesi %20 ve üzerinde olan olgularda HS ve HSS değerleri, %20'nin altında olan olgulara göre anlamlı derecede daha yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,014$, $p=0,020$).
- TİL yüzdesi ile lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 boyanma yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde doğru bir ilinti bulundu ($p<0,001$).
- Lenfositlerdeki CTLA-4, LAG-3 ve PD-1 boyanma yüzdelerinin birbirleri ile olan ilişkisine bakıldığında, her birinin diğeri ile doğru ilintide olduğu tespit edildi (CTLA-4 ile LAG-3: $p<0,001$; CTLA-4 ile PD-1: $p=0,036$; LAG-3 ile PD-1: $p=0,005$).

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Globocan Observatory W. Cancer Today - World. *Int Agency Res Cancer*. 2019;876:2018-2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
2. Rakha EA, Allison KH, Ellis IO, Horii R. Invasive Breast Carcinoma: General Overview. In: *WHO Classification of Breast Tumours. Fifth Edition*. International Agency for Research on Cancer (IARC), 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France; 2019:82-85.
3. Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol*. 2010;23(5):52-59.
4. Gatti-Mays ME, Balko JM, Gameiro SR, et al. If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2019;5(37):1-13.
5. Di Paola M, Angelini L, Bertolotti A, Colizza S. Host resistance in relation to survival in breast cancer. *BMJ*. 1974;4(5939):268-270.
6. 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(2):259-271.
7. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(6):311-335.
8. Yu H, Yang J, Jiao S, Li Y, Zhang W, Wang J. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(7):853-860.
9. Kassardjian A, Shintaku PI, Moatamed NA. Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), in female breast carcinomas. *PLoS One*. 2018;13(4):1-19.
10. Uhercik M, Sanders AJ, Owen S, et al. Clinical significance of PD1 and PDL1 in human

- breast cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(8):4249-4254.
11. Ren X, Wu H, Lu J, et al. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(5):373-380.
 12. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev.* 2017;276(1):80-96.
 13. Andrae S, Piras F, Burdin N, Triebel F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol.* 2002;168(8):3874-3880.
 14. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. *Ann Oncol.* 2017;28(12):2977-2984.
 15. Saleh RR, Peinado P, Fuentes-Antrás J, et al. Prognostic value of lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) in cancer: a meta-analysis. *Front Oncol.* 2019;9(1040):1-9.
 16. Anbazhagan R, Osin PP, Bartkova J, Nathan B, Lane EB, Gusterson BA. The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *J Pathol.* 1998;184(2):197-206.
 17. Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathology.* 2007;52(1):99-107.
 18. Osin PP, Anbazhagan R, Bartkova J, Nathan B, Gusterson BA. Breast development gives insights into breast disease. *Histopathology.* 1998;33(3):275-283.
 19. Hoda SA. Embryology And Development Of The Immature Breast. In: *Rosen's Breast Pathology*. Philadelphia, PA 19103 USA: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2014:1-3.
 20. Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):190-197.
 21. Topper YJ, Freeman CS. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev.* 1980;60(4):1049-1106.
 22. Cowin P, Wysolmerski J. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(6):1-14.

23. Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res.* 2005;8(1):1-11.
24. Going JJ, Moffat DF. Escaping from Flatland: clinical and biological aspects of human mammary duct anatomy in three dimensions. *J Pathol.* 2004;203(1):538-544.
25. van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature.* 2011;479(7372):189-193.
26. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 1999;402(6759):255-262.
27. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008;224(1):166-182.
28. Degnim AC, Brahmbhatt RD, Radisky DC, et al. Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144(3):539-549.
29. McCarty KJ, Tucker J. Breast. In: Mills SE, ed. *Histology for Pathologists*. 4th ed. New York: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2012:67-77.
30. Suzuki R, Atherton AJ, O'Hare MJ, Clarke C, Entwistle A, Lakhani SR. Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy. *Differentiation.* 2000;66(2-3):106-115.
31. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2009;100(3):538-544.
32. Zhang F, Ma J, Wu J, et al. Report PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol.* 2009;19(6):524-529.
33. Lazar AJ, Salgado R. Genetic Tumour Syndromes Of The Breast: Introduction. In: *WHO Classification of Breast Tumours. Fifth Edition*. International Agency for Research on Cancer (IARC), 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France; 2019:268-269.
34. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations.

- J Natl Cancer Inst.* 1998;90(15):1138-1145.
35. Stratton MR. Pathology of familial breast cancer: Differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet.* 1997;349(9064):1505-1510.
 36. Bane AL, Beck JC, Bleiweiss I, et al. BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(1):121-128.
 37. Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, et al. Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(11):4003-4011.
 38. Foulkes WD. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *CancerSpectrum Knowl Environ.* 2003;95(19):1482-1485.
 39. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(26):4282-4288.
 40. Lakhani SR, van de Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol.* 2002;20(9):2310-2318.
 41. Lax SF, Soares FA. Li-Fraumeni Syndrome, TP53-associated. In: *WHO Classification of Breast Tumours. Fifth Edition.* International Agency for Research on Cancer (IARC), 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France; 2019:279-281.
 42. Ruijs MWG, Verhoef S, Rookus MA, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet.* 2010;47(6):421-428.
 43. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48(18):5358-5362.
 44. Thompson E, Mann JR, Martin J, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994;54(5):1298-1304.

45. Wilson JRF, Bateman AC, Hanson H, et al. A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations. *J Med Genet.* 2010;47(11):771-774.
46. Patey DH, Scarff RW. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet.* 1928;211(5460):801-804.
47. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11(3):359-377.
48. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-410.
49. Tan PH, Ellis IO. Introduction To Tumours Of The Breast. In: *WHO Classification of Breast Tumours. Fifth Edition.* International Agency for Research on Cancer (IARC), 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France; 2019:6.
50. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th Ed. Heidelberg: Springer; 2017.
51. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, et al. Breast cancer-major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290-303.
52. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):1-12.
53. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-752.
54. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(25):1999-2009.
55. Buerger H, Otterbach F, Simon R, et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast - evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol.* 1999;187(4):396-402.
56. Hicks J, Krasnitz A, Lakshmi B, et al. Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. *Genome Res.* 2006;16(12):1465-1479.

57. Flagiello D, Gerbault-Seureau M, Sastre-Garau X, Padoy E, Vielh P, Dutrillaux B. Highly recurrent der(1; 16)(q10;p10) and other 16q arm alterations in lobular breast cancer. *Genes, Chromosom Cancer*. 1998;23(4):300-306.
58. Natrajan R, Lambros MBK, Geyer FC, et al. Loss of 16q in high grade breast cancer is associated with estrogen receptor status: evidence for progression in tumors with a luminal phenotype? *Genes, Chromosom Cancer*. 2009;48(4):351-365.
59. Kan Z, Jaiswal BS, Seshagiri S. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*. 2010;466(7):869-873.
60. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472(7341):90-95.
61. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6084-6091.
62. Greenman C, Stephens P, Smith R, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153-158.
63. Adélaïde J, Finetti P, Bekhouche I, et al. Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res*. 2007;67(24):11565-11575.
64. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes, Chromosom Cancer*. 2006;45(11):1033-1040.
65. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-536.
66. Bastien RR, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MT, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics*. 2012;5(44):1-12.
67. Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;159(2):257-263.
68. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with

- early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-2223.
69. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1533-1546.
 70. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, et al. The immune landscape of cancer. *Immunity.* 2018;48(4):812-830.
 71. Edechi CA, Ikeogu N, Uzonna JE, Myal Y. Regulation of immunity in breast cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(8):1-18.
 72. van Beek J, Martens A, Bakdash G, de Vries I. Innate lymphoid cells in tumor immunity. *Biomedicines.* 2016;4(1):1-15.
 73. Daussy C, Faure F, Mayol K, et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med.* 2014;211(3):563-577.
 74. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature.* 2010;464(7293):1367-1370.
 75. Spits H, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):145-149.
 76. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, et al. Cancer immunosurveillance by tissue-resident innate lymphoid cells and innate-like T cells. *Cell.* 2016;164(3):365-377.
 77. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer.* 2014;134(7):1669-1682.
 78. Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 2003;198(11):1741-1752.
 79. Dhakal M, Hardaway JC, Guloglu FB, et al. IL-13R α 1 is a surface marker for M2

- macrophages influencing their differentiation and function. *Eur J Immunol*. 2014;44(3):842-855.
80. Zhu XW, Mulcahy LA, Mohammed RAA, et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2008;10(6):1-11.
 81. He D, Li H, Yusuf N, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2010;184(5):2281-2288.
 82. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253-268.
 83. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
 84. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11(10):889-896.
 85. Coussens LM, Pollard JW. Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(3):1-22.
 86. Toor SM, Elkord E. Comparison of myeloid cells in circulation and in the tumor microenvironment of patients with colorectal and breast cancers. *J Immunol Res*. 2017;2017(11):1-8.
 87. Kuan EL, Ziegler SF. A tumor-myeloid cell axis, mediated via the cytokines IL-1 α and TSLP, promotes the progression of breast cancer. *Nat Immunol*. 2018;19(4):366-374.
 88. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522(7556):345-348.
 89. Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*. 2011;20(3):300-314.
 90. Markowitz J, Wesolowski R, Papenfuss T, Brooks TR, Carson WE. Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(1):13-21.
 91. Umemura N, Saio M, Suwa T, et al. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type

- characteristics. *J Leukoc Biol.* 2008;83(5):1136-1144.
92. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(1):49-59.
 93. Niculescu F, Rus HG, Retegan M, Vlaicu R. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am J Pathol.* 1992;140(5):1039-1043.
 94. Bareke H, Akbuga J. Complement system's role in cancer and its therapeutic potential in ovarian cancer. *Scand J Immunol.* 2018;88(1):1-13.
 95. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest.* 2017;127(3):780-789.
 96. Deslouches B, Peter Di Y. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget.* 2017;8(28):46635-46651.
 97. Shen M, Wang J, Ren X. New insights into tumor-infiltrating B lymphocytes in breast cancer: clinical impacts and regulatory mechanisms. *Front Immunol.* 2018;9(470):1-8.
 98. Xia Y, Tao H, Hu Y, et al. IL-2 augments the therapeutic efficacy of adoptively transferred B cells which directly kill tumor cells via the CXCR4/CXCL12 and perforin pathways. *Oncotarget.* 2016;7(37):60461-60474.
 99. Tang Y, Jiang Q, Ou Y, et al. BIP induces mice CD19hi regulatory B cells producing IL-10 and highly expressing PD-L1, FasL. *Mol Immunol.* 2016;69(12):44-51.
 100. Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2016;11(4):1-13.
 101. Guan H, Wan Y, Lan J, et al. PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Sci Rep.* 2016;6(35651):1-10.
 102. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med.* 2008;14(6):623-628.
 103. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer.*

2017;24(1):3-15.

104. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺ T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012(925135):1-12.
105. Benevides L, Da Fonseca DM, Donate PB, et al. IL17 promotes mammary tumor progression by changing the behavior of tumor cells and eliciting tumorigenic neutrophils recruitment. *Cancer Res*. 2015;75(18):3788-3799.
106. Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora SK. Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol (Madr)*. 2007;46(6):792-797.
107. Brunet J-F, Denizot F, Luciani M, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature*. 1987;328(6127):267-270.
108. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2016;39(1):98-106.
109. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):565-594.
110. Collins A V, Brodie DW, Gilbert RJC, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002;17(2):201-210.
111. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459-465.
112. Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol*. 2002;3(7):611-618.
113. Schneider H, Downey J, Smith A, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006;313(5795):1972-1975.
114. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996;4(6):535-543.
115. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by Cd25(+)Cd4(+) regulatory T Cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte–

- associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192(2):303-310.
116. Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer*. 2005;117(4):538-550.
 117. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264.
 118. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*. 1990;171(5):1393-1405.
 119. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5744-5749.
 120. Wang JH, Meijers R, Xiong Y, et al. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10799-10804.
 121. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, et al. Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8 T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(4):412-423.
 122. Xu F, Liu J, Liu D, et al. LSECTin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res*. 2014;74(13):3418-3428.
 123. A first in human study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of a intravenous (IV) dose of GSK2831781 in healthy volunteers and patients with plaque psoriasis. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02195349>.
 124. Avicé MN, Sarfati M, Delespesse G, Demeure CE, Triebel F. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF- α and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 1999;162(5):2748-2753.
 125. Buisson S, Triebel F. MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) leads to a distinct pattern of chemokine and chemokine receptor expression by human dendritic cells. *Vaccine*. 2003;21(9-10):862-868.

126. Brignone C, Gutierrez M, Mefti F, et al. First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity. *J Transl Med.* 2010;8(71):1-11.
127. Dirix L, Triebel F. AIPAC: A Phase IIb study of eftilagimod alpha (IMP321 or LAG-3Ig) added to weekly paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *Futur Oncol.* 2019;15(17):1963-1973.
128. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2773-2782.
129. Fitzgibbons PL, Page DB. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):966-978.
130. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181-187.
131. Narod SA. Tumour size predicts long-term survival among women with lymph node-positive breast cancer. *Curr Oncol.* 2012;19(5):249-253.
132. El-Sheredy HG, El-Benhawy SA, Matrawy K. Multifocal/multicentric versus unifocal breast cancer: what is the difference? *Middle East J Cancer.* 2016;7(2):69-78.
133. Oven Ustaalioglu B, Bilici A, Kefeli U. The importance of multifocal/multicentric tumor on the disease-free survival of breast cancer patients. *Am J Clin Oncol.* 2012;35(6):580-586.
134. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28(4-5):859-864.
135. Heimes A-S, Madjar K, Edlund K, et al. Subtype-specific prognostic impact of different immune signatures in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165(2):293-300.
136. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018;19(1):40-50.
137. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating

- lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):860-867.
138. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: a pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *J Clin Oncol*. 2019;37(7):559-570.
 139. Kim A, Kim JY, Lee SJ. Abstract P5-04-26: Expression of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is associated with tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) level in HER2-positive breast cancers. In: *Poster Session Abstracts*. San Antonio, TX. Philadelphia (PA): American Association for Cancer Research; 2020:P5-04-26.
 140. Salvi S, Fontana V, Boccardo S, Merlo D, Margallo E, Laurent S. Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1463-1472.
 141. Zhang X, Pan K, Weng D, Chen C, Wang Q, Zhao J. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 expression in esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Oncotarget*. 2016;7(18):26670-26679.
 142. Lobo J, Rodrigues A. Detailed characterization of immune cell infiltrate and expression of immune checkpoint molecules PD-L1/CTLA-4 and MMR proteins in testicular germ cell tumors disclose novel disease biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1535):1-25.
 143. Buisseret L, Garaud S, de Wind A, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):1-13.
 144. Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(255):1-12.
 145. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzales R. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sidar BAĞBUDAR

Doğum tarihi ve yeri: 01.01.1990, Adapazarı

Mezun olduğu ilkokul: Sakarya Üniversitesi Vakfı Özel İlköğretim Okulu (2003-2004)

Mezun olduğu lise: Kadıköy Anadolu Lisesi (2004-2009)

Mezun olduğu üniversite: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi (2009-2015)

Uzmanlık eğitimi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı (2016-2020)

E-mail: sidarbagbudar@istanbul.edu.tr