



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME TÜMÖRLERİNDE IDO1 VE TDO2
EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA
VE REAL-TİME PCR YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

DR. GÜLDEN YILDIZ
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR - 2021



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME TÜMÖRLERİNDE IDO1 VE TDO2
EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA
VE REAL-TİME PCR YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. GÜLDEN YILDIZ
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HÜSEYİN BÜYÜKBAYRAM

DİYARBAKIR - 2021

ÖN SÖZ

Asistanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilimsel ve mesleki deneyimleri başta olmak üzere her konuda yol gösterici olan başta tez danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM, diğer hocalarım, Prof. Dr. Selver ÖZŞENER ÖZEKİNCİ, Doç. Dr. Ulaş ALABALIK, Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur KELEŞ, Dr. Öğr. Üyesi Gülay AYDOĞDU, Dr. Öğr. Üyesi Dr. İbrahim İBİLOĞLU'na Dr. Öğr. Üyesi Engin Deniz YILMAZ'a,

İstatistiksel değerlendirmede yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi İsmail YILDIZ'a,

Beraber çalışmaktan ve tanışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uz. Dr. Arif HAMİDİ, Uz. Dr. Berat SOYLU, Uz. Dr. Fatma Şule KUTLAR DURSUN, Uz. Dr. Mustafa NACİR, Arş. Gör. Dr. Medine DİCLELİ, Arş. Gör. Dr. Hatice SERTAKAN, Arş. Gör. Dr. Özge YAMAN COŞKUN, Arş. Gör. Dr. Tuğçem BOLOVA'ya,

Çalışmamın kesit alma işlemi, immünohistokimya ve DNA izolasyon aşamalarında yardımcı olan arkadaşlarım teknisyen Neval TANIŞ ÖZDEMİR, Serdar LAÇİN, Abdürrahim GÜNDÜZ, Mesut KURTAY, Ali KARAL, biyolog Osman AKAMAN, biyolog Ali DEMİR ve kimyager Vedat YILDIRIM olmak üzere bölümümüzde çalışan tüm arkadaşlarıma,

Bu tezin hazırlanmasında maddi destek sağlayan “Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü (DÜBAP)”ne (TIP.20.015 no'lu proje),

Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda hissettiğim annem, varlığıyla her zaman bana güç veren, hayatıma ışık tutan hocam Süda TEKİN, huzur kaynağım biricik oğlum Roşan'a ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın olan ve akciğer kanserinden sonra en sık ölüm nedeni olan kanserdir. Tüm kadın kanserlerinin %24'ünü ve kanser kaynaklı ölümlerin %14'ünü oluşturmaktadır.

Kynurenin yolu, triptofanın parçalanması ve toksik Kynurenin metabolitleri üretilmesi yoluyla birçok hastalıkla yakından ilişkili önemli bir metabolik yoldur. Indoleamin-2,3-dioksijenaz (IDO1) ve triptofan-2,3-dioksijenaz (TDO, TDO2 olarak da bilinir), Kynurenin yolunun ilk adımında yer alan iki ana enzimdir. IDO eksprese eden hücrelerin, tümör kaynaklı antijenlere karşı bir immünolojik tepkisizlik durumu yarattığı düşünülmektedir. İmmün sistemden kaçış mekanizmalarının bir parçası olarak, çok sayıda kanser hücresi türü, tercihen IDO1 veya TDO2'yi ve bazı durumlarda her ikisini de gelişi güzel bir şekilde eksprese eder.

Bu çalışmada meme kanserlerinde IDO1 ve TDO2'nin immünohistokimyasal ve Real-Time yöntemiyle tespiti, ardından IDO1 ve TDO2'nin ER, PR, HER-2, Ki67 ekspresyonu, moleküler sınıflama, histolojik alt tipler ve metastaz ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamıza Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD.'na Ocak 2010-Aralık 2019 tarihleri arasında gönderilen neoadjuvan tedavi almamış, 74'ü meme karsinomu ve 14'ü normal meme dokusu içeren 88 olgu dahil edilmiştir.

IDO1 immünreaktivitesi ve gen ekspresyonu ile histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,005$, $p=0,009$). TDO2 de histolojik alt tiplerle ilgili ilişki saptanmadı. IDO1 daha çok tümörlü olgularda, TDO2 ise hem tümörlü hem tümörsüz olgularda eksprese edilme eğilimi göstermiştir. IDO1 gen ekspresyonu ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmiştir. Ayrıca IDO1 gen ekspresyonu Luminal A ve Luminal B olgularına kıyasla HER2 pozitif ve triple negatif olgularda daha yüksek oranda izlenmiştir. Metastaz, ER, PR, HER2 ve Ki67 ile IDO1 ve TDO2 arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Yaş, histolojik alt tip, hormon reseptörü durumu ve moleküler sınıf ile TDO2 arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

IDO1'in tümör dokusunda anlamlı artışı ve yaş, HER2 pozitif ve triple negatif olgularda diğer olgulara oranla yüksek pozitiflik izlenmesi tedavi seçiminde IDO1 inhibitörlerinin hedef hasta grubu için uygun olabileceğini düşünmekteyiz. TDO2'nin hem tümörlü dokuda hem de normal meme dokusunda eksprese edilmesinden dolayı anlamlı sonuç izlemedik. TDO2 için herhangi bir yorumda bulunmak için ilave geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Meme karsinomu, IDO1, TDO2, Real-Time PCR, immünohistokimya

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women and the second most common cause of death after lung cancer. It accounts for 24% of all female cancers and 14% of cancer-derived deaths.

The Kynurenine pathway is an important metabolic pathway that is closely related to many diseases through the breakdown of tryptophan and the production of toxic Kynurenine metabolites. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO1) and tryptophan-2,3-dioxygenase (also known as TDO, TDO2) are the two main enzymes involved in the first step of the Kynurenine pathway. It is thought that cells expressing IDO create a state of immunological unresponsiveness to tumor-derived antigens. As part of the immune escape mechanisms, a large number of cancer cell types preferentially express IDO1 or TDO2, and in some cases both, haphazardly.

It has been aimed to detect IDO1 and TDO2 by immunohistochemical and Real-Time method in breast cancer, and then to investigate the relationship of IDO1 and TDO2 with ER, PR, HER-2, Ki67 expression, molecular classification, histological subtypes and metastasis.

Our study included 88 cases, 74 with breast carcinoma and 14 with normal breast tissue, who did not receive neoadjuvant treatment, that were sent to Dicle University Faculty of Medicine, Department of Pathology between January 2010 and December 2019.

We examined IDO1 and TDO2 expressions by IHC and RT-PCR method. A significant difference was found between histological subtypes with IDO1 immunoreactivity and gene expression ($p=0,005$, $p=0,009$). IDO1 tends to be expressed mostly in cases with tumors and TDO2 tends to be expressed in both tumor and non-tumor cases. A statistically significant relationship was observed between IDO1 gene expression and age. In addition, IDO1 gene expression was observed at a higher rate in HER2 positive and triple negative cases compared to Luminal A and Luminal B cases. It has been described no significant difference between metastasis, ER, PR, HER2 and Ki67 and IDO1 and TDO2. There was no significant relationship of TDO2 with age, histological subtype, hormone receptor status and molecular class.

We think that IDO1 inhibitors might be suitable for the target patient group in the treatment selection of the significant increase in the tumor tissue of IDO and the higher positivity in the age, HER2 positive and triple negative cases compared to the other cases. Since TDO2 is expressed in both tumor tissue and normal breast tissue, we did not observe a significant result. Additional large series studies are needed to make any comments for TDO2.

Keywords: Breast carcinoma, IDO1, TDO2, Real-Time PCR, immunohistochemistry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA:	Komplementer deoksiribo nükleik asit
Ct:	Cycle treshold
DCIS:	Duktal karsinoma in situ
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER:	Östrojen reseptörü
EDTA:	Ethane-1,2-diyldinitrilo tetraacetic acid
HER2:	İnsan epitelyal büyüme faktörü reseptörü
H&E:	Hematoksilen & Eozin
5-HT:	5- seratonin
IDO1:	İndolamin 2,3- dioksijenaz 1
İHK:	İmmünohistokimya
Kyn:	Kynurenin
LCIS:	Lobüler karsinoma in situ
PR:	Progesteron reseptörü
RNA:	Ribonükleik asit
RT-PCR:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SS:	Standart sapma
TDLU:	Terminal duktal-lobuler ünite
TDO2:	Triptofan 2,3 dioksijenaz
Trp:	L- triptofan
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Memenin Epitelyal Tümörleri (DSÖ 2019).....	13
Tablo 2: TNM sınıflamasına göre evreleme	40
Tablo 3: İmmünohistokimyasal belirteçler ile moleküler sınıflama (DSÖ 2019).....	41
Tablo 4: İnvaziv Meme Karsinomlarının Derecelendirmesinde Nottigham Sistemi	42
Tablo 5: İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar	47
Tablo 6: cDNA çalışma protokolü 1. kısım	51
Tablo 7: cDNA çalışma protokolü 2. kısım	51
Tablo 8: IDO1 ve TDO2 için primer ve probe dizaynları.....	52
Tablo 9: LightCycler 480 Probe Master kullanarak her 18 �l reaksiyon için PCR karışımı hazırlama şablonu	53
Tablo 10: LightCycler 480 Cihazı ile çalışılan PCR protokolü	53
Tablo 11: Prognostik parametreler, immünohistokimyasal ve moleküler analiz sonuçları	55
Tablo 12: Yaş ile IDO1 gen ekspresyonun karşılaştırılması.....	56
Tablo 13: Metastaz durumu ile immünohistokimyasal olarak IDO1'in değerlendirilmesi	57
Tablo 14: Metastaz durumu ile immünohistokimyasal olarak TDO2'in değerlendirilmesi	58
Tablo 15: Histolojik alt tipler ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi.....	61
Tablo 16: Histolojik alt tipler ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi.....	63
Tablo 17: İmmünohistokimyasal olarak IDO1 ve TDO2'nin değerlendirilmesi	64
Tablo 18: Olgulara ait RNA konsantrasyon değerleri.....	65
Tablo 19: PCR �alışması sonucu olgulara ait Ct değerleri	66
Tablo 20: IDO1 gen ekspresyonu ile histolojik alt tiplerin değerlendirilmesi.....	70
Tablo 21: RT-PCR IDO1 ile immünohistokimyasal IDO1 ekspresyonunun değerlendirilmesi.....	71
Tablo 22: Moleküler TDO2 ekspresyonu ile histolojik alt tiplerin değerlendirilmesi.....	72
Tablo 23: TDO2 ve IDO1 gen ekspresyonu karşılaştırılması	73
Tablo 24: ER ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi	74
Tablo 25: ER durumu ile IDO1 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi	74
Tablo 26: PR ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi	76
Tablo 27: PR durumu ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi.....	76
Tablo 28: HER2 ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi	77
Tablo 29: HER2 ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi.....	77
Tablo 30: Moleküler sınıf ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi	78
Tablo 31: Moleküler sınıf ile IDO1 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi.....	78
Tablo 32: Moleküler sınıf ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi	79
Tablo 33: Moleküler sınıf ile TDO2 gen ekspresyonunun Ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade3 tanılı solid büyüme paterni gösteren atipik hücreler izlenmektedir (H&E; X200)	20
Şekil 2: İnvaziv Lobüler Karsinom tanılı fibrotik stromada tek sıra halinde infiltrasyon gösteren tümör hücreleri izlenmektedir (H&E; X200)	27
Şekil 3: Tübüler Karsinom tanılı, üniform görünümde, tek sıralı küboidal hücreler ile döşeli, tübüler yapılar izlenmektedir (H&E; X100).....	29
Şekil 4: Kribriform Karsinom tanılı, fibrotik stromada, düşük derecede nükleer atipi gösteren kribriform patern oluşturan tümör hücreleri izlenmektedir. (H&E; X100).....	31
Şekil 5: İnvaziv Mikropapiller Karsinom tanılı, belirgin nükleollü, eozinofilik sitoplazmalı, fibrovasküler kor içermeyen psödopapiller yapılar izlenmektedir (H&E; X100)	34
Şekil 6: Apokrin Karsinom tanılı belirgin nükleollü, bir kısmı vakuolize geniş eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri izlenmektedir (H&E; X100)	35
Şekil 7: Metaplastik Karsinom tanılı, nekrobiyotik alan içeren, belirgin nükleollü, bir kısmı veziküler nükleuslu, pleomorfizm gösteren tümör hücreleri izlenmektedir. (H&E; X200)	38
Şekil 8: Triptofan (Trp) katabolik yolları	45
Şekil 9: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade2 tanılı olguya ait zayıf sitoplazmik IDO1 pozitifliği izlenmektedir (immunperoksidaz; X200).....	59
Şekil 10: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade3 tanılı olguya ait orta şiddette sitoplazmik IDO1 pozitifliği izlenmektedir (immunperoksidaz; X200).....	60
Şekil 11: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade3 tanılı olguya ait güçlü sitoplazmik IDO1 pozitifliği izlenmektedir (immunperoksidaz; X200).....	60
Şekil 12: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade3 tanılı olguya ait zayıf sitoplazmik TDO2 pozitifliği izlenmektedir (immunperoksidaz; X200).....	62
Şekil 13: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade3 tanılı olguya ait orta şiddette sitoplazmik TDO2 pozitifliği izlenmektedir (immunperoksidaz; X200)	63
Şekil 14: Tübüler Karsinom tanılı olguya ait güçlü sitoplazmik TDO2 pozitifliği izlenmektedir (immunperoksidaz; X200)	63
Şekil 15: 1-15 numaralı olgulara ait IDO1 ve TDO2 gen bölgeleri ışıma eğrileri. Kırmızı renkte pik yapan eğriler ekspresyon gösteren olguları, yeşil renkte eğriler negatif olguları temsil etmektedir.....	68
Şekil 16: 11 numaralı olguya ait IDO1 gen bölgesi ışıma eğrisi.	69
Şekil 17: 11 numaralı olguya ait TDO2 gen bölgesi ışıma eğrisi.	72

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ	iv
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	5
TABLolar DİZİNİ	6
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	7
İÇİNDEKİLER	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Memenin Embriyolojik Gelişimi.....	11
2.2. Memenin Anatomisi ve Histolojisi.....	12
2.3. İnvaziv Meme Karsinomu	13
2.3.1. İnvaziv duktal karsinom, NOS.....	18
2.3.2. İnvaziv lobüler karsinom	25
2.3.3. Tübüler karsinom.....	28
2.3.4. Kribriform karsinom.....	30
2.3.5. Müsinöz karsinom.....	32
2.3.6. Müsinöz kistadenokarsinom	33
2.3.7. İnvaziv mikropapiller karsinom.....	34
2.3.8. Apokrin diferansiasyonlu karsinom.....	35
2.3.9. Metaplastik karsinom.....	37
2.4. Meme Tümörlerinde TNM Sınıflaması[17].....	40
2.5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması	43
2.6. Histolojik Derecelendirme.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması	48
3.2. Parafin Blok Seçimi.....	48
3.3. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Deparafinizasyon İşlemi.....	49
3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma	49
3.4.1. İmmünohistokimyada kullanılan belirteçler ve çalışma protokolü.....	49
3.4.2. İmmünohistokimyasal skrolama	51
3.5.1. RNA izolasyonu.....	51

3.5.2. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyon hesaplanması.....	52
3.5.3. cDNA sentezi.....	53
3.5.4. RT-PCR analizi.....	54
3.6. İstatiksel Yöntem.....	57
4. BULGULAR.....	57
4.1. Genel Bulgular	57
4.1.1. Histolojik alt tip	59
4.1.2. Yaş	59
4.1.3. Metastaz durumu.....	60
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	61
4.2.1. IDO1 ekspresyonu	61
4.2.2. TDO2 ekspresyonu	64
4.2.3. İmmünohistokimyasal IDO1 ve TDO2 korelasyonu	67
4.3. Gen Ekspresyon Bulguları.....	68
4.3.1. IDO1 gen ekspresyonu.....	71
4.3.2. TDO2 gen ekspresyonu	74
4.3.3. Real-Time PCR ile IDO1 ve TDO2 gen ekspresyonu korelasyonu	76
4.4. Hormon Reseptörleri	77
4.4.1. ER durumu	77
4.4.2. PR durumu	78
4.4.3. HER2 durumu	79
4.4.4. Moleküler sınıflama.....	81
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇLAR	90
7. KAYNAKÇA.....	92

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda görülen en sık malignitedir. Kanserden ölümlerde akciğerden sonra ikinci sırada yer alır. Sıklıkla menapozdan sonra görülür. Ancak her yaş aralığında görülebilir[1]. Cerrahi ile beraber radyoterapi, kemoterapi ve hormonoterapi tedavi seçenekleri bulunmaktadır[2]. Meme kanserinin tanı ve tedavisi gelişmiş olsa da, tümör progresyonunu etkili bir şekilde kontrol etmek hala bir sorundur. Cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi geleneksel tedavileri takiben kanser immünoterapisi, kanser hastalarında umut verici sonuçlar göstermiştir[3].

İndolamin 2,3-dioksijenaz 1 (IDO1), ve triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO2) kynurenin mekanizmasında, triptofan katabolizmasının ilk ve hız sınırlayıcı hücre içi bir enzimlerdir. Tümör, stromal, vasküler ve immün hücreler, özellikle antijen sunan hücreler gibi çeşitli hücrelerde bulunurlar. Ancak T hücrelerinde eksprese edilmezler. Triptofanın çoğu, IDO tarafından katabolize edilir.[4] Triptofan tükenmesi ve kynurenin gibi immünosupresif katabolitlerin birikmesi yoluyla immün baskılanmaya katkıda bulunurlar[5]

Tümör hücrelerinin IDO1 ve TDO2 ekspresyonu bir dizi karsinomda bildirilmiştir. IDO1 immün inhibitör yolunun blokajı, kanser immünoterapisi çağında ortaya çıkan önemli bir antikanser modalitesidir. Birkaç IDO1 inhibitörü şu anda klinik geliştirme aşamasındadır[5].

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan meme karsinomlu olgularda immünohistokimyasal çalışma ile IDO1 ve TDO2 protein ekspresyon durumu ve RT-PCR yöntemi ile IDO1 ve TDO2 gen ekspresyonu durumu değerlendirildi, hormon reseptör durumu, Ki67, moleküler sınıflama ve metastaz ile varsa anlamlı farklılıkları gösterildi. Böylece seçilmiş olgularda hedefe yönelik tedaviyle kombine ya da tedavi etkinliğini artırmaya yardımcı yeni belirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Memenin Embriyolojik Gelişimi

Meme gelişimi, gebeliğin beşinci haftasında, fetüsün ventral yüzeyinde ektoderm kalınlaşması şeklinde başlar. Süt çizgisi olarak da bilinen bu meme çıkıntıları, aksilladan kasıklara kadar uzanır. Pektoral bölgedeki küçük bir alan dışında, bu çıkıntılar fetüs gelişmeye devam ettikçe geriler. Süt çizgisinin diğer kısımlarının gerilememesi, ektopik meme dokusunun veya aksesuar meme uçlarının doğum sonrası yaşamında ortaya çıkmasına neden olabilir; bu durum en sık aksilla, inframammarian kıvrım ve vulvada görülür[6, 7].

Meme gelişiminin en erken aşamaları seks steroid hormonlarından büyük ölçüde bağımsızdır. Gebeliğin 15. haftasından sonra, gelişmekte olan meme, öncelikle mezenkim üzerine etki eden testosterona geçici duyarlılık gösterir. Mezenkim, meme bezinin gelişim bölgesi olan göğüs tomurcuğunu oluşturmak için göğüs duvarındaki epitel sapının etrafında yoğunlaşır. Daha sonra mezenkim içinde epitel sütunları gelişir, meme lobları veya segmentleri oluşur. Fetal papiller dermisin bölümleri gelişen epitel kordonlarını sarar, meme kanallarını ve lobüllerini çevreleyen vaskülarize fibröz bağ dokusunu oluşturur[8]. Kollajenden zengin retiküler dermis, meme parankimini cilde bağlayan Cooper ligamentlerini oluşturmak için memeye uzanır[9]. Mezenkim bölümleri 20. ve 32. gebelik haftaları arasında kollajenöz stroma içinde yağa dönüşür. Gebeliğin son 8 haftasında, epitelyal kordlar kanalize olur, dallanır ve mezenkimal parakrin etkinin bir sonucu olarak lobuloalveolar yapılar oluşur[8].

Gebeliğin son birkaç haftası boyunca, fetal meme bezi maternal ve plasental steroid hormonlarına yanıt verir ve asiner hücreler salgı aktivitesi gösterir. Doğum sırasında, anne ve plasental seks steroidlerinin geri çekilmesi prolaktin salgısını uyarır ve bu da kolostrumun salgılanmasını sağlar[8, 10]. Bu durumda yenidoğanlarda, meme tomurcuğunda elle hissedilebilir genişleme görülür. Maternal ve plasental seks steroid hormonlarının ve prolaktin serum seviyeleri yaşamın ilk ayında azaldıkça, salgı aktivitesi sona erer, bez geriler ve inaktif hale gelir. Ergenliğe kadar temel lobüler yapılar vardır, alveoller farklılaşmaz. Fetal

memede görülebilen bir diğer özellik ekstramedüller hematopoezdir ve bu 4 aylık olana kadar periduktal stromada devam edebilir[8].

2.2. Memenin Anatomisi ve Histolojisi

Meme deri ve deri altı dokusuyla kaplıdır ve fasiya ile ayrıldığı pektoralis kasına dayanır[1]. Meme, göğüs ön duvarında yer alır ve midklaviküler hatta ikinci kaburgadan altıncı kaburgaya kadar uzanır. Meme dokusu, sternumun yan kenarından ön aksiller çizgiye yayılır ve sıklıkla Spence'in kuyruğu olarak koltuk altı içine uzanır[11]. Memenin morfofonksiyonel birimi, topografik olarak loblar halinde düzenlenmiş ve iki ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar terminal duktal-lobüler ünite (TDLU) ve büyük duktus sistemidir. TDLU, sırayla asiniden oluşan lobül ve terminal duktustan oluşur ve bezin salgı kısmını temsil eder[1].

Normal meme epitel, meme dokusu kütesinin sadece küçük bir kısmını oluştursa da, memeyi etkileyen hastalıkların çoğu bundan kaynaklanır. Epitel, her biri çiçekli bir ağaca benzetilen dallanmış yapıdan oluşan 10 ila 15 segment şeklinde düzenlenmiştir[12]. Lobüller, duktuslara ve duktüllere akan çiçekleri temsil eder; bunlar sırayla meme başının yüzeyine açılan toplayıcı duktuslara akarlar. Meme ucunun hemen altında, kanallar laktiferöz sinüslere doğru genişler. Sistem boyunca epitel, bir iç epitel tabakası ve bir dış miyoepitelyal tabaka olmak üzere iki tabakalıdır. Bu çift hücre tabakasının değerlendirilmesi, iyi huylu ve kötü huylu lezyonlar arasındaki ayrımın ana kılavuzlarından biridir[12, 13].

Kadın memesindeki değişimler, üreme yıllarında çok dinamiktir. Östrojen, progesteron ve prolaktin gibi hormonların etkisi altında kanalların daha fazla dallanması ve lobül oluşumu meydana gelir. Tıpkı her menstrual döngüde endometriyum büyüyüp gerilemesi gibi, meme de büyür[14, 15]. Menstrual döngünün ilk yarısında lobüller nispeten hareketsizdir. Ovulasyondan sonra, östrojen ve yükselen progesteron seviyelerinin etkisi altında, hücre proliferasyonu ve lobül başına asini sayısı artar. Menstrüasyonun ardından hormon seviyelerindeki düşüş lobüllerin gerilemesine neden olur[15].

Sadece gebelikte meme tamamen olgunlaşır ve tamamen işlevsel hale gelir. Lobüller sayı ve boyut olarak artar. Gebeliğin sonunda, meme neredeyse tamamen çok az stroma ile ayrılmış lobüllerden oluşur. Doğumdan sonra, lobüller başlangıçta

kolostrum üretirler (protein açısından yüksek) ve progesteron seviyeleri düştükçe sonraki 10 gün içinde süte (yağ ve kalori açısından daha yüksek) dönüşürler. Laktasyonun kesilmesi üzerine, epitel hücreleri apoptozise uğrar ve lobüller kısmen geriler[15, 16].

2.3. İnvaziv Meme Karsinomu

Memenin epitelial tümörleri DSÖ 2019 sınıflamasına (Tablo 1) göre 10 ana gruba ayrılmıştır[17].

Tablo 1: Memenin Epitelial Tümörleri (DSÖ 2019)

❖ Benign Epitelial Proliferasyonlar ve Prekürsörler	❖ İnvaziv Meme Karsinomu, NOS
▪ Olağan Duktal Hiperplazi	▪ İnfiltratif Duktal Karsinom, NOS
▪ Kolumnar Hücre Lezyonları, Flat Epitelial Atipi İçeren	▪ Onkositik Karsinom
▪ Atipili Duktal Hiperplazi	▪ Yağdan Zengin Karsinom
❖ Adenozis ve Benign Sklerozan Lezyonlar	▪ Glikojenden Zengin Karsinom
▪ Sklerozan Adenozis	▪ Sebaseöz Karsinom
▪ Apokrin Adenom	▪ Lobüler Karsinom, NOS
▪ Mikroglandüler Adenozis	▪ Tübüler Karsinom
▪ Radyal Skar/ Kompleks Sklerozan Lezyon	▪ Kribriiform Karsinom, NOS
❖ Adenomlar	▪ Müsinöz Adenokarsinom
▪ Tübüler Adenom	▪ Müsinöz Kistadenokarsinom, NOS
▪ Laktasyon Adenomu	▪ İnvaziv Mikropapiller Karsinom
▪ Duktal Adenom	▪ Apokrin Adenokarsinom
❖ Epitelial- Myoepitelial Tümörler	▪ Metaplastik Karsinom, NOS
▪ Pleomorfik Adenom	❖ Nadir ve Tükürük Bezi Tipi Tümörler
▪ Adenomyoepitelyoma	▪ Asinik Hücreli Karsinom
▪ Karsinom İçeren Adenomyoepitelyoma	▪ Adenoid Kistik Karsinom (AdCC)
▪ Epitelial-Myoepitelial Karsinom	• Klasik AdCC
❖ Papiller Neoplazmlar	• Solid-Bazaloid AdCC
▪ İntraduktal Papillom	• Yüksek Dereceli Transformasyon Gösteren AdCC
▪ Papiller Duktal Karsinoma İn Situ	▪ Sekretuar Karsinom
▪ Enkapsüle Papiller Karsinom	▪ Mukoepidermoid Karsinom
▪ İnvazyon İçeren Enkapsüle Papiller	

Karsinom	▪ Solid Papiller Karsinoma İn Situ ▪ İnvaziv Solid Papiller Karsinom ▪ İnvaziv İntraduktal Papiller Adenokarsinom	▪ Polimorfoz Adenokarsinom ▪ Ters Polariteli Tall Cell Karsinom
❖ Non-invaziv Lobüler Neoplazi	▪ Atipili Lobüler Hiperplazi ▪ Lobüler Karsinoma İn Situ, NOS • Klasik LCIS • Florid LCIS • Pleomorfik LCIS	❖ Nöroendokrin Neoplazmlar ▪ Nörpendokrin Tümör, NOS ▪ Nöroendokrin Tümör, Grade 1 ▪ Nöroendokrin Tümör, Grade 2 ▪ Nöroendokrin Karsinom, NOS ▪ Nöroendokrin Karsinom, Küçük Hücreli ▪ Nöroendokrin Karsinom, Büyük Hücreli
❖ Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS)	▪ Duktal Karsinoma İn Situ, Non-invaziv, NOS • Düşük Dereceli DCIS • Orta Dereceli DCIS • Yüksek Dereceli DCIS	

Meme karsinomu, dünya çapında her yıl 1,7 milyondan fazla olgu ile kadınlarda en sık malign tümör ve ikinci en sık karsinomdan ölüm nedenidir[1].

İnvaziv meme karsinomu memenin glandüler epitelinin geniş, heterojen malign epitelyal tümör grubuna karşılık gelir. Meme kanserlerinin çoğu (~ %90) tek odaklı olup, sıklıkla üst dış kadranda olmak üzere memenin herhangi bir kadranda ortaya çıkabilir. Hastaların yaklaşık %2' sinde senkron kontralateral tümör bulunur. Yaklaşık %0.1 meme kanseri, belirgin meme primerinin olmadığı aksiller metastaz şeklinde görülür[17].

Klinik Özellikler

Palpe edilebilen bir kitle, invaziv meme karsinomunun en yaygın klinik belirtisidir. Ciltte retraksiyon, meme başı ters dönmesi, meme başı akıntısı, memenin boyutunda veya şeklinde veya cilt renginde bir değişiklik görülebilir. İleri

vakalarda cilt ülseri oluşabilir. Meme kanserinin tüm semptomlarına benign meme hastalıkları da neden olabilir, bu nedenle kesin tanı için histolojik örnekleme ile değerlendirme gereklidir[17].

Risk Faktörleri

En önemli risk faktörleri cinsiyet (etkilenenlerin% 99'u kadındır), yaş, ömür boyu östrojene maruz kalma, genetik ve daha az ölçüde çevresel faktörlerdir. Pestisitler ve plastikler gibi çevresel kirlenici maddelerin insanlar üzerinde meme kanseri riskini artırdığı yönünde görüşler ileri sürülmektedir [15].

Risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir:

Aile geçmişi: Birinci derece akrabası meme karsinomu olan kadınların riski genel popülasyonun 2 veya 3 katıdır, eğer akraba erken yaşta etkilenmişse ve / veya iki taraflı hastalığı varsa risk daha da artmıştır[1].

Menstrual ve reproduktif geçmiş: Artmış risk erken menarş, nulliparite, ilk doğumda geç yaş ve geç menopoz ile ilişkilidir. Bilateral ooforektomi geçiren kadınlarda meme kanseri nadirdir; 35 yaşından önce risk azaltıcı salpingoooforektomi, riski yaklaşık yarı yarıya azaltır. Daha genç yaşta gebelik, daha düşük meme kanseri riski ile ilişkilidir. En az 4 ay emziren kadınlarda meme karsinomu riskini azaltır[1].

İntraduktal proliferatif lezyonlar: Atipisiz intraduktal proliferatif lezyonlar 1,5- 2 kat artmış meme kanseri riski ile ilişkilidir ve izleyen karsinom her iki memede de olabilir[18].

Eksojen Östrojen: Eksojen steroidlerin meme karsinomlarının gelişiminde önemli bir rolü olduğu epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir [17].

Kontraseptif ajanlar: Yürütülen çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, genç uzun vadeli kullanıcılar arasında risk artışı olmadığını veya çok düşük bir artış göstermiştir[1].

Radyasyon: İyonize radyasyona maruz kalma ile artmış meme karsinomu riski belgelenmiştir. Özellikle bu maruziyet meme gelişimi sırasında, Hodgkin

hastalığı için radyoterapi alan genç kadınlarda veya 10 yaşından küçük atom bombasından kurtulanlar da artış göstermiştir[1].

Meme büyütme: Meme implantları meme kanseri riskinde artışa neden olmaz. Artmış risk bildiren daha önce yayınlanmış bir çalışmanın yeniden analizi, bu kohorttaki meme karsinomu insidansının genel popülasyondan farklı olmadığı gösterilmiştir[1].

Diğerleri: Alkol tüketimi, özellikle hormon reseptörü pozitif kanserler olmak üzere, meme kanseri riskinde sürekli olarak orta dereceli bir artışla ilişkilendirilmiştir. Mevcut kanıtlar, aktif sigara içme ve meme kanseri arasında nedensel bir ilişki olmadığını göstermektedir; ancak, büyük bir meta-analiz, ilk doğumdan önce sigara içmeye başlayan kadınlarda aktif sigara içimi ile artmış meme kanseri riski arasında bir bağlantı olduğunu bildirmiş ve sigara içmenin meme kanserinin başlamasında rol oynayabileceğini öne sürmüştür [17].

Meme kanseri, diğer neoplazmlardan daha fazla ailesel kümelenme gösterir. Meme kanseri gelişme riskini büyük ölçüde artıran iki gen tanımlanmıştır (BRCA1 ve BRCA2)[17]. BRCA1 kodlu protein, homolog rekombinasyon yoluyla DNA hasarının onarımı, hücre döngüsü kontrol noktası kontrolü, kromatin yeniden modelleme olmak üzere birçok işleve sahiptir. BRCA2 tarafından kodlanan protein, DNA onarımı, sitokinez ve mayozda rol oynar. Yani, hem BRCA1 hem de BRCA2, homolog rekombinasyon yoluyla DNA çift iplikli kırılmaların doğru onarımı için gereklidir[1]. BRCA1 mutasyonu olan kadınlarda yaşam boyu meme kanseri riski en yüksektir. Bu kadınların yaşam boyu %55-85 oranında meme kanseri riski vardır. BRCA2 mutasyonu, %25-60 yaşam boyu meme kanseri riski ile ilişkilidir[19].

Patogenezi

Diğer kanserler gibi, meme kanserleri de epitel hücrelerdeki sürücü mutasyonların aşamalı olarak oluşması ile ortaya çıkar. Meme kanseri, anormal klonların büyümesini kolaylaştıran hormonal bir ortamda gelişir. Kanser genlerindeki germline mutasyonları ile ilişkili karsinomlar, karsinomların az bir kısmını oluşturur, ancak genellikle meme kanserinin moleküler patogenezi ile ilişkili önemli bilgiler sağlar. Meme karsinomlarını bu yüzden sporadik ve herediter olmak üzere ikiye ayırabiliriz[15].

Sporadik Meme Kanseri

Meme kanserinin, esas olarak hormon reseptörleri ile ilişkili iki farklı moleküler ilerleme yolu boyunca geliştiğini güçlü bir şekilde gösteren kanıtlar vardır. Moleküler veriler ayrıca östrojen reseptörü (ER) pozitif ve ER-negatif meme kanserlerinin temelde farklı hastalıklar olduğunu ve ER-pozitif kanserlerde histolojik derece ve proliferasyonun, genetik sapmaların kapsamı, karmaşıklığı ve türü ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir[17].

ER-pozitif yolda, 1q kazancı, 16q kaybı, nadir 17q12 amplifikasyonu ve ER-pozitif fenotip ile ilişkili genlerle doldurulan bir gen ekspresyon imzası ile karakterize edilir. Bu lezyonlar hormon reseptörlerini eksprese eder, insan epitelyal büyüme faktör reseptörü (HER2) aşırı ekspresyonu ve bazal belirteçlerin ekspresyonu görülmez. Nispeten basit diploid veya diploide yakın karyotiplere sahiptir. Genellikle bu yol, yüksek dereceli tümörlerin küçük bir alt kümesine (~%9) ek olarak, çoğunlukla düşük ve orta dereceli neoplastik lezyonlarda oluşur. ER-negatif yolak yaygın olarak 13q kaybı, kromozomal bölge 11q13 kazancı, 17q12 amplifikasyonu ile karakterizedir. Bu yol, ağırlıklı olarak orta ve yüksek dereceli tümörlerde oluşur. PIK3CA mutasyonları genellikle her iki yolda da ortaya çıkar. TP53 mutasyonları ER-negatif yolda siktir[17].

Hereditör Meme Kanseri

Meme kanserlerinin üçte birinin bir duyarlılık geni veya genleri ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır Orta ile yüksek penetransa sahip tek gen mutasyonları ("penetrasyon", mutasyona uğramış genin kansere yakalanma riskini ifade eder) meme karsinomlarının % 8 ile % 17'sini oluşturur[15].

Hereditör meme kanseri için en önemli yüksek penetrans yatkınlık genleri, genomik stabiliteyi düzenleyen tümör baskılayıcı genlerdir. Otozomal dominant geçer. Diğer tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi, kanser gelişimi genin tek normal kopyasındaki sporadik işlev kaybı mutasyonları ile ilişkilidir. BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar, tek genli ailesel meme kanserlerinin %80 ile %90'ından ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %3 ile %6'sından sorumludur. Penetrans, başlangıç yaşı ve diğer kanser türlerine duyarlılık, kalıtsal olan spesifik BRCA1 ve

BRCA2 mutasyonuna göre değişir. Ancak çoğu taşıyıcıda 70 yaşına kadar meme kanseri gelişir[15].

2.3.1. İnvaziv duktal karsinom, NOS

İnvaziv duktal karsinom, invaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir. Bazı serilerde görülme sıklığı %70'den %75'e kadar değişmektedir. Bu tümörler patolojik özellikleri ve klinik gidişlerine bakıldığında oldukça heterojen grup tümörlerdir. Histolojik olarak herhangi bir spesifik tümör tipini düşündürecek yeterli bulgu içermezler[18].

Makroskopik Bulgular:

Tümör sert vasıfta düzensiz sınırlıdır, Kesit yüzeyi sarımsı-gri renktedir. Trabeküller çevredeki parankimden yağa yayılarak yıldızsı veya yengeç benzeri konfigürasyon oluşturur. Nekroz, kanama ve kistik dejenerasyon alanları nadirdir, ancak büyük tümörlerde olabilir. Tümör, cildi, fasiyayı ve pektoral kası infiltre edebilir[1].

Mikroskopik Bulgular:

Mikroskopik olarak küçük büyütmede rastgele dizilmiş epitelyal elemanlar görülür. Miyoepitelyal hücreler yoktur. Tümör, dağınık tabakalar, iyi sınırlı yuvalar, kordlar veya tek tek infiltre hücreler halinde görülebilir. Glandüler / tübüler farklılaşma belirgin olabilir, zorlukla tespit edilebilir veya hiç olmayabilir. Nekroz görülebilir. Bazen bu, psödokistlerin oluşmasına neden olacak kadar belirgin olabilir. Malign hücreler görünüş olarak farklılık gösterir. Bazı tümörlerde hücresel veya nükleer pleomorfizm minimaldir, diğerlerinde ise bazen çok çekirdekli dev formlarda görülür. Mitotik aktivite derecesi değişkendir. Müsin genellikle tübüler lümende veya hücre içinde de görülebilir. Epitelde odaksal tarzda apokrin ve skuamöz metaplazi dahil bir dizi değişiklik görülebilir [1, 12].

Stromal bileşen son derece değişkendir. Oldukça hücresel fibroblastik proliferasyon, az bağ dokusu veya belirgin hiyalinizasyon olabilir. Elastoz odakları ayrıca periduktal veya perivenöz bir dağılım da gösterebilir. Vakaların çok azında, tümörle ilişkili lenfoplazmasitoid infiltrat izlenebilir. Granüloamatöz inflamasyon nadiren görülür[1, 17].

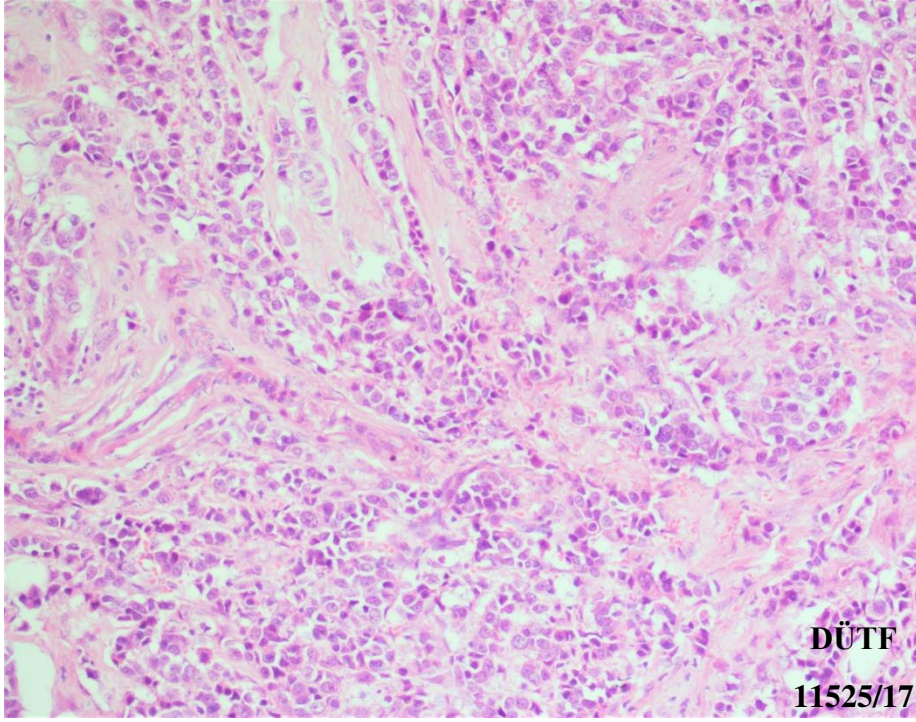
Vakaların %80 kadarında, duktal karsinoma in situ (DCIS) odakları mevcuttur ve bazı durumlarda in situ duktal karsinom yaygındır. Bir arada bulunan duktal karsinom in situ genellikle invaziv karsinom ile aynı nükleer derecededir. İnvaziv duktal karsinomun yaklaşık %20-30 kadarı lenfovasküler veya perinöral invazyon gösterir. Lenfovasküler emboli tipik olarak lenfatik boşluklarda ve nadiren vasküler boşluklarda görülür. Tümör boyunca vasküler tümör embolisi görülebilir, ancak meme kanserinde sadece tümör dışı lenfovasküler invazyon rutin olarak değerlendirilir ve bu, doku retraksiyonundan ayırt edilmelidir[17].

İmmünohistokimya:

Meme karsinom hücreleri, düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinler (özellikle 8, 18 ve 19 tipleri) ve EMA ile pozitif boyanır. Özellikle solid büyüme paternine sahip yüksek dereceli ve skuamöz metaplazili tümörler yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratin (CK5 / 6) ile de pozitif boyanır. Memeyle ilgili üç yararlı belirteç, mamaglobin, GCDFP-15 ve GATA3'tür. Her birinin, meme orijininin belirlenmesinin gerekli olduğu durumlarda kombinasyon halinde kullanılmasıyla değişen derecelerde duyarlılık ve özgüllüğü vardır[1].

Kalponin, p63 ve diğer miyoepitelyal hücre belirteçleri, invaziv karsinomlarda negatiftir ve tümör yuvalarının çevresinde miyoepitelyal hücrelerin yokluğunu doğrular[1].

İnvaziv duktal karsinomlarda çok sayıda biyobelirteç çalışılmış olmakla birlikte günlük uygulamada üç temel belirteç kullanılır. Bunlar östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2'dir. Histolojik heterojenite nedeniyle bu belirteçlerin ekspresyonu oldukça değişkendir. En güncel serilere göre infiltratif duktal karsinomlarda %70-80 oranında ER pozitifliği, %15 oranında HER2 protein ekspresyonu ve gen amplifikasyonu vardır[18].



Şekil 1: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade3 solid büyüme paterni gösteren malign hücreler (H&E; X200)

2.3.1.1. Mikst infiltratif duktal karsinom ve özel alt tipler

Bazı invaziv meme karsinomları hem infiltratif duktal karsinom hem de özel bir alt tipin bir karışımını içerebilir. Özel alt tip, tümörün % 10-90' ını oluşturuyorsa "mikst infiltratif duktal karsinom ve özel alt tip karsinom" terimi kullanılabilir. Bu tip mikst infiltratif duktal karsinom ve özel alt tip için, mevcut her iki unsurun yanı sıra özel alt tip örneğinin genel yüzdesinin, " mikst infiltratif duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom (% 30 lobüler)" rapor edilmesi önerilir. Her iki bileşenin derecesi ve biyobelirteç durumu, farklı olabildikleri için rapor edilmelidir. <% 10 özel alt tipi olan kanserler, isteğe bağlı olarak rapor yorumunda tanımlanabilir. % 90'dan fazla özelleşmiş alt tipi olan kanserler, özel alt tip olarak sınıflandırılmalıdır[17].

Özel morfolojik paternler

Onkositik, lipidden zengin, glikojenden zengin, berrak hücreli ve sebasöz karsinomlar, özel tümör alt tipleri olarak adlandırılmaları için yeterli klinik kanıta sahip olmayan nadir tümörlerdir. İnfiltratif duktal karsinomda görülen diferansiasyon spektrumunun bir parçası olarak kabul edilir. Benzer şekilde, medüller paternli karsinom, nöroendokrin özellikli invaziv karsinom, pleomorfik ve koryokarsinomatöz paternli karsinomlar ve melanositik özelliklere sahip tümörler şu anda infiltratif duktal karsinomun özel morfolojik paternleri olarak kabul edilmektedir. Bu tümörler, diferansiasyon/patern yoğunluğuna bakılmaksızın infiltratif duktal karsinomun morfolojik paternleri olarak kabul edilir ve özel alt tip için %90 kuralı, bu paterndeki tümörlere uygulanmaz[17].

Medüller Özellikli Karsinom

Bu tümörler daha genç kadınlarda görülme eğilimindedir ve ortalama yaş 42 ile 52 yaş arasındadır. BRCA1 mutasyonları olan hastaların özellikle medüller özellikli karsinomlara sahip olma ihtimalinin yüksek olduğu da bildirilmiştir[1].

Makroskobik olarak kesit yüzey solid, homojen ve gridir, bazen küçük nekroz odakları içerir. Nadiren kısmen veya büyük ölçüde kistik olabilir. Mikroskobik olarak, sınırları itici tarzdadır. Sinsityal büyüme paterni sergiler. Tümör hücreleri büyüktür. Geniş, pleomorfik nükleuslu, belirgin nükleolludur. Bol miktarda mitoz izlenir. İğsi hücre morfolojisi, bizar dev hücreler, yaygın nekroz diğer özelliklerdir. Değişmez komponent, konağın tümöre reaksiyonunu temsil ettiği düşünülen belirgin bir lenfoplazmasitik infiltrasyondur. DCIS genellikle minimumdur veya yoktur. Bu tümörler tipik olarak triple negatiftir. Bazal keratinler ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonu değişkendir[1, 18].

Nöroendokrin Özellikli İnvaziv Karsinom

Klinik özelliği, sıradan meme karsinomundan farklı değildir. Spesifik olarak, yaygın hastalık varlığında bile hiçbir hastada karsinoid sendrom görülmemiştir. Belirgin makroskobik özellikleri yoktur. Nöroendokrin özellikli karsinomlar yaşlı kadınlarda ortaya çıkar ve tüm meme karsinomlarının% 1'inden azını oluşturur[1].

Mikroskopik olarak, tümör hücreleri küçüktür ve ince fibröz bantlar ile ayrılmış solid yuvalar halinde düzenlenmiştir. Mitoz genellikle nadirdir. Müsin salgısı mevcut olabilir. Ayırıcı tanıda, invaziv lobüler karsinomun alveolar varyantı ve metastatik nöroendokrin tümör yer alır. Tümör bölgesinde DCIS bulunması ayırıcı tanıda yardımcıdır. Kromogranin, sinaptofizin, NSE ve CD56 immünohistokimyasal pozitiflik gösterir[1, 18, 20].

Osteoklast Benzeri Dev Hücreler İçeren İnvaziv Karsinom

İnvaziv epitelyal komponentin dev hücreler ile karışımı ile karakterizedir. Bu hücreler morfolojik olarak osteoklastlara benzer ve immünohistokimyasal olarak histiyosit fenotipi gösterirler. Mamografik ve mikroskopik olarak düzgün sınırlı olduğundan benign görünümde izlenirler. Epitelyal komponent genellikle orta- az diferansiye infiltratif duktal karsinom özelliğindedir. Hemoraji odağı ve hemosiderin pigmenti sık olarak görülür. Prognoz, ilişkili karsinomun özellikleriyle ilgilidir ve stromal dev hücrelerin varlığından etkilenmediği görülmektedir[17, 18].

Pleomorfik Karsinom

Pleomorfik karsinom yüksek dereceli infiltratif duktal karsinomun bir varyantıdır. En az %50 hücrede belirgin pleomorfizm, bizar dev hücreler ve yüksek mitoz oranı görülür. Büyük tümörlerde nekroz ve kavitasyon alanı izlenir. Tanı anında %50 vakada lenf nodu tutulumu vardır. Bu tümörlerin büyük bir kısmı ER, PR negatiftir. Kötü prognozludur ancak aynı boyut ve evredeki derece 3 infiltratif duktal karsinomlardan daha kötü olup olmadığı net değildir[18].

Koryokarsinomatöz Özellikli İnvaziv Karsinom

İnfiltratif duktal karsinomu olan hastalarda yüksek serum hcG seviyeleri olabilir ve vakaların %60 kadarının hcG-pozitif hücreler içerdiği bulunmuştur. Bununla birlikte, koryokarsinomatöz farklılaşmanın histolojik kanıtı istisnai olarak nadirdir ve sadece hepsi 50-70 yaş arasında birkaç vaka bildirilmiştir[17].

Melanotik Patern

Birkaç vaka raporu, duktal karsinom ve melanom kombinasyonlarını temsil ediyor gibi görünen istisnai meme parankim tümörlerini tanımlamıştır ve bu

vakaların bazılarında bir hücre tipinden diğerine geçiş olduğu görülmüştür. Böyle bir vakanın genetik analizi, tümörün tüm bileşenlerinde aynı kromozomal lokustaki heterozigot kayıp göstermiştir, bu da aynı neoplastik klondan bir köken olduğunu düşündürmüştür. Meme kanseri hücrelerinde sadece melanin varlığı, melanositik farklılaşmanın kanıtı olarak yorumlanmamalıdır, çünkü meme kanserleri cildi infiltre ettiğinde ve dermoepidermal bağlantıyı içerdiğinde karsinom hücrelerinin melanin ile pigmentasyonu meydana gelebilir. Ek olarak, melanositik farklılaşma gösteren tümörleri, belirgin sitoplazmik lipofuskin birikimi olan meme karsinomlarından ayırt etmek için dikkat edilmelidir. Memenin melanotik tümörlerinin çoğu, meme dışı bölgelerden kaynaklanan metastazları temsil eder. Primer melanomlar, meme derisinin herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir, ancak meme başı-areola kompleksinde nadiren köken alır. Meme başı-areola bölgesinde ortaya çıkan melanomun ayırıcı tanısında, hücreleri bazen melanin pigmenti içerebilen paget hastalığı yer almaktadır[17].

Onkositik Patern

Bazı meme kanserleri, yüksek sayıda mitokondri nedeniyle eozinofilik ve granüler sitoplazmaya sahip neoplastik hücreler ile onkositik farklılaşma gösterir. Klinik özellikler, infiltratif duktal karsinomdan farklı değildir; bu nedenle, öncelikle apokrin diferansiasyon dışlanmalıdır. Bir seride, tümör hücrelerinin >%50'sinin mitokondriyal immünohistokimyasal boyama ile güçlü pozitiflik 76 invazif meme karsinomunun %19.7'sinde mevcuttu. Onkositik paternde tümör hücreleri, tabakalar, adalar ve yuvalar içeren ağırlıklı olarak solid büyüme gösterir. Bazen papiller, pleksiform ve glandüler paternler görülür. Tümör hücreleri, sınırları belirgin, bol, parlak eozinofilik, granüler sitoplazma ile karakterizedir. Nukleuslar yuvarlaktır ve santral yerleşimli belirgin nükleoller izlenir. Onkositik paternde ER, PR ve HER2 ekspresyonu değişkendir. Yukarıda alıntı yapılan çalışmada olguların %78'i ER, %62.5'i PR ve %25'i HER2 pozitif boyanmıştır. Vakaların %64.4'ünde in situ karsinom tespit edilmiştir. Eozinofilik granüler sitoplazmalı meme karsinomları nadir olmadığından, "onkositik karsinom paternli infiltratif duktal karsinom" terimi yalnızca tipik morfolojiye ve uygun immünohistokimyasal ve / veya ultrastrüktürel özelliklere sahip lezyonlar için kullanılmalıdır. Bu lezyonlar,

tipik olarak hormon reseptör negatif ve androjen reseptörü (AR) pozitif olan apokrin farklılaşması olan kanserlerden ayırt edilmelidir[17].

Lipidden Zengin Patern

Bu paternde bol sitoplazmik nötr lipidler mevcuttur ve sitoplazmik vakuoller oluşturur. Sitoplazmadaki vakuoller, Sudan III veya Oil Red O ile pozitif boyanırken, PAS, Alcian blue veya musikarmin ile boyanmazlar. Çekirdekler düzensizdir, orta ila şiddetli atipi ve bir veya daha fazla nükleol içerir. Çoğu durumda, lipitten zengin karsinom histolojik derece 3 olarak sınıflandırılır. Bildirilen vakaların çoğu ER ve PR için negatif, HER2 pozitifdir. Literatürde HER2 pozitifliği %50 ile %100 arasında değişmektedir[17].

Glikojenden Zengin Şeffaf Hücreli Patern

Glikojen bakımından zengin berrak hücreli karsinomlar, neoplastik hücrelerin% 90'ından fazlasının glikojen içeren bol miktarda berrak sitoplazma sergilediği tümörlerdir. Tüm invaziv meme karsinomlarının %1-3' ünü oluşturur[21].

Tümör hücreleri, keskin sınırlı ve poligonal şekildedir. Berrak veya ince granüler sitoplazma, PAS pozitif, diastaza duyarlı glikojen içerir. Oval- yuvarlak nükleuslu, kümelenmiş kromatin ve belirgin nükleollüdür. Glikojen bakımından zengin berrak hücreli karsinomlar, tamamen intraduktal olabilir veya intraduktal ve invaziv bileşenlerden oluşabilir. ER, vakaların %35-50'sinde pozitifdir ve çoğu vaka PR için negatiftir. HER2 durumu, literatürde değişkendir. Bazı yazarlar, genel olarak meme kanserlerinde olduğu gibi benzer bir HER2 amplifikasyon oranı bildirmişlerdir; bazı yazarlar ise daha düşük bir oran bildirmiştir[17, 21].

2.3.2. İnvaziv lobüler karsinom

İnvaziv lobüler karsinom ikinci sıklıkta görülen meme karsinomudur. Tüm meme karsinomlarının %5-15'ini oluşturur. Aynı tip memede multifokal olması ve diğer tip meme karsinomlarından daha sık bilateral olması(%6-47) ile karakterizedir. Lobüler karsinoma in situ (LCIS) invaziv lobüler karsinom ile %70-80 oranında birlikte görülür[18, 21].

Klinik

Çoğu kadın palpe edilen kitle ile başvurur. Radyolojik olarak en yaygın mamagrafik bulgular belirsiz sınırlı asimetrik yapısal distorsiyon şeklindedir. Kalsifikasyonlar nadir görülür. Ultrasonografi daha duyarlıdır (%78-95), ancak tümörün boyutu tahmin edilemeyebilir. MRG, özellikle multifokal lezyonların teşhisinde daha yararlıdır, ancak yüksek sensitivite ve düşük spesifitede olan bu teknik tümör boyutunun daha büyük algılanmasına neden olabilir[17, 18, 21].

Patogeneze

Çoğu vaka E-kaderini kodlayan gen olan CDH1'in bialelik ekspresyon kaybını gösterir. Klasik lobüler karsinomlar tipik olarak ER, PR eksprese eder, Nadiren HER2 overekspresyonu ve gen amplifikasyonu gösterirler. Gen ekspresyon profiline göre vakaların %85'i luminal A olarak sınıflandırılır[15, 17].

Makroskopi

Bazı invaziv lobüler karsinomlar sert, kumsu, gri- beyaz renkte kitleler şeklinde olup infiltratif duktal karsinomlardan ayrılmayabilir. Bazı olgularda ise makroskobik olarak kitle tespit edilemeyip meme dokusu lastiğe benzer bir kıvamda olabilir[18].

Mikroskopi

İnvaziv lobüler karsinom, kendine özgü sitolojik özellik ve patern oluşturan neoplastik hücrelerin stromal infiltrasyonu ile karakterizedir. Klasik form lobüler karsinomun yaklaşık %40'ını oluşturur. Relatif olarak uniform neoplastik hücrelerin, stromada tek tek veya tek sıra infiltrasyonu ile karakterizedir. Bu hücreler sıklıkla meme duktusunu konsantrik olarak sarar. Stromada çok az doku reaksiyonuna neden olurlar. Neoplastik hücreler nispeten üniformdur. Göze çarpmayan nükleollere ve ince bir sitoplazmaya sahip yuvarlak veya çentikli oval nukleuslara sahiptir. Nukleus genellikle egzantrik yerleşimli olabilir. Çok az pleomorfizm sergilerler. Mitoz nadirdir. Hücreler sıklıkla intrasitoplazmik lümen içerebilir ve eozinofilik globül bulundurabilirler. Bazı hücrelerde taşlı yüzük hücresi görünümü oluşabilir. Klasik formda taşlı yüzük hücreleri tümör hücre popülasyonunun küçük bir kısmını oluşturur[18, 22].

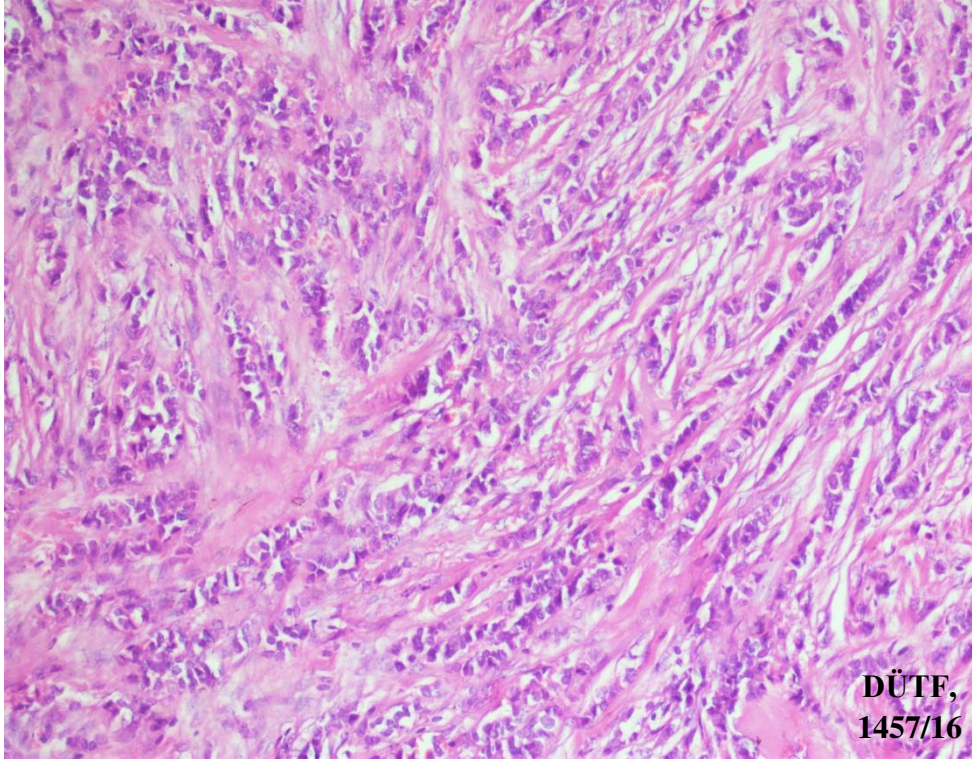
Alveoler varyant, lobüler karsinomun %5'inden azında görülen nadir bir varyanttır. Hücreler, klasik tipte olanlarla aynı mikroskopik özelliklere sahiptir, ancak ince fibrovasküler bir stroma ile ayrılmış 20 veya daha fazla hücrenin kümelenmesi ile karakterizedir[22].

Solid varyant lobüler karsinomun % 10'unu oluşturur. Tümör hücreleri birleşme eğiliminde olan tabakalar halinde izlenir. Minimal stroma içerirler. Hücreler genellikle daha pleomorfiktir ve klasik tipe göre daha sık mitoz izlenir[18, 22].

Pleomorfik varyant, klasik invaziv lobüler karsinomunun büyüme paternine sahiptir, ancak belirgin derecede nükleer pleomorfizm sergiler. Apokrin farklılaşması ve fokal taşlı yüzük morfolojisi de görülebilir. Pleomorfik invaziv lobüler karsinom, daha sık olarak hormon reseptör negatifliği ve HER2, p53 pozitifdir[1].

Histoyositoid karsinom da invaziv lobüler karsinomun bir alt tipidir. Tümör hücreleri histiyosit benzeri görüntüde, geniş, köpüksü, eozinofilik sitoplazmalı ve hafif nükleer atipi içerir. GCDFP15 pozitif, E-kaderin negatiftir[18].

Taşlı yüzük hücreli karsinom önemli sayıda tümör hücresinin intrasitoplazmik müsin birikimi gösterdiği ve tipik taşlı yüzük görünümü ile sonuçlandığı bir tür meme karsinomudur. Bu tümörü, farklı prognozları nedeniyle müsinöz karsinomdan ayırmak önemlidir. Taşlı yüzük karsinomu vakalarının çoğu, klasik invaziv lobüler karsinoma benzer sitolojik özellikler gösterir ve bazen onunla birlikte bulunur. Ayrıca, LCIS veya invaziv lobüler karsinomun dağınık taşlı yüzük hücreleri içermesi nadir değildir. Bu nedenle, taşlı yüzük karsinomu vakalarının çoğu, invaziv lobüler karsinomun varyantları olarak kabul edilir. İmmünohistokimyasal olarak taşlı yüzük karsinomu CK7 ve MUC1 pozitif ve genellikle E-kaderin negatiftir[1].



Şekil 2: İnvaziv Lobüler Karsinom, fibrotik stromada tek sıra halinde infiltrasyon gösteren tümör hücreleri (H&E; X200)

2.3.3. Tübüler karsinom

Tübüler karsinom metastatik kapasitesi sınırlı ve iyi prognozludur. Semptomatik olarak ortaya çıkan invaziv karsinomların %1-2'sini oluştururlar, ancak taramayla saptanan tümörlerin %20'sini oluştururlar[18, 23].

Klinik

Tübüler karsinomu diğer tiplerden ayıran belirli bir klinik özellik yoktur. Yaşlı hastalarda ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir ve boyut olarak küçük olma eğilimindedir. Çoğu tübüler karsinom, tesadüfen mamografik tarama ile tespit edilir. Mamografik olarak ayrı bir kitle oluşturabilir ve çoğunlukla küçük sivri uçlu lezyonlar olarak izlenirler. Nadiren kalsifikasyon içerirler. Ultrasonografide, genellikle düzensiz sınırlı hipoekoik bir kitle olarak görünür[17, 18].

Patogenez

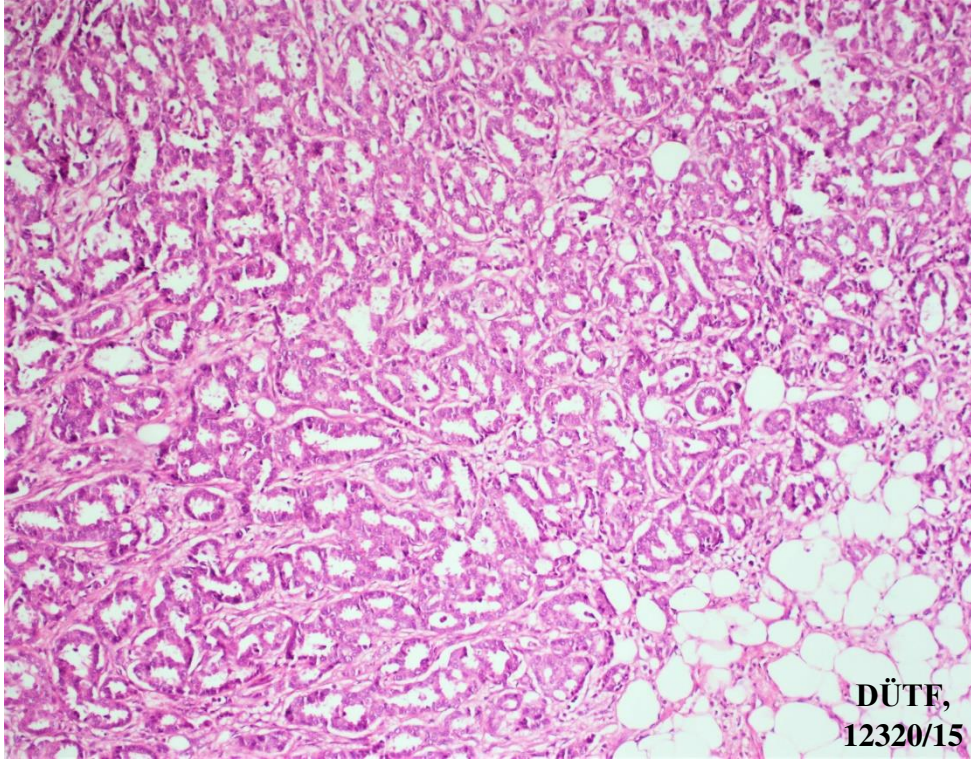
Moleküler çalışmalara göre tübüler karsinomlar lüminal A sınıfına dahil edilmişlerdir. Hormon reseptörleri pozitifdir. Nadiren HER2 overekspresyonu ve gen amplifikasyonu gösterirler [17].

Makroskopi

Genel zellikler infiltratif duktal karsinoma benzer şekilde düzensiz sınırlı sert kitle şeklindedir. Ancak tübüler karsinomlar genellikle 2 cm'den kktr[1, 12].

Mikroskopi

Histolojik olarak, hücreleri çok az pleomorfizm ve düşük mitotik aktivite gösteren iyi sınırlı tübüler yapılar izlenir. Tübüller küboidal veya kolumnar hücreler ile döşeli, kk–orta büyüklükte nispeten uniform hücrelerden oluşur. Çevrelerinde myoepitelyal tabaka yoktur. Tübüller oval şekilli, açılı köşelidir. Lmenleri açıktır. Sıklıkla apikal sitoplazmik çıkıntılar içerirler. Stroma genelde desmoplastiktir ve belirgin elastosis bulunabilir. DCIS sıklıkla görülür ve mevcut olduğunda, genellikle düşük dereceli olup, kribriform veya mikropapiller paterndedir[12, 17, 23].



Şekil 3: Tübüler Karsinom üniform, tek sıralı küboidal hücreler ile döşeli, tübüler yapılar (H&E; X100)

2.3.4. Kribriform karsinom

İnvazif kribriform karsinom, kribriform DCIS'ye benzer bir kribriform büyüme paterni sergileyen, nadir iyi diferansiye karsinomdur. Bazı invaziv kribriform karsinomlar, tübüler karsinomda görüldüğü gibi karışık tübüler glandlara sahiptir. Bildirilen insidans %0,3 ile %3,5 arasında değişmektedir[24].

Klinik

Bu tümörler palpe edilen kitle şeklinde karşımıza çıkabilir fakat sıklıkla mamografi ile tespit edilirler. Mamografide sivri uçlu kitleler şeklindedir. Kalsifikasyon içerebilirler. Vakaların %10-20'sinde multifokalite gözlenmiştir[17, 18].

Patogenez

İnvaziv kribriform karsinomlar karakteristik olarak ER pozitiflerdir. Üçte ikisinden fazlası PR pozitifdir. Bu tümörler tipik olarak HER2 overekspresyonu ve gen amplifikasyonu göstermez. Luminal A moleküler alt tipe dahildirler[18].

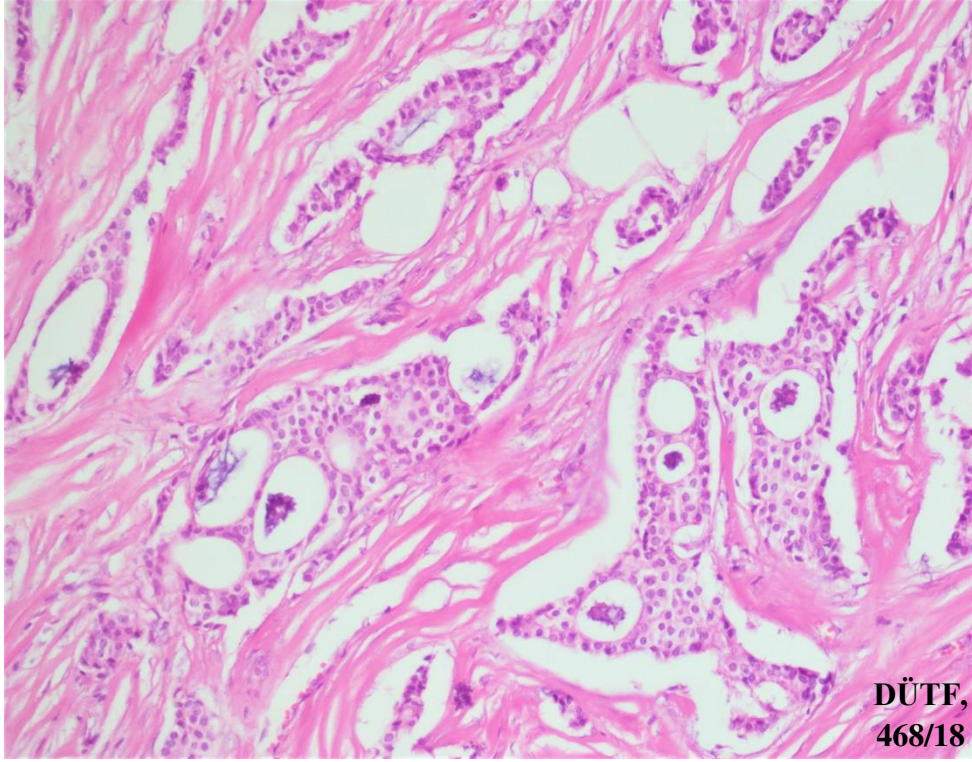
Makroskopi

Kribriform karsinomu infiltratif duktal karsinomdan ayıran spesifik makroskopik özellik yoktur. Genellikle ortalama boyutu 31 mm olan, sert, düzensiz sınırlı kitleden oluşur. 20 cm büyüklüğünde invaziv kribriform karsinomlar da tanımlanmıştır[17].

Mikroskopi

Adından da anlaşılacağı gibi, tümör, kribriform in situ karsinomda görülene benzer bir kribriform görünüme sahiptir, ancak stromal invazyon sergiler ve miyoepitelyal hücre tabakası yoktur. Tümör hücreleri, kübik ya da düşük kolumnar görünümündedir, apikal çıkıntılara sahiptir. Düşük veya orta derecede nükleer atipi sergiler. Mitoz nadirdir. Neoplastik glandlarla ilişkili kalsifikasyonlar görülebilir. Çevreleyen stroma, fibroblastiktir. Bazı durumlarda, osteoklast benzeri histiyositik kökenli dev hücreler tanımlanmıştır. Kribriform tip DCIS, vakaların % 80'ine kadar görülebilir[24, 25].

Bu tümörün en önemli yönü, bir kribriform lezyonunun invazif olabileceğinin tanınmasıdır, bu potansiyel bir tanı tuzağıdır. Gerekirse, invazif kribriform karsinom ve DCIS'yi ayırmak için miyoepitelyal belirteçler kullanılabilir[1].



Şekil 4: Kribriform Karsinom. Fibrotik stromada, düşük derecede nükleer atipi gösteren kribriform patern oluşturan tümör hücreleri (H&E; X100)

2.3.5. Müsinöz karsinom

Müsinöz karsinom (kolloid karsinom olarak da bilinir) göreceli olarak iyi prognozludur. Nadir görülür. Çoğu seride sıklığı invaziv meme karsinomlarının %2'sini oluşturur[24].

Klinik

Müsinöz karsinom 25-85 yaş gibi geniş yaş aralığında görülür. Ortalama görülme yaşı 71'dir. Mamografik olarak iyi sınırlı veya lobüle bir kitle olarak görünür ve benign bir süreci taklit edebilir. Sonografik olarak, çoğu tümör hipoekoiktir. MR, T2 ağırlıklı görüntülerde hiperintens olarak izlenir[17, 18].

Patogenez

Müsinöz karsinomlar tipik olarak ER pozitiflerdir. Yaklaşık %70'i PR pozitifdir. Genellikle HER2 ekspresyonu ve gen amplifikasyonu göstermezler. Bu tümörler göreceli olarak küçük oranda genomik instabilite taşırlar. Gen ekspresyon profili çalışmalarına göre luminal A moleküler subtipindedirler[18].

Makroskopi

İyi sınırlı, yumuşak kıvamlı, parlak ve septa ile bir arada tutulan jelatinimsi bir kitle şeklindedir. Kanama odakları görülebilir[1].

Mikroskopi

Tümör, çok az pleomorfizm ve düşük mitotik oran gösteren malign hücre gruplarından oluşur. Hücreler, fibröz bağ dokusu ile çevrili müsin gölcükleri içinde yer alır. Müsini geleneksel H&E kesitlerde görmek zor olabilir, ancak Alcian mavisi veya PAS boyama ile gösterilebilir. Az miktarda hücre içi müsin de mevcut olabilir. Kalsifikasyon nadirdir. Müsinöz karsinom sıklıkla DKİS ile beraberdir. Mikropapiller, papiller, kribriform, solid paternler görülebilir. [12, 18].

Bazı yazarlar, müsinöz karsinomları sırasıyla tip A ve B olarak adlandırır. Hücreden fakir olanlar tip A, hücreden zengin olanlar tip B şeklinde sınıflandırılır. Tip B karsinomlar sıklıkla endokrin diferansiasyon gösterirler. Bu durum hem sitoplazmik argirofilik granüllerin varlığı hem de endokrin belirteçlerden sinaptofizin ve kromogranin immün reaktivitesi ile gösterilebilir[1].

2.3.6. Müsinöz kistadenokarsinom

Memenin müsinöz kistadenokarsinomu, pankreatobiliyer veya over müsinöz kistadenokarsinomuna benzeyen, bol intrasitoplazmik müsin içeren uzun kolumnar hücrelerle kaplı kistik yapılarla karakterizedir. Hastalar genellikle 0,8-19 cm, ortalama boyutu 3 cm olan palpe edilebilir bir kitle ile başvurur[17].

Makroskopik olarak, iyi sınırlı, solid veya kistik bir kitle şeklinde izlenir. Kistik boşluklar genellikle jelatinöz materyal içerir. Müsinöz kistadenokarsinom, tabakalaşma, papiller oluşumlar içeren uzun kolumnar hücrelerle kaplı kistik boşluklarla karakterizedir. Neoplastik hücrelerde nukleus bazal yerleşimlidir. Bol miktarda intrasitoplazmik müsin içerir. Müsin ayrıca kistik boşluklarda da mevcuttur. Sitolojik atipi derecesi, aynı tümör içinde bile değişkendir. Kistik yapılar yuvarlak bir kontura sahiptir ancak periferde miyoepitelyal hücrelerden yoksundur. Komşu meme duktus ve lobüllerde DCIS mevcut olabilir. Memenin çoğu müsinöz kistadenokarsinomu ER, PR ve HER2 negatiftir. Nadir HER2 pozitif vakalar bildirilmiştir. Bazı tümörler CK5 / 6 ve EGFR eksprese eder. Memenin

primer müsinöz kistadenokarsinomu CK7 pozitifdir ancak CK20 ve CDX2 için negatiftir. Bu bulgular, özellikle CK7, CK20 ve CDX2 pozitif olan metastatik pankreatobiliyer müsinöz kistadenokarsinomdan ayırt edilmesine yardımcı olur[17].

2.3.7. İnvaziv mikropapiller karsinom

İnvazif mikropapiller karsinom, klinik olarak agresiftir. Morfolojik diğer bölgelerdeki primer mikropapiller karsinom ile aynıdır. Pür mükropapiller karsinom nadirdir ve meme karsinomlarının %1,7-2,3'ünü oluşturur[24].

Klinik

İnvaziv mikropapiller karsinomlar genellikle ele gelen kitle olarak bulgu verir. Mamografik olarak tümör, sınırları belirsiz yoğun, düzensiz bir kitle şeklinde görünür. Kalsifikasyon mevcut olabilir. USG' de hipoekoik veya bazen izoeoik kitle olarak izlenir. MRI'de, tümör genellikle heterojen kontrastlı, düzensiz sınırlı kitle şeklindedir. Aksiller lenf nodu metastazı tanı anında vakaların üçte ikisinden fazlasında mevcuttur[17].

Patogenez

Spesifik patogenetik mekanizmalar veya yüksek düzeyde tekrarlayan moleküler değişiklikler tanımlanmamıştır. Büyük çoğunluğu ER pozitif, yaklaşık yarısı da PR pozitifdir. HER2 overekspresyonu vakaların üçte birinde görülmüştür. Çoğu luminal A ya da luminal B grubundadır[17, 18].

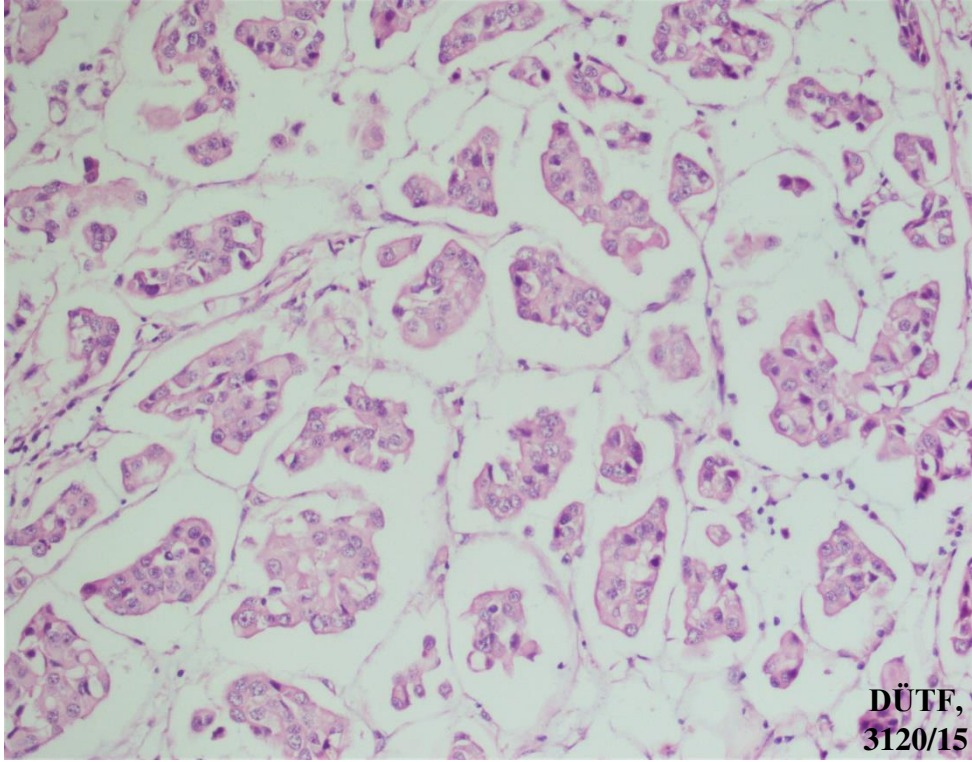
Makroskopi

Makroskopik özellikleri infiltratif duktal karsinomdan farklı değildir. Birkaç milimetreden 11 cm'ye kadar değişen tümörler bildirilmiştir. Genel olarak, bu tümörler infiltratif duktal karsinomdan önemli ölçüde daha büyüktür[24].

Mikroskopi

Fibrovasküler kor içermeyen psödopapiller yapılar ve açık boş alanlarda serbestçe yüzen tübüler yapılar ile karakterizedir. Tümör hücreleri ince granüler veya yoğun eozinofilik sitoplazmaya, orta ila yüksek dereceli nukleuslara sahiptir.

Mitoz sık izlenir. Psammom cisimleri vakaların yaklaşık yarısında mevcuttur. Tümör hücrelerinin bulunduğu boşluklardan bazılarının lenfatik damarlar olduğu gösterilmiştir, ancak çoğunluğu tümör hücrelerinin apikal yüzeyinin dışı doğru polarize olmasından kaynaklanan yeni oluşmuş yarıklardır. Bu morfolojik gözlem, elektron mikroskopunda mikrovillusların varlığı ve epitel membran antijeni (EMA) ile stromaya bakan hücre zarlarının karakteristik boyanması ile desteklenmiştir[1, 24].



Şekil 5: İnvaziv Mikropapiller Karsinom. Belirgin nükleollü, eozinofilik sitoplazmalı, fibrovasküler kor içermeyen psödopapiller yapılar (H&E; X100)

2.3.8. Apokrin diferansiasyonlu karsinom

Pek çok invaziv karsinom apokrin diferansiasyon göstermektedir. Pür apokrin karsinom meme karsinomlarının %1'inden azını oluşturmaktadır[18].

Klinik

Klinik özellikler, infiltratif duktal karsinoma benzer. Genellikle sert, düzensiz sınırlı bir kitle olarak ortaya çıkar. Mikrokalsifikasyonlar, özellikle in situ duktal karsinom (DCIS) ile ilişkili ise mamografide görülebilir[17].

Patogenez

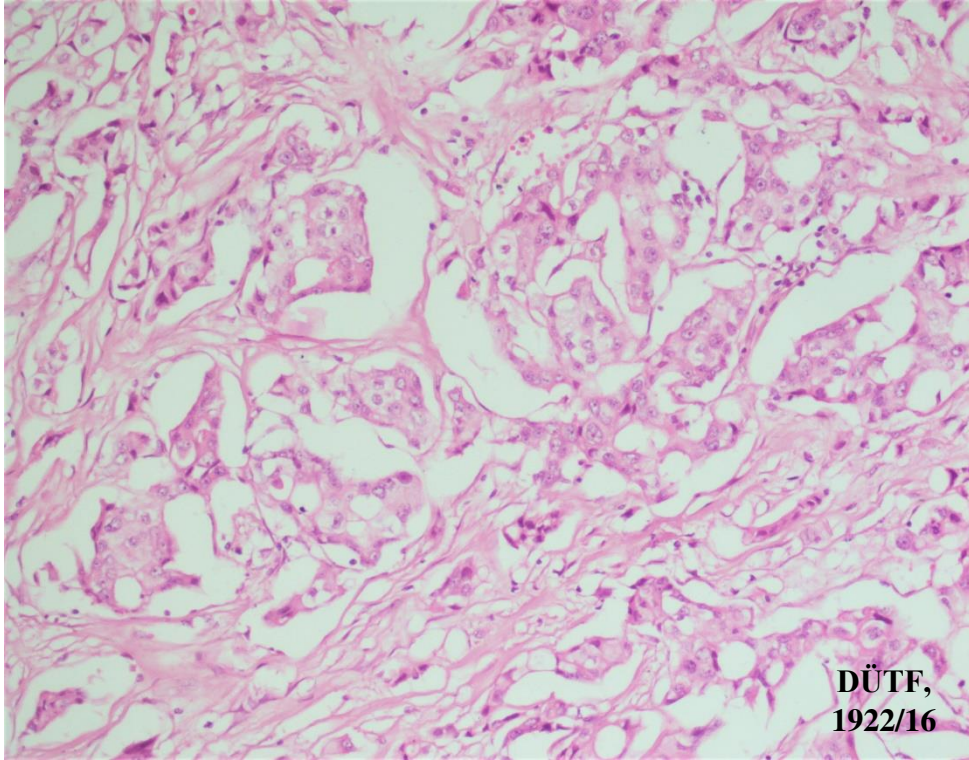
Apokrin karsinomlar ER, PR negatiftir fakat androjen reseptör ekspresyonu gösterirler. Ayrıca GCDFP immünboyanması gösterirler. HER2 overekspresyonu ve gen amplifikasyonu %40-50 vakada tespit edilmiştir[18].

Makroskopi

Apokrin karsinomlarda ayırıcı bir makroskopik görünüm yoktur. Boyut dağılımı infiltratif duktal karsinoma benzer[18].

Mikroskopi

Tümör hücreleri, eozinofilik veya kahverenkte granüller içeren geniş eozinofilik ya da vakuole sitoplazmalıdır. Nukleuslar yuvarlak ve vezikülerdir. Nükleol belirgindir. Solid büyüme paterni baskındır. Ancak herhangi bir yapısal paternde olabilir. Vakaların çoğu derece 2 veya derece 3'tür. Apokrin morfolojili DKIS genellikle invaziv karsinoma eşlik eder. Genellikle in situ karsinom, komedo nekroz ve kalsifikasyon içermekte olup yüksek nükleer derecelidir[1, 17].



Şekil 6: Apokrin Karsinom. Belirgin nükleollü, bir kısmı vakuolize geniş eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri (H&E; X200)

2.3.9. Metaplastik karsinom

Metaplastik karsinom, epitelyal bileşenin glandüler olmayan elemanlara farklılaştığı meme karsinomu için genel bir terimdir[1].

Çoğu meme karsinomu adenokarsinomun varyantları olmasına rağmen, bazıları iğsi hücreli metaplastik değişiklikler gösterir. Metaplaziye uğramış hücreler mezenkimal elemanlar veya skuamöz hücre tiplerini de içerebilir. Metaplastik karsinom sık değildir, tüm meme karsinomlarının %1'inden azını oluşturur. Metaplastik karsinomlarda prognozun belirlenmesi güç olup metaplazi tipi ile ilişkili olabilir[12, 18].

Klinik

Metaplastik karsinomun klinik özellikleri, ER negatif infiltratif duktal karsinoma benzerdir; ancak metaplastik karsinomlar tanı konduğunda sıklıkla ileri evrededir. Çoğu vaka palpe edilen kitle ile başvurur. Ultrasonografi veya mamografide kitle lezyonu olarak tespit edilir. Kalsifikasyon nadirdir; mevcut olduğunda, genellikle DCIS ve/veya osseöz diferansiasyon ile ilişkilendirilirler[17].

Patogenezi

Büyük kısmı ER, PR, HER2 negatiftir. Bazal keratinler (CK5/6, 7, 14), EGFR ve P63 ekspresyonu gösterebilirler. Metaplastik karsinomlarda sıklıkla mutasyona uğramış genler arasında TP53 ve PIK3CA bulunur. Diğer genetik anormallikler arasında PTEN ve CDKN2A kayıpları bulunur[17, 26].

Makroskopi

Düzenli sınırlı ya da düzensiz sınırlı kitleler şeklindedir. Skuamöz diferansiasyon olan tipte kistik dejenerasyon alanları olabilir. Genellikle göreceli olarak büyük tümörlerdir ve ortalama 3.9 cm'dir[18].

Mikroskopi

DSÖ 2019 çalışma grubu metaplastik karsinomları kategorize etmiştir.

Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom; kistik formasyon ve skuamöz inci alanları içeren skuamöz diferansiasyon ve glandüler yapılardan oluşur. Gland yapıları sıklıkla siringomatöz diferansiasyonu düşündüren, uzamış, lümenleri komprese olmuş görünümündedir. Stroma, fibromatozis benzeri görünüm oluşturan iğsi hücrelerden meydana gelir. Konservatif cerrahiyi takiben lokal rekürrens yaygındır ancak nodal ve uzak metastazlar nadirdir. adenomyoepitelyoma ve benign sklerozan lezyonlar ile birlikte ortaya çıkabilir[1, 18].

Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom; adından da anlaşılacağı gibi fibromatozise benzeyen sitolojik atipisi çok az olan veya hiç olmayan iğsi hücreler ile karakterizedir. İğsi gücreler yağ dokuya infiltre ve duktus ile lobüller arasında fasiküller halinde izlenir. Bazen santral skar benzeri alan mevcut olabilir. Bu tümörlerin bazıları, kompleks sklerozan lezyonlar, sklerozan papiller lezyonlar veya adenomyoepitelyomalar ile ilişkili olarak ortaya çıkar[1].

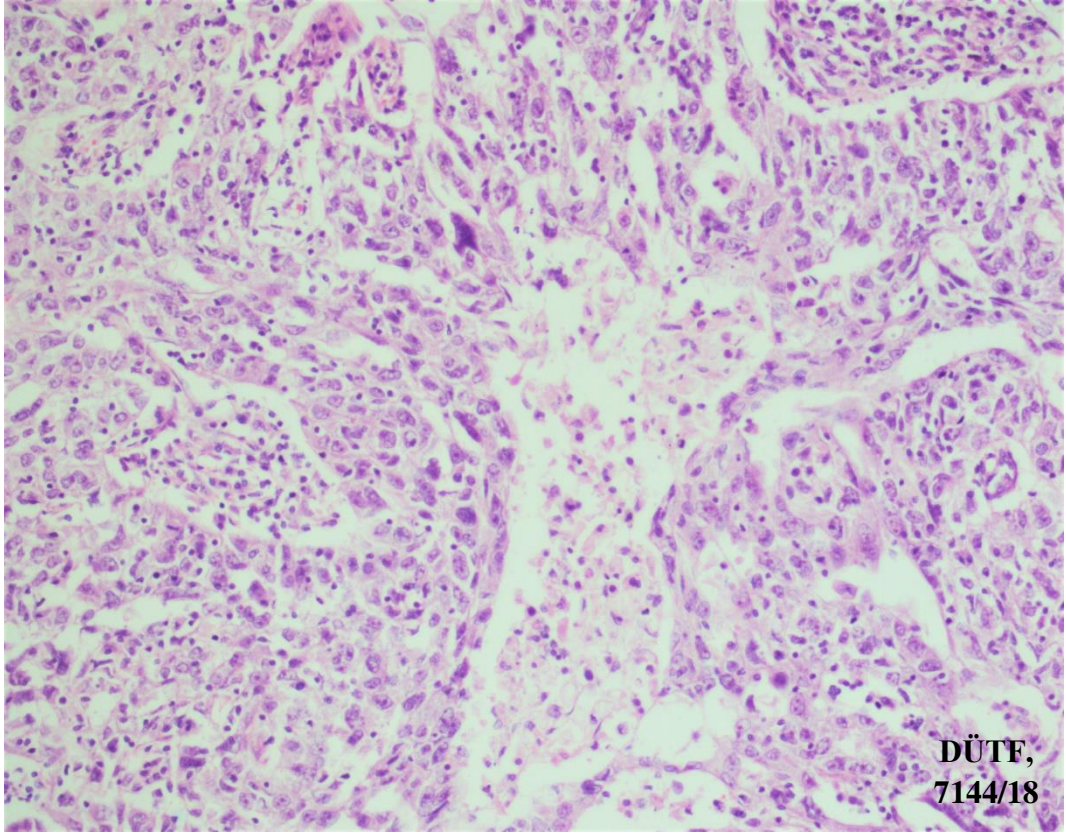
İğsi hücreli karsinom; uzun fasiküllerden oluşan balık sırtı veya kısa fasiküllerden oluşan storiform paternde dizelenmiş atipik iğsi hücreler ile karakterizedir. Çoğu zaman, farklı paternlerin karışımı şeklinde gözlenir. Sitoplazma, oval veya iğsidir. Nükleer pleomorfizm genellikle orta veya yüksektir. İnflamatuvar infiltrat, vakaların bir kısmında izlenir. Neoplastik hücrelerin daha epiteloïd morfolojiye veya skuamöz farklılaşmaya sahip küçük kümeler oluşturduğu alanlar bulunabilir[17].

Skuamöz hücreli karsinom; Memenin saf skuamöz hücreli karsinomu genellikle büyüktür ve malign skuamöz epitel ile kaplı ortası kistik boşluk şeklindedir. Bu tümörlerin prognozu tartışmalıdır, ancak akantoliz gösteren skuamöz hücreli karsinomlarda kötü prognoz bildirilmiştir[12].

Heterolog mezenkimal diferansiasyonlu metaplastik karsinom; en sık görülen mezenkimal elemanlar kıkırdak ve kemiktir. Bu elemanlar benign ya da malign karakterde olabilir. Mezenkimal komponenti baskın vakalarda epitelyal komponenti veya DKİS komponentini tespit etmek doğru tanı için gereklidir[18].

Mikst metaplastik karsinom; geniş örneklemeyle, metaplastik meme kanserlerinin büyük bir kısmı, farklı metaplastik elemanlar yanı sıra metaplastik ve

adenokarsinomatöz komponentlerinin karışımını sergiler. Bu vakalar metaplastik karsinom olarak bildirilmeli ve farklı komponentler raporda belirtilmelidir[17].



Şekil 7: Metaplastik Karsinom. Nekrobiyotik alan içeren, belirgin nükleollü, bir kısmı veziküler nukleuslu, pleomorfizm gösteren tümör hücreleri (H&E; X200)

2.4. Meme Tümörlerinde TNM Evrelemesi[17].

Primer Tümör

Tx: Değerlendirilemeyen primer tümör

T0: Primer tümöre ait bulgu yok

Tis: İn situ karsinom

Tis (DCIS): Duktal karsinoma in situ

Tis (LCIS): Lobüler karsinoma in situ

Tis (Paget): Meme başının Paget hastalığı (primer başka tümör yok)

T1: En büyük tümör çapı ≤ 2 cm

T1mic: En büyük çapı ≤ 0.1 cm (mikroinvaziv tümör)

T1a: Tümör çapı > 0.1 cm ancak ≤ 0.5 cm

T1b: Tümör çapı > 0.5 cm ancak ≤ 1 cm

T1c: Tümör çapı > 1 cm ancak ≤ 2 cm

T2: Tümör çapı > 2 cm ancak ≤ 5 cm

T3: Tümör çapı > 5 cm

T4: Boyutu ne olursa olsun, göğüs duvarı veya cilde direkt yayılan tümör

T4a: Pektoralis major kası dışında göğüs duvarına yayılım

T4b: Ödem, cilt ülserasyonu, aynı memede satellit cilt nodülleri, portakal kabuğu görünümü

T4c: T4a + T4b

T4d: İnflamatuvar karsinom

Lenf Nodları Patolojik Sınıflama (pN)

pNX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

pN0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

pN1: Mikrometastazlar veya 1-3 ipsilateral aksiller lenf nodundaki metastazlar ve/veya klinik olarak tespit edilmeyen ancak sentinel lenf nodu biyopsisi ile tespit edilen metastazlar

pN1mi: Mikrometastazlar (0,2 mm'den büyük ve/veya daha fazla 200 hücreden fazla, ancak 2.0 mm'den küçük)

pN1a: 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz, en az bir lenf nodunda 2 mm'den büyük

pN1b: Klinik olarak saptanmamış internal mammarian lenf nodları

pN1c: 1-3 aksiller lenf nodunda ve klinik olarak saptanamayan internal mammarian lenf nodlarında metastaz

pN2: 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammarian lenf nodunda metastaz

pN2a: 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm' den büyük en az bir tümör odağı)

pN2b: Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammarian lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN3a: 10 veya daha fazla ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz veya ipsilateral infraklaviküler lenf nodlarında metastaz

pN3b: İpsilateral aksiller ve internal mammarian lenf nodu metastazı

pN3c: İpsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

M: Uzak Metastaz

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Tablo 2: TNM sınıflamasına göre evreleme

Evre	Tümör	Lenf nodu	Metastaz
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1a	T1	N0	M0
Evre 1b	T0, T1	N1mi	M0
Evre 2a	T0, T1 T2	N1 N0	M0
Evre 2b	T2 T3	N1 N0	M0

Evre 3a	T0, T1, T2 T3	N2 N1,N2	M0
Evre 3b	T4	N0,N1,N2	M0
Evre 3c	T(Herhangi)	N3	M0
Evre 4	T(Herhangi)	N (Herhangi)	M1

2.5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması

Meme kanseri, davranış ve prognoz açısından değişiklik gösteren farklı gen ekspresyonları ile moleküler düzeyde heterojendir. Son birkaç yılda, tedavi etkinliği için meme kanserini moleküler düzeyde karakterize etmek ve sınıflandırmak için önemli çaba sarf edilmiştir. Bununla birlikte, zaman ve maliyet kısıtlamaları nedeniyle, moleküler meme kanseri sınıflandırması hala büyük ölçüde biyobelirteçlerin (ER, PR, HER2 ve Ki-67) immünohistokimyasal değerlendirmesine dayanmaktadır[17, 23].

Tablo 3: İmmünohistokimyasal belirteçler ile moleküler sınıflama (DSÖ 2019).

Moleküler sınıf	İmmünohistokimyasal belirteçler
Luminal A	ER+, PR+, HER2 –, düşük Ki-67
Luminal B (HER2 -)	ER+, PR– ya da zayıf PR + , HER2– , yüksek Ki-67
Luminal B (HER2 +)	ER+, PR– ya da zayıf PR + , HER2+ , yüksek Ki-67
HER2 pozitif	ER–, PR–, HER2 +
Triple negatif	ER–, PR–, HER2 –

En yeni bulgulardan biri bazal benzeri meme kanserlerinin farklı bir grup olduğunun tespitidir. Bu tümörler tübül yapısının olmaması, genellikle düzgün sınırlı, stromada yoğun lenfoplazmatik infiltrasyon, coğrafik nekroz gibi özelliklere sahip yüksek dereceli tümörlerdir. Tipik olarak ER, PR, HER2 negatiftirler. Bazal sitokeratinler ve EGFR pozitiflerdir. Bununla beraber bu grup içinde de heterojenite tanımlanmıştır. BRCA1 ile ilişkili meme kanserlerinin %80'i bu gruptadır[18, 27].

2.6. Histolojik Derecelendirme

Pek çok klinik çalışmada, meme kanserinde tümör derecesinin önemi açıkça gösterilmiştir. Tüm invaziv meme kanseri tiplerinde histolojik derece verilmesi önerilir. Histolojik derece kısmen bazı histolojik alt tipleri tanımlar (tübüler karsinom derece 1, medüller karsinom derece 3)[18].

Tübüller ve glandüler/asini oluşumu, küçük büyütmede tümör boyunca değerlendirilir. Skoru belirlemek için glandüler/tümör alanı için %75 ve %10'luk oran kullanılır. Nükleer pleomorfizm, komşu meme dokusundaki normal epitel hücrelerinin nükleer boyutu ve şekli ile karşılaştırıldığında en yüksek pleomorfizmi gösteren alanda değerlendirilir. Nükleer membran düzensizliği, nükleollerin sayısı ve boyutu, pleomorfizm için kullanılan yararlı ek özelliklerdir. Skor 1 nükleuslar, önceden var olan benign epitel hücrelerinin çekirdeklerine çok benzer boyuttadır (benign epitel hücre nükleuslarının <1.5 katı), minimal pleomorfizm ve homojen kromatin paterni izlenir. Skor 2 nükleuslar daha büyüktür (benign epitel hücre nükleuslarının 1.5-2 katı), hafif-orta derecede pleomorfizm ve küçük ya da göze çarpmayan nükleollere sahiptir. Skor 3 nükleuslar veziküler kromatinli daha da büyük (benign epitel hücre nükleuslarının > 2 katı büyüklüğünde); boyut ve şekil olarak belirgin farklılık gösterirler. Sıklıkla belirgin nükleol içerirler. Nükleer skor için tercih edilen büyütme, 40x objektiftir[14, 17].

Tablo 4: İnvaziv Meme Karsinomlarının Derecelendirmesinde Nottingham Sistemi

SKOR			
	1	2	3
Tübül	>%75	%10-%75	<%10
Nükleer derece	Düşük	Orta	Yüksek
Mitozlar*	0-5	5-10	>10

* Mikroskopik alana göre değer değişir.

Derece 1: Toplam skor 3,4 veya 5

Derece 2: Toplam skor 6 veya 7

Derece 3: Toplam skor 8 veya 9

2.7. IDO1 ve TDO2

L-Triptofan (Trp), protein yenilenmesine, 5-serotonin (5-HT) üretimi ve Kynurenin (Kyn) yolağının metabolitleri dahil olmak üzere önemli moleküler üretime katılan dokuz temel amino asitten biridir[4]. Protein sentezindeki vazgeçilmez rolüne ek olarak, Trp 3'ü kantitatif olarak önemsiz olan, 4 yol boyunca indirgenmesi sırasında üretilen, fizyolojik olarak önemli birçok metabolitin öncüsüdür. Kyn yolu, toplam Trp indirgenmesinin ~% 95'ini oluşturur[28].

Trp ve Kyn yolağının katabolitleri, hastalığa tolerans göstermek ve göz, beyin, plasenta ve testis dahil olmak üzere immün ayrıcalıklı bölgelerin oluşmasına katkıda bulunmak için immünosupresif bir ortam oluşturur. Günümüzde, enfeksiyon, inflamasyon ve kanser gibi diğer hastalıklara dahil olmasıyla bağışıklığın önemli bir faktörü olarak kabul edilir[4].

İndolamin 2,3- dioksijenaz 1 (IDO1) ve triptofan 2,3 dioksijenaz (TDO2), birinci ve hız sınırlayıcı adımda Kyn yoluna katılır. Tümör, stromal, vasküler ve immün hücreler, özellikle antijen sunan hücreler gibi çeşitli hücrelerde bulunurlar. Ancak T hücrelerinde eksprese edilmezler. Triptofanın çoğu, insan vücudunda yaygın olarak eksprese edilen ve interferon gama ile indüklenebilen IDO tarafından katabolize edilir[4].

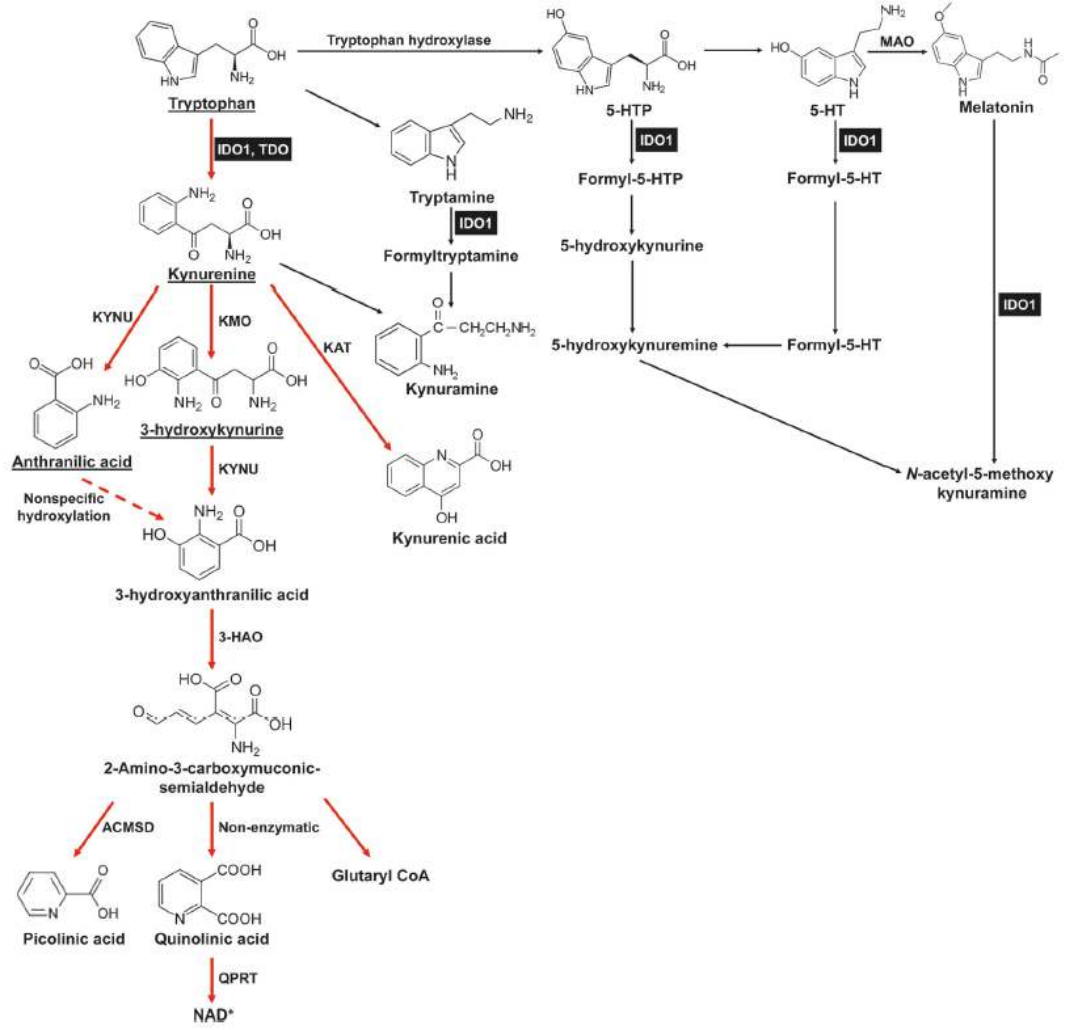
IDO, Trp'de indol halkasının 2,3- çift bağı kırarak Kyn yolağına katılan, hem içeren endoselüler monomerik bir enzimdir. Başlangıçta N-formyl-Kyn üretir. Daha sonra, N-formyl-Kyn, hızla ve kendiliğinden Kyn'e dönüşür. Son olarak, Kyn ayrıca diğer aktif metabolitlere dönüşür[4, 29].

Birçok farklı tümör tipi, interferon gama gibi sitokinlere yanıt olarak IDO1'i aşırı eksprese eder. Ardından triptofanın Kyn gibi çeşitli metabolitlere ayrılması, tümörü infiltre eden lenfositlerin anerjik hale gelmesine ve ölmesine neden olur[30].

Kanserlerde artan IDO1 seviyelerinin keşfedilmesinden bu yana, akut miyeloid lösemi, kolorektal karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kansinimleri, prostat karsinomu, over karsinomu, endometriyal karsinom ve özofagus karsinomunda IDO1 ekspresyonunu kötü prognozu ile ilişkilendiren birkaç rapor bulunmaktadır. Beklenmedik bir şekilde, renal hücreli karsinom ve hepatoselüler karsinom hastalarında yüksek IDO1 ekspresyonu, daha iyi sağkalım ile ilişkili bulunmuştur[31].

TDO, TDO2 geni tarafından kodlanan tetramerik bir hemoproteindir. Ayrıca, Trp'nin indol halkasının 2,3-bağına O2 ekleyerek L-Trp'nin N-formil-Kyn'e dönüşümünü katalize eder. TDO ilk olarak 1936'da memeli karaciğerinde bulunmuştur[4]. TDO'nun önce glioma hücrelerinde ve daha sonra hepatokarsinomlar, melanomlar, mesane karsinomları, meme kanseri ve diğer tümör dokuları gibi birçok tümörde eksprese edildiği ve tümör immün yanıtını düzenlediği bulunmuştur[32].

Meme kanserinde IDO1 inhibitörlerini araştıran klinik çalışmalar vardır. Meme kanserinde tek ajan halinde ya da dosetaksel ile kombinasyon halinde indoksimod (L-metil triptofan) üzerinde faz1 çalışmaları devam etmektedir[33]. Epacadostat, hem tek bir ajan olarak hem de anti-PD-1, anti-PD-L1 veya anti-CTLA-4 ile kombinasyon halinde klinik çalışmalardaki farklı bir IDO1 inhibitörüdür. NK hücre çoğalması ve T-hücresi aktivitesini artırarak etki gösterir. Solid tümörlerde ve hematolojik malignitelerde Faz 1'den 3'e kadar değişen epacadostat ile çok sayıda klinik çalışma yapılmıştır. Ayrıca 680C91, LM10 gibi TDO2 inhibitörlerinin farklı tümörler için klinik öncesi çalışmaları devam etmektedir [34].



Şekil 8: Triptofan (Trp) katabolik yolları

Protein sentezi için bir yapı bloğu olarak kullanılmasına ek olarak, diyetteki Trp'nin çoğu (%95), Trp → Kyn yolu (kırmızı oklar) yoluyla katabolize edilir. Diğer küçük yollar, triptamin veya melatonine dönüşümü içerir. Kyn yolu içinde altı çizili metabolitler kan beyin bariyerini geçebilir. IDO1 (ve TDO) siyah kutularda vurgulanmıştır. ACMSD: 2-amino-3-karboksimukonat semialdehit karboksilaz; 3-HAO, 3-hidroksianthranilate 3,4-dioxygenase; IDO1, indolamin 2, 3-dioksijenaz 1; KAT, kynurenin aminotransferase (I, II, III); KMO, kynurenine 3-monooksijenaz; KYNU, kynureninaz; MAO, monoamin oksidaz; QPRT, kinolinik asit fosforibosil transferaz; TDO, triptofan 2,3-dioksijenaz[31].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması

Çalışmamıza Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD.'na Ocak 2010-Aralık 2019 tarihleri arasında gönderilen meme karsinom tanısı alan, uygun tespit işlemi yapılmış ve yeterli dokuya sahip meme koruyucu cerrahi ya da mastektomi materyalleri arasından seçilen 74 olguya ait arşiv materyalleri ve mamoplasti yapılmış normal meme dokusu izlenen 14 olgu kontrol dokusu olarak, toplam 88 olgu dahil edildi.

Olgularımız neoadjuvan tedavi almamış, ER, PR, HER2 ve Ki67 immün boyaları çalışılmış, tümöre ait blok ve H&E boyalı camı mevcut olan hastalardan seçildi. Tümör hücrelerinin en yoğun olduğu ve nekrozun en az olduğu bloklar seçildi. Bu koşulları sağlamayan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Olgulara ait yaş, tümörün histolojik alt tipi ve prognostik değerleri gösteren veriler patoloji raporlarından, hastane otomasyon sisteminden elde edildi.

Çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yerel etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, TIP.20.015 nolu proje kod numarası ile desteklenmiştir.

3.2. Parafin Blok Seçimi

Tüm materyallere ait hematoksilen-eozin (H&E) ve tanıya yönelik yapılmış olan immünohistokimyasal belirteçler ile boyalı preparatlar iki gözlemci (ilgili asistan ve ilgili öğretim üyesi) tarafından tekrar incelendi. H&E boyalı preparatlar ile materyaller DSÖ sınıflamasına göre histolojik alt tiplerine ayrılmıştır. Çalışma için tümör hücrelerinin en yoğun olduğu ve nekrozun en az olduğu bloklar seçilmiştir.

3.3. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Deparafinizasyon İşlemi

Çalışmada IDO1 ve TDO2' ye yönelik immünohistokimyasal belirteçler için, rutin doku takibi işlemleri uygulanan bloklardan mikrotom cihazı (Shandon, ABD) kullanılarak her olgu için adezivli lamlara (Isotherm, Almanya) 5µm kalınlığında ikişer adet kesit alındı. Aynı esnada DNA'dan IDO1 ve TDO2 gen

bölgelerini PCR aracılığıyla çoğaltmak için 1,5ml reaksiyon tüplerine 5µm kalınlığında ikişer adet kesit alındı. PCR çalışmak amacıyla reaksiyon tüplerine kesit alınmadan önce doku bulaşmasını önlemek için mikrotom cihazı ksilen ile temizlendi ve her olgu için mikrotom bıçağı değiştirilerek mikrotom cihazı yeniden silindi.

İmmünohistokimyasal çalışma için kesit alınan lamlar 65°C'lik etüvde 30 dakika bekletilerek deparafinizasyonu yapıldı ve lamlara dokuların yapışması sağlandı.

3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma

3.4.1. İmmünohistokimyada kullanılan belirteçler ve çalışma

protokolü

İmmünohistokimyasal çalışmada IDO1 (EMD Millipore Corporation, ABD, klon 10.1 fare/IgG antikoru, katalog no: 05-840), TDO2 (Novus Biologicals, ABD, poliklonal fare/IgG antikoru, katalog no: H00006999-B01P) kullanıma hazır formda primer antikorlar kullanıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmanın en doğru şekilde değerlendirilmesi için kontrol dokular ile birlikte çalışıldı. IDO1 için tümörsüz apendiks dokusu, TDO2 tümörsüz böbrek üstü bezi dokusu içeren parafin bloklar kontrol bloğu olarak seçildi. Bu kontrol blokları kullanılarak primer antikorların optimum çalışma dilüsyonu ve inkübasyon süresi saptandı (Tablo 5).

Tablo 5: İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar

Antikor	Klon	Sellüler	Dilüsyon	İnkübasyon	Firma
Lokalizasyon					
IDO1	10.1	Sitoplazmik	1/50	60 dk	Millipore
TDO2	Poliklonal	Sitoplazmik	1/150	60 dk	Novusbio

İmmünohistokimyasal çalışma Ventana BenchMark Ultra cihazında (Roche Diagnostics, ABD) otomatik olarak, aşağıda belirtilen sıra ile yapıldı:

IDO1 antikoru için;

- 1) Cihaza yerleştirilen lamalar, 72°C'ye kadar ısıtılarak deparafinizasyon yapıldı.
- 2) 95°C'ye kadar ısıtılarak Ventana Conditioner 1-EDTA solüsyonu (Roche Diagnostics, ABD) ile 76 dakika inkübe edilerek hücre iyileştirmesi yapıldı.
- 3) Antikor inkübasyonu için lamalar 37°C'ye soğutuldu ve 4 dk süre ile inkübe edildi.
- 4) Bu aşamada primer antikor uygun dilüsyonda manuel şekilde lamalara uygulandı. 60 dakika süre ile inkübe edildi.
- 5) Arka plan boyanma için bir damla hematoksilin uygulanıp 16 dk, Bluing belirteci uygulanıp 8 dk süre ile inkübe edildi.

TDO2 antikoruna için;

- 1) Cihaza yerleştirilen lamalar, 72°C'ye kadar ısıtılarak deparafinizasyon yapıldı.
- 2) 95°C'ye kadar ısıtılarak Ventana ULTRA Conditioner 1-EDTA solüsyonu (Roche Diagnostics, ABD) ile 76 dakika inkübe edilerek hücre iyileştirmesi yapıldı.
- 3) Antikor inkübasyonu için lamalar 37°C'ye soğutuldu ve 4 dk süre ile inkübe edildi.
- 4) Bu aşamada primer antikor uygun dilüsyonda el ile lamalara uygulandı. 60 dakika süre ile inkübe edildi.
- 5) Arka plan boyanma için bir damla hematoksilin uygulanıp 16 dk, Bluing belirteci uygulanıp 4 dk boyunca inkübe edildi.

Makineden çıkarılan lamalar deterjanlı su ile zarar verilmeden yıkandı, saf alkolde 5 dakika boyunca bekletildi. Ardından 5 dakika boyunca ksilende bekletildi ve lamel ile kapatıldı.

3.4.2. İmmünohistokimyasal skorlama

İmmünohistokimyasal boyama uygulanan preparatlar ışık mikroskopunda, 2 patolog tarafından semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi. IDO1 ve TDO2 için sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi.

Tüm olgularda pozitif boyanan alanların yüzdesi (yaygınlığı) ve boyanma şiddeti (yoğunluğu) skorlandı ve toplam skor elde edildi. Tümör hücrelerinin %0-

5'inde boyanma skor 0, %6-25'inde boyanma skor 1, %26-50'sinde boyanma skor 2, %51-75'inde boyanma skor 3 ve %76-100'ünde boyanma skor 4 olarak belirlendi[35]. Tümör hücrelerinde boyanma mevcut değilse skor 0, boyanma şiddeti 40x'lık objektifte tespit edildiyse skor 1 (zayıf boyanma), 10-20x'lık objektifte görülüyorsa skor 2 (orta şiddette boyanma), 2-5x'lık objektifte görülüyorsa skor 3 (güçlü boyanma) olarak belirlendi[17]. Toplam skorda boyanma yoksa negatif, 1 ve 2 zayıf pozitif, 3 ve 4 orta şiddette pozitif, 5-7 ise güçlü pozitif olarak kabul edildi [35].

3.5. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve PCR Analizi

3.5.1. RNA izolasyonu

DNA'dan IDO1 ve TDO2 gen bölgelerini PCR aracılığıyla çoğaltmak için RNA izolasyonu işlemi, Roche High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Almanya, Ref no: 06650775001)'i, santrifüj cihazı (Beckman Coulter, Microfuge 16, ABD), vorteks (IKA, Almanya) ve dijital kurutma banyosu (Labnet AccuBlock, ABD) kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde yapıldı:

- 1) Parafin bloklardan 5µm kalınlığında ikişer adet kesit alınan 1,5ml reaksiyon tüplerine 800 µl ksilen eklendi. Daha sonra 5 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 2) 400 µl etanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. 16000 devirde 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 3) 1 ml etanol eklendi, vorteks ile karıştırıldı. 16000 devirde 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 4) Etanol kalıntılarından kurtulmak için tüp kağıt havlu ile kurutuldu. 55°C'de 10 dk doku pelleti kurutuldu.

Bu basamaklar ile deparafinizasyon sağlandı ve RNA izolasyon işlemine geçildi.

- 5) Her doku peletine (yukarıda açıklandığı gibi deparafinize edilmiş), 100 µl RNA Tissue Lysis Buffer, 16 µl% 10 SDS ve 40 µl Proteinaz K çalışma solüsyonu eklendi. 5 saniye vorteks ile karıştırdı, +85°C'de 30 dakika inkübe edildi, Proteinaz K eklemenden önce +55°C'nin altına soğutuldu.

- 6) 80 µl Proteinaz K eklendikten sonra, 5 saniye vorteksle karıştırıldı, 5 saniye santrifüj cihazında döndürüldü, +55°C'de 30 dakika inkübe edildi, 5 saniye santrifüj cihazında döndürüldü bu adımda berrak lizat elde edildi.
- 7) 325 µl Binding Buffer ve 325 µl etanol eklenip, 5 saniye vorteksle karıştırıldı, 5 saniye santrifüj cihazında döndürüldü.
- 8) Lizat pipet ile High Pure filtreli tüp ve toplayıcı tüp kombinasyonuna aktarıldı. 30 sn 6000 devirde santrifüj edildi.
- 9) Filtreli tüp yeni toplayıcı tüpe yerleştirildi, filtre keçesini tamamen kurutmak için 16.000 devirde 2 dakika döndürüldü.
- 10) Filtreli tüp yeni toplayıcı tüpe yerleştirildi, filtreye temas etmeden 100 µl DNase çalışma solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
- 11) 500 µl Wash Buffer I çalışma solüsyonu eklenip 6000 devirde 20 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- 12) 500 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklenip 6000 devirde 20 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- 13) 500 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklenip 6000 devirde 20 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı. 2 dk 16000 devirde santrifüj edilerek filtrenin tamamen kuruması sağlandı.
- 14) High Pure filtreli tüpün altına 1,5 ml reaksiyon tüpü yerleştirildi. 50 µl Elution Buffer eklendi, +15-+25°C'de 1 dk inkübe edildi. 6000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Böylelikle RNA toplanmış oldu. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.5.2. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyon hesaplanması

RNA'dan cDNA sentezine başlamadan önce, spektrofotometre cihazı (BioDrop, µLite, İngiltere) kullanılarak 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı ölçüldü. Saflık oranları 1,8 civarı olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

3.5.3. cDNA sentezi

RNA'dan cDNA sentezinde Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya, Ref no: 04896866001)'i ve termal cycler cihazı (SensoQuest, Almanya) kullanıldı. Aşağıda belirtilen işlemler yapıldı:

- 1) cDNA Master Kiti içerisinde bulunan reaktifler çözündürölüp buz üzerine bırakıldı.
- 2) Her reaktif berrak bir görünüm alana kadar vortekslendi.
- 3) Öncelikle her vaka için spektrofometrede ölçülen RNA 500 ng'ye göre eşitlenerek hesaplandı, diğler reaksiyon bileşenleri de Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterildiğı gibi toplam 20µl olacak şekilde hesaplandı. Buz üzerine yerleştirilen reaksiyon tüplerine reaksiyon bileşenleri bırakıldı.

Tablo 6: cDNA çalışma protokolü 1. kısım

Malzeme	Miktar
Total RNA	A µl (RNA miktarı 500 ng'a eşitlendi)
Anchored-oligo Primer	1 µl
Random Hexamer Primer	1 µl
Su	11-A µl

- 4) Tüpler 65°C'de 10 dk bekletildi.
- 5) 10 dk sonra tüpler buza alındı.
- 6) Tüpler içerisine sırası ile Tablo 7'deki gibi eklendi.

Tablo 7: cDNA çalışma protokolü 2. kısım

Malzeme	Miktar
Transcriptor RT Reaction Buffer 5X	4 µl
Protector RNase Inhibitor	0.5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5 Ml

- 7) Tüpler Termal Cyclor cihazında; +25°C’de 10 dk, +50°C’de 60 dk, +85°C’de 5 dk, +4°C’de sonsuz olacak şekilde bekletildi. İşlem sona erdikten sonra -20°C’de saklandı.

3.5.4. RT-PCR analizi

RT-PCR analizinde Roche LightCycler 480 Probes Master (Roche, Almanya, Ref no: 04707494001) kiti, primer ve probe olarak Molbiol IDO1 (Molbiol, Almanya, Id:), Molbiol TDO2 (Molbiol, Almanya, Id:) ve pozitif kontrol olarak Molbiol β -Actin (Molbiol, Almanya, Id:) kullanıldı. Primerlerde IDO1 ve TDO2 için 4 bölge (F, S, A, R), β -Actin için 2 bölge (F, R) temsil edildi (Tablo 8).

Tablo 8: IDO1 ve TDO2 için primer ve probe dizaynları

Primer	Sekans Bilgisi	Sekans Uzunluğu
IDO1sh F	gTTTTgTTCTCATTTGgTgATgg	23
IDO1sh S	TgTTCTCATTTGgTgATggAgACT	24
IDO1sh A	TTgAATACAgTAaggAATTACTTTgATTgC	29
IDO1sh R	gCGTTgAATACAgTAaggAATTACTTTgA	28
TDO2 F	gAACTCCAaggTTTAgAgCCACA	22
TDO2 S	ggATTTAACCTTCTggggAAAgCT	23
TDO2 A	TTCTCATCAAATAAggACAgTAgCAC	26
TDO2 R	CTTTACTAAggAgATgTTCATgACg	25
Probe	Sekans Bilgisi	Sekans Uzunluğu
IDO1 TM	6FAM-CCACCAATAgAgAgACCaggAAgAATCCTTAC—BBQ	32
TDO2 P	6FAM-CTTCTgAAATTCAgCCACCTgTTCCTC—BBQ	27

PCR karışımı, reaksiyon kuyusu başına 20 μ l nihai hacim olacak şekilde Roche FastStart Essential DNA Probes Master kiti ile aşağıda belirtilen prosedüre göre hazırlandı.

- 1) Primerler 250 μ l, probler 150 μ l su ile sulandırıldı.
- 2) Reaksiyon tüplerine buz üzerinde PCR karışımları hazırlandı. Bileşenler Tablo 9’da gösterilen sırayla eklenerek her reaksiyon kuyusu için 18 μ l

PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 9: LightCycler 480 Probe Master kullanarak her 18 µl reaksiyon için PCR karışımı hazırlama şablonu

Bileşen	Hacim
Su	(7,8-Primer volümü) µl
LightCycler 480 Probe Master	10 µl
Primer Solüsyon	Primer bölge x 0,5 µl
Probe solüsyon	0,2 µl
Toplam Hacim	18 µl

- 3) Yukarı ve aşağı pipetleme yaparak dikkatlice karıştırıldı.
- 4) LightCycler 480 Multiwell Plakasının her bir kuyucuğuna 18 µl PCR karışımı pipetlendi
- 5) Her kuyudaki PCR karışımına 2 µl örnek cDNA pipetlendi
- 6) MultiCell Plakası LightCycler 480 Sızdırmaz Folyo ile kapatıldı
- 7) MultiCell Plakası LightCycler 480 cihazına aktarıldı
- 8) Tablo 10'da tarif edilen PCR protokolü kullanılarak LightCycler 480 Cihazı çalıştırıldı.

Tablo 10: LightCycler 480 Cihazı ile çalışılan PCR protokolü

Tespit biçimi	Blok Tipi	Reaksiyon Volümü
Mono color hydrolysis probes Or Multi color hydrolysis probes	384	3 – 20 µl
Programlar		
Program ismi	Döngüler	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	Yok
Amplifikasyon	45	Niceleme
Soğutma	1	Yok
Sıcaklık Hedefleri		

Hedef (°C)	Edinme Modu	Bekletme (saat:dk:sn)	Pik değeri
Pre-inkübasyon			
95	Yok	00:05:00	4.8
Amplifikasyon			
95	Yok	00:00:10	4.8
Primer bağımlı	Yok	00:00:30 00:00:15	2.5
72	Tek	00:00:01	4.8
Soğutma			
40	Yok	00:00:10	2

Real Time PCR çalışmasından sonra analiz için tüm örneklerin Ct değerleri housekeeping geni olarak kullanılan β -Actin'e fold change 'kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)' yöntemiyle Microsoft Excel 2010 Bilgisayar programı aracılığıyla oranlanarak yaklaşık kat değişimi bulundu [36].

3.6. İstatiksel Yöntem

Araştırma verilerimizin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS 21.0 for windows istatistik paket programı kullanıldı. Ölçümsel değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) ile, kategorik değişkenler sayı ile sunuldu. İki'den fazla grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Testi ile Friedman Testi kullanıldı. Nitel değişkenlerin karşılaştırılmasında Chi-kare (χ^2) testi ve Mc-Nemar testi kullanıldı. Hipotezler çift yönlü alınacak, $p \leq 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Çalışmamıza Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD.'na Ocak 2010-Aralık 2019 tarihleri arasında gönderilen 88 olgu değerlendirildi. Çalışmamızdaki hastaların prognostik parametreleri, immünohistokimyasal boyanma özellikleri ve moleküler analiz sonuçları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: Prognostik parametreler, immünohistokimyasal ve moleküler analiz sonuçları

		Sayı	%
Histolojik Alt Tip	Duktal	32	36,5
	Lobüler	5	5,7
	Mikropapiller	7	7,9
	Tübüler	5	5,7
	Sekretuar karsinom	1	1,1
	Apokrin	6	6,8
	Medüller özellikli	4	4,6
	Tübülolobüler	7	7,9
	Papiller	3	3,4
	Kribriform	3	3,4
	Metaplastik	1	1,1
	Meme dokusu	14	15,9
Metastaz	Yok	31	41,9
	Var	43	58,1

IDO1 İHK	Negatif	44	50
	Zayıf pozitif	3	3,4
	Orta şidd. Pozitif	12	13,7
	Güçlü pozitif	29	32,9
TDO2 İHK	Orta şidd. Pozitif	13	14,8
	Güçlü pozitif	75	85,2
IDO1 Gen Eks.	Negatif	47	53,4
	Pozitif	41	46,6
TDO2 Gen Eks.	Negatif	83	94,3
	Pozitif	5	5,7
Yaş	Ortalama ± SS	51,21 ± 13,42	

4.1.1. Histolojik alt tip

Olgular DSÖ sınıflamasına göre 32'si infiltratif duktal karsinom, 7'si infiltratif lobüler karsinom, 5'i invaziv mikropapiller karsinom, 5'i invazi tübüler karsinom, 6'sı apokrin karsinom, 1'i sekretuar karsinom, 4'ü medüller özellikli infiltratif duktal karsinom, 7'si tübülobüler karsinom, 3'ü invaziv papiller karsinom, 3'ü invaziv kribriform karsinom, 1'i metaplastik karsinom ve 14'ü benign meme dokusu olarak değerlendirildi.

4.1.2. Yaş

Olguların en genci 21, en yaşlısı 86 yaşında olup yaş ortalaması 51±13,42 olarak değerlendirildi. Yaşa göre IDO1 gen ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,035, Tablo 12).

Yaşa göre TDO2' nin immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonları arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Tablo 12: Yaş ile IDO1 gen ekspresyonunun karşılaştırılması

YAŞ - PCR İDO1			
	Negatif	Pozitif	Total
≤ 50 yaş	30	16	46
> 50 yaş	17	25	42
Total	47	41	88

4.1.3. Metastaz durumu

Çalışmamızda 74 olgumuzun 41’inde bölgesel lenf nodu, 2’sinde uzak metastaz mevcut olup bu iki grup ‘metastatik grup’ olarak kabul edildi. 31 olguda ise metastaz mevcut değildi.

Metastatik olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 18’i negatif, 2’si zayıf pozitif, 7’si orta şiddette pozitif, 16’sı güçlü pozitif izlendi. Metastatik olmayan olgularda ise 14’ü negatif, 1’i zayıf pozitif, 4’ü orta şiddette pozitif, 12’si güçlü pozitif izlendi(p=0,963, Tablo 13). Metastatik olgularda IDO1 gen ekspresyonu incelendiğinde 21’i negatif, 22’si pozitif izlendi. Metastatik olmayan olgularda ise 12’si negatif, 19’u pozitif izlendi(p=0,530). Metastaz durumuna göre IDO1 immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonunda anlamlı ilişki izlenmedi.

Tablo 13: Metastaz durumu ile immünohistokimyasal olarak IDO1’in değerlendirilmesi

METASTAZ - İHK IDO1					
	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
Yok	14	1	4	12	31
Var	18	2	7	16	43
Total	32	3	11	28	74

Metastatik olgularda TDO2 immünreaktivitesi incelendiğinde 7'si orta şiddette pozitif, 36'sı güçlü pozitif izlendi. Metastatik olmayan olgularda ise 3'ü orta şiddette pozitif, 28'i güçlü pozitif izlendi. Metastatik olgularda TDO2 gen ekspresyonu incelendiğinde 41'i negatif, 2'si pozitif izlendi. Metastatik olmayan olgularda 28'i negatif, 3'ü pozitif izlendi. Metastaz durumuna göre TDO2 immünohistokimyasal (p=0,412, Tablo 14) ve moleküler (p=0,644) ekspresyonunda anlamlı ilişki izlenmedi.

Tablo 14: Metastaz durumu ile immünohistokimyasal olarak TDO2'in değerlendirilmesi

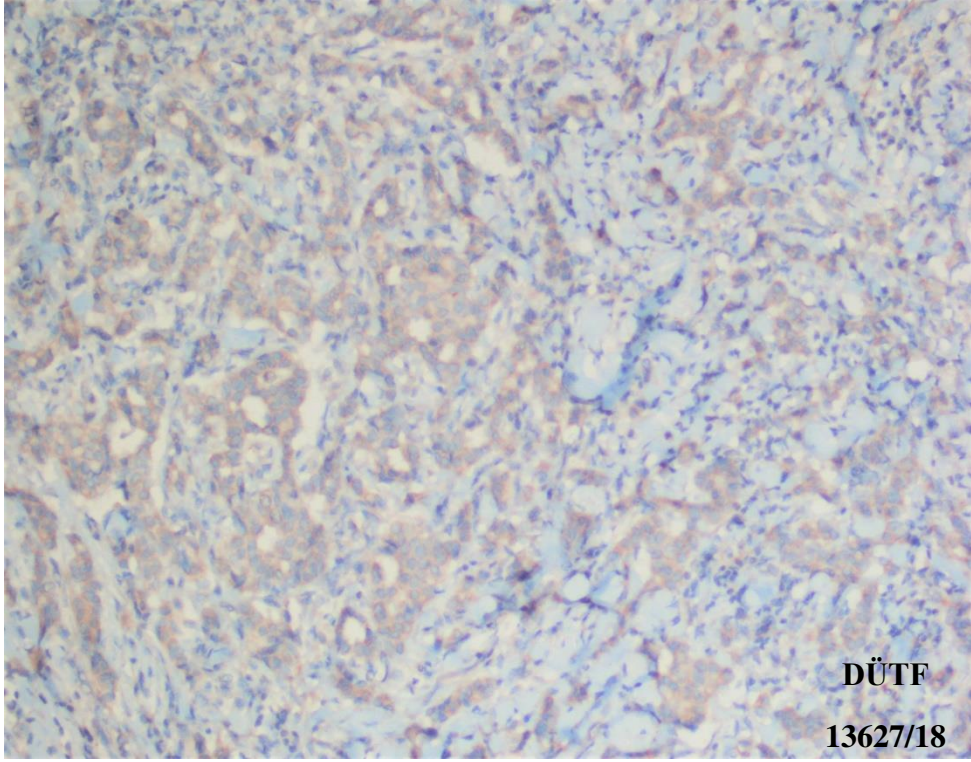
METASTAZ - İHK TDO2			
	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
Yok	3	28	31
Var	7	36	43
Total	10	64	74

Metastaz durumu ve çalışmamızda yer alan histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

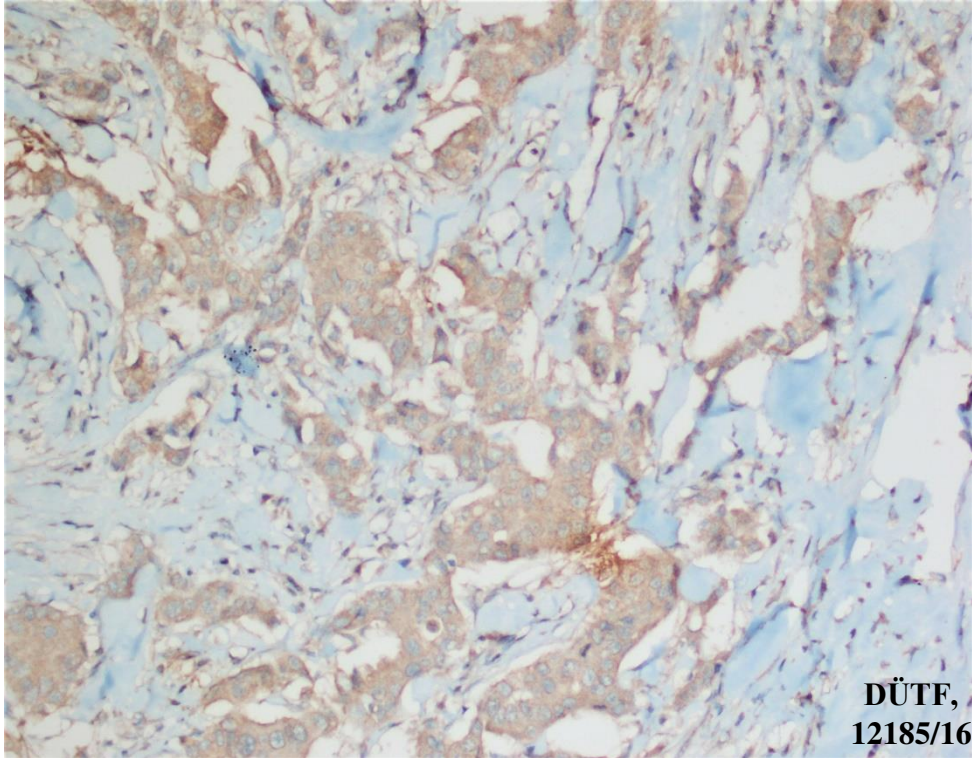
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. IDO1 ekspresyonu

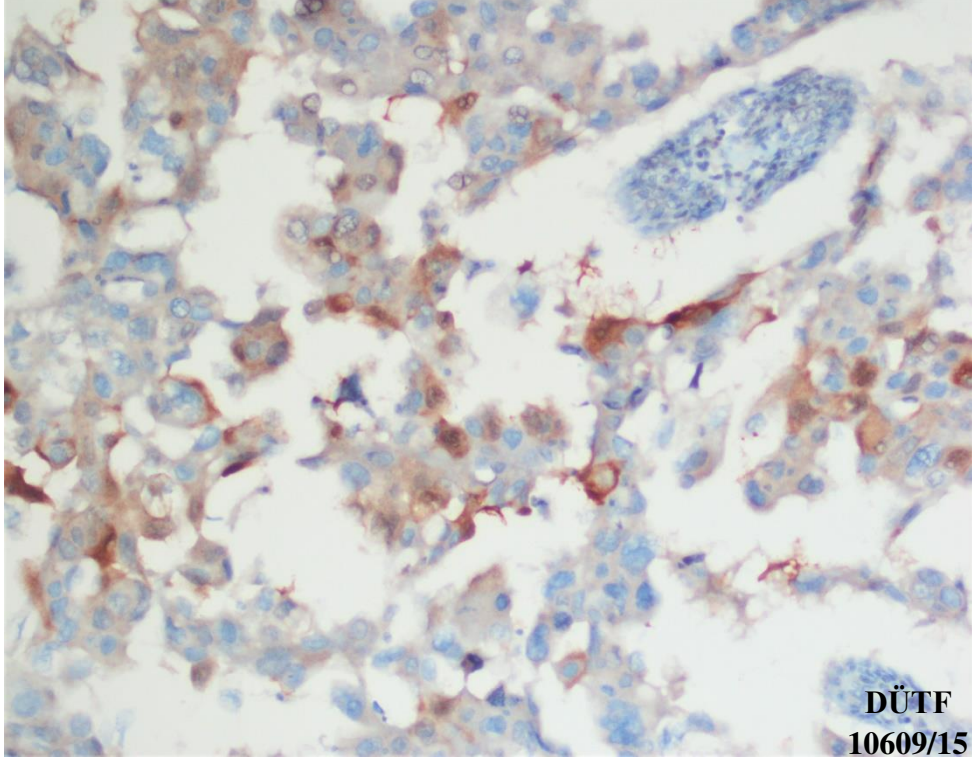
Olgularımızda IDO1 ekspresyonu incelendiğinde 88 olgunun, 3'ü zayıf (%3,4), 12'si orta şiddette (%13,6), 29'u güçlü (%33) olmak üzere toplam 44'ü pozitif (%50), 44'ü negatif (%50) izlendi (Şekil 9, 10, 11).



Şekil 9: İnfiltratif Duktal Karsinom, Grade2. Zayıf sitoplazmik IDO1 pozitifliği (İmmünperoksidaz; X200)



Şekil 10: İnfiltratif Duktal Karsinom Grade3. Orta şiddette sitoplazmik IDO1 pozitifliği (İmmunperoksidaz; X200)



Şekil 11: İnfiltratif Duktal Karsinom Grade3. Güçlü sitoplazmik IDO1 pozitifliği (İmmunperoksidaz; X200)

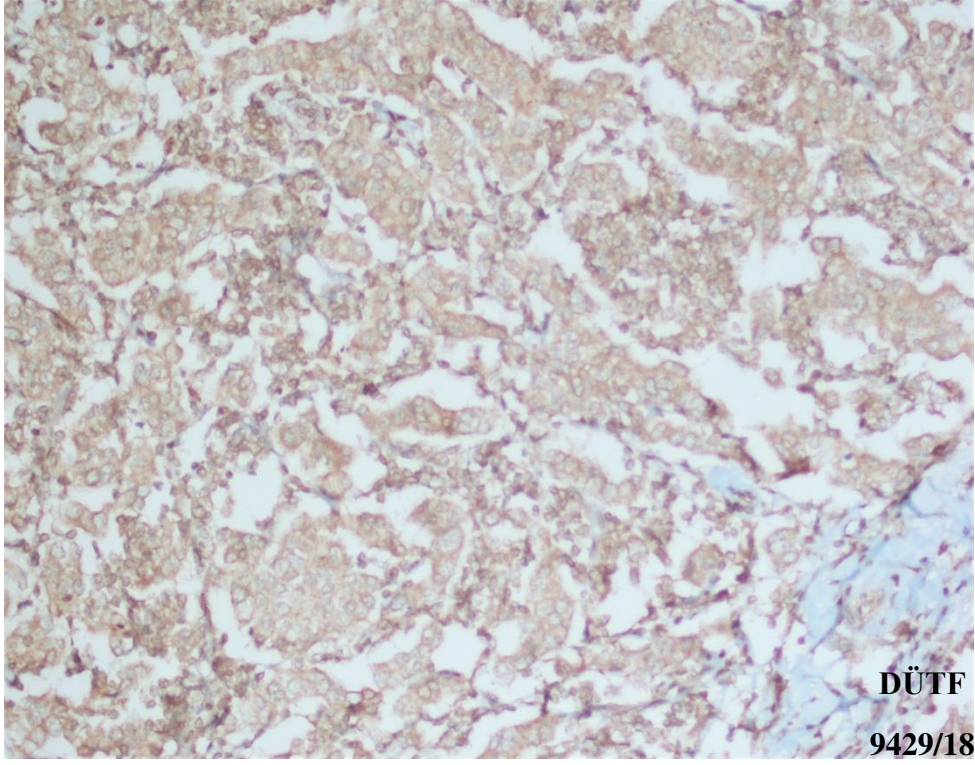
IDO1 pozitif izlenen 44 olgunun 42'si tümöral olgular olup, immünreaktivite skoru ve histolojik alt tipler arasında istatistiksel ilişki bulundu($p=0,005$, Tablo 15).

Tablo 15: Histolojik alt tipler ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

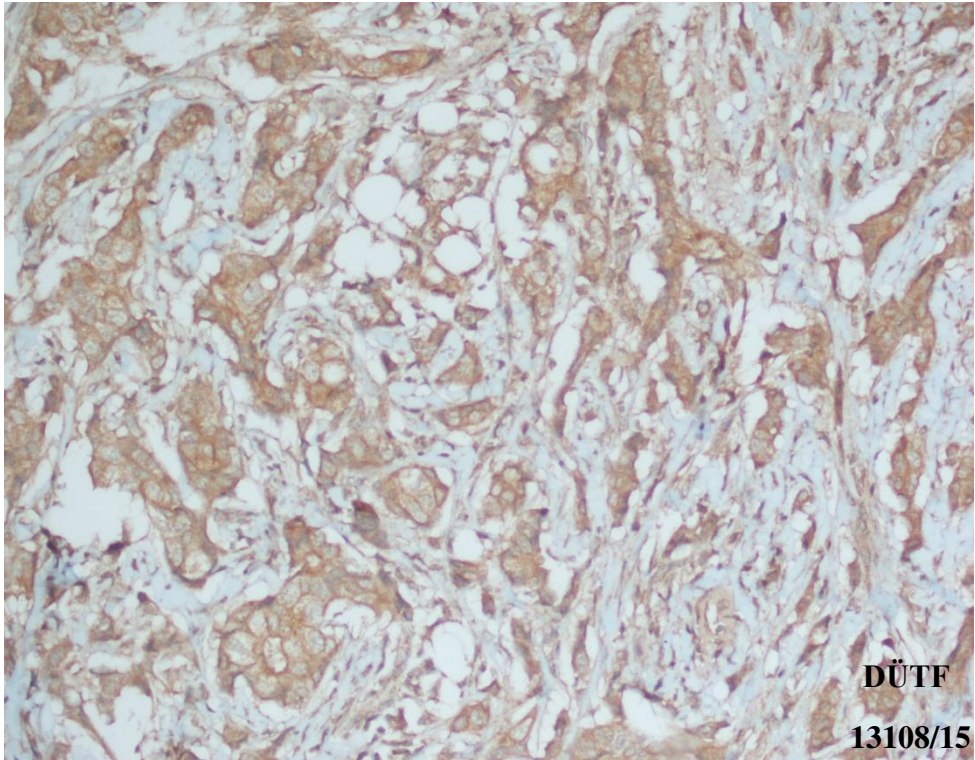
Histolojik Alt Tip	IDO1 İmmünreaktivite				Total
	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	
İnfiltratif duktal	11	0	6	15	32
Mikropapiller	3	0	0	2	5
Lobüler	5	0	0	2	7
Tübüler	2	2	0	1	5
Sekretuar	1	0	0	0	1
Apokrin	4	0	1	1	6
Medüller öz. Dk	3	0	0	1	4
Tübülobüler	0	1	2	4	7
Papiller	1	0	2	0	3
Kribriform	1	0	0	2	3
Metaplastik	1	0	0	0	1
Meme dokusu	12	0	1	1	14
Total	44	3	12	29	88

4.2.2. TDO2 ekspresyonu

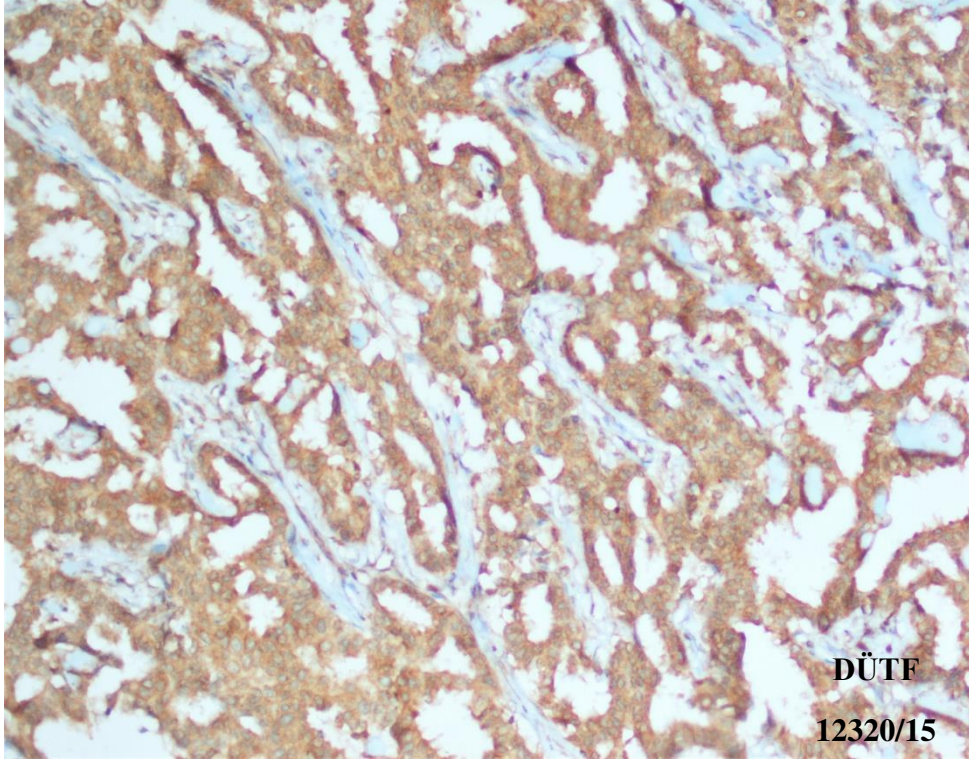
Olgularımızda TDO2 ekspresyonu incelendiğinde 88 olgunun 13'ü orta şiddette (%14,8), 75'i (%85,2) güçlü pozitif izlendi. Tüm olgularda TDO2 immünreaktivitesi mevcut olup negatif boyanma gösteren olgu izlenmedi. TDO2 immünreaktivitesi ile histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak bir ilişki izlenmedi ($p=0,815$, Şekil 12,13,14).



Şekil 12: İnfiltratif Duktal Karsinom Grade3, zayıf sitoplazmik TDO2 pozitifliği (İmmunperoksidaz; X200)



Şekil 13: İnfiltratif Duktal Karsinom Grade3, orta şiddette sitoplazmik TDO2 pozitifliği (İmmunperoksidaz; X200)



Şekil 14: Tübüler Karsinom, güçlü sitoplazmik TDO2 pozitifliği (İmmunperoksidaz; X200)

Tablo 16: Histolojik alt tipler ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

TÜR - İHK TDO2			
Histolojik Alt Tip	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
İnfiltratif Duktal	6	26	32
Mikropapiller	1	4	5
Lobüler	0	7	7
Tübüler	0	5	5
Sekretuar	0	1	1

Apokrin	2	4	6
Medüller öz. Dk	0	4	4
Tübülolobüler	1	6	7
Papiller	0	3	3
Kribriform	0	3	3
Metaplastik	0	1	1
Meme dokusu	3	11	14
Total	1	75	88

4.2.3. İmmünohistokimyasal IDO1 ve TDO2 korelasyonu

İstatistiksel olarak IDO1 ve TDO2 immünohistokimyasal ekspresyonları arasında ilişki bulunmadı ($p=0,34$). İmmünohistokimyasal IDO1 ve TDO2 ekspresyonları arasındaki ilişki Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17: İmmünohistokimyasal olarak IDO1 ve TDO2’nin değerlendirilmesi

İHK IDO1					
İHK TDO2	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Total
Orta şiddette pozitif	8	0	3	2	13
Güçlü pozitif	36	3	9	27	75
Total	44	3	12	29	88

4.3. Gen Ekspresyon Bulguları

Olgulara ait 88 örnek, Roche Cobas Z 480 cihazında RT-PCR çalışıldı ve LightCycler 480 Sistemi ile analiz edildi.

Olguların parafine gömülü dokularından ilk olarak RNA izole edildi. Olgulara ait RNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçülen konsantrasyon değerleri Tablo 18’de verilmiştir. Daha sonra bu değerler cDNA elde etmede referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 18: Olgulara ait RNA konsantrasyon değerleri

Hasta No	RNA Konsantrasyonu (µg/µl)	Hasta No	RNA Konsantrasyonu (µg/µl)
1.	69,27	45.	32,5
2.	136,8	46.	111
3.	146,7	47.	143,1
4.	44,2	48.	29,46
5.	129,6	49.	44,5
6.	174,2	50.	69,05
7.	213,5	51.	46,1
8.	80,69	52.	161,1
9.	113	53.	158,5
10.	167,6	54.	152,7
11.	146,4	55.	81,26
12.	124	56.	52,27
13.	53,5	57.	87,44
14.	168,3	58.	103,8
15.	147	59.	278,4
16.	119	60.	359,8
17.	76,25	61.	92,44
18.	98,46	62.	37,84
19.	182	63.	32,24
20.	247	64.	98,05
21.	69,47	65.	32,49
22.	134	66.	121,5
23.	307,4	67.	25,80

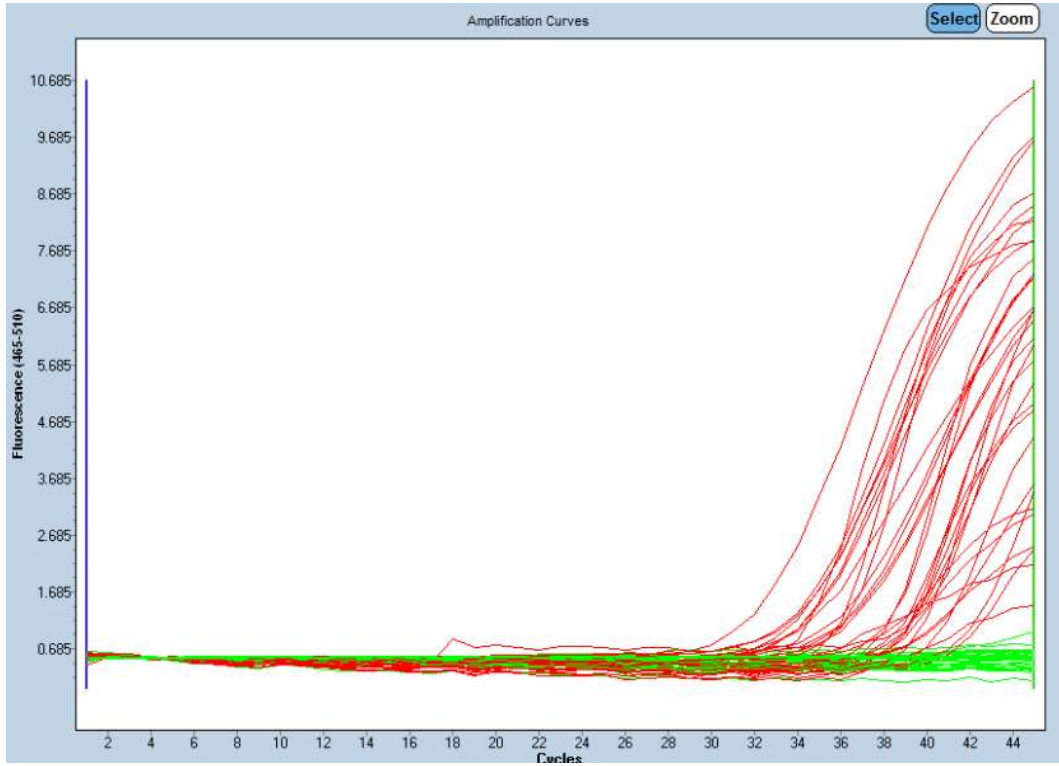
24.	259	68.	157,4
25.	32,8	69.	150,5
26.	69,29	70.	46,60
27.	125	71.	65,67
28.	56	72.	54,62
29.	82	73.	40
30.	107,5	74.	115,4
31.	108,5	75.	17,43
32.	51,72	76.	16,87
33.	120	77.	27,87
34.	141	78.	24,95
35.	73,6	79.	20,43
36.	130,8	80.	15,53
37.	40,7	81.	15,86
38.	117,6	82.	21,90
39.	114,3	83.	48,28
40.	42,66	84.	31,45
41.	107,1	85.	42,92
42.	64,54	86.	27,90
43.	43	87.	18,83
44.	65,9	88.	27,56

Olgulardan RNA izole edilmesini takiben cDNA elde edilerek RT-PCR analizleri yapıldı. Her olgu için β -Actin ile kıyaslanıp ‘kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)’ formülünün uygulanmasında kullanılan C_t değerleri Tablo 19’da yer almaktadır. 1-15 numaralı olgulara ait ısıma eğrileri Şekil 15’te gösterilmiştir.

Tablo 19: PCR çalışması sonucu olgulara ait C_t değerleri

Hasta No	Aktin	IDO1	TDO2	Hasta No	Aktin	IDO1	TDO2
1.	34,91	---	---	45.	34,17	37,79	---
2.	35,21	37,57	---	46.	30,75	35,37	40,27
3.	33,62	38,94	---	47.	35,26	---	---

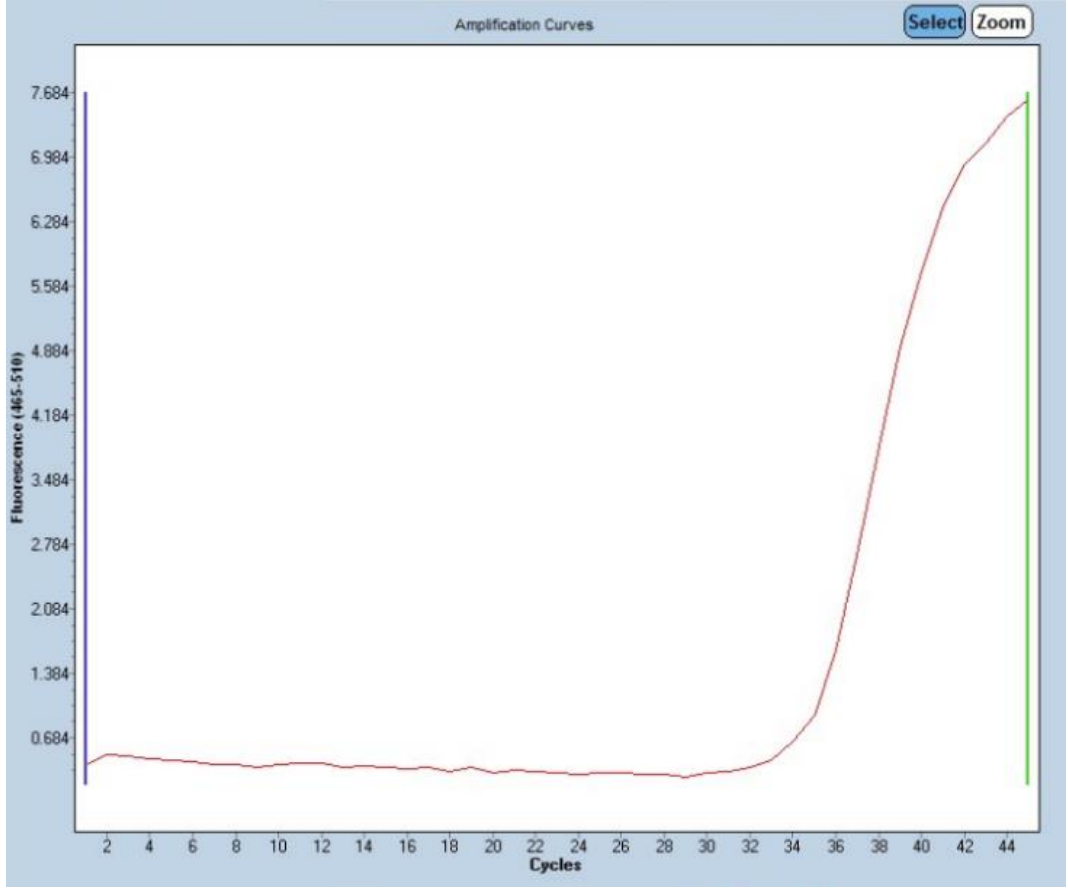
4.	31,79	39,28	42,52	48.	41,85	9,8	---
5.	30,27	36,1	39,69	49.	29,91	37,69	---
6.	34,34	36,93	---	50.	27,9	33,5	---
7.	30,74	38,24	---	51.	38,56	38,75	---
8.	31,62	34,98	---	52.	30,15	36,28	39,43
9.	38,77	35,26	---	53.	35,93	39,74	---
10.	34,36	---	---	54.	27,55	32,45	34,63
11.	33,1	34,62	34,89	55.	30,61	37,09	---
12.	36,74	38,83	---	56.	28,86	36,99	38,73
13.	38,5	40,01	---	57.	35,15	36,61	---
14.	31,3	35,49	---	58.	32,09	31,01	39,98
15.	30,33	33,82	38,63	59.	29,3	32,79	37,61
16.	34,78	38,64	---	60.	33,57	36,33	---
17.	35,45	41,8	---	61.	32,36	37,19	38,73
18.	33,35	39,29	41,49	62.	35,65	---	---
19.	32,25	35,48	40,88	63.	35,18	36,82	---
20.	32,42	35,5	39,43	64.	28,73	39,75	---
21.	34,32	37,84	---	65.	31,41	36,41	---
22.	33,44	38,87	---	66.	25,41	32,33	37,9
23.	35,25	38,44	---	67.	33,97	---	---
24.	39,6	38,77	---	68.	29,08	37,9	42
25.	38,62	---	---	69.	31,22	34,57	38,7
26.	38,62	38,01	---	70.	27,49	34,2	38,12
27.	37,56	---	---	71.	30,6	36,23	---
28.	32,42	34,16	---	72.	30,8	36,93	40
29.	31,81	35,54	39,2	73.	31,87	36,13	---
30.	35,05	35,93	---	74.	32,33	33,57	38,55
31.	35,27	37,58	---	75.	33,76	---	---
32.	36,53	37,97	---	76.	29,71	37,76	40,14
33.	30,5	35,5	---	77.	32,44	---	---
34.	31,25	37,06	34,24	78.	30,71	---	---
35.	31,06	39,18	---	79.	30,99	---	---
36.	33,32	37,61	42,99	80.	31,8	---	---
37.	33,97	38,1	---	81.	31,93	---	---
38.	28,27	36,39	---	82.	30,44	---	---
39.	34,25	37,73	---	83.	38,51	---	---
40.	35,49	---	---	84.	31,9	38,97	---
41.	28,11	35,26	---	85.	39,24	---	---
42.	33,22	38,34	---	86.	34,1	---	---
43.	36,65	40,12	---	87.	30,98	---	---
44.	27,26	37	---	88.	35,19	---	---



Şekil 15: 1-15 numaralı olgulara ait IDO1 ve TDO2 gen bölgeleri ışıma eğrileri. Kırmızı renkte pik yapan eğriler ekspresyon gösteren olguları, yeşil renkte eğriler negatif olguları temsil etmektedir.

4.3.1. IDO1 gen ekspresyonu

PCR ile elde edilen IDO1 gen bölgesine ait ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 88 olgunun 41'inde (%46,59) gen ekspresyonu saptandı. 11 numaralı olguya ait IDO1 gen ışıma eğrisi Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16: 11 numaralı olguya ait IDO1 gen bölgesi ışıma eğrisi.

IDO1 gen ekspresyonu anlamlı düzeyde ölçülen 41 olgudan 19'u infiltratif duktal karsinom, 3'ü mikropapiller karsinom, 1'i lobüler karsinom, 2'si tübüler karsinom, 1'i sekretuar karsinom, 3'ü apokrin karsinom, 4'ü medüller özellikli duktal karsinom, 3'ü tübüler karsinom, 1'i invaziv papiller karsinom, 3'ü kribriform karsinom, 1'i metaplastik karsinom tanılı iken, normal meme dokusu içeren mamoplasti olgularında IDO1 gen ekspresyonu izlenmemiştir.

Histolojik alt tipler ile IDO1 gen ekspresyonu arasında Ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,003$, Tablo 20). Ayrıca IDO1 mmünohistokimyasal ekspresyonu ve IDO1 gen ekspresyonu arasındaki ilişki anlamlı izlenmiştir ($p=0,009$, Tablo 21).

Tablo 20: IDO1 gen ekspresyonu ile histolojik alt tiplerin değeriendirilmesi

PCR IDO1			
Histolojik Alt Tip	Negatif	Pozitif	Total
İnfiltratif Duktal	13	19	32
Mikropapiller	2	3	5
Lobüler	6	1	7
Tübüler	3	2	5
Sekretuar	0	1	1
Apokrin	3	3	6
Medüller öz. dk	0	4	4
Tübülobüler	4	3	7
Papiller	2	1	3
Kribriform	0	3	3
Metaplastik	0	1	1
Meme dokusu	14	0	14
Total	47	41	88

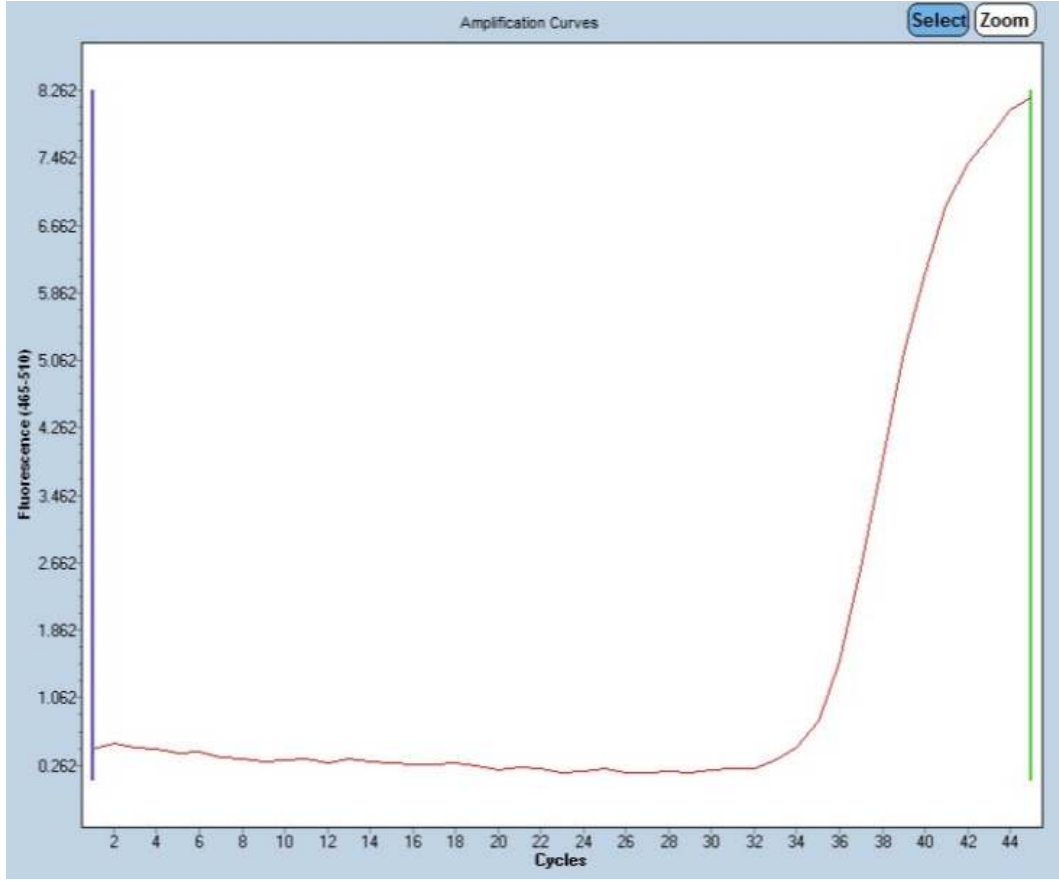
Tablo 21: RT-PCR IDO1 ile immünohistokimyasal IDO1 ekspresyonunun değerlendirilmesi

İHK IDO1					
PCR IDO1	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Total
Negatif	29	2	8	8	47
Pozitif	15	1	4	21	41
Total	44	3	12	29	88

4.3.2. TDO2 gen ekspresyonu

PCR ile elde edilen TDO2 gen bölgesine ait ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 88 olgunun 5'inde (%5,68) gen ekspresyonu saptandı. 11 numaralı olguya ait TDO2 gen ışıma eğrisi Şekil 17'de gösterilmiştir.

TDO2 gen ekspresyonu anlamlı düzeyde ölçülen 5 olgu infiltratif duktal karsinom, mikropapiller karsinom, apokrin karsinom, tübülolobüler karsinom ve metaplastik karsinom tanısı alan birer vakadan oluşmaktadır. TDO2 gen ekspresyonu ile histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur($p=0,015$, Tablo 22). Ancak immünohistokimyasal TDO2 ekspresyonu ve moleküler TDO2 ekspresyonu arasında anlamlılık izlenmemiştir ($p=0,559$).



Şekil 17: 11 numaralı olguya ait TDO2 gen bölgesi ışıma eğrisi.

Tablo 22: Moleküler TDO2 ekspresyonu ile histolojik alt tiplerin değerlendirilmesi

MOLEKÜLER TDO2			
Histolojik Alt Tip	Negatif	Pozitif	Total
İnfiltratif Duktal	31	1	32
Mikropapiller	4	1	5
Lobüler	7	0	7
Tübüler	5	0	5
Sekretuar	1	0	1
Apokrin	5	1	6

Medüller öz. dk	4	0	4
Tübülolobüler	6	1	7
Papiller	3	0	3
Kribriform	3	0	3
Metaplastik	0	1	1
Meme dokusu	14	0	14
Total	83	5	88

4.3.3. Real-Time PCR ile IDO1 ve TDO2 gen ekspresyonu korelasyonu

Olguların 47'si IDO1 ve TDO2 ekspresyonu göstermezken, 36'sı IDO1 için anlamlı olup TDO2 ekspresyonu izlenmemiştir. TDO2 ekspresyonu gösteren 5 vaka aynı zamanda IDO1 ekspresyonu da göstermiştir. IDO1 ve TDO2 gen ekspresyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı izlenmiştir. (p=0,019, Tablo 23)

Tablo 23: TDO2 ve IDO1 gen ekspresyonu karşılaştırılması

PCR TDO2 - PCR IDO1			
	Negatif	Pozitif	Total
Negatif	47	36	83
Pozitif	0	5	5
Total	47	41	88

4.4. Hormon Reseptörleri

4.4.1. ER durumu

ER durumuna göre 19 ER negatif, 55 ER pozitif tümörlü olgumuz izlendi. ER negatif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 7'si güçlü pozitif,

2'si orta şiddette pozitif, 1'i zayıf pozitif, 9'u negatif olarak izlendi. ER pozitif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 21'i güçlü pozitif, 9'u orta şiddette pozitif, 2'si zayıf pozitif, 23'ü negatif olarak izlendi. ER durumu ile IDO1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmadı(p: 0,914, Tablo 24).

Tablo 24: ER ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

İHK IDO1					
	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
ER negatif	9	1	2	7	19
ER pozitif	23	2	9	21	55
Total	32	3	11	28	74

ER negatif olgularda IDO1 gen ekspresyonu incelendiğinde 14'ü pozitif, 5'i negatif olarak izlendi. ER pozitif olgularda 27'si pozitif, 28'i negatif olarak izlendi. ER durumu ile IDO1 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı(p=0,111, Tablo 25).

Tablo 25: ER durumu ile IDO1 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi

PCR IDO1			
	Negatif	Pozitif	Total
ER negatif	5	14	19
ER pozitif	28	27	55
Total	33	41	74

TDO2 immünreaktivitesi incelendiğinde ER negatif olguların 18'i güçlü pozitif, 1'i orta şiddette pozitif, ER pozitif olguların 46'sı güçlü pozitif, 9'u orta şiddette pozitif olarak izlendi. ER durumu ile TDO2 immünreaktivitesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,222$).

TDO2 gen ekspresyonu incelendiğinde ER negatif olguların 3'ü pozitif, 16'sı negatif, ER pozitif olguların 2'si pozitif, 53'ü negatif olarak izlendi. ER durumu ile TDO2 gen ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,103$).

4.4.2. PR durumu

PR durumuna göre 24 PR negatif, 50 PR pozitif olgumuz izlendi. PR negatif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 10'u güçlü pozitif, 4'ü orta şiddette pozitif, 1'i zayıf pozitif, 9'u negatif izlendi. PR pozitif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 18'i güçlü pozitif, 7'si orta şiddette pozitif, 2'si zayıf pozitif, 23'ü negatif izlendi ($p=0,922$, Tablo 26).

PR negatif olgularda IDO1 gen ekspresyonu incelendiğinde 17'si pozitif, 7'si negatif izlendi. PR pozitif olgularda IDO1 gen ekspresyonu incelendiğinde 24'ü pozitif, 26'sı negatif izlendi. PR durumu ile IDO1 gen ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmadı($p=0,110$).

PR negatif olgularda TDO2 immünreaktivitesi incelendiğinde 21'i güçlü pozitif, 3'ü orta şiddette pozitif izlendi. PR pozitif olgularda 43'ü güçlü pozitif, 7'si orta şiddette pozitif izlendi ($p=0,860$, Tablo 27).

PR negatif olgularda TDO2 gen ekspresyonu incelendiğinde 3'ü pozitif, 21'i negatif izlendi. PR pozitif olgularda 2'si pozitif, 48'i negatif izlendi. PR durumu ile TDO2 gen ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmadı($p=0,321$).

Tablo 26: PR ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

İHK IDO1					
	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Total
PR negatif	9	1	4	10	24
PR pozitif	23	2	7	18	50
Total	32	3	11	28	74

Tablo 27: PR durumu ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

İHK TDO2			
	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
PR negatif	3	21	24
PR pozitif	7	43	50
Total	10	64	74

4.4.3. HER2 durumu

HER2 durumuna göre 54 HER2 negatif, 20 HER2 pozitif olgumuz izlendi. HER2 negatif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 20'si güçlü pozitif, 6'sı orta şiddette pozitif, 2'si zayıf pozitif, 26'sı negatif izlendi. HER2 pozitif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 8'i güçlü pozitif, 5'i orta şiddette pozitif, 1'i zayıf pozitif, 6'sı negatif izlendi. HER2 durumu ile IDO1 immünreaktivitesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,376$, Tablo 28).

HER2 negatif olgularda IDO1 gen ekspresyonu incelendiğinde 28'i pozitif, 26'sı negatif izlendi. HER2 pozitif olgularda 13'ü pozitif 7'si negatif izlendi. HER2 durumu ile IDO1 gen ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,455$).

HER2 negatif olgularda TDO2 immünreaktivitesi incelendiğinde 47’si güçlü pozitif, 7’si orta şiddette pozitif izlendi. HER pozitif olgularda 17’si güçlü pozitif, 3’ü orta şiddette pozitif izlendi. HER2 durumu ile TDO2 immünreaktivitesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,820$, Tablo 29).

HER2 negatif olgularda TDO2 gen ekspresyonu incelendiğinde 3’ü pozitif, 51’i negatif izlendi. HER2 pozitif olgularda 2’si pozitif, 18’i negatif izlendi. HER2 durumu ile TDO2 gen ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0,607$).

Tablo 28: HER2 ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

İHK IDO1					
	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
HER2 negatif	26	2	6	20	54
HER2 pozitif	6	1	5	8	20
Total	32	3	11	28	74

Tablo 29: HER2 ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

HER2 - TDO2			
	Orta şidd. Pozitif	Güçlü pozitif	Total
HER2 negatif	7	47	54
HER2 pozitif	3	17	20
Total	10	64	74

4.4.4. Moleküler sınıflama

Olgularımızın immünohistokimyasal belirteçler ile moleküler sınıflaması yapıldığında 74 hastanın 19’u lüminal A, 37’si lüminal B, 9’u HER2 pozitif, 9’u

triple negatif izlendi. Lüminal A olgularında IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 8'i negatif, 3'ü orta şiddette pozitif, 8'i güçlü pozitif izlendi. Lüminal B olgularında IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 16'sı negatif, 2'si zayıf pozitif, 6'sı orta şiddette pozitif, 13'ü güçlü pozitif izlendi. HER2 pozitif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 2'si negatif, 1'i zayıf pozitif, 2'si orta şiddette pozitif, 4'ü güçlü pozitif izlendi. Triple negatif olgularda IDO1 immünreaktivitesi incelendiğinde 6'sı negatif, 3'ü güçlü pozitif izlendi (p=0,688, Tablo 30).

Tablo 30: Moleküler sınıf ile IDO1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

MOLEKÜLER SINIFLAMA- IHK IDO1					
	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Total
Lüminal A	8	0	3	8	19
Lüminal B	16	2	6	13	37
HER2 pozitif	2	1	2	4	9
Triple negatif	6	0	0	3	9
Total	32	3	11	28	74

IDO1 gen ekspresyonu lüminal A olgularında incelendiğinde 12'si negatif, 7'si pozitif izlendi. Lüminal B olgularında incelendiğinde 17'si negatif, 20'si pozitif izlendi. HER2 pozitif olgularda 3'ü negatif, 6'sı pozitif, triple negatif olgularda ise 1'i negatif, 8'i pozitif izlendi. Moleküler sınıflama ile IDO1 gen ekspresyonu arasında uygulanan Ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı(p=0,065). Ancak HER2 pozitif (%66) ve triple negatif (%88) olgularda lüminal A ve lüminal B olgulara kıyasla IDO1 pozitifliğinde belirgin artış izlendi (Tablo 31).

Tablo 31: Moleküler sınıf ile IDO1 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi

MOLEKÜLER SINIFLAMA - PCR IDO1			
	Negatif	Pozitif	Total
Lüminal A	12	7	19
Lüminal B	17	20	37
HER2 pozitif	3	6	9
Triple negatif	1	8	9
Total	33	41	74

TDO2 immünreaktivitesi lüminal A olgularında incelendiğinde 3'ü orta şiddette pozitif, 16'sı güçlü pozitif izlendi. Lüminal B olgularında incelendiğinde 6'sı orta şiddette pozitif, 31'i güçlü pozitif izlendi. HER2 pozitif olgularda 1'i orta şiddette pozitif, 8'i güçlü pozitif, triple negatif olgularda ise 9'u güçlü pozitif izlendi (p=0,622, Tablo 32).

Tablo 32: Moleküler sınıf ile TDO2 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

MOLEKÜLER SINIFLAMA - İHK TDO2			
	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Total
Lüminal A	3	16	19
Lüminal B	6	31	37
HER2 pozitif	1	8	9
Triple negatif	0	9	9
Total	10	64	74

TDO2 gen ekspresyonu lüminal A olgularında incelendiğinde 19'u da negatif izlendi. Lüminal B olgularında incelendiğinde 35'i negatif, 2'si pozitif

izlendi. HER2 pozitif olgularda 8'i negatif, 1'i pozitif izlendi. Triple negatif olgularda ise 7'si negatif, 2'si pozitif izlendi. (p=0,160, Tablo 33).

Tablo 33: Moleküler sınıf ile TDO2 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi

MOLEKÜLER SINIFLAMA - PCR TDO2			
	Negatif	Pozitif	Total
Lüminal A	19	0	19
Lüminal B	35	2	37
HER2 pozitif	8	1	9
Triple negatif	7	2	9
Total	69	5	74

5. TARTIŞMA

Meme kanserinin tanı ve tedavisi gelişmiş olsa da, tümör progresyonunu etkili bir şekilde kontrol etmek hala bir sorundur. Cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi geleneksel tedavileri takiben kanser immünoterapisi, kanser hastalarında umut verici sonuçlar göstermiştir[3].

Triptofan katabolizmasının, immün kaçıışı ve tümör kaynaklı immün baskılamayı destekleyerek tümör ilerlemesinde etkili olduğu bilinmektedir[37]. IDO1 ve TDO2 olarak bilinen indüklenabilir enzimler, triptofan katabolizmasına katılır ve kynurenin gibi çeşitli biyolojik olarak aktif immünosupresif metabolitler oluşturur[30, 38]. IDO1, astrositler, makrofajlar, dendritik hücreler, epididimis, timus, akciğer ve tümör hücreleri dahil birçok hücrede eksprese edilebilir[4, 39]. İnsan vücudunda, karaciğerde yüksek TDO düzeyi gösterilmiştir. TDO, hepatik Trp metabolizmasının %95'i kadarında rol oynar. Ayrıca TDO, uyarıldıktan sonra böbrek, deri ve plasenta, gebe uterusu, epididim, testis ve beyin dahil diğer dokularda tespit edilebilir[4].

IDO eksprese eden hücrelerin, tümör kaynaklı antijenlere karşı bir immünolojik tepkisizlik durumu yarattığı düşünülmektedir. İmmün sistemden kaçış mekanizmalarının bir parçası olarak, çok sayıda kanser hücresi türü, tercihen IDO1 veya TDO2'yi ve bazı durumlarda her ikisini de gelişigüzel bir şekilde eksprese eder[38]. IDO1, meme kanseri dahil birçok farklı tümör tipinde aşırı eksprese edilir. IDO inhibitörleri, meme kanseri murin modellerinde kemoterapi ile sinerji oluşturur. Meme kanserinde IDO ekspresyonunun karakterize edilmesi, hangi hastaların IDO inhibitörleri alabileceğini tanımlayabilir[30].

Çalışmamızda meme kanseri hastalarında cerrahi, radyoterapi, hormonoterapi ve kemoterapi yanısıra immünoterapinin faydalı olabileceği meme kanseri alt gruplarını belirleyebilmek amacıyla IDO1 ve TDO2 ekspresyonunu immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemi ile araştırdık. IDO1 ve TDO2'yi ER, PR, HER2, Ki67 ekspresyonu, metastaz, yaş, histolojik alt tipler ile varsa anlamlı farklılıklarını göstermeyi amaçladık.

Çalışmamızda 74'ü neoadjuvan tedavi almamış tümör dokusu ve 14'ü normal meme dokusu olmak üzere 88 olgudan hazırlanan parafin blok kesitlerinde

immünohistokimyasal IDO1 ve TDO2 ekspresyonu ile, olgulara ait dokudan elde edilen komplementer DNA'dan RT-PCR yöntemiyle IDO1, TDO2 ekspresyonunu ve bunların klinikopatolojik ve prognostik parametreler açısından önemini değerlendirdik.

Dill ve ark. [33] yaptığı çalışmada IDO1 pozitifliğini, kovansiyonel duktal vakalar ve medüller, apokrin, nöroendokrin ve metaplastik özelliklere sahip olanlar dahil olmak üzere ağırlıklı olarak duktal karsinomlarda gözlemlemişlerdir. 23 lobüler karsinomda ekspresyon izlenmemişlerdir. Çalışmamızda tümör dokularında infiltratif duktal, tübülobüler ve papiller karsinomlarda oransal olarak daha fazla boyanma izlenmiştir. 7 lobüler karsinomun 2'sinde pozitiflik saptanmıştır. Birer olgudan oluşan sekretuar ve metaplastik karsinomda negatif izlenmiştir. Çalışmamızda IDO1 immünohistokimyasal ekspresyonu 14 normal meme dokusundan sadece 2'sinde pozitif izlenmiş olup tümör olgularında normal meme dokusuna oranla belirgin artış izlenmiştir. Histolojik alt tipler ile IDO1 arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Chien Chen ve ark. [40] 192 insan dokusuna ait kolorektal karsinomlarda immünohistokimyasal olarak IDO1 ekspresyonunu lenf düğümü metastazı ile ilişkili bulmuşlardır. Soliman ve ark. [30] meme karsinomuna ait 203 hastada yaptıkları çalışmada lenf nodu pozitif hastalarda immünohistokimyasal olarak daha düşük IDO1 ekspresyonu izlemişlerdir. Brandacher ve ark. [41] kolorektal karsinomlarda yüksek IDO ekspresyonunun, tümör infiltre lenfosit miktarını azalttığı, uzak metastazı arttırdığı ve genel sağkalımı azalttığını saptamışlardır. Dill ve ark. [33] 281 primer meme karsinomu örneklerinde ve metastatik dokularda immünohistokimyasal olarak IDO1 ekspresyonu ile metastatik yayılım arasında bir ilişkiye ulaşmamışlardır. Bizim çalışmamızda 43 metastatik olgudan 25'inde, 31 metastaz izlenmeyen olgudan 17'sinde immünohistokimyasal olarak IDO1 pozitifliği izlenmiştir. IDO ile metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Ghafouri-Fard ve ark. [42] infiltratif duktal karsinomlu 82 hastada RT-PCR yöntemi ile IDO1, TDO2 ve 3 adet uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) gen ekspresyonunu araştırmışlardır. Malign dokular ve tümöre komşu normal meme dokuları arasında IDO1 ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir.

Benzer IDO1 ekspresyon seviyelerini, iki numune arasındaki doku mikroçevresinin benzerliğinden kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Literatürde meme kanserinin, IDO1 aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalardan farklı bir sonuç bulmuşlardır. Tümörlü dokuda IDO2 ekspresyonunun normal dokulara oranla azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda RT-PCR ile IDO1 ekspresyonunu incelediğimizde 14 tümörsüz meme dokusunda gen ekspresyonu izlenmemiş olup, anlamlı ekspresyon gösteren 41 vakanın tamamı tümör dokusundan oluşmaktaydı. Anlamlı ekspresyon gösteren vakaların 19'unu (%59,4) infiltratif duktal karsinom, 4'ünü (%100) medüller özllikli infiltratif duktal karsinom, 3'ünü (%60) mikropapiller karsinom, 3'ünü (%100) kribriform karsinom, 3'ünü (%50) apokrin karsinom, 3'ünü (%42,9) tübülobülör karsinom, 2'sini (%40) tübüler karsinom, 1'er vakayı da sekretuar (%100), lubüler (%14,3), papiller (%33,3) ve metaplastik (%100) karsinom oluşturmaktadır. IDO1 ekspresyonu ile histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık izlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda IDO gen ekspresyonu ve immünohistokimyasal ekspresyonu arasında istatistiksel olarak korelasyon saptadık. Ancak immünohistokimyasal olarak negatif saptanan ancak PCR olarak pozitif saptanan vakaların (medüller özellikli infiltratif duktal karsinom, sekretuar karsinom, metaplastik karsinom gibi) tümör mikroçevresinin IDO1 ekspresyonu ediyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Soliman ve ark. [30] 203 meme karsinomunda immünohistokimyasal olarak IDO1 protein ekspresyonunu ER, PR ve HER2 reseptörü ile ayrı ayrı ilişkisini değerlendirmişlerdir. PR ve HER2 reseptörü durumu ile IDO1 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptamamışlardır. ER pozitif hastalarda daha yüksek IDO1 ekspresyonu izlenmiştir. Dewi ve ark. [43] 6 ER negatif ve 9 ER pozitif meme tümöründe IDO1 gen ekspresyonunu RT-PCR yöntemiyle incelemişlerdir. ER negatif vakaların 4'ünde IDO1 ekspresyonu izlenmiş olup, ER pozitif vakalarda ekspresyon saptamamışlardır. Ayrıca bu hastalarda triptofan metaboliti olan serum kynurenin düzeyinin ER negatif hastalarda daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da PR, HER2, ve Ki67 durumu ile IDO1 arasında immünohistokimyasal ve moleküler olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır. Bu sonuçlar önceki çalışmaları destekler niteliktedir.

Wei ve ark [44] 65 meme karsinomuna ait parafin kesitte IDO1 immünohistokimyasal reaktivitesini incelemişlerdir. IDO1 ekspresyonunu evre, lenf

nodu metastazı ve histolojik derece ile korele izlemişlerdir. ER, PR, HER2 durumu ile IDO1 arasında bir ilişki bulmamışlardır.

Literatürde ER durumu ile IDO1 ekspresyonu arasında birbirinden farklı sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmamızda ER durumu ile IDO1 ekspresyonu arasında Wei ve ark [44] çalışmasında görüldüğü gibi anlamlı ilişki saptamadık. ER reseptörü ve diğer hormon reseptörleri ile ilgili daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Dill ve ark. [33] immünohistokimyasal olarak IDO pozitifliğini aynı zamanda en sık triple negatif ve HER2 + tümörlerde gözleyip, Luminal A benzeri ve Luminal B benzeri vakaların sadece %5'inde ekspresyon izlemişlerdir. Çalışmamızda ise moleküler sınıf ile IDO1 immünreaktivitesi arasında anlamlı ilişki saptamadık.

Liu ve ark. [45] birçok veri tabanından aldıkları meme kanseri ile ilgili geniş bir çalışmada mikrodizi veri setlerinde IDO2 gen ekspresyonunu araştırmışlardır. Ayrıca 1881 örnek mikrodizi veri setinde IDO1 ve KYNÜ ekspresyonunu da araştırmışlardır. IDO1 ve KYNÜ ekspresyonlarını IDO2 ile benzer şekilde bazal benzeri ve HER2 pozitif alt tiplerde ve ER negatif meme kanserinde daha yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda moleküler sınıf ile IDO1 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak sınırda bir anlamlılık izlenmiştir. Özellikle 9 HER2 pozitif vakanın 6'sında (%66,6) ve 9 triple negatif vakanın 8'inde (%88,9) gen ekspresyonu saptanmıştır. Luminal A ve Luminal B vakaları ile kıyaslandığında HER2 pozitif ve triple negatif vakalarda daha yüksek gen ekspresyonu bulunmuştur.

Tina ve ark. [46] bazal hücreli kanserin (BCC) kansinogenezinde önemli olabilecek faktörleri belirlemeyi hedefleyerek aminoasit metabolizmasında ve taşınmasında rol alan SLC7A5 SLC7A7 SLC7A8 ve IDO2'yi analiz etmişlerdir. 14 olguya ait tümürlü ve tümörsüz dokularda, SLC7A5, SLC7A8 ve IDO2'yi mikrodizi analizi ve PCR yöntemiyle, eşleştirilmiş tümör dışı dokuya kıyasla eksprese edildiğini gözlemlemişlerdir. BCC hücrelerinin çoğu IDO2 proteinini eksprese etmemiştir. İki sağlıklı donörden alınan abdominal epidermisin, immünohistokimyasal olarak BCC'lerdeki epidermise göre daha yüksek IDO2

eksprese ettiği belirtilmiştir. TDO2 proteini ile gen ekspresyonu arasında korelasyon saptanamamışlardır.

Shanbao ve ark. [32] 93 Hepatosellüler Karsinom (HCC) hastasında TDO2 ekspresyonunu RT-PCR, İHK, Western Blot yöntemiyle araştırmışlardır. Normal bitişik dokulara kıyasla HCC'li dokularda TDO2 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. TDO ekspresyonunun tümör boyutu ($P = 0.006$), tümör diferansiasyonu ($P = 0.043$) ve vasküler invazyon ($P = 0.022$) ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ancak yüksek TDO ekspresyonunun cinsiyet, yaş, karaciğer sirozu, hepatit virüsü ile ilişkili olduğuna dair kanıt bulamamışlardır. Yüksek TDO2 ekspresyonu olan hastaların düşük TDO2 ekspresyonu olan hastalara oranla daha az genel sağkalım ve hastalıksız sağkalıma sahip olduğunu saptamışlardır. TDO'nun yüksek ekspresyonunu, ileri klinik evre ve tümör nüksünden bağımsız olarak daha kısa genel sağkalım için yeni bir bağımsız prognostik biyobelirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Pham ve ark. [47] özofagial skuamöz hücreli karsinom (SCC) hastalarında RT-PCR, İHK, Western Blot ve hücre kültürü yöntemiyle TDO2 ekspresyonunu incelemişlerdir. Normal dokularla karşılaştırıldığında SCC doku örneklerinde yüksek TDO2 mRNA seviyeleri gözlemlemişlerdir. RT-PCR ile TDO2 ekspresyonunu 10 SCC vakasından 8'inde (%80) izlemişlerdir. TDO2 yüksek ekspresyonu, tümör evresi ve nüks durumu ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar, TDO2'nin SCC'nin ilerlemesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Yüksek TDO2 ekspresyonlu SCC vakalarının, düşük TDO2 ekspresyonlu SCC vakalarından daha düşük surveye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda tümörlü ve tümörsüz tüm dokularda immünohistokimyasal olarak TDO2 negatif vakalar saptanamamıştır. 88 olgunun 13'ü orta şiddette (%14,8), 75'i (%85,2) güçlü pozitif izlendi. TDO2 immünreaktivitesi ile histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak bir ilişki izlenmemiştir.

TDO2 gen ekspresyonu ile histolojik alt tipleri incelediğimizde 88 vakadan sadece 5'inde anlamlı ekspresyon saptanmıştır. Bu vakaları metaplastik karsinom, tübülolobüler karsinom, apokrin karsinom, mikropapiller karsinom ve infiltratif duktal karsinomdan birer olgu oluşturmaktadır. TDO2 immünreaktivitesi ve gen ekspresyonu arasında korelasyon saptanamamıştır. İki çalışma arasındaki

farklılıkları uzlaştırmak için ek araştırmalar gereklidir, ancak mRNA ekspresyonunun, çoklu transkripsiyonel kontrol mekanizmaları nedeniyle protein ekspresyonundan farklı olabileceği bilinmektedir. Ayrıca doku takip işlemleri esnasında kimyasallara maruz kalan dokunun hassas bir yapıya sahip mRNA'sının degradasyona uğramış olmasına bağlı olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda IDO1 ve TDO2 immünreaktivitesi karşılaştırıldığında aralarında korelasyon saptanmamıştır. Triptofan mekanizmasında aynı basamakta rol almalarına rağmen farklı dokularda farklı oranlarda eksprese edilebilmektedirler[38].

Liu ve ark. [45] birçok veri tabanından aldıkları meme kansinomu ile ilgili geniş bir çalışmada öncelikle 1881 meme kanserinden oluşan mikrodizi örneğinde TDO2 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. TDO2 ekspresyonunun bazal benzeri ve HER2 pozitif alt tiplerde anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ve ER pozitif meme kansinomuna kıyasla ER negatif meme kansinomunda anlamlı derecede daha yüksek TDO2 ekspresyonunun bulunduğunu göstermişlerdir. Farklı bir veri tabanında 10.001 mikrodizi örneğinde TDO2 ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Bu çalışmada da önceki çalışma ile tutarlı olarak TDO2 ekspresyonu, bazal benzeri, HER2 pozitif moleküler alt tiplerde ve ER negatif meme kansinomunda daha yüksek izlemişlerdir. Çalışmamızda TDO2 immünreaktivitesi ve gen ekspresyonu ile ER, PR, HER2 ve Ki67 ile arasında ayrı ayrı değerlendirildiğinde anlamlı ilişki izlenmedi.

D'Amato ve ark. [48] yaptıkları bir çalışmada ayrıca immünohistokimyasal olarak infiltratif duktal kansinumlu triple negatif meme kansinomu örneklerinde TDO2 ekspresyonunu incelemişlerdir. Triple negatif meme kansinomunda TDO2 ekspresyonunu güçlü bir şekilde pozitif saptamışlardır. Fare deneyleri üzerinde yaptıkları çalışmada TDO2 inhibitörlerinin enjekte edildiği farelerde akciğerdeki metastatik nodüllerin azaldığını saptamışlardır. TDO2 inhibitörlerinin metastazı azalttığı gösterilmiştir.

Novikov ve ark. [49] ER pozitif tümörlerle karşılaştırıldığında triple negatif tümörlerde ve evre 3 tümörlere oranla evre 4'te daha yüksek TDO2 pozitifliği izlemişlerdir. TDO2 mRNA seviyesini de aynı şekilde saptamışlardır. Bu da yüksek TDO2 seviyesinin agresif kansinomları temsil ettiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda TDO2 gen ekspresyonu ve immünreaktivitesi ile Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif ve Triple negatif vakalar arasında istatistiksel olarak farklılık izlemedik. Ayrıca TDO2 ekspresyonu ve metastaz arasında da anlamlı ilişki saptamadık.

Literatürde Tina ve ark. [46] BCC’de RT-PCR ve İHK’sal olarak yaptıkları çalışmada tümör dokusu ile TDO2 ekspresyonu arasında bir anlamlılık bulmamaları dışında diğer çalışmalarda TDO2 ekspresyonunu metastaz, triple negatiflik, HER2 pozitifliği, ileri evre ile ilişkili saptamışlardır. Ancak TDO2 ekspresyonunun meme dokusu üzerindeki çalışmaları oldukça azdır. Çalışmamız ile önceki çalışmalar arasındaki farkları uzlaştırmak için ek çalışmalar gereklidir. Daha sonraki çalışmalar TDO2 ekspresyonu ile ilgili daha yol gösterici sonuçlar verebilir.

6. SONUÇLAR

- Neoadjuvan tedavi almamış meme kanseri hastaları arasında histolojik alt tipler ile metastaz arasında ilişki saptanmamıştır.
- IDO1 immünreaktivitesi normal meme dokusuna oranla tümörlü dokuda pozitif izlenmiştir. IDO1 immünreaktivitesi ile histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmiştir.
- IDO1 immünreaktivitesi ile ER, PR, HER2 ve Ki67 arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- IDO1 immünreaktivitesi ile Luminal A, Lüminal B, HER2 pozitif ve triple negatif moleküler sınıf arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.
- IDO1 immünreaktivitesi ile metastaz arasında ilişki saptanmamıştır.
- IDO1 immünreaktivitesi ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ancak 50 yaştan büyük hastalarda IDO1 pozitifliğinde artış görülmüştür. IDO1 negatif vakaların büyük kısmının da 50 yaş altı hastalar olduğu izlenmiştir.
- IDO1 gen ekspresyonu ile IDO1 immünreaktivitesi arasında korelasyon izlenmiştir.
- IDO1 gen ekspresyonu ile histolojik alt tipler arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.
- IDO1 gen ekspresyonu ile ER, PR, HER2 ve Ki67 arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- IDO gen ekspresyonu ile moleküler sınıflama arasında sınırda anlamlı ilişki saptanmıştır. IDO1 ekspresyonu triple negatif ve HER2 pozitif olgularda daha fazla bulunmuştur.
- IDO1 gen ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. 50 yaş üstü hastalarda daha yüksek oranda pozitiflik saptanmıştır.
- IDO1 gen ekspresyonu ile metastaz arasında anlamlı ilişki izlenmemiştir.
- TDO2 immün reaktivitesi tümörlü ve tümörsüz dokularda farklılık göstermemiş olup histolojik alt tipler arasında da ilişki saptanmamıştır.
- TDO2 immünreaktivitesi ile ER, PR, HER2, Ki67 arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- TDO2 immünreaktivitesi ile moleküler sınıflama arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

- TDO2 immünreaktivitesi ve gen ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.
- TDO2 immünreaktivitesi ile gen ekspresyonu arasında korelasyon izlenmemiştir.
- TDO2 gen ekspresyonu ile IDO1 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında TDO2 ekspresyonu gösteren 5 olgu IDO1 ekspresyonu da göstermiştir.
- TDO2 gen ekspresyonu ile hormon reseptörleri ve moleküler sınıflama arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

7. KAYNAKÇA

1. Goldblum, J.R., et al., *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology in Breast*. 2017, Elsevier Health Sciences.
2. Ferri, F.F., *Breast Cancer*, in *Ferri's Clinical Advisor 2021*, B. Rathore, Editor. 2021. p. 261-266.

3. Ye, Q., et al., *Expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) in the tumor microenvironment and in tumor-draining lymph nodes of breast cancer*. Hum Pathol 2018. **75**: p. 81-90.
4. Ye, Z., et al., *Role of IDO and TDO in Cancers and Related Diseases and the Therapeutic Implications*. J Cancer., 2019. **10**(12): p. 2771.
5. Kim, S., et al., *Strong correlation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 expression with basal-like phenotype and increased lymphocytic infiltration in triple-negative breast cancer*. 2017. **8**(1): p. 124.
6. McKirdy, L.M.A.a.M.J., *Breast*, in *Gray's Surgical Anatomy*. 2020. p. 306-314.
7. Shiffman, M.A., *Breast Augmentation*. 1 ed. 2009.
8. Mills, S.E., *Breast*, in *Histology for pathologists*. 2012. p. 67-79.
9. Donna L. Stahl, K.S.C.a.M.S.B., in *Atlas of Pelvic Anatomy and Gynecologic Surgery*, B. Karam, Editor. 2021. p. 1219-1230.
10. Jones, J.L., *Breast*, in *Underwood's Pathology*, S.S. Cross, Editor. 2019. p. 416-437.
11. Neda A. Moatamed, L.W.B.a.S.K.A., *Breast Imaging*, in *The Normal Breast*. 2011. p. 223-235.
12. Mills, S.E., et al., *Sternberg's diagnostic surgical pathology*. 2012.
13. *Female reproductive system*, in *Wheater's Functional Histology*, G.O.D. Barbara Young, Philip Woodford, Editor. 2014. p. 351-383.
14. Nentin, M.H.S.a.F.G., *The Breast*, in *Textbook of Physical Diagnosis: History and Examination*, M.H. Swartz, Editor. 2021. p. 341-353.
15. Vinay Kumar, A.K.A., John C. Aster, *The Breast*, in *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease*. 2020. p. 1038-1063.
16. Jesinger, R.A.J.T.i.v. and i. radiology, *Breast anatomy for the interventionalist*. 2014. **17**(1): p. 3-9.
17. Allison KH, B.E., Ellis IO, *Breast Tumors*, in *WHO Classification of Tumors*,. 2019.
18. Collins, S.J.S.a.L.C., *İnvaziv Meme Kanseri*, in *Meme Biyopsilerinin Yorumu*. 2014. p. 282-363.
19. Jennifer A. Harvey MD, F.a.D.E., *Making the Diagnosis: A Practical Guide to Breast Imaging*, in *Measuring and Managing Breast Cancer Risk*. 2013. p. 350-373.
20. Rosen, L.E., P.J.A.o.p. Gattuso, and I. medicine, *Neuroendocrine tumors of the breast*. 2017. **141**(11): p. 1577-1581.
21. Dabbs, D.J., *Rare Breast Carcinomas*, in *Breast Pathology*. 2017. p. 639-662.
22. Ian O. Ellis, A.H.S.L., Sarah E. Pinder, *Diagnostic Histopathology of Tumors*, in *Tumors of the Breast*. 2018. p. 1119-1210.
23. Jones, J.L., *Breast*, in *Underwood's Pathology*. 2019. p. 416-437
24. Sunati Sahoo, E.H., Sandra J. Shin, *Special Types of Invasive Breast Carcinoma*, in *Breast Pathology*. 2017. p. 597-638.
25. Ian O. Ellis, A.H.S.L., Sarah E. Pinder and Emad A. Rakha, *Tumors of the Breast*, in *Diagnostic Histopathology of Tumors*, F. Christopher D.M., Editor. 2021. p. 1119-1210.
26. Tray, N., J. Taff, and S.J.C.t.r. Adams, *Therapeutic landscape of metaplastic breast cancer*. 2019. **79**: p. 101888.
27. Bhargava, R., *Molecular Classification of Breast Carcinoma*, in *Breast Pathology*. 2017. p. 417-435.
28. Badawy, A.A.J.I.J.o.T.R., *Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatory and functional aspects*. Int J Tryptophan Res, 2017. **10**: p. 1178646917691938.
29. Wirleitner, B., et al., *Interferon- γ -induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects*. Curr Med Chem. 2003. **10**(16): p. 1581-1591.

30. Soliman, H., et al., *Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(5): p. 829-837.
31. Zhai, L., et al., *IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints*. Cell Mol Immunol, 2018. **15**(5): p. 447-457.
32. Li, S., et al., *TDO Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 5845.
33. Dill, E.A., et al., *IDO expression in breast cancer: an assessment of 281 primary and metastatic cases with comparison to PD-L1*. Modern Pathology, 2018. **31**(10): p. 1513-1522.
34. Opitz, C.A., et al., *The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer*. Br J Cancer, 2020. **122**(1): p. 30-44.
35. Alabalik, U., et al., *Can aquaporins be used as diagnostic and prognostic markers for uterine smooth muscle tumours?* Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2017. **31**(1): p. 148-155.
36. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
37. Puccetti, P., et al., *Accumulation of an endogenous tryptophan-derived metabolite in colorectal and breast cancers*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122046.
38. Cheong, J.E. and L.J.T.i.p.s. Sun, *Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR pathway for cancer immunotherapy—challenges and opportunities*. Trends Pharmacol Sci, 2018. **39**(3): p. 307-325.
39. Mellor, A.L. and D.H.J.T.J.o.I. Munn, *Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 5809-5813.
40. Chen, I., et al., *Expression pattern and clinicopathological relevance of the indoleamine 2, 3-dioxygenase 1/tryptophan 2, 3-dioxygenase protein in colorectal cancer*. Dis Markers, 2016. **2016**.
41. Brandacher, G., et al., *Prognostic value of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1144-1151.
42. Ghafouri-Fard, S., et al., *Gene expression of indoleamine and tryptophan dioxygenases and three long non-coding RNAs in breast cancer*. Exp Mol Pathol, 2020. **114**: p. 104415.
43. Dewi, D.L., et al., *Suppression of indoleamine-2, 3-dioxygenase 1 expression by promoter hypermethylation in ER-positive breast cancer*. Oncoimmunology., 2017. **6**(2): p. e1274477.
44. Wei, L., et al., *High indoleamine 2, 3-dioxygenase is correlated with microvessel density and worse prognosis in breast cancer*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 724.
45. Liu, Q., et al., *Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for TDO2 in Breast Cancer*. 2020. **17**: p. 153-168.
46. Tina, E., et al., *Expression profile of the amino acid transporters SLC 7A5, SLC 7A7, SLC 7A8 and the enzyme TDO 2 in basal cell carcinoma*. Br J Dermatol., 2019. **180**(1): p. 130-140.
47. Pham, Q.T., et al., *TDO2 overexpression is associated with cancer stem cells and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncology., 2018. **95**(5): p. 297-308.
48. D'Amato, N.C., et al., *A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer*. Cancer Res., 2015. **75**(21): p. 4651-4664.

49. Novikov, O., et al., *An aryl hydrocarbon receptor-mediated amplification loop that enforces cell migration in ER-/PR-/Her2- human breast cancer cells.* Mol Pharmacol, 2016. **90**(5): p. 674-688.