



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRİPLE NEGATİF MEME KARSİNOMLARINDA
İMMÜNOLOJİK BELİRTEÇLERİN
PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ**

Dr. HÜLYA ŞAHİN ÖZKAN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2019



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TRİPLE NEGATİF MEME KARSİNOMLARINDA

İMMÜNOLOJİK BELİRTEÇLERİN

PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ

Dr. HÜLYA ŞAHİN ÖZKAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. HANDAN KAYA

İSTANBUL 2019

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tezimin hazırlanması süresince bana bilgi ve deneyimlerini aktaran, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Handan Kaya'ya; patoloji bilimini bana sevdiren, deneyimlerini benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Şirin Funda Eren, Prof. Dr. Çiğdem Ataizi Çelikel, Prof. Dr. Asiye Rengin Ahıskalı, Prof. Dr. Zeliha Leyla Cinel, Prof. Dr. Süheyla Uyar Bozkurt, Doç. Dr. Hüseyin Kemal Türköz, Doç. Dr. Pelin Bağcı, Doç. Dr. Deniz Filinte, Dr. Öğrt. Üyesi İpek Erbarut Seven, Dr. Öğrt. Üyesi Emine Bozkurtlar ve Uzm. Dr. Ali Koyuncuer'e; çalışma arkadaşlarım ve sevgili dostlarım Dr. Hande Mollamemişoğlu, Dr. Faruk Erdem Kombak, Dr. Fatma Gerin, Dr. Hasan Toper, Dr. Gamze Akbaş, Dr. İdris Önem, Dr. İrem Şahver İşgör, Dr. Selim Yiğit Erçetin, Dr. Medine Özgür Günay, Dr. Tuba Oğuzsoy, Dr. Beyza Keskin, Dr. Mehmet Fatih Tekin, Dr. Ebru Kaçar ve Dr. Cem Berk Türk'e; başta tezimde emeği geçen Gevher Alkan, Tansu Karadağ, Elif Uğurlu ve Mücahit Özkelle olmak üzere tüm laboratuvar ekibine, sekreter ve personel arkadaşlarıma; desteklerini benden esirgemeyen ve hep yanımda olan eşim ve aileme sonsuz teşekkürlerimle...

ÖZET

Amaç: Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser tipidir ve kansere bağlı kadın ölümlerinin en önemli nedenidir. Hormon reseptör ve HER2 ekspresyonları, histolojik tip, histolojik derece, evre, proliferasyon indeksi ve hasta yaşı meme karsinomlarında iyi bilinen ve rutin olarak bakılan prognostik ve prediktif faktörlerdir. Triple negatif meme karsinomu; ER, PR ve HER2 ekspresyonu görülmeyen olguları ifade eder. Triple negatif meme karsinomlarında prognoz, diğer meme karsinomu tiplerine göre daha kötüdür. Tümör immün-mikroçevresinin içeriği ve etkileri, triple negatif meme karsinomu olgularının medikal yönetiminde oldukça önemlidir. Tümör immün-mikroçevresinin triple negatif meme karsinomlarında prognostik bir faktör olduğu ve immünoterapötik ajanlar için potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Amacımız, tümör immün-mikroçevresindeki CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 ekspresyonlarını inceleyerek, bunların histopatolojik parametrelerle ve prognozla ilişkisini anlamaktır.

Gereç ve Yöntem: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2012-2017 yılları arasında lumpektomi veya mastektomi spesmeni değerlendirilen ve neoadjuvan terapi almadığı bilinen toplam 51 triple negatif meme karsinomu olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Formalin-fikse parafine-gömülü dokulardan hazırlanan kesitlere CD8 (C8/144B-Dako), FOXP3 (EP340-Epitomics), PD-L1 (SP263-Ventana) ve CD163 (EP324-Epitomics) immünohistokimyasaları uygulanmıştır. CD8, FOXP3 ve CD163 ekspresyonları intratümöral alanlarda ve tümör stromasında ayrı ayrı değerlendirilmiştir. PD-L1 ekspresyonu da tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Bulgular: Olgularımızın tanı anındaki ortalama yaşı 49,7 ve ortalama takip süresi 48,3 aydır. Çalışmamızda, yüksek CD8 ekspresyonu uzun genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım ve düşük primer tümör evresi varlığı ile ilişkili bulunurken; düşük ekspresyon anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve perinöral ile

ilişkili bulunmuştur. Yüksek FOXP3 ekspresyonu uzun genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, genç hasta yaşı ve yüksek proliferasyon indeksi ile ilişkilidir. Düşük FOXP3 ekspresyonu anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, yüksek patolojik risk skoru ve yüksek kötü prognoz skoru ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek PD-L1 ekspresyonu uzun genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, genç hasta yaşı ve lenfosit-predominant meme karsinomu ile ilişkilidir; düşük ekspresyon anjiyoinvazyon ve lenfatik invazyon ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek CD163 ekspresyonu uzun genel sağkalım, metastazsız sağkalım, ileri primer tümör evresi ve peritümöral lenfositik yanıt yoğunluğu ile ilişkili olup düşük ekspresyon anjiyoinvazyon ve lenfatik invazyon ile ilişkilidir. CD8, FOXP3, CD163, PD-L1 immünohistokimyasal belirteçlerinin ko-ekspresyon gösterdiği dikkait çekmiştir.

Sonuç: Triple negatif meme karsinomlarında immünolojik mikroçevreyi değerlendirmede CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 immünohistokimyasaları güvenilir birer belirteçtir. İmmünolojik mikroçevreyi oluşturan hücrelerin tipi, yoğunluğu ve yerleşim yeri; sağkalım ve diğer prognostik parametreleri etkilemektedir. Literatürde, çeşitli çalışmalarda CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 ekspresyonlarının farklı prognostik etkileri bildirilmiştir. Çalışmamızda, bulgularımız literatürle uyumlu niteliktedir. Triple negatif meme karsinomlarında immünolojik mikroçevreyi daha iyi anlamak, prognozu tayin etmek ve medikal tedavi planını yönlendirebilmek için bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: triple negatif meme kanseri, tümörü infiltre eden lenfositler, programlı hücre ölümü ligandı 1, PD-L1, FOXP3, CD8, CD8 pozitif T lenfositler, CD163, prognoz.

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Aim: Breast cancer is the most common cancer type among women and the leading cause of cancer death. Hormone receptor and HER2 expressions, histological type, histological grade, stage, proliferation index, and patient age are the well known prognostic and predictive factors in breast cancer. Triple negative breast carcinomas, which do not express Estrogen receptor, Progesterone receptor and HER2, are associated with a worse prognosis. Composition and interactions of tumor-immune-microenvironment has become ever more important for the management of triple negative breast carcinoma. The tumor-immune-microenvironment is considered to be a prognostic factor in breast carcinoma and a potential target for immunotherapeutic agents. Our aim is to evaluate the relationship between CD8, FOXP3, PD-L1, and CD163 expressions and histopathological parameters to understand their prognostic role.

Material and Methods: A total number of 51 lumpectomy and mastectomy specimens, which had been diagnosed as triple negative breast carcinoma in the Pathology Department of Marmara University School of Medicine between 2012 and 2017 and had not received neo-adjuvant therapy, were included in the study. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were immunostained with CD8 (C8/144B-Dako), FOXP3 (EP340-Epitomics), PD-L1 (SP263-Ventana), and CD163 (EP324-Epitomics) antibodies. CD8, FOXP3, and CD163 expressions were separately evaluated in intratumoral and stromal areas. PD-L1 expression was also individually considered in neoplastic cells and tumor-infiltrating-lymphocytes.

Findings: Mean age was 49.7 and mean survival was 48.3 months. All patients were female. Higher expression of CD8 was found to be related with longer overall survival, recurrence-free survival, metastasis-free survival, and earlier tumor stage; while its lower expression was associated with angioinvasion, lymphatic invasion, and perineural invasion. Higher FOXP3 expression was observed in the cases with

younger age, higher proliferation index, and longer overall, recurrence-free, and metastasis-free survival. Lower expression of FOXP3 was related to angiogenesis, lymphatic invasion, perineural invasion, higher pathological-risk-score, and higher worse-prognosis-score. Higher PD-L1 expression was associated with younger age, lymphocyte-predominant breast carcinoma, and longer overall, recurrence-free, and metastasis-free survival. Higher expression of CD163 was related with longer overall survival, metastasis-free survival, advanced tumor stage, and higher peritumoral lymphocytic response. On the other hand, low PD-L1 and CD163 expressions were found in the cases with angiogenesis and lymphatic invasion. There was a significant positive correlation between the expressions of each of the four antibodies (Co-expression).

Conclusion: CD8, FOXP3, PD-L1 and CD163 are useful immunohistochemical markers to evaluate the immunological microenvironment in triple negative breast carcinoma. Type, density and localisation of the immune cells effect the survival and other prognostic parameters. Different prognostic effects of CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 expressions were reported in the literature. Our findings were compatible with the literature. Further investigation is needed to understand the immunological microenvironment of triple negative breast carcinoma, predict the prognosis, and lead the medical treatment options.

Keywords: triple negative breast cancer, tumor infiltrating lymphocytes, programmed cell death ligand 1, PD-L1, FOXP3, CD8, CD8 positive T lymphocytes, CD163, prognosis.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xii
TABLO DİZİNİ.....	xiv
RESİM DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2. Embriyoloji	6
2.3. Anatomi, Histoloji ve İmmünprofil.....	7
2.3.1. Anatomi.....	7
2.3.2. Histoloji.....	8
2.3.3. İmmünprofil	12
2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi	13
2.5. Sınıflama ve İnvaziv Meme Karsinomu Alt Tipleri.....	15
2.5.1. İnvaziv karsinom, “ <i>No special type</i> ” (Özelleşmiş olmayan tip)	16
2.5.2. İnvaziv lobüler karsinom	19
2.5.3. Tubüler karsinom.....	20
2.5.4. Kribriform karsinom.....	20
2.5.5. Müsinöz karsinom	21
2.5.6. Medüller özellikler gösteren karsinom (Lenfosit-baskın karsinom)	21
2.5.7. Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom.....	23
2.5.8. İnvaziv mikropapiller karsinom	23
2.5.9. Metaplastik karsinom.....	24
2.5.10. Nadir meme karsinomu tipleri	25
2.6. Meme Karsinomunun Moleküler Temelleri ve Moleküler Sınıflaması	27

2.6.1.	Triple negatif meme karsinomları (TNMK)	32
2.7.	Meme Karsinomunda Prognostik Faktörler	38
2.7.1.	Histolojik tip.....	38
2.7.2.	Histolojik derece.....	39
2.7.3.	Tümör boyutu ve lenf nodu durumu.....	41
2.7.4.	Lenfovasküler ve perinöral invazyon	41
2.7.5.	Proliferasyon indeksi	42
2.7.6.	Hormon reseptörleri.....	44
2.7.7.	Moleküler özellikler.....	45
2.7.8.	Diğer faktörler	45
2.8.	Meme Karsinomlarında İmmünolojik Mikroçevre	46
2.8.1.	Sitotoksik T lenfositler.....	50
2.8.2.	Regülatuar T lenfositler	50
2.8.3.	PD1 / PD-L1 yolağı	52
2.8.4.	M2 makrofajlar.....	54
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1.	Olgu Seçimi.....	56
3.2.	Etik Kurul.....	56
3.3.	Yöntem.....	57
3.3.1.	İmmünohistokimya.....	57
3.3.2.	HER2 in situ hibridizasyon.....	59
3.4.	Değerlendirme	60
3.4.1.	Histopatolojik değerlendirme.....	60
3.4.2.	CD8 immünohistokimyasal değerlendirme	61
3.4.3.	FOXP3 immünohistokimyasal değerlendirme	63
3.4.4.	PD-L1 immünohistokimyasal değerlendirme	64
3.4.5.	CD163 immünohistokimyasal değerlendirme.....	66
3.4.6.	ER ve PR immünohistokimyasal değerlendirme.....	67
3.4.7.	HER2 immünohistokimya ve in situ hibridizasyon değerlendirme...67	
3.4.8.	Ki67 immünohistokimyasal değerlendirme	68
3.5.	Patolojik Risk Skoru ve Kötü Prognoz Skoru	69
3.6.	İstatistik.....	70
4.	BULGULAR.....	71

4.1.	Demografik Veriler ve Klinik Takip Bulguları.....	71
4.2.	Histomorfolojik Veriler	75
4.2.1.	Patolojik ve klinik evre	75
4.2.2.	Histolojik tümör tipi ve histolojik derece	76
4.2.3.	Cerrahi sınırlar.....	77
4.2.4.	Proliferasyon indeksi	77
4.2.5.	Anjiyo / lenfatik / perinöral invazyon.....	78
4.2.6.	Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL; peritümöral lenfositik yanıt)....	78
4.2.7.	Lenfoid folikül ve histiyositik agregatlar.....	81
4.3.	İmmünohistokimyasal Veriler.....	81
4.3.1.	CD8.....	81
4.3.2.	FOXP3	87
4.3.3.	CD8/FOXP3 oranı	92
4.3.4.	PD-L1.....	93
4.3.5.	CD163.....	103
4.4.	Klinik ve Histomorfolojik Verilerin Prognostik Parametrelerle İlişkileri .	108
4.4.1.	Yaş.....	108
4.4.2.	Histolojik tip ve derece	109
4.4.3.	Patolojik ve klinik evre	109
4.4.4.	Anjiyo / lenfatik / perinöral invazyon.....	111
4.4.5.	Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL; peritümöral lenfositik yanıt)..	112
4.4.6.	Lenfoid folikül ve histiyositik agregat.....	113
4.4.7.	Proliferasyon indeksi	113
4.5.	İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Prognostik Parametrelerle İlişkileri .	114
4.5.1.	CD8.....	114
4.5.2.	FOXP3	120
4.5.3.	CD8/FOXP3 oranı	126
4.5.4.	PD-L1.....	129
4.5.5.	PD-L1 ekspresyon skoru.....	135
4.5.6.	CD163.....	137
4.5.7.	Çok değişkenli analizler.....	143
4.6.	Patolojik Risk Skoru	144
4.7.	Kötü Prognoz Skoru	145

5. TARTIŞMA.....	147
5.1. Klinik Veriler	147
5.1.1. Yaş.....	147
5.1.2. Klinik Evre	149
5.1.3. Sağkalım, nüks ve metastaz	150
5.2. Histopatolojik Veriler	152
5.2.1. Patolojik evre.....	152
5.2.2. Histolojik tümör tipi ve histolojik derece	155
5.2.3. Lenfatik / anjiyo / perinöral invazyon	157
5.2.4. Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL; peritümöral lenfositik yanıt)..	159
5.2.5. Lenfoid folikül ve histiyositik agregatlar.....	162
5.2.6. Proliferasyon indeksi	162
5.3. İmmünohistokimyasal Veriler.....	164
5.3.1. CD8.....	164
5.3.2. FOXP3	169
5.3.3. CD8/FOXP3 oranı	175
5.3.4. PD-L1.....	176
5.3.5. CD163.....	184
6. SONUÇ	190
7. KAYNAKLAR	193

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASCO	: <i>American Society of Clinical Oncology</i>
AJCC	: <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AR	: Androjen Reseptör
BBA	: Büyük Büyütme Alanı
BRCA	: <i>Breast Cancer Gene</i>
CAP	: <i>College of American Pathologists</i>
CTLA4	: <i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4</i>
DKIS	: Duktal Karsinoma In Situ
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
FGFR	: <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FISH	: Floreasn In Situ Hibridizasyon
FOXC1	: <i>Forkhead box C1</i>
FOXP3	: <i>Forkhead Box P3</i>
GCDFP15	: <i>Gross Cystic Disease Fluid Protein 15</i>
HER2	: <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
IDO1	: Indolamin 2,3-dioksigenaz 2
IFN- γ	: İnterferon-gama
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
LBMK	: Lenfosit-Baskın Meme Karsinomu
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NOS	: <i>Not Otherwise Specified</i>
NST	: <i>No Special Type</i>
PARP	: Poli-ADP-Riboz Protein
PD1	: <i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	: <i>Programmed cell death - ligand 1</i>
PDGFR	: <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>

pN	: Patolojik lenf nodu evresi
PR	: <i>Progesterone Receptor</i>
pT	: Patolojik primer tümör evresi
SK	: Sitokeratin
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TİL	: Tümörü infiltre eden lenfositler
TİM	: Tümör ilişkili makrofajlar
TNF α	: <i>Tumor Necrosing Factor - alfa</i>
TNMK	: Triple Negatif Meme Karsinomu
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Kadınlarda meme kanserinin bölge-spesifik insidans ve mortalitesi.....	5
Şekil 2. Kadınlarda en sık görülen on kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları	6
Şekil 3. Meme karsinomunda çok basamaklı moleküler karsinogenez.....	28
Şekil 4. İn situ ve invaziv meme karsinomlarında gelişimsel modeller	29
Şekil 5. Tümör supresyonu veya progresyonuna etkilerine göre tümörü infiltre eden lenfosit grupları.....	49
Şekil 6. Regülatuar T lenfositlerde ve karsinom hücrelerinde eksprese edilen FOXP3'ün etkisi.	52
Şekil 7. PD1 / PD-L1 yolağı.....	55
Şekil 8. Olguların tanı anındaki yaş dağılımı.	71
Şekil 9. Olguların tanı anındaki yaş grupları.....	72
Şekil 10. Histolojik tümör tiplerinin dağılımı	76
Şekil 11. İntratümöral ve stromal CD8 immünekspresyon dağılımı.	82
Şekil 12. İntratümöral ve stromal FOXP3 immünekspresyon dağılımı.....	88
Şekil 13. İntratümöral ve stromal CD8/FOXP3 oranı dağılımı.....	92
Şekil 14. Neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon dağılımı.....	94
Şekil 15. Neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon skoru dağılımı.	98
Şekil 16. Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyon skoru grupları	98
Şekil 17. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyon skoru grupları.	102
Şekil 18. İntratümöral ve stromal CD163 immünekspresyonu dağılımı.	103
Şekil 19. İntratümöral CD8 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi	115
Şekil 20. Stromal CD8 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi	116
Şekil 21. İntratümöral FOXP3 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.....	121

Şekil 22. Stromal FOXP3 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.....	122
Şekil 23. Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi	130
Şekil 24. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi	131
Şekil 25. İntratumöral CD163 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi	138
Şekil 26. Stromal CD163 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi	140
Şekil 27. Patolojik risk skorunun sağkalım ile ilişkisi.....	144



TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Meme karsinomunda risk faktörleri ve relatif risk grupları.	13
Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü Meme Tümörleri Sınıflaması: Epitelyal Tümörler ...	17
Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü Meme Tümörleri Sınıflaması: Diğer Tümörler	18
Tablo 4. Meme karsinomlarında histolojik tipe göre prognostik gruplar.	39
Tablo 5. Meme karsinomu histolojik derecelendirmesinde Nottingham Elston & Ellis yöntemi.	40
Tablo 6. Meme karsinomu histolojik derecelendirmesinde Nottingham Elston&Ellis metoduna göre mitotik indeks puanları.	40
Tablo 7. Meme karsinomlarında patolojik tümör (pT) evresi.....	42
Tablo 8. Meme karsinomlarında patolojik lenf nodu (pN) evresi.....	43
Tablo 9. İmmünohistokimya kullanılan antikorlar ve özellikleri.	58
Tablo 10. Eksitus ile sonuçlanan olguların klinik, patolojik ve immünohistokimyasal özellikleri.	74
Tablo 11. Klinik evrelerin dağılımı	76
Tablo 12. İntratümöral ve stromal CD8 immünoekspresyon grupları.....	83
Tablo 13. İntratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyon grupları.	88
Tablo 14. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon grupları.	94
Tablo 15. Neoplastik hücrelerde PD-L1 boyanma şiddeti.	97
Tablo 16. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünoekspresyon grupları.....	99
Tablo 17. Tümörü infitre eden lenfositlerde PD-L1 boyanma şiddeti.....	102
Tablo 18. İntratümöral CD163 immünoekspresyon grupları.....	104
Tablo 19. İntratümöral CD163 immünoekspresyon grupları.....	106

RESİM DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 1. Meme dokusunun mikroanatomik yapısı	10
Resim 2. Terminal duktal-lobüler ünite.	11
Resim 3. Tümörü infiltre eden lenfositler: Negatif	79
Resim 4. Tümörü infiltre eden lenfositler: Hafif.....	79
Resim 5. Tümörü infiltre eden lenfositler: Orta.	80
Resim 6. Tümörü infiltre eden lenfositler: Şiddetli.	80
Resim 7. İntratümöral CD8 immünekspresyonu: Negatif.	83
Resim 8. İntratümöral CD8 immünekspresyonu: Düşük.....	84
Resim 9. İntratümöral CD8 immünekspresyonu: Orta.	84
Resim 10. İntratümöral CD8 immünekspresyonu: Yüksek.	85
Resim 11. Stromal CD8 immünekspresyonu: Düşük.	85
Resim 12. Stromal CD8 immünekspresyonu: Orta.	86
Resim 13. Stromal CD8 immünekspresyonu: Yüksek.	86
Resim 14. İntratümöral FOXP3 immünekspresyonu: Negatif.	89
Resim 15. İntratümöral FOXP3 immünekspresyonu: Düşük.....	89
Resim 16. İntratümöral FOXP3 immünekspresyonu: Yüksek.....	90
Resim 17. Stromal FOXP3 immünekspresyonu: Negatif.	90
Resim 18. Stromal FOXP3 immünekspresyonu: Düşük.....	91
Resim 19. Stromal FOXP3 immünekspresyonu: Yüksek.....	91
Resim 20. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Negatif	95
Resim 21. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Hafif.....	96
Resim 22. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Orta.	96
Resim 23. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Şiddetli.	97

Resim 24. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Negatif.....	100
Resim 25. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Hafif.	100
Resim 26. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Orta.	101
Resim 27. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Şiddetli.	101
Resim 28. İntratümöral CD163 immünekspresyonu: Negatif.....	105
Resim 29. İntratümöral CD163 immünekspresyonu: Düşük.	105
Resim 30. İntratümöral CD163 immünekspresyonu: Yüksek.	106
Resim 31. Stromal CD163 immünekspresyonu: Düşük.	107
Resim 32. Stromal CD163 immünekspresyonu: Yüksek.....	107

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser tipidir [1, 2]. Tüm dünyada kadınlarda görülen kanserlerin %25'i meme kanseridir [3]. Türkiye'de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup, insidansı 43/100.000'dir [4]. Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölüm sebepleri arasında dünyada ve ülkemizde birinci sıradadır [2, 5].

Meme kanseri hastalarında en iyi bilinen prognostik ve prediktif faktörler, Östrojen reseptör (ER; *Estrogen Receptor*), Progesteron reseptör (PR; *Progesterone Receptor*) ve *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) ekspresyonudur. ER, PR ve HER2 eksprese etmeyen olgular triple negatif meme karsinomu (TNMK) olarak adlandırılır. TNMK, tüm meme kanserlerinin %15-20 kadarını oluşturur ve diğer meme kanseri tiplerine göre daha kötü prognoza sahiptir [6, 7]. Meme karsinomlarında tanımlanan diğer prognostik faktörler arasında hasta yaşı, tümör tipi, histolojik derece, evre ve proliferasyon düzeyi yer almaktadır [1]. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile yeni bir prognostik faktör grubu olarak immünolojik belirteçler gündeme gelmiştir. Tümör hücrelerine karşı geliştirilen immün yanıtın prognostik öneme sahip olduğu ve çeşitli immünoterapi ajanlarının hedefi olabileceği düşünülmektedir [8].

Tümör hücrelerine karşı geliştirilen immün yanıtta en önemli hücre grubu lenfositlerdir. Tümör mikroçevresinde yer alarak farklı immünolojik etkiler gösteren lenfositler tümörü infiltre eden lenfositler (TİL) olarak adlandırılmaktadır [9]. İmmün sistemde B ve T lenfosit olmak üzere iki temel lenfosit ailesi bulunmaktadır. TİL, T lenfosit ailesinde yer alır. TİL miktarı ve rolü hastaların prognozunda oldukça önemlidir [10]. TİL aktive edici veya inhibe edici olarak rol alabilmektedir. Aktive edici lenfositler, tümör karşıtı immün mekanizmaları aktive ederek anti-tümör etki göstermektedir. Bu lenfositler arasında en önemli grup sitotoksik T hücreleridir ve bunlar CD8 eksprese etmektedir [11, 12]. İnhibe edici lenfositler ise immün-supresif rol oynayarak tümör progresyonuna yol açmaktadır. İnhibe edici lenfositler arasında

en önemli grup regülatuar T lenfositlerdir ve bu lenfositler FOXP3 eksprese etmektedir [12-15].

Lenfositlerin tümör-yıkıcı görevinde Programlı hücre ölümü proteini 1 (PD1; “*Programmed cell death protein*”) / Programlı hücre ölümü ligandı 1 (PD-L1; *Programmed cell death ligand 1*) yolağı önemli rol oynamaktadır [16, 17]. T ve B lenfositlerin membranında yer alan bir molekül olan PD1; reseptörüne bağlandığında tümöre karşı sitotoksik yanıtı aktive etmektedir. Sitotoksik yanıtın çok şiddetli olduğu bazı durumlarda self-yıkım oluşabilmektedir. Olası self-yıkımı önlemek için PD-L1 molekülü fizyolojik şartlarda PD1’e bağlanarak düzenleyici bir görev üstlenmektedir. PD1/PD-L1 bağlantısı gerçekleştiğinde sitotoksik etki sonlanmaktadır. TNMK da dahil olmak üzere bazı kanser türlerinde, tümör hücrelerinin yüksek miktarda PD-L1 eksprese ettiği son çalışmalarla ortaya koyulmuştur [15, 18-20]. Tümör hücrelerinde eksprese edilen PD-L1 molekülü, lenfositlerdeki PD1’e bağlanarak PD1’in tümörü durdurucu etkisini sonlandırır. PD1 / PD-L1 yolağını hedef alan anti-PD-L1 immünoterapi ajanları küçük hücreli dışı akciğer kanseri, malign melanoma, mesane kanseri, böbrek hücreli karsinom ve Merkel hücreli karsinom gibi olgularda kullanıma girse de; yeterli literatür bilgisi bulunmadığından meme kanseri olgularında henüz rutin olarak kullanılmamaktadır [21-25].

Tümöre karşı immün yanıtta lenfositlerden sonra ikinci önemli hücre grubu makrofajlardır. Tümör ilişkili makrofajlar (TİM) aktive edici ve inhibe edici etkilere sahiptir. “M1 makrofaj” olarak adlandırılan aktive edici makrofajlar anti-tümör özelliğindedir. İnhibe edici makrofaj ailesi “M2 makrofaj” olarak adlandırılır. Tümör mikroçevresinde M2 makrofajların bulunması tümör invazyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi artırarak pro-tümörogenik etki eder. M2 makrofajlar CD163 eksprese etmektedir. TNMK olgularında CD163(+) makrofajları inceleyen çalışmalar bu belirtecin kötü prognostik bir parametre olabileceğini öne sürmüştür. Öte yandan M1 makrofajdan zengin tümör mikroçevresinin hasta sağkalımını uzattığı bildirilmiştir [15, 26].

TNMK kötü prognoza sahip olup diğer meme kanseri tiplerinde kullanılan klasik tedavi ajanlarına cevap vermemektedir. Bu nedenle TNMK olgularının medikal yönetiminde yeni terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır [27]. TNMK’nun

immünolojik temellerini daha iyi anlamak, prognozun immünolojik belirteçler ile ilişkisini incelemek ve uygun immünoterapi ajanları geliştirebilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızın amacı TNMK olgularında CD8, PD-L1, FOXP3 ve CD163 immünolojik belirteçlerinin ekspresyonunun saptanması ve bu belirteçlerin sağkalım ve diğer prognostik parametrelerle ilişkisinin incelenmesidir. Tümör mikroçevresinde yer alan immünolojik elemanların tanımlanması ve prognoz ile ilişkilerinin ortaya koyulması, TNMK olgularının takip ve tedavi sürecine katkıda bulunacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

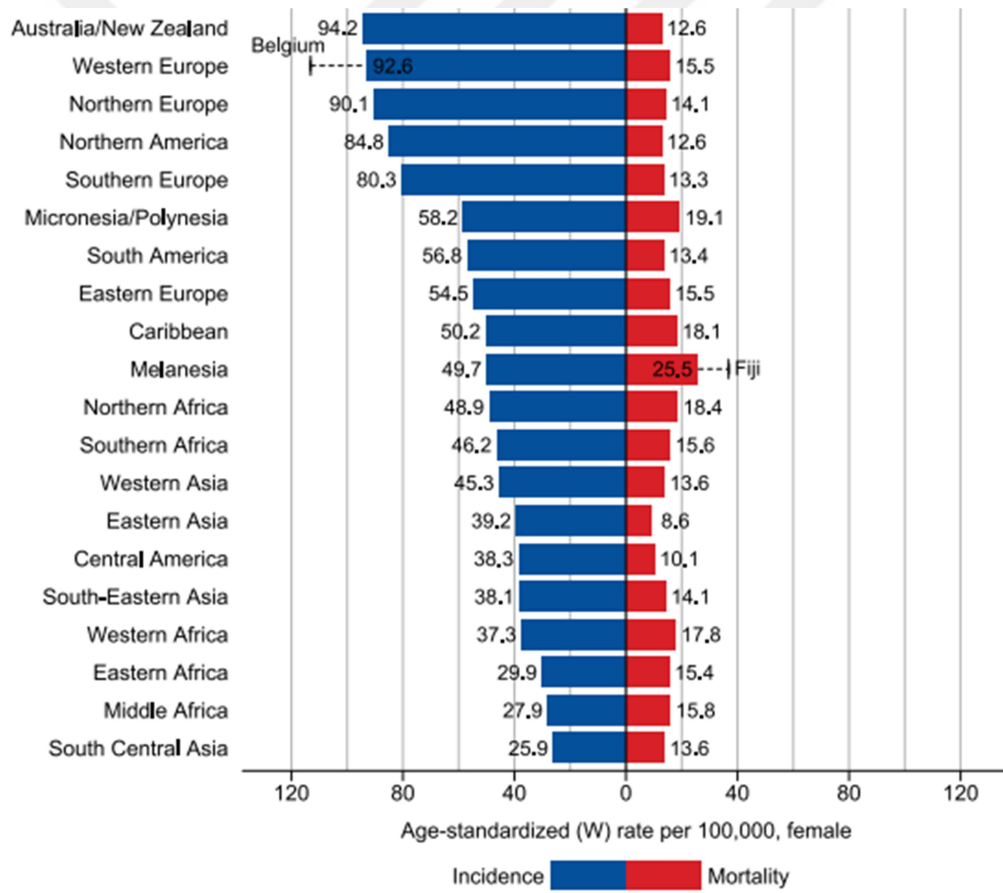
Meme kanseri tarihte bilinen en eski kanser tiplerinden biridir. Meme kanseri hakkında en eski bilgilerin milattan önce 1600 yılında Mısır'da yazıldığı keşfedilmiştir. Günümüzde meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir [1, 2].

Tüm dünyada kadınlarda görülen kanserlerin %25'i meme kanseridir [2]. Bu oran gelişmiş ülkelerde %27'yi bulmaktadır [3]. 75 yaş öncesi kadınlarda meme kanseri insidansı Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika gibi gelişmiş bölgelerde %6 iken, Güneydoğu Asya ve Sahraaltı Afrika gibi bölgelerde %2'dir [1]. Amerika Birleşik Devletleri'nde her 8 kadından birinde meme kanseri gelişmektedir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünyanın farklı bölgelerinde meme kanseri insidans ve mortalite oranları Şekil 1'de gösterilmiştir [2]. Tüm meme kanserlerinin %1'den azı erkeklerde gelişmektedir. Meme kanseri, erkeklerde görülen tüm kanser tiplerinin yalnızca %1'ini oluşturmaktadır [28].

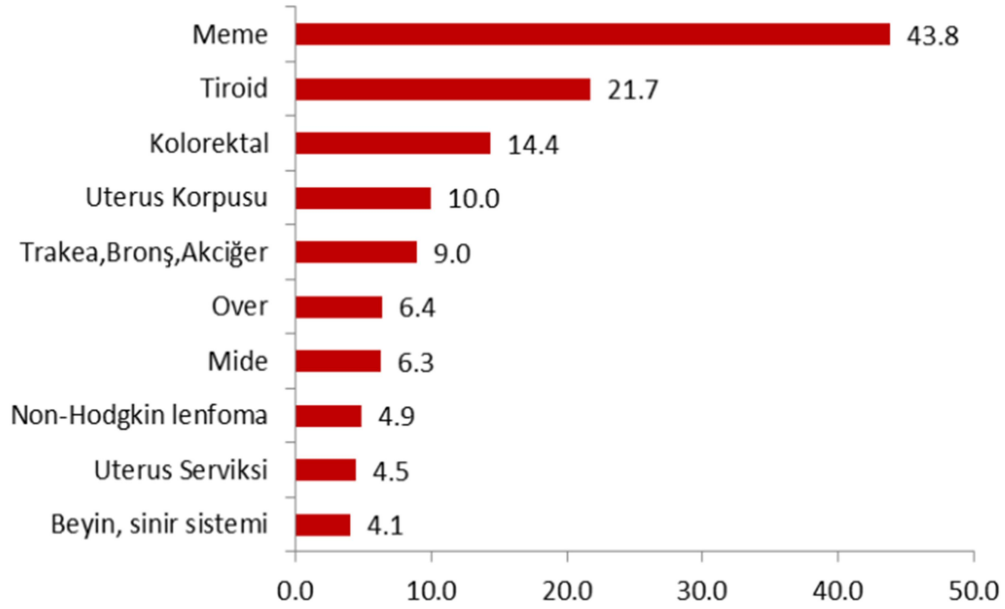
Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Kadınlarda en sık görülen on kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları şekil 2'de gösterilmiştir [29]. Türkiye'de kadınlarda meme kanseri insidansı 43/100.000'dir. Her yıl 17.531 kadın meme kanseri tanısı almaktadır. Kadınlarda görülen her 4 kanserden biri memeden gelişmektedir. Türkiye'nin batısında meme kanseri insidansı, doğusundakinden fazladır [4, 5].

Meme kanserine bağlı mortalite gelişmiş ülkelerde %15,4 iken, gelişmekte olan ülkelerde %14,3'tür [3, 30]. Dünya genelinde kansere bağlı kadın ölümlerinin en sık nedeni meme kanseridir [2]. Ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre incelendiğinde; kansere bağlı kadın ölümlerinin az gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmiş ülkelerde ikinci en sık nedeni meme kanseridir [3].

Meme kanseri, Türkiye’de kansere bağlı kadın ölümlerinin en sık nedenidir [5]. Tarama programlarının yaygınlaşması ve erken tanı oranının artması ile meme kanserine bağlı mortalite azalma eğilimi göstermiştir. 1990’lı yıllardan itibaren ikinci ve üçüncü kuşak kemoterapötiklerin anti-hormonal terapötikler ile kombine kullanımı, bununla birlikte hastalığın seyrini etkileyen yeni moleküler belirteçler tanımlanarak hedefe yönelik tedavi ajanlarının geliştirilmesi ile meme kanseri tedavisinde yeni bir süreç başlamıştır [1].



Şekil 1. Kadınlarda meme kanserinin bölge-spesifik insidans ve mortalitesi (Global Cancer Statistics, 2018).



Şekil 2. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide). (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri, Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015).

2.2. Embriyoloji

Meme dokusu, “süt çizgisi” veya “meme kristası” adı verilen yapılardan gelişir. Bu yapılar, mezenkimal indüksiyon ile oluşan kalın epidermal bantlardır. Embriyolojik süreçte ilk kez 6. haftada ortaya çıkarak aksilladan uyluk üst medialine kadar uzanım gösterirler ve bu hat boyunca meme tomurcuklarını oluştururlar. Normal meme lokalizasyonu dışında kalan meme tomurcukları gelişimlerini devam ettiremeyerek zamanla yok olur [31].

On beşinci haftada, epitelyal tomurcukların çevresinde mezenkimal kondensasyon başlar ve bunu solid epitelyal kordonların gelişimi izler. Bir solid epitelyal kordon bir meme lobunu oluşturur. Epitelyal kordonlardan salınan *transforming growth factor* (TGF) α hem mitojenik etki gösterir hem de östrojenin

proliferatif etkisini artırır. Meme stromasının gelişiminde ana mediatör TGF β 1'dir. Dallanıcı morfogenez epitelyal-stromal hücreler arasındaki *cross-talk* ile gerçekleşir. Myoepitelyal hücreler, 23 ile 28. haftalar arasında bazal hücrelerin diferansiyasyonu ile oluşur ve dallanmada önemli rol alır [32].

Yirminci hafta ile 32. hafta arasında, kollajenden zengin mezenkimal yağ dokuya transformasyonu gerçekleşir. Gestasyonun son iki ayında, epitelyal kordonların kanalizasyonu ve dallanması ile lobülo-alveolar yapı oluşur. Geç fetal süreçte epiderminin çökmesi ile meydana gelen meme çukuru, doğum sonrasında evajinasyon göstererek meme başını oluşturur.

Fetal meme gelişiminin ilk haftaları hormon-bağımsızdır. On beşinci haftadan itibaren ön planda testosteron olmak üzere maternal steroid hormonlar meme tomurcuklarından meme kanallarının oluşumunu indükler. Gestasyonun son haftalarına gelindiğinde; prolaktin, fetal meme dokusuna etki ederek sekretuar aktiviteyi indükler. Fetal meme dokusunda yüksek miktarda *bcl-2* ekspres edilir. *Bcl-2* apoptozu inhibe ederek meme gelişimini destekler. Doğumda süt kanalları büyük oranda gelişmiş olmakla birlikte, alveoler yapı az gelişmiş haldedir. Doğumdan itibaren *bcl-2* düzeyi düşer ve meme gelişimi puberteye kadar durur. Puberte ile birlikte meme gelişimi hormon-sensitif olarak devam eder [6, 31].

2.3. Anatomi, Histoloji ve İmmünprofil

2.3.1. Anatomi

Erişkin kadında meme dokusu dikey ekseninde ikinci ve altıncı kostaların arasında, yatay ekseninde ise sternum kenarı ile mid-aksiller çizginin arasında ekzantrik morfolojide yerleşmektedir. Memenin yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ü pektoralis majör kasının üzerinde bulunmaktadır. Meme dokusu lateralde *Spence* kuyruğu ile aksillaya uzanım göstermektedir. Memenin posterior yüzünde pektoral fasya yer almaktadır. Fasyanın infiltratif patolojilerden etkilenmesi halinde meme fiksasyonu

görülmektedir. Anteriyorda suspensör ligamanlar (Cooper ligamanları) ile dermise tutunmaktadır. Bu ligamanların infiltratif patolojilerden etkilenmesi durumunda deride çekintiler ve meme başında çökme olmaktadır.

Memenin arteryal kan akımı majör olarak internal mammarian arterden sağlanmaktadır. Buna aksillar arter ve interkostal arter farklı oranlarda destek olmaktadır . Yüzeyel venöz drenaj, internal torasik ven ile gerçekleşmektedir. Derin venöz drenaj, aksiller ven ve internal torasik ven ile sağlanır. Lenfatik drenajın %75'i aksiller lenf nodlarına dökülürken; kalanın tamamına yakını internal mammarian lenf nodlarına, çok küçük bir kısmı posterior interkostal lenf nodlarına dökülmektedir. Memenin inervasyonu torasik sinir dallarından sağlanmaktadır.

Kadınlarda meme dokusunun boyutu, ağırlığı ve dansitesi bireylerin vücut özelliklerine göre farklılık gösterebilir. Ortalama 10-12 cm çapta ve santralde 5-8 cm kalınlıktadır. Ağırlığı laktasyon dönemi dışında 150-250 gram kadardır. Laktasyon döneminde meme dokusunun ağırlığı 400 gramı bulabilir.

Meme dokusu yaklaşık 15-20 adet lobdan meydana gelmektedir. Lobları daha küçük lobül yapıları oluşturmaktadır. Her lobu drene eden bir toplayıcı duktus vardır. Toplayıcı duktus orifisinden kontrast madde enjekte edilerek lob yapısı radyolojik olarak ortaya koyulabilmektedir. Oysa anatomik veya histolojik olarak lob yapılarını ayırt etmek mümkün değildir [6, 33].

2.3.2. Histoloji

Meme başı - areola kompleksi yoğun pigmente, duysal sinir uçlarından zengin, keratinize skuamöz epitel ile örtülü sirküler bir alan olarak temsil edilmektedir. Kompleks pre-pubertal dönemde pigmente değildir. Pigmentasyon menarş ile başlayarak gebelikte kuvvetlenir. Skuamöz epitelde dağınık berrak sitoplazmalı hücreler yer almaktadır. Bu hücrelerin bir kısmı berrak sitoplazmalı keratinositler iken, bir kısmı epidermal yerleşimli benign meme duktusu hücreleridir (Toker hücreleri). Modifiye sebace bezler olan *Montgomery* bezleri bu bölgede bulunur ve duktuslar aracılığıyla aynı isimli tüberküllerine açılır. Laktasyon dönemi dışında

tüberküller keratin tıkaçları ile tıkanmıştır. Ayrıca meme başı dermisinde longitudinal ve ışınsal uzanımlı düz kas lifleri yer almaktadır. Bazı kadınlarda meme başında lobül yapısı saptanabilir.

Laktiferöz duktuslar meme başından terminal duktal-lobüler üniteye kadar uzanmaktadır. Meme başında laktiferöz duktuslar sirküler ve longitudinal tarzda uzanan düz kas lifleri, kollajen ve elastik lifler ile çevrilmiştir. Duktuslar, orifisten laktiferal sinüs seviyesindeki skuamokolumnar bileşkeye kadar skuamöz epitel ile döşelidir. Bu noktadan itibaren, lüminal yerleşimli epitelyal hücreler ve bazal yerleşimli myoepitelyal hücreler olmak üzere iki sıralı hücre tabakasından oluşur. Epitelyal hücreler farklı seviyelerde işlevlerine göre kolumnar, kübik ve yassı nal grup ile bazal grup arasındadır [ADDIN EN.CITE rı yassı, iğsi, oval ya da mekik benzeri morfolojide olabilmektedir. Sitoplazmaları eozinofilik veya berrak görülebilmektedir. Berrak sitoplazma özellikle siklusun luteal fazında beklenen bir bulgudur. Bazal lamina myoepitelyal hücre tabakasını çevreler. Duktuslarda görülebilen üçüncü hücre tipi progenitör (kök) hücrelerdir. Bu hücreler epitelyal ve myoepitelyal farklılaşma yeteneğine sahip olup duktus ve asinüs yapılarında dağınık halde ve az sayıda bulunmaktadır.

Meme dokusunun mikroanatomik yapısı çiçek açan ağaca benzetilmektedir (Resim 1) [34]. Lobülleri oluşturan asinüs yapıları ağacın çiçeklerini, duktüller ve duktuslar ise ağacın dallarını temsil etmektedir. Bir lobül ve bu lobüle ait terminal duktus birlikte terminal duktal-lobüler üniteyi oluşturmaktadır (Resim 2). Terminal duktal-lobüler ünite memenin fonksiyonel birimidir. İnvaziv karsinomlar da dahil olmak üzere pek çok meme patolojisi terminal duktal-lobüler üniteden gelişmektedir.

Meme stroması intra-lobüler ve inter-lobüler alanlarda farklı özellik göstermektedir. İntra-lobüler stroma, gevşek fibrovasküler özelliktedir. Yoğun retiküler lif bulundurmakla birlikte, elastik lif bulundurmaz. Bu stroma lenfoplazmasiter hücrelerden, makrofajlardan ve mast hücrelerinden zengindir. İnter-lobüler stroma ise yoğun kollajenize, hücreden fakir, yağ dokudan zengin niteliktedir. Peri-duktal alanda yoğun elastik lifler içermektedir. Bazen inter-lobüler stromada multi-nükleer dev hücreler bulunabilmektedir. Bu hücrelerin etiyojisi ve önemi belirsizdir. İki stroma birbirinden belirgin sınırla ayrılmaktadır [33].



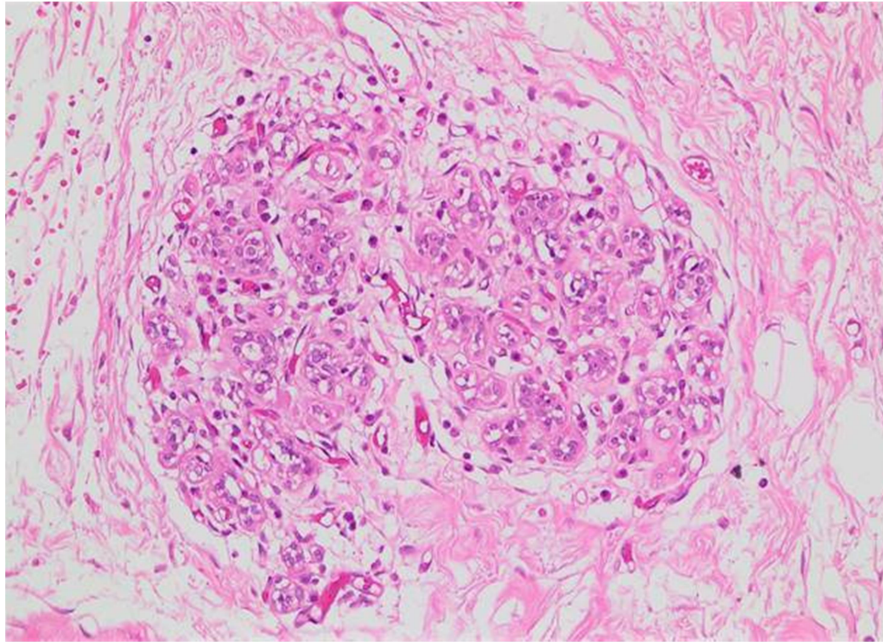
Resim 1. Meme dokusunun mikroanatomik yapısı (*Biopsy Interpretation of the Breast*, 2. edisyon). (ELD: Ekstralobüler duktus, TD: Terminal duktus, L: Lobüller).

Lobül histolojisi menstrüel siklus boyunca değişiklikler göstermektedir. Erken foliküler fazda, tek hücre tipi olarak soluk poligonal sitoplazmalı küçük eozinofilik hücreler görülmektedir. Myoepitelyal hücreler belirgin değildir. Stroma denstir ve bol fibroblast içerir. Geç foliküler fazda, luminal bazofilik hücreler, bunların dışında erken foliküler fazdaki soluk poligonal sitoplazmalı hücreler ve en dışta myoepitelyal hücreler olmak üzere üç hücre tabakası görülmektedir. Erken sekretuar fazda, bazofilik hücrelerde küçük apikal çıkıntılar başlamakta, myoepitelyal hücreler berraklaşmakta ve stroma ödemlenmektedir. Geç luteal fazda, apikal çıkıntılar belirginleşmekte ve myoepitelyal hücrelerde vakuolizasyon saptanmaktadır. Bu fazda mitotik aktivite belirgindir. Luminal apokrin sekret görülebilir. Menstrüasyon fazında, bazofilik ve myoepitelyal hücrelerden oluşan iki tip hücre izlenmektedir. Stroma dens görünüm almaktadır.

Kadınlarda meme dokusunun gelişimi gebelikte tamamlanmaktadır. İlk trimesterden itibaren östrojen, progesteron, prolaktin, büyüme hormonu, insülin ve

adrenal kortikosteroidlerin etkisi ile meme gelişimi uyarılır. Lobül ve asinüsler hem sayıca artmakta, hem de boyutça büyümektedir. Lobülo-alveolar diferansiyasyon izlenir. Gebelik haftası ilerledikçe epitelyal hücrelerde vakuolizasyon belirginleşir ve lümenler sekret ile dolarak genişler. Laktasyon dönemindeki meme dokusunda, sekretlerini atmakta olan apikal kısımlarını kaybetmiş vakuolize hücrelerin kabarcık benzeri morfolojide lümene uzandıkları saptanır. Mitotik aktivite artmıştır. Gebelik ve laktasyon sürecinde myoepitelyal hücreler gerilemektedir ve görünülükleri azalmıştır.

Postmenopozal dönemde, östrojen ve progesteron düzeylerindeki azalma ile birlikte terminal duktal-lobüler ünitelerde atrofi ve involüsyon görülmektedir. İntra-lobüler stroma kaybolur, asinüsler küçülür, duktuslarda ektazi gelişebilir. Glandüler ve kollajenöz dokular geriledikçe bunların yerine adipöz doku almaktadır. İlerleyen dönemde adipöz doku içinde sıkışmış halde çıplak veya hyalinize stroma ile çevrili atrofik asinüs ve duktus yapıları dikkati çeker [6, 33, 34].



Resim 2. Terminal duktal-lobüler ünite.

2.3.3. İmmünprofil

Duktal ve lobüler epitelyal hücreler sitokeratin (SK) 7, SK8, SK18 ve SK19 gibi düşük molekül ağırlıklı SK'leri eksprese etmektedir. ER- α ve PR ile az sayıda epitelyal hücrede, dağınık, heterojen nükleer immünreaktivite görülmektedir. ER- α eksprese eden hücrelerin proliferasyon indeksi düşüktür. Menstrüel siklusun foliküler fazında ER- α ekspresyonu luteal faza göre daha fazla olmaktadır. Yaşla birlikte ER- α eksprese eden hücrelerin sayısında artış beklenmektedir. Ayrıca epitelyal hücreler diğer ER alt tipi olan ER- β ekspresyonu da göstermektedir. ER- β ekspresyonu menstrüel siklusun fazlarına göre değişmemektedir. Yüksek ER- β ekspresyonu, yüksek ER- α ekspresyonunun aksine, neoplastik progresyondan koruyucu etki göstermektedir [35]. Epitelyal hücrelerde anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 ekspresyonu da görülmektedir. Bazı epitelyal hücrelerde S100 protein ile immünreaktivite izlenebilir. Epitelyal hücrelerde eksprese edilen diğer proteinler arasında mamogobulin, laktalbumin, *Gross Cystic Disease Fluid Protein-15* (GCDFP-15), *GATA binding protein-3*, kazein ve c-kit yer almaktadır. Androjen reseptör (AR) ile dağınık ve heterojen immünreaktivite görülebilmektedir [33, 36].

Myoepitelyal hücreler SK 5/6, SK 14, SK 17 gibi yüksek molekül ağırlıklı SK'ler ile immünreaktivite göstermektedir. SK 14 büyük ve terminal duktuslardaki myoepitelyal hücrelerde eksprese edilirken, intra-lobüler myoepitelyal hücrelerde eksprese edilmemektedir. Ek olarak, myoepitelyal hücreler S100 protein, P63, CD10, düz kas aktini, kasa spesifik aktin, düz kas miyozin ağır zinciri ve kalponin gibi belirteçler ile de immünreaktivite vermektedir. Myoepitelyal hücrelerde ER- α ekspresyonu görülmezken, ER- β ekspresyonu izlenmektedir. Ayrıca ER- β 'nin meme dokusunda endotelyal ve stromal hücrelerde de eksprese edildiği bilinmektedir.

Memenin progenitör hücrelerinde SK 5, SK 14, CD44 ve aldehit dehidrogenaz-1 ekspresyonu izlenmektedir. Bu hücreler spesifik epitelyal ve myoepitelyal belirteçler ile immünreaktivite vermezler. Progenitör hücrelerde ER ve PR ekspresyonu tipik olarak görülmemektedir. CD24 ekspresyonu hiç yoktur veya çok düşüktür [33, 34].

2.4. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri etiyojisi multifaktöriyeldir (Tablo 1) [6, 37]. Hormonlar, reproduktif faktörler, yaşam tarzı ve genetik etmenler etiyojide rol almaktadır. Kadın cinsiyet ve ileri yaş meme kanseri için risk faktörleri arasındadır. Etiyojide radyasyon maruziyeti, alkol kullanımı ve ekzojen hormonlar gibi çevresel faktörler de tanımlanmıştır. Bununla birlikte meme kanseri olgularının çoğunda mevcut risk faktörlerini spesifiye etmek mümkün olmamaktadır [1].

Tablo 1. Meme karsinomunda risk faktörleri ve relatif risk grupları.

Faktör	Relatif Risk Grubu
Kadın cinsiyet	Yüksek
İleri yaş	Yüksek
Kuzey Amerika ve Avrupa	Yüksek
BRCA 1/2	Yüksek
İki kişide aile öyküsü	Yüksek
Bir kişide aile öyküsü	Orta
Diğer memede karsinom öyküsü	Yüksek
Mamografik dansite >%75	Yüksek
Mamografik dansite %5 - %75	Orta
Mamografik dansite <%5	Düşük
Biyopside atipili hiperlazi	Orta
Erken menarş	Düşük
Geç menopoz	Düşük
İlk gebelik >30 yaş	Düşük
Nullipar	Düşük
Hormon replasman terapisi	Düşük

Ailesel kümelenme, meme kanseri olgularında diğer neoplazilerde olduğundan daha fazla görülmektedir. Annesinde ve kız kardeşinde meme kanseri

saptanan bir kadının meme kanseri geliştirme riski 2-3 kat artmıştır [38]. Tüm meme kansinomlarının %7 kadarının aileden aktarılmış genlerden kaynaklandığı düşünülmektedir [37].

Tanımlanan ilk meme kansinomu ilişkili gen *Breast Cancer Gene* (BRCA) 1'dir. *BRCA 1* mutasyonu saptanan bir kadında meme kanseri gelişme riski, aile öyküsü de varsa %80-85; aile öyküsü yoksa %55-70 kadardır [39]. Meme kansinomlarında, herediter ve somatik *BRCA1/2* mutasyonları, *BRCA1 promoter* metilasyonu ve düşük *BRCA1* protein ekspresyonu gibi *BRCA* disfonksiyonları tanımlanmıştır [40]. *BRCA* disfonksiyonu, başta bazal benzeri ve medüller benzeri özellikler gösteren lenfosit-baskın kansinomlar olmak üzere, daha çok triple negatif kansinomlar ve bilateral kansinomlar ile ilişkilidir [1, 40]. *BRCA1* ilişkili meme kansinomlarının yaklaşık %80'ini TNMK oluştursa da, TNMK olgularının yalnızca küçük bir bölümü *BRCA* ilişkilidir [41-43]. Ayrıca *P53* mutasyonları, ataksi telenjiektazi ve Ha-ras polimorfizmi meme kanseri ilişkili genetik alterasyonlar arasındadır. Östrojen sentezi ve metabolizmasında görev alan sitokromlardaki genetik polimorfizmler de meme kanseri riskini artırmaktadır [37, 44].

Hayvansal yağ ve proteinden zengin yüksek kalorili diyet ve fiziksel inaktivite ile karakterize "Batılı yaşam tarzı" meme kanseri gelişiminde önemli bir etkidir. Diyetle A, C, B vitaminleri, selenyum, folat ve soya proteinine yer vermenin meme kanseri riskini azalttığına dair yayınlar vardır. Soya proteinindeki fito-östrojenlerin tamoksifen benzeri etki gösterdiği düşünülmektedir. Postmenopozal kadınlarda yüksek beden kitle indeksi meme kanseri riskini artırmaktadır. Premenopozal kadınlarda ise yüksek beden kitle indeksinin anovulatuvar sikulaslara neden olarak meme kanseri riskini azaltabileceği düşünülmektedir [1, 37, 45, 46].

Endojen hormonlar meme kanseri etiyolojisinde yer almaktadır. Premonopozal ve postmenopozal kadınlarda yüksek östrojen, testosteron ve prolaktin düzeyleri meme kanseri riskini artırmaktadır. Bu olgularda özellikle ER-pozitif kanserler görülmektedir. Serum progesteron ve seks hormon bağlayıcı protein düzeyleri ile meme kanseri arasında ilişki saptanmamıştır. Geç menarş, erken menopoz, 30 yaşından önce parite, multiparite ve laktasyon meme kanserinden koruyucu etki göstermektedir [1].

Ekzojen hormonlar meme kanseri etiyolojisinde yer alan düşük rölatif riskli faktörlerdendir. Oral kontraseptif kullanmakta olan veya kullanımını son dört sene içinde sonlandıran kadınlarda rölatif risk 1,07'dir. Oral kontraseptif kullanımını sonlandırdıktan on sene sonra meme kanseri riski genel popülasyon ile eşitlenmektedir. Postmenopozal östrojen replasman tedavisi alan olgularda meme kanseri riski biraz daha yüksek bulunmuştur. Beş yıl veya daha uzun süre replasman tedavisi alan ileri yaşlı kadınlarda risk %30-50 oranında artmıştır. Bu olgularda endometriyumu korumak amacıyla östrojeni progesterin ile kombine etmek yaygın bir yaklaşımdır. Ancak, endometriyum kanserinden farklı olarak, kombine tedavi meme kanserinden koruyucu değildir [37, 47-49].

Mamografik dansite, memenin non-radyolüsen özellikteki glandüler ve fibröz komponentlerini göstermektedir. Postmenopozal kadınlarda yüksek mamografik dansite meme kanseri riskini en az 4 kat artırmaktadır [50]. Alkol kullanımı meme kanseri riskini bir miktar artırırken, sigara kullanımı anti-östrojenik etki ile meme kanseri riskini azaltabilmektedir. Bununla birlikte N-asetil transferaz enzimi yavaş morfolojide olan kadınlarda sigara kullanımının meme kanseri riskini artırdığına dair çalışmalar mevcuttur [1, 37, 46].

Benign proliferatif meme lezyonlarından bazıları meme karsinomu için rölatif risk taşımaktadır. Atipisiz florid hiperplazi, kompleks fibroadenom, atipiz papillom ve sklerozan adenozis olgularında meme karsinomu riski hafifçe artmıştır (rölatif risk: 1,5-2). Atipili duktal hiperplazi ve atipili lobüler hiperplazi olgularında meme kanseri riski yaklaşık 4 kat artmıştır. Adenozis (sklerozan adenozis hariç), duktal ektazi, fibroadenom (kompleks fibroadenom hariç), fibrozis, mastit, atipisiz hafif hiperplazi, kistik değişiklik, apokrin metaplazi ve skuamöz metaplazi gibi diğer benign meme lezyonlarında meme karsinomu riski artmamıştır [6, 51].

2.5. Sınıflama ve İnvaziv Meme Karsinomu Alt Tipleri

Meme tümörleri sınıflamasında güncel Dünya Sağlık Örgütü sınıflama sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2 ve 3). Bu sınıflamada epitelyal, mezenkimal, fibroepitelyal

tümörler, meme başı tümörleri ve malign lenfomalar alttipleri ile birlikte listelenmektedir. Ayrıca metastatik tümörler, erkek memesine ait tümörler ve klinik meme karsinomu paternleri de sınıflamada yer almaktadır.

2.5.1. İnvaziv karsinom, “No special type” (Özelleşmiş olmayan tip)

Özelleşmiş olmayan meme karsinomu tipini ifade eden “invaziv karsinom, *no special type* (NST)” en sık görülen meme karsinomu tipidir. Farklı serilerde tüm meme karsinomlarının %50-80 kadarını oluşturduğu saptanmıştır. Literatürde “invaziv duktal karsinom” ve “invaziv karsinom, *not otherwise specified* (NOS)” isimleriyle de geçmektedir. “Duktal” ismi bu karsinomun özel olarak duktal sistemden köken aldığını ifade etmemektedir. Tüm meme karsinomları gibi invaziv karsinom, NST de sıklıkla terminal duktal-lobüler ünitelerden gelişmektedir [1].

Makroskopik olarak krem-kirli beyaz renkte olup sıklıkla nekrotik alanları temsil eden sarı-beyaz tebeşirimsi çizgilenmeler içermektedir. Palpasyonu serttir. Bıçak ile kesit uygulanırken kumsu hissedilebilmektedir. Olguların çoğu düzensiz sınırlı, yıldızsı, çevre meme dokusunu infiltre eden morfolojidedir. Bazı olguların iyi sınırlı, ekspansil, nodüler özellikte olabileceği bilinmektedir [1, 6].

Mikroskopik bulgular olgudan olguya farklılık gösterebilmektedir. Tümör hücreleri kordlar, kümeler, trabeküller veya solid adalar oluşturabilir. Sinsityal büyüme paterni izlenebilir. Diferansiyasyon derecesine göre farklı oranlarda tubül yapıları oluşturabilir. Bazı invaziv karsinom, NST olgularında tek hücre paterni, tek sıralı hücre dizileri ve targetoid patern saptanabilmektedir. Bu olgularda sitomorfolojik özelliklerin, invaziv lobüler karsinomun karakteristik özelliklerine uymadığına dikkat edilmedilir. Olguların %80 kadarında duktal karsinoma in situ (DKIS) saptanabilir. DKIS odağının histolojik derecesi genellikle invaziv karsinomun histolojik derecesi ile aynı olmaktadır. Farklı yaygınlıklarda lenfovasküler ve perinöral invazyon izlenebilir. Stromada fibroblastik proliferasyon,

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü Meme Tümörleri Sınıflaması: Epitelyal Tümörler

Mikroinvaziv karsinom	
İnvaziv meme karsinomu	İnvaziv karsinom, NST
	İnvaziv lobüler karsinom
	Tübüler karsinom
	Kribriform karsinom
	Müsinöz karsinom
	Medüller özellikler gösteren karsinom
	Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom
	Taşlı yüzük hücreli diferansiyasyon gösteren karsinom
	İnvaziv mikropapiller karsinom
	Metaplastik karsinom
	Nöroendokrin özellik gösteren karsinom
	Sekretuar karsinom
	İnvaziv papiller karsinom
	Asinik hücreli karsinom
	Mukoepidermoid karsinom
	Polimorfik karsinom
	Onkositik karsinom
	Lipidden zengin karsinom
	Glikojenden zengin berrak hücreli karsinom
Sebaseöz karsinom	
Tükrük bezi / deri eki tipi tümörler	
Epitelyal/myoepitelyal tümörler	Pleomorfik adenom
	Adenomyoepitelyoma +/- karsinoma
	Adenoid kistik karsinom
Prekürsör lezyonlar	Duktal karsinoma in situ
	Lobüler karsinoma in situ
	Atipik lobüler hiperplazi
İntraduktal proliferatif lezyonlar	Basit duktal hiperplazi
	Kolumnar hücre lezyonları
	Atipili duktal hiperplazi
Papiller lezyonlar	İntraduktal papillom
	İntraduktal papiller karsinom
	Enkapsüle papiller karsinom
	Solid papiller karsinom
Benign proliferasyonlar	Sklerozan adenozis
	Apokrin adenozis
	Mikroglandüler adenozis
	Kompleks sklerozan lezyon / Radial skar
	Adenomlar

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü Meme Tümörleri Sınıflaması: Diğer Tümörler

Mezenkimal Tümörler	Nodüler fasiitis
	Myofibroblastom
	Desmoid fibromatozis
	İnflamatuvar myofibroblastik tümör
	Benign vasküler lezyonlar
	Psödoanjomatöz stromal hiperlazi
	Granüler hücreli tümör
	Benign periferik sinir kılıfı tümörleri
	Lipom
	Liposarkom
	Anjiosarkom
	Rhabdomyosarkom
	Osteosarkom
	Leiomyom
	Leiomyosarkom
Fibroepitelyal lezyonlar	Fibroadenom
	Filloides tümör
	Hamartom
Meme başı tümörleri	Meme başı adenomu
	Siringomatöz tümör
	Paget hastalığı
Malign lenfomalar	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
	Burkitt lenfoma
	T hücreli lenfoma
	Ekstranodal marjinal zon B hücreli lenfoma
	Foliküler lenfoma
Metastatik tümörler	
Erkek meme tümörleri	Jinekomasti
	İnvaziv / in situ karsinom
Klinik paternler	İnflamatuvar karsinom
	Bilateral karsinom

hyalinizasyon, elastoziş görülebilmektedir. Elastozişin ER pozitifliği ile korele olabileceği düşünölmektedir [52]. Nekroz, kalsifikasyon ve sekonder kistik dejenerasyon odakları eşlik edebilir. Farklı yoğunluklarda peritümöral lenfositik yanıt saptanabilir. Pleomorfik karsinom, osteoklast benzeri stromal dev hücreler içeren karsinom, koryokarsinomatöz özellikler gösteren karsinom, melanotik özellikler gösteren karsinom gibi nadir morfolojik varyantlar görülebilmektedir [1].

Bazı olgularda morfolojik olarak birden fazla tümör tipi saptanabilmektedir. Bu olgularda NST komponenti %50'den fazla ise, invaziv karsinom NST olarak tanımlanmaktadır. NST komponenti %10 ile %49 arasında ise, mikst karsinom ismi verilmektedir. Mikst karsinomlar, NST + özel tip karsinom ve NST + loböler karsinom olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

İnvaziv karsinom, NST olgularının %70-80 kadarı ER pozitifdir. HER2 pozitifliği yaklaşık %15 olguda izlenmektedir. Olgularda sıklıkla kromozom 17 kaybı görölmektedir. On yıllık sağkalım %35-50 arasındadır [1].

2.5.2. İnvaziv loböler karsinom

İnvaziv loböler karsinom, tüm meme karsinomlarının %5-15 kadarını oluşturmaktadır [1]. Çoğunlukla memenin santralinde, kötü sınırlı, geniş çaplı kitle veya arkitektürel bozukluk şeklinde ortaya çıkmaktadır [53]. Bilateral ve multisentrik saptanma ihtimali invaziv karsinom, NST'den daha yüksektir [1].

İnvaziv loböler karsinomun en önemli özelliği tümör hücrelerinin kohezyon göstermemesidir. Bu özellik *e-cadherin* mutasyonundan kaynaklanmaktadır ve immünohistokimyasal olarak *e-cadherin* ekspresyon kaybı gösterilebilmektedir. Nadir olguda aberan *e-cadherin* ekspresyonu da saptanabilmektedir. Klasik invaziv loböler karsinom tek sıralı kordonlar (*indian file*) yapan, duktusların çevresinde hedef tahtası benzeri (*targetoid*) paternde yerleşen veya dağınık halde tek tek duran küçük yuvarlak-oval nükleuslu, belirgin olmayan nükleoluslu, dar sitoplazmalı, belirgin atipi veya pleomorfizm göstermeyen uniform tümör hücrelerinden oluşur. Taşlı yüzük hücreleri saptanabilir. Solid tip invaziv loböler karsinom da klasik tip ile benzer sitolojik özellikleri taşımakla birlikte bir miktar atipi gösteren hücrelerin

tabakalar ve solid adalar halinde bulunduğu görülür. Tubülobübler karsinomda tubübler ve klasik lobübler büyüme paternleri bir arada bulunmaktadır. Pleomorfik lobübler karsinomda tümör hücreleri belirgin atipi, pleomorfizm ve yüksek mitotik indeks göstermektedir [1]. Pleomorfik lobübler karsinomun histiyosit benzeri, buzlu cam sitoplazmalı, görece düşük atipili ve apokrin diferansiyasyon gösteren varyantına histiyositoid meme karsinomu adı verilmektedir [54].

Klasik invaziv lobübler karsinom olgularında tümör hücreleri ER pozitif, PR pozitif, HER2 negatif özelliktedir. Pleomorfik lobübler karsinom olgularında HER2 pozitifliği, ER negatifliği veya triple negatif özellik izlenebilmektedir. Lobübler karsinomda sıklıkla kromozom 16q kaybı, 16p ve 1q kazanımı görülmektedir [1].

2.5.3. Tubübler karsinom

Tübübler karsinom tüm invaziv meme karsinomlarının %2 kadarını oluşturmaktadır. İnvaziv karsinom, NST ile karşılaştırıldığında tümörün daha küçük boyutlu olması ve lenf nodu tutulumunun daha nadir olması dikkat çekicidir. Mikroskopik olarak tümörün %90'dan fazlası tek sıralı tümör hücrelerinin oluşturduğu, lümeni açık, yuvarlak veya oval angüle tubül yapılarından oluşmaktadır. Tümör hücrelerinde pleomorfizm, nükleol belirginliği veya yüksek mitotik indeks beklenmez. Tümör yoğun, fibroblastlardan zengin, selüler, desmoplastik bir stromaya sahiptir. Tübübler patern tümörün %50-90 kadarını oluşturuyor ve geri kalanında farklı bir meme karsinomu paterni izleniyorsa, bu olgular mikst karsinom olarak adlandırılır. Tübübler karsinom olgularında prognoz çok iyidir [1].

2.5.4. Kribriform karsinom

Literatürdeki farklı çalışmalara göre, invaziv meme karsinomlarının %0,3 ila %4 kadarını kribriform karsinomlar oluşturmaktadır [55, 56]. İnvaziv kribriform karsinomlar pür ya da mikst olarak görülebilmektedir. Pür kribriform karsinomda

tümörün %90'dan fazlası elek benzeir kribrifom adalardan oluşmaktadır. Lümenlerde müsün benzeri sekret veya mikrokalsifikasyon saptanabilir. Tümör hücreleri hafif-orta derecede pleomorfizm gösterebilir. Mitotik indeks düşüktür. Olguların %80 kadarında kribriform tipte duktal karsinoma in situ eşlik etmektedir. İnvaziv kribriform karsinom olgularında prognoz oldukça iyidir [1].

2.5.5. Müsinöz karsinom

Pür müsünöz karsinomlar tüm invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Makroskopik incelemede parlak yüzeyle, jelatinöz, ekspansil kitle saptanır. Histopatolojik olarak, ince fibröz septalarla bölünmüş müsün gölleri ve bu göllerin içinde yüzen tümör hücreleri ile karakterizedir. Tip A müsünöz karsinomlar müsün göllerinden zengin olup hiposelülerdir, nöroendokrin diferansiyasyon beklenmez. Tip B müsünöz karsinomlar geniş tümör hücre kümeleri içerir; hiperselüler olup sıklıkla nöroendokrin diferansiyasyon saptanır. Müsinöz karsinom olgularında prognoz oldukça iyidir [1].

2.5.6. Medüller özellikler gösteren karsinom (Lenfosit-baskın karsinom)

Dünya Sağlık Örgütüne göre medüller özellikler gösteren karsinom başlığı altında, klasik medüller karsinom, atipik medüller karsinom ve bir grup invaziv karsinom, NST yer almaktadır. Klasik medüller karsinom tüm meme karsinomlarının %1'den azını oluşturmaktadır. Olguların %26'sı 35 yaşından genç kadınlarda görülmektedir. Makroskopik olarak iyi sınırlı, itici tarzda, yer yer nekroz ve hemoraji odakları içerebilen kitle ile karakterizedir.

Klasik medüller karsinomun beş tanı kriteri vardır. Tümör hücrelerinin %75'ten fazlası sinsityal patern göstermektedir. Histopatolojik olarak tümörün yuvarlak ve itici hatlara sahip olduğu saptanır. Tubüler diferansiyasyon görülmez. Tümör stromasının %75'ten fazlasını oluşturan diffüz ve yoğun lenfoplazmatik

infiltrat izlenir. Tümör hücreleri pleomorfik, veziküler nükleuslu, belirgin nükleoluslu ve geniş sitoplazmalı olup yüksek mitotik indeks gösterir. Bu kriterlerin tamamını sağlayan tümörler klasik medüller karsinom adını almaktadır.

Tanımlanan beş kriteri tam olarak karşılamayan tümörler atipik medüller karsinom ve/veya medüller özellikler gösteren invaziv karsinom, NST olarak tanımlanmaktadır. Tanımlanan kriterlerin günlük pratikte kullanımında gözlemciler arası farklılığın yüksek olduğu dikkati çekmiştir. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü klasik medüller karsinom, atipik medüller karsinom ve medüller özellikler gösteren invaziv karsinom, NST olgularının “Medüller özellikler gösteren karsinom” başlığı ile raporlanmasını önermektedir.

Dünya Sağlık Örgütünün “Medüller özellikler gösteren karsinom” terimine karşılık olarak, son çalışmalarda “Lenfosit-baskın meme karsinomu” (LBMK) terimi kullanılmaya başlanmıştır. LBMK, tümör stromasında yüksek miktarda TİL içeren karsinomları ifade etmektedir. Lenfosit-baskın karsinomların diğer meme karsinomlarından çok daha iyi prognoz göstermesi, LBMK olgularını yeni bir histolojik tip olarak tanımlama ihtiyacını doğurmuştur. LBMK olgularını tanımlarken minimum TİL yüzdesi için farklı çalışmalar %30 [57], %40 [58], %50 [9, 57, 59, 60] ve %60 [9, 61] değerlerini kullanmıştır. Ohtani ve arkadaşlarına göre, minimum TİL miktarı %30 kabul edilerek belirlenen LBMK olguları, Dünya Sağlık Örgütünün “Medüller özellikler gösteren karsinom” tanımındaki olgulara tam olarak karşılık gelmektedir [57]. TİL Çalışma Grubu, tümör hücresinden çok lenfosit içeren olgularda LBMK teriminin kullanımını önermiş olup, minimum tanısal TİL miktarını %50 ila %60 olarak kabul etmiştir [9].

Medüller özellikler gösteren ve lenfosit-baskın karsinomlarda tümör hücreleri genellikle triple negatif özelliktedir. Proliferasyon indeksi yüksektir. Bazı olgularda bazal benzeri özellikler saptanabilir. Farklı oranlarda SK 5/6, SK 14, düz kas aktini ve *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ile ekspresyon izlenebilmektedir. Sıklıkla *TP53* mutasyonu saptanmaktadır. *BRCA1* mutasyonlu hastalarda görülen karsinomlar sıklıkla medüller özellikler göstermektedir. Yüksek histolojik derecede olmasına karşın iyi prognozludur. On yıllık sağkalım yaklaşık %95 olup prognoz aynı histolojik derecedeki invaziv karsinom, NST olgularından çok daha iyidir [1].

2.5.7. Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom

İnvaziv karsinom, NST ve diğer meme karsinomlarında fokal apokrin diferansiyasyon genellikle izlenmektedir. Duktal karsinoma in situ ve lobüler karsinoma in situ olgularında da sıklıkla apokrin diferansiyasyon saptanmaktadır. Yaygın apokrin diferansiyasyon gösteren olgular tüm meme karsinomlarının yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır.

Mikroskopik incelemede geniş granüler eozinofilik sitoplazmalı A tipi tümör hücreleri ve lipitten zengin vakuollü sitoplazmalı B tipi tümör hücreleri izlenmektedir. Tümör hücreleri iri yuvarlak nükleusa ve belirgin kiraz kırmızısı nükleolusa sahiptir.

Apokrin karsinom olguları immünohistokimyasal ve moleküler incelemede apokrin imza adı verilen özel bir profil sergiler. ER ve PR negatifliği, AR ve HER2 pozitifliği apokrin imzanın en önemli özellikleridir. Bununla birlikte, olguların yarısına yakınında HER2 negatifliği görülebilmektedir. ER izotiplerine tek tek bakıldığında, apokrin karsinom hücrelerinde ER- β ve ER- $\alpha 36$ ekspresyonu görülmektedir. ER- $\alpha 36$ sitoplazmik ve membranöz ekspresyon gösteren özel bir ER izotipidir. Ayrıca apokrin diferansiyasyon belirteci olan GCDFP-15 ile tümör hücrelerinde immünreaktivite saptanabilir [1, 6].

2.5.8. İnvaziv mikropapiller karsinom

İnvaziv mikropapiller karsinom, tüm meme karsinomlarının %1-2 kadarını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, mikropapiller patern tüm meme karsinomlarının yaklaşık %7'sine eşlik etmektedir.

İnvaziv mikropapiller karsinom, fibrovasküler kor içermeyen, ters polarite gösteren, ters yüz paternde dizilmiş, morula benzeri tümör agregatlarından oluşmaktadır. Ters yüz patern Epitelyal Membran Antijen immünohistokimyası ile gösterilebilir. Tümör agregatları temiz stromal boşluklarla çevrilidir. Lenfatik invazyon sıklıktır.

Tümör hücreleri ER ve PR ekspresyonu göstermektedir. HER2 amplifikasyonu yaklaşık %10-30 vakada saptanmaktadır. İnvaziv mikropapiller karsinom olgularından lenfatik invazyon ve lenf nodu pozitifliği sık olduğundan, mikropapiller fenotipin bağımsız prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir [1].

2.5.9. Metaplastik karsinom

Metaplastik karsinom başlığı, tümör hücrelerinin skuamöz ve/veya mezenkimal diferansiyasyon gösterdiği heterojen bir grup tümörü kapsamaktadır. Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom, skuamöz hücreli karsinom, fibromatozis benzeri karsinom, içsi hücreli karsinom ve mezenkimal (kondroid, osteoid, rabdoid ve benzeri) diferansiyasyon gösteren karsinomlar bu grupta yer almaktadır. Metaplastik karsinomlar tüm meme karsinomlarının yaklaşık %0,2-5 kadarını oluşturur.

Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom olgularında glandüler ve tübüler diferansiyasyon gösteren tümör hücreleri ile solid skuamöz adalar bir arada yer almaktadır. Skuamöz *pearl* yapıları, kistik dejenerasyon odakları ve özellikle tümör periferinde olmak üzere *cannon ball* yapıları görülebilmektedir. Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom olguları infiltratif sınırlarla karakterize olup lokal nüks sıktır.

Skuamöz hücreli karsinom olgularının makroskopisinde sıklıkla kistik dejenerasyon ve kavite oluşumları görülmektedir. Tümör hücrelerinde pleomorfizm ve atipi belirgindir. Tümör stromasında lenfositik inflamatuvar yanıt sıklıkla izlenmektedir. Genellikle, invaziv karsinom, NST veya lenfosit-baskın karsinomlar ile mikst olarak bulunur. Memede pür skuamöz hücreli karsinom saptandığında, primer kabul edilmeden önce başta deri olmak üzere diğer olası primer odaklar ekarte edilmelidir.

Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom içsi, soluk eozinofilik sitoplazmalı, ince fuziform nükleoslu tümör hücreleri ile karakterizedir. Tümör hücreleri dalgalı fasiküller şeklinde uzanım göstermektedir. Zeminde farklı yoğunluklarda kollajenizasyon izlenebilir.

İğsi hücreli karsinom geniş bir spektrumun içinde yer almaktadır. Spektrumun bir ucunda iğsi hücreli skuamöz hücreli karsinom, diğer ucunda myoepitelyal karsinom bulunmaktadır. İğsi hücreli karsinom olgularında mikroskopik incelemede fasiküler, balık sırtı benzeri veya storifom bir paternde dağılmış atipik pleomorfik iğsi tümör hücreleri izlenmektedir. Tümör stromasında lenfositik ve dendritik inflamatuvar yanıt sıklıkla mevcuttur.

Mezenkimal diferansiyasyon gösteren metaplastik karsinom olgularında glandüler, tubüler veya skuamöz patern gösteren karsinomatöz komponente kondroid, osteoid, rabdoid ve/veya glial diferansiyasyon gösteren mezenkimal komponent eşlik etmektedir. Epitelyal mezenkimal değişimde ara elemanlar olan iğsi hücrelerin izlenmediği olgular için matriks üreten metaplastik karsinom terimi kullanılmaktadır.

Metaplastik karsinom olgularının çoğunda farklı tümör fenotipleri mikst halde izlenmektedir. Olguların %11-65 kadarında duktal karsinoma in situ eşlik etmektedir. İmmünohistokimyasal incelemede, metaplastik karsinomlar ER, PR ve HER2 negatifliği ile karakterizedir. Tümör hücreleri düşük molekül ağırlıklı SK'ler ile sıklıkla negatifken; SK 5/6 ve SK 14 gibi yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler, P63, 34 βe12 ve EGFR ile pozitifdir.

Pür mezenkimal veya iğsi morfolojide olan metaplastik karsinomlarda ayırıcı tanıda malign mezenkimal tümörler yer almaktadır. Bu olgularda geniş örnekleme yapılmalı, gerekirse yeni parçalar alınarak invaziv veya in situ karsinomatöz odak aranmalı; ayrıca epitelyal orijin immünohistokimyasal belirteçler ile gösterilmelidir. Metaplastik karsinom olgularında prognoz kötü olup sıklıkla nodal metastaz olmaksızın uzak metastaz beklenmektedir [1, 6].

2.5.10. Nadir meme karsinomu tipleri

İnvaziv papiller karsinom: Oldukça nadir görülen bir meme karsinomu tipidir. Görülme sıklığı tam olarak bilinmemektedir. İnvaziv komponenti %90'dan fazla oranda papiller arkitektür gösteren tümörleri tanımlar. Solid papiller karsinom veya

enkapsüle papiller karsinom zemininde gelişmiş invaziv non-papiller karsinom ile karıştırılmamalıdır.

Taşlı yüzük hücreli karsinom: Fokal taşlı yüzük hücre diferansiyasyonu, başta invaziv lobüler karsinom olmak üzere pek çok meme karsinomuna eşlik edebilmektedir. Pür taşlı yüzük hücreli karsinom ise oldukça nadirdir. Bu olgular memenin primer taşlı yüzük hücreli karsinomu olarak kabul edilmeden önce, diğer olası primer odakların ekarte edilmesi gereklidir. Memenin taşlı yüzük hücreli karsinomlarında ER ve PR pozitifdir.

Nöroendokrin karsinom: Başta invaziv müsinöz karsinom ve solid papiller karsinom olmak üzere, meme karsinomlarının %30 kadarı fokal nöroendokrin diferansiyasyon göstermektedir. Pür nöroendokrin karsinom nadir olup tüm meme karsinomlarının %1'den azını oluşturmaktadır. Memenin iyi diferansiye nöroendokrin karsinomları ve kötü diferansiye/küçük hücreli nöroendokrin karsinomları histomorfolojik olarak diğer organlarda izlenen benzerlerinden ayrılamaz. Memede izlenen iyi diferansiye nöroendokrin karsinomlarda tümör hücrelerinin tamamına yakını, kötü diferansiye/küçük hücreli nöroendokrin karsinomlarda ise tümör hücrelerinin yarısından fazlası ER ve PR ile pozitifdir.

Tükrük bezi/deri eki tipi tümörler: Adenoid kistik karsinom, mukoeypidermoid karsinom, polimorfik karsinom ve asinik hücreli karsinom tüm meme karsinomlarının %1'den azını oluşturmaktadır. Bu tümörler histomorfolojik olarak tükrük bezinde görülen eşlerine benzer özelliktedir. İmmünohistokimyasal olarak triple negatiftir. Silindroma ve berrak hücreli hidradenomalar memede nadiren görülebilmektedir.

İnflamatuvar karsinom: Klinikte hızlı büyüme ve meme cildinde kızarıklık, ödem ve portakal kabuğu görünümü ile prezente olan; histomorfolojik olarak ise dermal lenfatiklerde yaygın tümör trombusları ile karakterize bir tümör grubudur. Altta yatan tümör sıklıkla invaziv karsinom, NST'dir. Oldukça agresif seyir göstermektedir. Olguların yarısı ER ve PR ile negatif iken, yaklaşık %40 kadarı HER2 over-ekspresyonu göstermektedir.

Sekretuar karsinom: Tüm meme karsinomlarının %0,1'den azını oluşturmaktadır. Ortanca yaş 25 olup juvenil meme karsinomu olarak da isimlendirilmektedir. Histopatolojik olarak intra ve ekstraselüler PAS-pozitif sekret

ile karakterizedir. Sekretuar karsinom olgularında t(12;15) translokasyonu görülmektedir. İmmünohistokimyasal olarak triple negatif özelliğindedir.

Onkositik karsinom: Tümör hücrelerinin %70'ten fazlasında onkositik morfoloji saptanan olgular onkositik karsinom olarak isimlendirilmektedir. Onkositik morfoloji, mitokondrilerin hücre sitoplazmasının %60'tan fazlasını diffüz olarak kaplamasını ifade etmektedir. Tümör hücreleri ER, PR ve mitokondriyal antikor ile pozitifdir. Olguların yaklaşık %25'inde HER2 over-ekspresyonu bildirilmiştir [62].

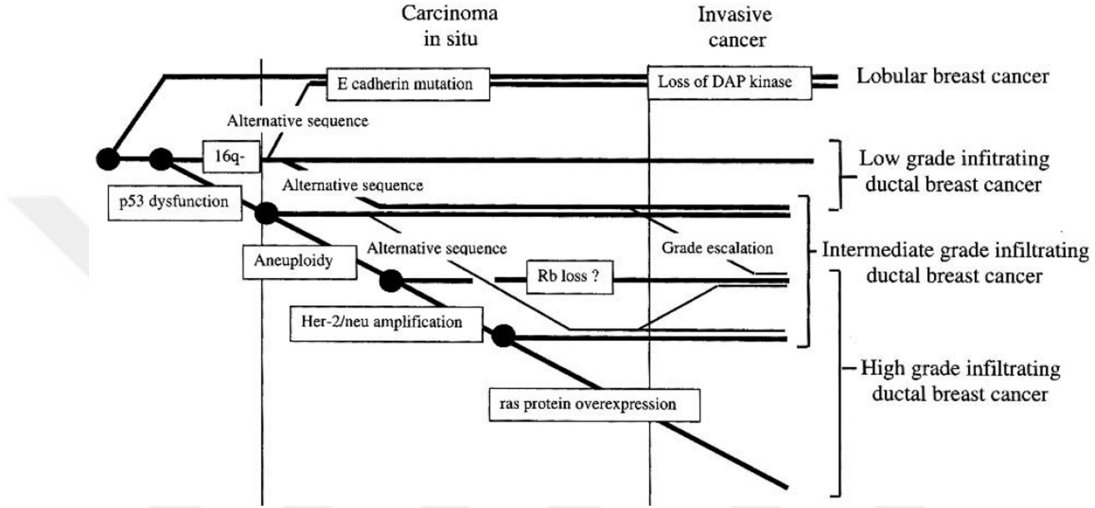
Diğer nadir meme karsinomu tipleri arasında sebaceöz karsinom, lipitten zengin karsinom ve glikojenden zengin karsinom yer almaktadır [1].

2.6. Meme Karsinomunun Moleküler Temelleri ve Moleküler Sınıflaması

Meme karsinomları birbirinden çok farklı histomorfolojik özellikler ve klinik seyirler gösterebilen bir grup tümörü kapsamaktadır. Histomorfoloji ve klinikteki bu farklılıkların moleküler temellere dayandığı ilk kez 2000 senesinde Perou ve arkadaşları tarafından ifade edilmiştir [63]. Selfors ve ark.'ın 2017 yılında yayınladıkları çalışmaya göre, meme karsinomlarında en sık saptanan 10 genetik alterasyon, sırasıyla; *P53* mutasyonu, *MYC* amplifikasyonu, *ERBB2* amplifikasyonu, *PIK3CA* mutasyonu ve amplifikasyonu, *MAP3K1* mutasyonu, *CDH1* mutasyonu, *RBI* delesyonu, *PTEN* delesyonu ve *GATA3* mutasyonudur [64].

Meme karsinomu gelişiminde genetik ve epigenetik faktörlere dayalı çok basamaklı karsinogenez görülmektedir [64, 65] (Şekil 3). Meme karsinomlarının, diğer pekçok karsinom gibi, normal epitel > hiperplastik epitel > karsinoma in situ > invaziv karsinom sekansı ile oluştuğu düşünülmektedir [65, 66]. Meme karsinomlarının moleküler portresi çizilene kadar, bu sekans kapsamında, öncelikle düşük dereceli invaziv karsinomların oluştuğu, ardından ek mutasyonlar ile yüksek dereceli invaziv karsinoma ilerlediği kabul edilmekteydi. 2000'li yıllarda yapılan moleküler temelli çalışmalar, bu kabulün yalnızca küçük bir grup meme karsinomu için geçerli olduğunu göstermiştir. Genellikle düşük veya yüksek dereceli karsinoma yol açan mutasyonlar erken dönemde (prekürsör lezyon ve hatta normal

epitel döneminde) kazanılmaktadır. Bu noktada en önemli moleküler kanıtlardan biri 16q kaybının düşük dereceli karsinomlarda sıklıkla saptanırken; yüksek dereceli karsinomlarda oldukça nadir görülmesidir [66, 67].

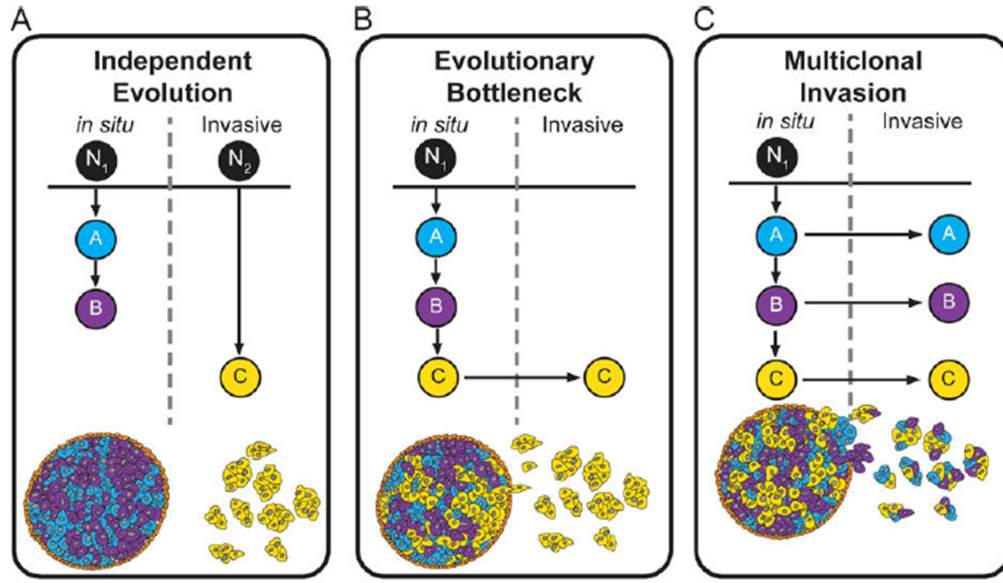


Şekil 3. Meme karsinomunda çok basamaklı moleküler karsinogenez (Shackney, S.E. and J.F. Silverman, Molecular evolutionary patterns in breast cancer. Adv Anat Pathol, 2003. 10(5): p. 278-90).

Casent ve ark. 2017 yılında yayınladıkları çalışmalarında, in situ ve invaziv meme karsinomlarının gelişimini üç model ile açıklamıştır (Şekil 4) [68]. Bağımsız gelişim modeline göre; in situ ve invaziv karsinomlar iki ayrı hücreden (N1 ve N2), birbirinden bağımsız olarak gelişmektedir. Gelişimsel geçit modeline göre; bir hücreden (N1) in situ karsinom gelişmekte ve tek bir klon halinde çoğalarak invaziv karsinoma evrilmektedir. Multiklonal invazyon modeline göre; bir hücreden (N1) in situ karsinom gelişirken multiklonal özellik kazanmakta ve invaziv karsinom multiklonal hücrelerce oluşturulmaktadır [68].

Tübüler karsinom, kribriform karsinom ve düşük dereceli invaziv karsinom, NST gibi düşük dereceli karsinomlar sıklıkla kolumnar hücre değişikliği, atipik duktal hiperplazi ve düşük dereceli duktal karsinoma in situ gibi prekürsör lezyonlardan köken almaktadır. Bu grupta yer alan karsinomlar benzer

immünohistokimyasal ve moleküler özellikler taşımaktadır. SK 8, SK 18 ve SK 19 gibi düşük molekül ağırlıklı SK, ER ve PR ekspresyonu görülmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı SK, P63, EGFR gibi bazal belirteçler ve HER2 ekspresyonu edilmemektedir. Moleküler sekanslama çalışmalarında düşük dereceli karsinomlarda ve prekürsörlerinde sıklıkla 16q kaybı saptanmaktadır. 16q kaybının invaziv lobüller



Şekil 4. İn situ ve invaziv meme karsinomlarında gelişimsel modeller. A) Bağımsız gelişim modeli. B) Gelişimsel geçit modeli. C) Multiklonal invazyon modeli. (Casasent, A.K., M. Edgerton, and N.E. Navin, Genome evolution in ductal carcinoma in situ: invasion of the clones. J Pathol, 2017. 241(2): p. 208-218).

karsinomlarda ve prekürsörlerinde de saptanması; düşük dereceli duktal ve lobüller karsinomların erken karsinogenez döneminde ortak basamaklardan geçtiğini düşündürmektedir [6, 66].

Yüksek dereceli invaziv karsinom, NST, LBMK ve metaplastik karsinom gibi yüksek dereceli karsinomlarda ortak immünohistokimyasal ve moleküler özellikler saptanmaktadır. Yüksek dereceli karsinomlar sıklıkla yüksek dereceli karsinoma in situ ve apokrin metaplazi zemininde gelişmektedir. Bu karsinomlarda genellikle SK 5/6, SK 14 ve SK 17 gibi yüksek molekül ağırlıklı SK, P63 ve EGFR ekspresyonu görülmektedir. Sıklıkla HER2 amplifikasyonu saptanmaktadır. Öte

yandan, düşük molekül ağırlıklı SK, ER ve PR ekspresyonu beklenmemektedir. Düşük dereceli karsinomlarda izlenen basit 16q kaybının aksine, yüksek deereli karsinomlar oldukça kompleks moleküler değişikliklere sahiptir. Olgularda sıklıkla 11q, 13q, 14q, 8p kayıpları; 17q, 8q, 5p kazanımları; 17q12, 17q22–24, 6q22, 8q22, 11q13 ve 20q13 amplifikasyonları görülmektedir [6, 66].

Perou ve ark, meme karsinomlarının gen ekspresyon paternlerini inceleyerek moleküler sınıflama sistemini oluşturmuştur [63]. Bu sistemde luminal, bazal, HER2 ve normal meme benzeri olmak üzere dört grup yer almaktadır. Normal meme duktuslarında izlenen luminal epitel hücrelerine benzer özellikler taşıyan karsinomlar luminal grupta yer almaktadır. Luminal grupta yer alan karsinomlar ER pozitif özelliktedir. Anti-hormonal terapiye iyi yanıt verirken; kemoterapi yanıtı kötüdür [69]. Sonraki çalışmalarda luminal grup kendi içinde ikiye bölünmüştür. Yüksek ER ekspresyonu gösteren olgular luminal A, düşük-orta ER ekspresyonu gösteren veya ER pozitifliğine ek olarak, HER2 amplifikasyonu gösteren olgular luminal B grubunda yer almaktadır. Genetik instabilite luminal A grupta düşük olup, luminal B grupta yüksektir. Luminal B grubu olgularda sıklıkla 16q heterozigotisme kaybı saptanmaktadır [70, 71].

Normal meme duktuslarında luminal epitel hücreleri ile bazal membran arasında izlenen myoepitelyal/bazal hücrelere benzer özellikler taşıyan karsinomlar bazal grubu oluşturmaktadır [63]. Sıklıkla pre-menopozal kadınlarda ve iyi sınırlı kitleler şeklinde prezente olmaktadır. Bazal karsinomlar hematogen metastaz yapma ve herediter (BRCA ilişkili) olma eğilimindedir. Tümör ilişkili inflamatuvar yanıt belirgindir. Bazal grupta sıklıkla EGFR ve c-kit mutasyonu saptanmaktadır [69, 72, 73]. Kombine RB1, TP53 ve *BRC A1* mutasyonu bazal grubun karakteristik moleküler paternini oluşturmaktadır [63]. Genellikle ER, PR ve HER2 negatif olup triple negatif özelliktedir. Bazal karsinomlarda epitelial-mezenkimal transizyon özelliği görülebilmektedir [74]. Bazal karsinomlar kötü prognoza sahiptir. Olguların kemoterapi yanıtı iyi olmakla birlikte, anti-hormonal terapiye yanıt kötüdür [69]. Luminal B grubu ve bazal grupta RB1 heterozigotisme kaybı saptanırken, bu özellik luminal A grubunda ve diğer moleküler gruplarda saptanmamıştır [75].

HER2 grubunda, HER2 amplifikasyonu gösteren ve ER negatif olan agresif seyirli karsinomlar yer almaktadır [63]. HER2 grubunda yer alan tümörlerden bir

kısmı AR ekspresyonu ve apokrin morfoloji gibi özellikler sergilemektedir [1, 76]. HER2 grubu karsinomlarda trastuzumab tedavisine yanıt oldukça iyidir. Kemoterapi yanıtı, luminal grup ile bazal grup arasındadır [69]. Fosfoinositid-3-kinaz mutasyonu luminal A grubu ve HER2 grubunda sıklıkla saptanmakta iken, diğer gruplarda bu nadirdir [6].

Normal meme benzeri grup, memenin stromal elemanlarına benzer özellikler taşıyan karsinomları kapsamaktadır [63]. Normal meme benzeri grubun sınıflamada olmaması gerektiğini ve bu grubun gerçekte var olmayabileceğini savunan çalışmalar mevcuttur [71].

Son yıllarda *claudin-low* ismi verilen yeni bir meme karsinomu grubu tanımlanmıştır [77]. Bu grupta *claudin 3/4/7* ve *e-cadherin* ekspresyonu düşüktür. CD44 ekspresyonu yüksek iken CD24 ekspresyonu düşüktür veya hiç yoktur [6]. *Claudin-low* grubu tümör hücreleri epitelyal-mezenkimal transizyonda görevli kök hücrelere benzer özellikler taşımaktadır. Epitelyal-mezenkimal transizyon hücrelerinde *e-cadherin* gibi interselüler adezyon moleküllerinde kayıp, SK gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonunda kayıp, düz kas aktini gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonunda artış, morfolojik olarak fibroblast benzeri iğsi görünüm ve motilite artışı saptanmaktadır [78, 79]. Epitelyal-mezenkimal transizyon özelliğine sahip tümör hücreleri bazal grup karsinomlarda da görülebilmektedir [74]. Buna rağmen, klasik olarak bazal grupta yer alan metaplastik karsinomun epitelyal-mezenkimal transizyon özelliği nedeniyle *claudin-low* grupta yer alması gerektiğini savunan çalışmalar da vardır [1, 80]. *Claudin-low* grubu tümörler, hormon-sensitif tümörlere göre kötü prognoza sahiptir [63].

Moleküler tetkikler meme karsinomlarının sınıflandırılmasında altın standart olmakla birlikte, yüksek maliyet ve gerekli teknolojik altyapının bulunmaması gibi sebeplerle her zaman gerçekleştirilememektedir. Bu nedenle günlük pratikte meme karsinomlarını sınıflandırmada immünohistokimyasal testler kullanılmaktadır [27, 69]. İmmünohistokimyasal olarak, yüksek molekül ağırlıklı SK eksprese eden olguların bazal grupta, yüksek molekül ağırlıklı SK eksprese etmeyen ve bununla birlikte düşük molekül ağırlıklı SK eksprese eden olguların luminal grupta yer aldığı düşünülmektedir [81]. Bir çalışmaya göre; ER, HER2, SK 5/6 ve EGFR immünohistokimyasaları birlikte kullanıldığında, ER negatif, HER2 negatif, SK 5/6

ve/veya EGFR pozitif olgular %76 sensitivite ve %100 spesifite ile bazal gruba alınabilmektedir [72]. Sarrio ve ark. bu belirteçlere SK 14, P63, CD10, p-cadherin ve caveolin belirteçleri eklendiğinde sensitive ve spesifitenin yükseleceğini ortaya koymuştur [74]. Bazal grupta yer alan BRCA ilişkili karsinom olguları vimentin ve laminin immünoekspresyonu gösterirken, genellikle SK 8 ve SK 18 ekspresyonu göstermemektedir. Sporadik olgularda ise bu ekspresyon paterninin tersi söz konusudur [82]. İmmünohistokimyasal olarak luminal ve bazal grupların arasında bir profil sergileyen olgular bazoluminal karsinom olarak sınıflanmaktadır [83].

Meme karsinomu sınıflamasına ve prognoz tayinine yönelik günlük patoloji pratiğinde en sık kullanılan immünohistokimyasal belirteçler ER, PR, HER2 ve Ki67'dir. Bu belirteçlere göre, yüksek ER ekspresyonu gösteren olgular genellikle luminal A grubunda; düşük-orta ER ekspresyonu gösteren veya ER pozitifliğine ek olarak HER2 amplifikasyonu gösteren olgular ise genellikle luminal B grubunda yer almaktadır. Luminal B grubunda, Ki67 proliferasyon indeksi luminal A grubuna göre daha yüksek beklenmektedir. Günlük pratikte, moleküler sınıflamadaki terimleri kullanmak yerine; olguları "ER-pozitif", "HER2-pozitif" ve "triple-negatif" kategorilerinden oluşan pratik bir sistemle sınıflamayı öneren yayınlar bulunmaktadır [84]. ER-pozitif meme karsinomlarında anti-hormonal terapi, HER2-pozitif meme karsinomlarında trastuzumab terapisi başlıca tedavi ajanlarıdır. Triple negatif grupta ise spesifik tedavi ajanı bulunmamaktadır. Bu nedenle TNMK terapötik yönetimi zor olan bir klinikopatolojik antitedir [27].

2.6.1. Triple negatif meme karsinomları (TNMK)

ER ve PR eksprese etmeyen ve HER2 amplifikasyonu göstermeyen meme karsinomlarına TNMK adı verilmektedir. Tüm meme karsinomlarının %10-25 kadarı triple negatif özelliktedir [85-89]. Önceleri, TNMK ifadesi bazal grubu tanımlamak için kullanılmaktaydı. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki; TNMK olguları bazal grup ile sınırlı olmadığı gibi, bazal karsinomlar da TNMK olguları ile sınırlı değildir [6, 7, 27, 90]. TNMK olgularının yaklaşık %75'i bazal benzeri özellik taşımaktadır [91]. TNMK (immünohistokimya) / bazal benzeri karsinom

(microarray) tanılarında immünohistokimyasal analiz ile microarray analizi arasında %75 uyum mevcuttur. İmmünohistokimyasal analiz ile microarray analizinin uyumsuz olduğu %25'lik kısımda, olguların büyük kısmını bazal benzeri özellik göstermeyen TNMK olguları oluşturmaktadır [91, 92]. TNMK, tanımı gereği luminal ve HER2-pozitif meme kansinolarını dışarıda bıraksa da, gerçekte TNMK olgularının %6 ila %30 kadarı minimal HER2 ekspresyonu göstermekte ve bununla birlikte, daha küçük bir grup TNMK olgusu luminal özellikler taşımaktadır [63, 70, 90, 92, 93]. Triple negatif kansinolar erkeklerde de görülebilmektedir. Erkeklerde görülen tüm meme kansinolarının yaklaşık %6'sı triple negatiftir [94].

TNMK farklı meme kansinomu alt tiplerini kapsayan heterojen bir ailedir [89, 90, 92, 95]. Buna rağmen TNMK olguları bazı klinik ve histomorfolojik özellikleri ile birbirine benzemektedir. TNMK sıklıkla genç kadınları etkileyen yüksek dereceli kansinolardır [96, 97]. Plasilova ve ark. tarafından 2016 yılında yayınlanan ve 38.813 meme kanseri olgusunu içeren çalışmaya göre, 70 yaş üstü meme kanseri olgularının yalnızca %10'u TNMK olup, bu oran 30 yaş altı ve 31-40 yaş arası için sırasıyla %23,3 ve %21,1'dir [94]. Afroamerikan kadınlarda TNMK prevalansı daha yüksektir [94, 98]. Ancak, 30 yaş altındaki kadınlarda TNMK riski beyaz ve Afroamerikan ırk için eşittir [94]. TNMK olgularında sıklıkla aile öyküsü vardır. TNMK ile obezite arasında güçlü bir ilişki vardır [87]. Düşük sosyoekonomik düzeye sahip kadınlarda görülen meme kansinolarının triple negatif olma ihtimali daha fazladır [99].

BRCA ilişkili kansinolar genellikle triple negatif özellik göstermektedir [1, 97, 100, 101]. TNMK olgularında; herediter ve somatik *BRCA1/2* mutasyonları, *BRCA1 promoter* metilasyonu, düşük *BRCA1* protein ekspresyonu ve heterozigosite kaybı gibi *BRCA* disfonksiyonları tanımlanmıştır [92, 102, 103]. Herediter *BRCA1* mutasyonu bilateral TNMK ile ilişkili olup bilateral meme kansinomu olgularına genetik test yapılması önerilmektedir [40, 104]. Xie ve ark.'ın 2017 yılında yayınlanan çalışmalarında; *BRCA1 promoter* metilasyonu düşük genel sağkalım süresi ile ilişkili bulunurken, *BRCA1/2* mutasyonları sağkalımla ilişkili bulunmamıştır [40]. TNMK olgularının yaklaşık %20'sinde *BRCA1/2* mutasyonu saptanmıştır [105].

Triple negatif karsinomlar genellikle düzgün sınırlı kitleler oluşturmaktadır. Ultrasonografik incelemede, tümör nekrozuna işaret eden posterior akustik gölgelenme olguların dörtte birinde saptanmaktadır [106]. Tümör boyutu, triple negatif dışı karsinoma kıyasla daha büyüktür [85, 99].

Histopatolojik incelemede vasküler invazyon sıklıkla saptanmaktadır. TNMK olguları, lenf nodu tutulumu yapmadan uzak metastaz yapma eğilimindedir [1, 107, 108]. Triple negatif karsinomlar, aynı tümör boyutu ve histolojik derecedeki triple negatif dışı karsinomlarla kıyaslandığında; lenf nodu metastazı riski çok daha düşüktür [94, 109]. Uzak metastazlar genellikle visseral organlara ve beyne olmaktadır; luminal karsinomların aksine, kemik metastazı nadirdir [110].

TNMK olgularının çoğunu invaziv karsinom, NST oluşturmaktadır [111]. Bununla birlikte; LBMK, metaplastik, apokrin karsinom gibi bazı özel meme karsinomu histolojik tiplerinin triple negatif olma ihtimali diğer histolojik tiplere göre yüksektir [1]. Plasilova ve ark., inceledikleri 38813 meme kanseri olgusu içinde; lenfosit-baskın karsinomların %60'ında, metaplastik karsinomların %76'sında, apokrin karsinomların %56'sında, adenoid kistik karsinomların %78'inde, duktal karsinomların %15'inde triple negatif özellik saptamıştır [94]. Aynı çalışmada, lobüler karsinomların %2 kadarı triple negatif özellikte olup bu grubu pleomorfik lobüler karsinomlar oluşturmaktadır [94].

TNMK olgularında prognoz genellikle kötüdür. Neoadjuvan kemoterapiye iyi yanıt vermesine rağmen nüks riski yüksektir TNMK olgularında, beş yıllık nüks ve mortalite riski, diğer meme karsinomu olgularına göre daha yüksek bulunmuştur [99]. Metaplastik karsinomun prognozu diğer TNMK olgularından daha kötü iken; LBMK olgularında prognoz daha iyidir [1, 85, 88]. Triple negatif karsinomlarda, GATA3 de dahil olmak üzere meme karsinomlarında sıklıkla eksprese edilen ve günlük pratikte kullanılan belirteçlerin kaybı görülebilmektedir [112, 113]. TNMK olgularında, mortalite riski tanı sonrası ilk 5 yılda; nüks riski tanı sonrası ilk 3 yılda en fazladır [85]. İlerleyen dönemlerde mortalite ve nüks riskleri giderek azalmakta ve triple negatif dışı karsinomlar ile benzer düzeylere gelmektedir [114]. TNMK'nın moleküler ve biyolojik temellerini daha iyi anlamak; bu agresif tümör grubunu hedefe yönelik tedavi edebilmek ve hastaların medikal yönetimini optimize etmek için oldukça önemlidir.

Lehmann ve ark. TNMK olgularını altı moleküler gruba ayırmıştır [7]. Bazal benzeri-1 grubunda hücre döngüsünde görevli genlerin ekspresyonu artmıştır. Bazal benzeri-2 grubunda büyüme faktörü sinyal genlerinin ekspresyonu artmıştır. Bu grup tümörlerde bazal/myoepitelyal diferansiyasyon çok belirgindir. CD10 ve P63 gibi belirteçlerle çok yoğun immünekspresyon saptanır. Bazal karsinomlar genellikle bu iki grupta yer almaktadır. Mezenkimal ve mezenkimal kök hücre benzeri gruplarda hücre motilitesi ve diferansiyasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonu artmıştır. Mezenkimal kök hücre benzeri grupta, mezenkimal gruptan farklı olarak, proliferasyon indeksi ve *claudin* ekspresyonu düşüktür. Mezenkimal kök hücre benzeri grupta yer alan tümörler, *claudin-low* tümörler ile moleküler benzerlik göstermektedir. Metaplastik karsinomlar sıklıkla mezenkimal veya mezenkimal kök hücre benzeri grupta yer almaktadır. İmmünomodülatuar grupta immün cevapla ilişkili genlerin ekspresyonu artmıştır. Bu grupta sıklıkla medüller özellikler gösteren lenfosit-baskın karsinomlar yer almaktadır. Prognoz diğer TNMK'larından daha iyidir. Luminal androjen reseptör grubunda AR ekspresyonu ve bunun yanı sıra luminal SK 18 ekspresyonu görülmektedir. Bu grupta çoğunlukla apokrin karsinomlar yer almaktadır. AR eksprese eden TNMK olgularında prognoz, diğer TNMK olgularından daha iyidir [6, 7, 115, 116]. AR ekspresyonu görülmeyen TNMK olguları “kuadriple negatif” olarak adlandırılmaktadır ve 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada bunların daha çok bazal benzeri 1 ve 2 grupları ile immünomodülatuar grupta yer aldığı söylenmiştir [117].

Burstein ve ark., TNMK olgularını luminal / androjen reseptör grubu, mezenkimal grup, bazal benzeri immün suprese grup ve bazal benzeri immün aktive grup olmak üzere dört moleküler gruba ayırmıştır [118]. Luminal / androjen reseptör grupta *CCDN1* amplifikasyonu, mezenkimal grupta *EGFR* amplifikasyonu, bazal benzeri immün suprese grupta *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) 2 amplifikasyonu, bazal benzeri immün aktive grupta ise *CDK1* amplifikasyonu tanımlanmıştır. Bazal benzeri immün suprese grupta prognoz en kötü iken bazal benzeri immün aktive grupta prognoz en iyidir [118].

Kim ve ark., 2018 yılında yayınlanan çalışmalarında; AR, *claudin-3*, E-cadherin, SK5/6, *EGFR*, *IDO1* ve *FOXC1* immünohistokimya boyalarını kullanarak, TNMK olgularını Burstein'in dört moleküler grubuna ayırmıştır [119]. AR pozitif olgular luminal / androjen reseptör grubuna; *Claudin-3* ve/veya E-cadherin negatif

olgular ise mezenkimal gruba dahil edilmiştir. SK5/6 ve/veya EGFR pozitif olgular bazal gruba alınarak, IDO1 ve FOXC1 ekspresyonlarına göre ikiye ayrılmıştır. IDO1 pozitif ve FOXC1 negatif olgular bazal benzeri immün aktive grupta yer alırken; IDO1 negatif ve FOXC1 pozitif olgular bazal benzeri immün suprese grupta yer almıştır. İki veya daha fazla moleküler grubun özelliklerini taşıyan olgular “mikst”; hiçbir moleküler grubun özelliğini taşımayan olgular “sınıflandırılmayan” grubuna alınmıştır. Çalışmaya göre, luminal / androjen reseptör grubunda yer alan olgular; apokrin özellikler, düşük proliferasyon ve iyi prognozla karakterizedir. Mezenkimal grupta yer alan olgular; metaplastik özellikler, medüller özellikler ve diskohezyon gibi lobüler özellikler taşımaktadır. Bazal benzeri immün suprese grubu, bazal benzeri immün aktive gruba göre daha az TİL içermektedir; ayrıca, tüm gruplar içinde en kötü prognoza sahiptir. Çalışmada olguların %30'u mikst, %5'i sınıflandırılmayan grupta yer almıştır [119].

Le Du ve ark., Lehmann ve Burstein'in çalışmaları ışığında TNMK olgularının moleküler temellerini yeniden incelemeyi amaçlayan çalışmalarında, TNMK olgularını beş moleküler gruba ayırmıştır [93]. Bazal benzeri TNMK grubunda, DNA tamir defekti ve büyüme faktörü yolaklarında mutasyonlar bildirilmiştir. Mezenkimal benzeri TNMK grubu, epitel-mezenkimal transizyon ve kök hücre benzeri özellikler ile tanımlanmıştır. İmmün-ilişkili TNMK grubu, histomorfolojik olarak TİL ile karakterizedir ve bu grupta immün kontrol noktalarında defektler saptanmıştır. Yüksek TİL yüzdesi, neoadjuvan kemoterapiye iyi yanıt için prediktiftir [61, 120]. İmmün-ilişkili TNMK grubunda yer alan olguların, PD1/PD-L1 yolağını hedefleyen terapötiklerden ve diğer immün-bazlı terapi seçeneklerinden fayda görebileceği düşünülmektedir [93, 121]. Luminal/apokrin TNMK grubu, AR ekspresyonu ile karakterizedir. HER2'den zengin TNMK grubu immünohistokimyasal olarak 1+/2++ HER2 ekspresyonu saptanan TNMK olgularını kapsamaktadır. Bu grupta saptanan minimal HER2 ekspresyonunun klinik önemi tartışmalıdır [93].

TNMK olgularının medikal yönetiminde, hormonoterapi ve/veya trastuzumab terapisi kullanılmadığından, hedefe yönelik terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmuştur. PI3K/AKT/mTOR yolağı, hedefe yönelik terapi açısından araştırılan yollardan biridir. Bu yolaktaki alterasyonlar, genellikle ER negatif / HER2 pozitif tümörlerde saptanmakta ve TNMK grubu tümörlerde beklenmemektedir; ancak, istisna olarak,

metaplastik karsinomların %47 kadarında *PIK3CA* mutasyonu görülmektedir. [90, 122]. TNMK olgularında hedefe yönelik terapi seçeneklerinden biri de androjen reseptörüdür. Literatürde TNMK olgularının %25 ila %75'inde AR ekspresyonu bulunmuştur [115, 123, 124]. Safarpour ve Tavassoli, 2015 yılında yayınladıkları çalışmada, TNMK olgularında AR ekspresyonunun rutin olarak test edilmesini önermiştir [124]. Lehmann, Burstein, ve Le Du'ya göre, luminal apokrin / androjen reseptör gruplarında yer alan olguların, androjen reseptörünü hedefleyen terapötiklerden fayda göreceği düşünülmektedir. Platinum bazlı kemoterapi ve *poly-ADP ribose polymerase* (PARP) inhibitörleri TNMK olgularında kullanılmaktadır. Özellikle, Lehmann'a göre bazal benzeri-1 ve bazal benzeri-2 gruplarında yer alan olgular ile Le Du'ya göre bazal benzeri TNMK grubunda yer alan olgular bu terapötiklerden fayda görmektedir [7, 95, 125]. Ayrıca, *BRCA* ilişkili olguların platinum bazlı kemoterapi ve özellikle PARP inhibitörlerinden fayda gördüğü düşünülmektedir [7, 87, 125]. Bazal benzeri TNMK olgularının %62, bazal benzeri dışı TNMK olgularının %43 kadarında *TP53* mutasyonu görülmekte olup *TP53* yolağını hedef alan terapötik ajanların geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir [126, 127]. Öncelikle bazal benzeri, *claudin-low* ve HER2'den zengin gruplar olmak üzere, TNMK olgularının; EGFR, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ve FGFR gibi büyüme faktörlerini hedefleyen terapötik ajanlardan fayda görebileceği düşünülmektedir [90, 93, 128]. *Insulin like growth factor* (IGF) 1 ve *Platelet Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR) inhibitörleri, mezenkimal grup TNMK olgularında faydalı olabilmektedir [118]. Lehmann'ın immünomodülatuar grubunda, Burstein'in bazal benzeri immün suprese grubunda ve Le Du'nun immün-ilişkili TNMK grubunda yer alan olguların immün bazlı terapilerden fayda göreceği düşünülmektedir [7, 93, 95, 118, 125]. Burstein'in bazal benzeri immün aktif grubunda yer alan TNMK olguları için, medikal tedavide STAT ve CTLA4 inhibitörleri kullanılabilir [118].

2.7. Meme Karsinomunda Prognostik Faktörler

Meme karsinomlu hastaların medikal yönetiminde prognostik faktörlerin tayini oldukça önemlidir. Patoloji raporlarında prognostik faktörlerin bildirilmesi gerekmektedir. Clark, meme karsinomunda prognostik faktörlerin önemini üç başlıkta değerlendirmiştir: 1) Çok iyi prognoz beklenen ve adjuvan terapiye ihtiyaç duymayan hastaları belirleyerek gereksiz terapötik ajan kullanımını ve bundan doğacak gereksiz maliyeti önlemek 2) Kötü prognoz beklenen ve agresif adjuvan terapiye ihtiyaç duyan hastaları belirleyerek uygun terapötik ajan kullanımını sağlamak 3) Belirli terapötik ajanlara duyarlı veya dirençli olan olguları saptayarak terapi rejimini belirlemek [129].

Elston ve ark., meme karsinomunda etkili prognostik faktörleri geleneksel faktörler, hormon reseptörleri ve moleküler özellikler olmak üzere üç grupta incelemiştir. Geleneksel faktörler arasında histolojik tip, histolojik derece, tümör boyutu, lenf nodu durumu, lenfovasküler invazyon, tümör nekrozu, stromal fibrozis ve elastozis yer almaktadır [130]. Geleneksel faktörlere ek olarak, perinöral invazyon, proliferasyon indeksi ve immünolojik mikroçevre gibi özellikler de günümüzde önemli prognostik parametreler arasında yer almaktadır [6].

2.7.1. Histolojik tip

Belirli histolojik tiplerin prognozu daha iyi veya daha kötü olabilmektedir. Tubüler, müsinöz, kribriform, lenfosit-baskın, papiller, klasik lobüler ve tubülo-lobüler karsinomlar iyi prognozludur. Bu olgularda mastektomi sonrası sağkalım 25 sene ile diğer meme karsinomlarından daha uzun bulunmuştur [131, 132]. Adenoid kistik karsinom ve düşük dereceli adenoskuamöz karsinom gibi nadir görülen karsinomlarda da prognoz iyidir. İnvaziv karsinom, NST, pleomorfik lobüler karsinom, solid lobüler karsinom ve metaplastik karsinomlarda prognoz kötüdür [1, 130]. Elston ve ark. meme karsinomlarını histolojik tipe göre dört prognostik gruba ayırmıştır (Tablo 4) [130].

2.7.2. Histolojik derece

Meme karsinomlarında histolojik derecenin histolojik tipten daha önemli olduğu düşünülmektedir. Galea ve ark., histolojik derecenin lenf nodu durumu kadar önemli bir prognostik faktör olduğunu ortaya koymuştur [133]. İlk olarak Patey & Scarff ve Bloom & Richardson tarafından geliştirilen semikuantatif histolojik derece sistemleri 1991 yılında Nottingham'da Elston & Ellis tarafından modifiye edilmiştir. Bugün

Tablo 4. Meme karsinomlarında histolojik tipe göre prognostik gruplar.

Çok iyi prognoz (10 yıllık sağkalım >%80)	Tübüler karsinom
	Kribriform karsinom
	Müsinöz karsinom
	Tübülobüler karsinom
İyi prognoz (10 yıllık sağkalım %60-80)	Mikst karsinom: NST + lobüler dışı spesifik tip karsinom
	Atipik medüller karsinom
Orta prognoz (10 yıllık sağkalım %50-60)	Medüller karsinom
	İnvaziv papiller karsinom
	Klasik lobüler karsinom
Kötü prognoz (10 yıllık sağkalım <%50)	Solid/pleomorfik lobüler karsinom
	İnvaziv karsinom, NST
	Mikst karsinom: NST + lobüler karsinom
	Metaplastik karsinom

meme karsinomlarında histolojik derece Nottingham Elston & Ellis semikantatif yöntemine göre belirlenmektedir (Tablo 5) [134].

Tübül formasyonuna küçük büyütmede tümörün geneline bakılarak karar verilmelidir. Nükleer pleomorfizme en kötü diferansiyasyon gösteren alanda karar verilmelidir. Mitotik indeksin doğru sayımı için optimal fiksasyon ve optimal doku kesiti gerekmektedir. Mitoz sayımı tümör periferinde proliferasyon indeksi yüksek alanda yapılmalıdır. Kullanılan mikroskopta büyük büyütme alanının (BBA)

genişliği milimetre kare cinsinden belirlenerek, uygun sınır değerlere göre mitotik indeks puanlanmalıdır (Tablo 6) [134]. Carey ve ark. bazal karsinomların %87’sinde, HER2 pozitif karsinomların %69’unda yüksek mitotik indeks saptarken; luminal A ve B karsinomların yalnızca %31 ve %32 kadarında yüksek mitotik indeks saptamıştır [135].

Tablo 5. Meme karsinomu histolojik derecelendirmesinde Nottingham Elston & Ellis yöntemi.

Özellik		Skor
Tubl formasyonu	>%75	1
	%50-75	2
	<%50	3
Nükleer pleomorfizm	Küçük regüler uniform nükleuslar	1
	Nükleer büyüklük ve varyasyonda orta derece artış	2
	Belirgin varyasyon	3
Mitotik indeks	Mikroskopik alanın genişliğine bağlıdır	1-3

Tablo 6. Meme karsinomu histolojik derecelendirmesinde Nottingham Elston&Ellis metoduna göre mitotik indeks puanları.

	Mikroskop		
	Leitz Ortholux	Nikon Labophot	Leitz Diaplan
Objektif	25x	40x	40x
Alan genişliği	0,274 mm ²	0,152 mm ²	0,312 mm ²
Mitoz Sayısı (Puan)	0-9 (1 puan)	0-5 (1 puan)	0-11 (1 puan)
	10-19 (2 puan)	6-10 (2 puan)	12-22 (2 puan)
	>20 (3 puan)	>11 (3 puan)	>23 (3 puan)

Nottingham Elston & Ellis skoru 3-5 ise derece 1 (iyi diferansiye), 6-7 ise derece 2 (orta diferansiye), 8-9 ise derece 3 (kötü diferansiye) olarak skorlanmaktadır. Derece 1 olgularda 10 yıllık sağkalım %85 iken, derece 3 olgularda %45'tir [134].

2.7.3. Tümör boyutu ve lenf nodu durumu

Tümör boyutu patolojik incelemede fiksasyon öncesi makroskopik ölçüm veya küçük tümörler için mikroskopik ölçüm ile belirlenmelidir. Klinik ve radyolojik ölçümler gerçek tümör boyutunu yansıtmamaktadır. Patolojik tümör evresi (pT) tümör boyutuna göre belirlenmektedir (Tablo 7) [136]. Rosen ve Grosen'a göre 20 yıllık relapsız sağkalım 10 mm'den küçük tümörlerde %88 iken; boyutu 17 ila 22 mm olan tümörlerde %59'a düşmektedir [137].

Meme karsinomlarında lenf nodu durumu en önemli prognostik faktörlerden biridir. Lenf nodu metastazı olmayan olgularda 10 yıllık sağkalım %75 olmakla birlikte, metastatik olgularda 10 yıllık sağkalım %25-30'dur. Metastatik lenf nodu sayısı ve aksiller seviyesi yükseldikçe prognoz kötüleşmektedir [138]. Patolojik bölgesel lenf nodu evresi (pN) metastatik tümör hücresi sayısına, metastatik lenf nodu sayısına ve yerleşimine göre belirlenmektedir (Tablo 8) [136].

2.7.4. Lenfovasküler ve perinöral invazyon

Lenfovasküler invazyon, meme karsinomlarında önemli bir prognostik parametredir. Lenf nodu metastazı olmayan olgularda bile lenfovasküler invazyon varlığı erken dönemde nüks ile korele bulunmuştur [139]. Özellikle dermal lenfatiklerde tümör trombüsü varlığı nüks ve uzak metastaz ile yakından ilişkilidir [140].

Perinöral invazyon tüm meme karsinomlarının %1 kadarında görülmektedir. Sıklıkla yüksek dereceli tümörlerde ve lenfovasküler invazyonla birlikte saptandığı için bağımsız bir prognostik faktör olup olmadığı tartışmalıdır [6, 141].

Tablo 7. Meme karsinomlarında patolojik tümör (pT) evresi (AJCC; *American Joint Committee on Cancer, Cancer Staging Manual*, 8. edisyon).

TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör kanıtı bulunamadı
Tis (DKIS)	Duktal karsinoma in situ
Tis (Paget)	İn situ/invaziv karsinom olmaksızın Paget hastalığı
T1	Tümör en büyük boyutu ≤ 20 mm
T1mi	Tümör en büyük boyutu ≤ 1 mm
T1a	Tümör en büyük boyutu > 1 mm fakat ≤ 5 mm
T1b	Tümör en büyük boyutu > 5 mm fakat ≤ 10 mm
T1c	Tümör en büyük boyutu > 10 mm fakat ≤ 20 mm
T2	Tümör en büyük boyutu > 20 mm fakat ≤ 50 mm
T3	Tümör en büyük boyutu > 50 mm
T4	Herhangi bir boyutta göğüs duvarı ve/veya cilde direkt uzanım
T4a	Göğüs duvarına uzanım
T4b	Ciltte ülserasyon ve/veya ipsilateral makroskopik satellit nodül ve/veya ödem (<i>Peau d'orange</i> dahil)
T4c	T4a ve T4b kombine
T4d	İnflamatuvar karsinom

2.7.5. Proliferasyon indeksi

Günlük pratikte proliferasyon indeksini saptamak için Ki67 antikoru kullanılmaktadır. Ki67, hücre siklusunda G_0 dışındaki tüm hücreleri boyayan bir fare monoklonal antikordur [142]. Ki67 proliferasyon indeksi benign meme lezyonlarında ortalama %3-4 olup meme karsinomlarında ortalama %16-17'dir [143].

Ki67 proliferasyon indeksi için belirli bir sınır değeri bulunmamaktadır. 2009 yılındaki Saint Gallen konsensusuna göre, Ki67 proliferasyon indeksi %15 ve altında olan olgulara yalnızca endokrin terapi, %30 ve üzerinde olan olgulara kemoendokrin terapi verilebilmektedir [144]. 2011 ve 2013 yıllarındaki Saint Gallen konsensuslarına göre, Ki67 proliferasyon indeksi %14'ün altında ise düşük, %20'nin

üzerinde ise yüksek olarak kabul edilmektedir [145, 146]. 2011 yılındaki başka bir çalışmada Ki67 proliferasyon indeksi %10'un altında ise düşük, %10 ve üzerinde ise yüksek olarak adlandırılması önerilmiştir [147]. 2016 yılındaki bir çalışmada ise Ki67 sınır değerinin %20 olarak kullanılması önerilmiştir [148].

Tablo 8. Meme karsinomlarında patolojik lenf nodu (pN) evresi (AJCC; *American Joint Committee on Cancer, Cancer Staging Manual*, 8. edisyon).

NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Metastatik lenf nodu saptanmadı veya yalnızca izole tümör hücreleri saptandı
N0(i+)	İzole tümör hücreleri (<0,2 mm)
N0(mol+)	Revers kriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile pozitif moleküler bulgular
N1mi	Mikrometastaz (>200 hücre, >0,2 mm fakat <2 mm)
N1a	1-3 metastatik aksiller lenf nodu (En az bir lenf nodunda tümör >2 mm)
N1b	Metastatik ipsilateral internal mamaryan lenf nodu
N1c	N1a ve N1b kombine
N2a	4-9 metastatik aksiller lenf nodu (En az bir lenf nodunda tümör >2 mm)
N2b	Metastatik aksiller lenf nodu olmaksızın klinik olarak saptanmış metastatik internal mamaryan lenf nodu +/- mikroskopik konfirmasyon
N3a	>10 metastatik aksiller lenf nodu (En az bir lenf nodunda tümör >2 mm) ve/veya metastatik infraklavikuler (seviye 3 aksiller) lenf nodu
N3b	N2b ve N1a/N2a kombine; veya N2a ve N1b kombine
N3c	Metastatik ipsilateral supraklavikuler lenf nodu

Ki67 proliferasyon indeksi yüksek dereceli karsinomlarda ve TNMK olgularında daha yüksek bulunmaktadır [6, 84, 149]. Ki67 proliferasyon indeksinin, mitotik indeksi yansıtmada faydalı bir belirteç olduğu düşünülmektedir [150].

Yüksek proliferasyon indeksi izlenen olgularda genel ve hastalısız sađkalım daha dūşüktür [151, 152].

2.7.6. Hormon reseptörleri

Hormon reseptörleri steroid yapıda olup nükleusta lokalizedir. Hormon diffüzyon veya transportasyon yoluyla nükleusa girerek reseptörüyle kompleks oluşturur. Meme karsinomunda en yaygın test edilen ve terapiyi spesifik olarak yönlendiren hormon reseptörü ER'dir. ER- α ve ER- β olmak üzere iki alt tipi vardır. Fizyolojik şartlarda, ER- α ekspresyonu menstrüel siklusun fazlarına göre değişiklik göstermekte ve yaşla birlikte artmaktadır. ER- α neoplastik progresyonu artırırken; ER- β neoplastik progresyondan koruyucu etki göstermektedir [35]. Günlük pratikte kullanılan ER immünohistokimya antikoru ER- α alt tipini göstermektedir. PR, ER bağımlı bir gen tarafından eksprese edilmektedir [6]. Meme karsinomlarında rutinde ER ile birlikte PR de test edilmektedir. Hormon reseptörleri hem primer karsinomda hem de metastazlarda çalışılmalıdır [153]. Meme karsinomlarının yaklaşık %75 kadarında hormon reseptörleri pozitifdir [6]. Hormon reseptör negatifliği kötü prognostik bir faktördür. Tubüler ve kribriform karsinomlar gibi düşük dereceli karsinomların hemen hepsi ve orta dereceli karsinomların büyük kısmı hormon reseptör pozitifdir. Hormon reseptör pozitifliği metastatik kapasiteyi yansıtmamakla birlikte; hormon reseptör pozitif tümörler daha geç dönemde ve sıklıkla kemik, yumuşak doku ve genitoüriner organlara metastaz yapmaktadır. Hormon reseptör negatif tümörler ise erken dönemde ve sıklıkla beyin ve viseral organlara metastaz yapmaktadır [154, 155]. ER-pozitif olguların 1/3 kadarı endokrin terapiye çok iyi yanıt vermektedir. ER-pozitif olguların tamamı endokrin terapiye iyi yanıt vermese de; ters yönden bakıldığında, ER-negatif olguların tamamı endokrin terapiye yanıtızsızdır [156]. ER-negatif olguların çok küçük bir kısmı PR-pozitif olabilmektedir ve bu grupta endokrin-terapi faydalıdır [157].

2.7.7. Moleküler özellikler

Meme karsinomlarında en yaygın test edilen moleküler alterasyon HER2 amplifikasyonudur. HER2 amplifikasyonu tümör hücrelerinin çoğalmasını ve devamlılığını sağlamaktadır. HER2 amplifikasyonu gösteren meme karsinomları trastuzumab terapisine oldukça iyi yanıt vermektedir. Yapılan ilk çalışmalarda HER2 pozitifliği meme karsinomlarının %20 kadarında bulunmuştur [158]. Yeni çalışmalara göre, meme karsinomlarının yaklaşık %14'ünde HER2 pozitifliği görülmektedir [159]. Trastuzumab terapisi almayan olgularda HER2 amplifikasyonu bağımsız kötü prognostik bir parametredir [160]. Bununla birlikte EGFR amplifikasyonu, EGFR/HER2 koamplifikasyonu ve FGFR1/HER2 koamplifikasyonu da meme karsinomlarında kötü prognostik parametreler arasındadır [161-163]. Meme karsinomlarında moleküler özellikler ve prognoza etkileri bölüm 2.6'da detaylı tartışılmıştır.

2.7.8. Diğer faktörler

Tümör nekrozu genellikle yüksek dereceli karsinomlara eşlik eden bir bulgudur. Mikroskopik incelemede orta büyütmelerde fark edilen konfluen nekroz varlığının 10 yıllık genel sağkalımı azalttığı ve nüks riskini artırdığı saptanmıştır [164]. Meme karsinomlarına sıklıkla stromal fibrozis ve elastozis eşlik etmektedir. Çeşitli yayınlarda stromal fibrozis ve elastozisin iyi prognostik, kötü prognostik veya prognozla ilişkisiz olduğu savunulmuştur. Humeniuk ve ark.'a göre stromal elastozis ER pozitifliği ile koreledir [52]. Meme karsinomu olgularında mikroskopik incelemede apoptotik hücreler saptanabilir. Yüksek apoptotik indeks; yüksek histolojik derece, yüksek mitotik indeks, hormon reseptör negatifliği, P53 ekspresyonu ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [165, 166]. Bununla birlikte çok değişkenli analizlerde apoptotik indeksin bağımsız bir prognostik faktör olmadığı ortaya koyulmuştur [6]. Anti-apoptotik etki gösteren bcl-2'nin artmış ekspresyonu uzamış genel sağkalımla, uzamış hastaliksız sağkalımla ve endokrinoterapiye iyi yanıtla ilişkili bulunmuştur [167, 168]. Telomeraz ekspresyonu, lenf nodu negatif

olgulara kötü prognostik etkiye sahiptir [169]. Lu ve ark. telomeraz ekspresyonunu endokrinoterapiye iyi, kemoterapiye kötü yanıt ile ilişkili bulmuştur [170]. Meme karsinomu olgularına farklı yoğunluk ve hücresel içerikte inflamatuvar hücre infiltratları eşlik etmektedir. Prognostik öneme sahip olabileceği düşünülen bu infiltratlar karsinomun immünolojik mikroçevesini oluşturmaktadır. Meme karsinomlarında immünolojik mikroçevre bölüm 2.8’de detaylı tartışılacaktır.

2.8. Meme Karsinomlarında İmmünolojik Mikroçevre

İmmün sistem, doku homeostazını sağlamakla görevli doğal ve adaptif elemanlardan oluşan bir sistemdir. Tümörögenез sürecinde immün sistemin pozitif, negatif ve nötr etkileri bulunmaktadır [8]. Kronik inflamasyon tümör oluşumunu destekleyici etkiye sahiptir [171]. Öte yandan sağlam bir immün sistemin kanseri kontrol edebileceği veya progresyonunu şekillendirebileceği düşünülmektedir. İmmün sistemin karsinogenез sürecinde gösterdiği birbirinden farklı sonuçlara yol açabilen kompleks ve dinamik etkilerin bütününe kanser immün-düzenlemesi (*cancer immunoediting*) adı verilmektedir [8, 172, 173].

Kanser immün-düzenlemesi eliminasyon (*elimination*), denge (*equilibrium*) ve kaçış (*escape*) fazlarını içermektedir [174, 175]. Kanser immün-düzenlemesinin temelini tümör hücrelerine ait antijenleri tanıyan ve sitotoksik etki gösteren T hücreleri oluşturmaktadır [8]. Eliminasyon için intakt lenfositik immün kompartman ve interferon- γ (IFN- γ), perforin, FAS/FAS-ligand ve TRAIL gibi anti-tümöral moleküller gereklidir [174-177]. Ek olarak, M1 makrofajlar ve NK hücreleri de eliminasyon fazında görev almaktadır [8]. Denge fazında IL12 gibi elimine edici interlökinler ile IL23 ve IL10 gibi inhibe edici interlökinler arasında denge vardır [178].

Kaçış fazında tümör hücreleri immün sistemden kaçmak için farklı mekanizmalar kullanmaktadır: 1) Tümör antijenitesinin düşük olması, MHC (*Major histocompatibility complex*) sınıf I moleküllerinin yokluğu ve kostimülasyonun bozulması gibi durumlarda immün tanımanın azalması yoluyla tümör hücreleri

immün sistemden kaçabilmektedir. 2) bcl-2 gibi anti-apoptotik moleküllerin yüksek ekspresyonu durumunda tümör hücrelerinin ömrü uzamakta ve ölümsüz tümör hücreleri immün sistemden kaçabilmektedir. 3) Tümör hücreleri PD1/PD-L1 aksı gibi immüno-regülatuar mekanizmalar ve TGF β gibi anti-inflamatuar sitokinler üzerinden immün-supresör bir mikroçevre oluşturarak immün sistemden kaçabilmektedir [174-176, 179, 180]. Kanser hastalarının çoğu kaçış fazında tanı almaktadır [9].

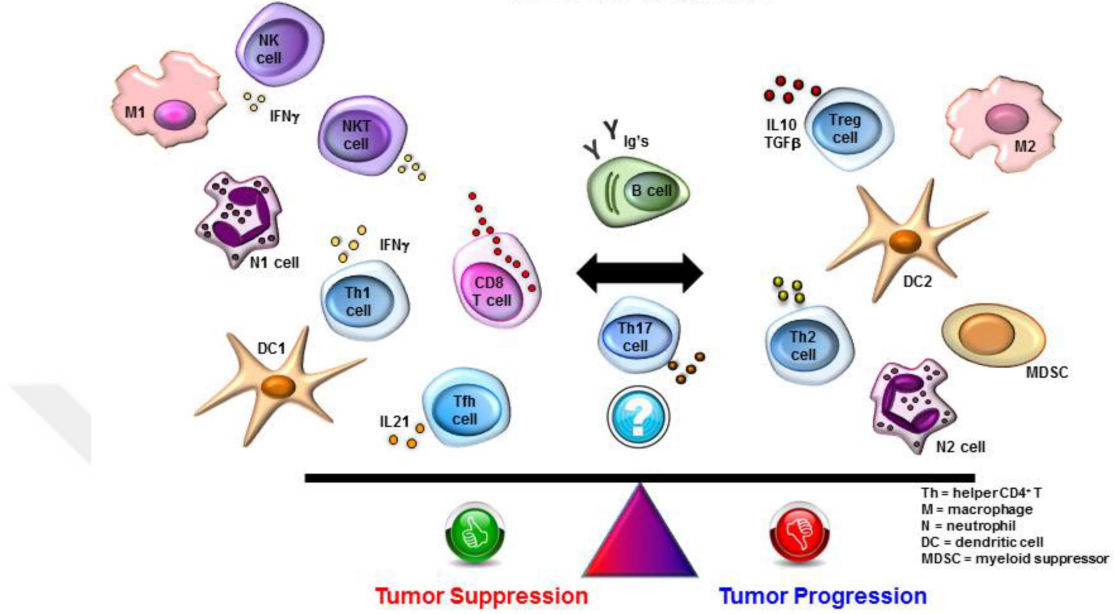
Meme karsinomlarında farklı hücresel komponente sahip ve farklı yoğunlukta immüno-lojik mikroçevreler görülebilmektedir. Meme karsinomlarının immüno-lojik mikroçevresini oluşturan en önemli hücre grubu TİL'dir. Başta TNMK olmak üzere, pek çok meme karsinomu olgusunda düşük TİL miktarı kötü prognostik etki etmektedir [181-185]. Lenfositlere farklı miktarlarda plazmasitler, makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri eşlik edebilmektedir [6]. Lenfositik ve lenfoplazmasitik mikroçevre medüller özellikler gösteren karsinomların bir bulgusu olarak bilinmekle birlikte; yalnızca medüller özellikler gösteren karsinomlarda değil; başta invaziv karsinom, NST olmak üzere pek çok meme karsinomu tipinde farklı yoğunluklarda saptanmaktadır.

Literatürde farklı meme karsinomu gruplarında TİL miktarını ve prognostik rolünü inceleyen çalışılmalar mevcuttur. Luminal meme karsinomları genellikle TİL'den fakir olup bu olgularda TİL'in prognostik etkisi tartışmalıdır. Yang ve ark., 2018 yılında yayınladıkları HER2-pozitif meme kanserlerini inceleyen çalışmalarında, tru-cut biyopside yüksek TİL düzeyini iyi prognoz ve neoadjuvan terapiye iyi yanıt ile ilişkili bulmuştur [186]. TNMK olgularının önemli bir kısmı TİL'den zengindir ve bu olgularda yüksek TİL miktarı pozitif prognostik bir faktördür [9, 92, 181, 187-189]. TNMK olgularında yüksek TİL düzeyinin neoadjuvan ve adjuvan kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [120, 181, 185, 187-190]. Denkert ve ark., 2018 yılındaki çalışmalarında, yüksek TİL düzeyini triple negatif ve HER2-pozitif olgularda uzun sağkalım ve iyi kemoterapi yanıtı ile ilişkili bulurken; luminal HER2-negatif olgularda kötü prognozla ilişkili bulmuştur [61]. Loi ve ark., 2019 yılında yayınlanan çalışmalarında; erken evre TNMK olgularında ileri hasta yaşı, büyük tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve düşük histolojik dereceyi düşük TİL düzeyi ile ilişkili bulmuştur. Aynı çalışmada,

yüksek TİL düzeyi iyi prognozla ve adjuvan kemoterapi sonrası uzun sağkalımla ilişkili bulunmuştur [185].

İmmün sistemde B ve T lenfosit olmak üzere iki temel lenfosit ailesi bulunmaktadır. İmmünohistokimyasal ve akım sitometrik çalışmalara göre TİL'in büyük kısmını T lenfositler oluşturmaktadır. T lenfosit altgruplarına bakıldığında, sitotoksik T lenfositler dominant olup yardımcı ve regülatuar T lenfositler daha nadir görülmektedir. B lenfositler ve plazmasitler ise tümör mikroçevresinde çok daha küçük bir kompartmana sahiptir [191-194]. TİL, gösterdiği aktive edici (tümör-supresör) veya inhibe edici (tümör-progresör) etkinliğe göre ikiye ayrılabilir (Şekil 5) [9]. Aktive edici lenfositler, pro-inflamatuar ve anti-tümör etkinliğe sahiptir. Bu lenfositler arasında en önemli grup sitotoksik T hücreleridir [11, 12]. Bununla birlikte tip 1 yardımcı T lenfositler de aktive edici etkinlik göstermektedir. İnhibe edici lenfositlerin etkisi immün-supresif ve pro-tümörogeniktir. İnhibe edici lenfositler arasında en önemli grup tip 2 yardımcı T lenfositler ve regülatuar T lenfositlerdir [12-15].

TILs in Cancer



Şekil 5. Tümör supresyonu veya progresyonuna etkilerine göre tümörü infiltre eden lenfosit grupları (Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group* 2014. *Ann Oncol*, 2015. 26(2): p. 259-71)

Lenfosit-baskın meme kanseri, tümör mikroçevresinde yüksek miktarda TİL içeren karsinomları ifade etmektedir. Lenfosit- baskın meme kanserini tanımlarken, minimum TİL yüzdesi için farklı çalışmalar %30 [57], %40 [58], %50 [9, 57, 59, 60] ve %60 [9, 61] değerlerini kullanmıştır. O'Loughlin ve ark., 2018 yılında yayınlanan çalışmalarında, neoadjuvan terapiye tam yanıtın en sık lenfosit baskın TNMK olgularında görüldüğünü saptamıştır [60].

Yalnızca tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin değil; periferik kandaki immün hücrelerin de hasta prognozuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Patel ve ark., 2019 yılında yayınlanan ve 126 TNMK olgusundan oluşan serilerinde; periferik kanda yüksek nötrofil/lenfosit oranını kısa sağkalım, yüksek absolü lenfosit düzeyini ise uzun sağkalım ile ilişkili bulmuştur [195].

2.8.1. Sitotoksik T lenfositler

TNMK olgularında, tümör immünolojik mikroçevresini oluşturan en önemli hücre grubu lenfositlerdir. İmmünolojik mikroçevrede izlenen TİL miktarı ve içerdiği hücre tipi prognozda oldukça önemlidir [9, 10]. TİL içinde majör lenfosit grubunu sitotoksik T lenfositler oluşturmaktadır. Sitotoksik-TİL, anti-tümöral ve pro-inflamatuar etkinlik göstermektedir. Sitotoksik TİL'lerin granüllerinde depolanan perforin ve granzimler, sınıf 1 MHC moleküllerine bağlı tümöral antijenler ile karşılaşıldığında hızla salıverilerek; tümör hücresinin apoptotik ölümüne neden olurlar. Tümör mikroçevresinde yüksek sitotoksik-TİL düzeyleri iyi prognoz, uzun sağkalım ve tedaviye iyi yanıt ile ilişkilidir [182, 184, 196, 197].

Meme karsinomlarında tümör mikroçevresinde saptanan yüksek sitotoksik TİL düzeyleri; genç hasta yaşı, yüksek histolojik derece, hormon reseptör negatifliği, bazal benzeri moleküler subgrup, medüller benzeri histoloji ve uzun sağkalım ile ilişkili bulunmuştur [183, 196, 198-201]. TNMK olgularında CD8-pozitif TİL düzeylerini inceleyen bir çalışma, stromal ve/veya intratümöral yerleşimli CD8-pozitif TİL düzeyini bağımsız pozitif prognostik faktör olarak tanımlamıştır [202].

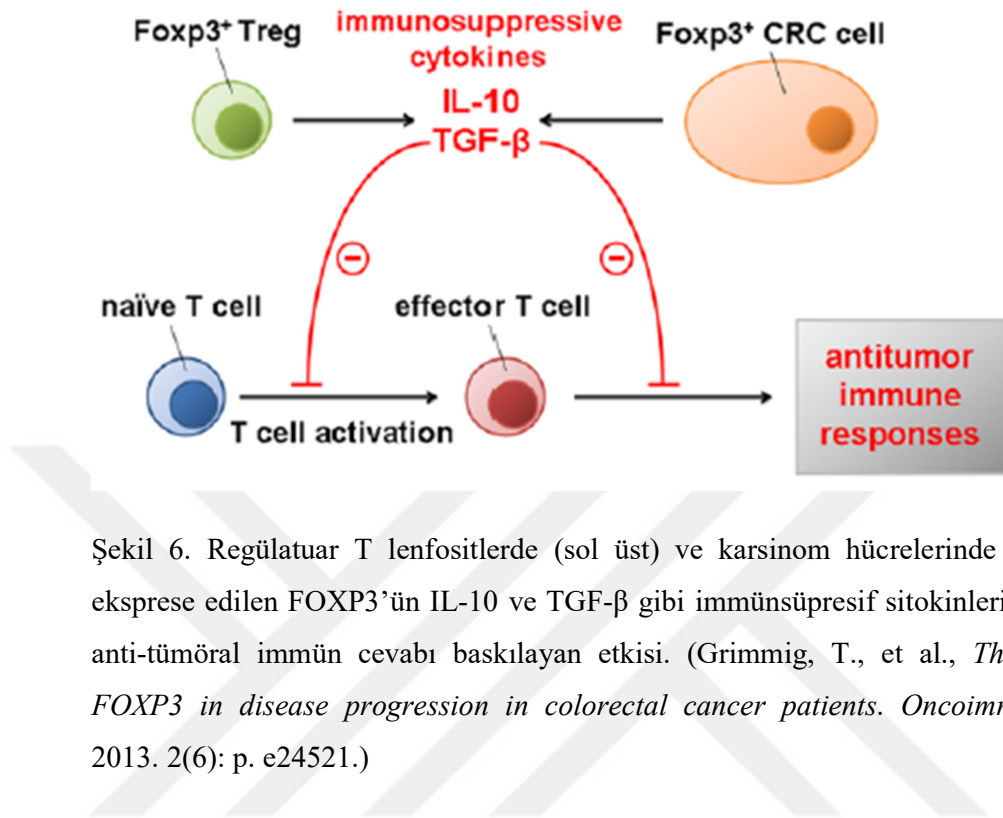
2.8.2. Regülatuar T lenfositler

Regülatuar T lenfositler, diğer inflammatuar hücreleri baskılayarak anti-inflamatuar etkinlik ve tümör progresyonunu destekleyerek pro-tümörogenik etkinlik gösteren özel bir yardımcı T lenfosit alt grubudur. Regülatuar T lenfositlerin büyük kısmı FOXP3 (*Forkhead Box P3*) antikoru kullanılarak immünohistokimyasal olarak sensitif ve spesifik olarak gösterilebilmektedir. FOXP3 proteini, *forkhead/winged-helix* ailesinde yer alan ve transkripsiyonu düzenleyici etki gösteren bir proteindir.

Fizyolojik şartlarda, periferal immünolojik toleransın sağlanmasında rol almaktadır. Erken gestasyonel dönemde, maternal immün sistemin fetusun taşıdığı paternal antijenlere karşı susturulmasını sağlamaktadır [203]. FOXP3 eksprese eden

regülatuar T hücreler; TGF- β ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinler üzerinden, sitotoksik T lenfositleri, tip 1 yardımcı T lenfositleri ve B lenfositleri inhibe ederek tümör progresyonunu artırmaktadır (Şekil 6) [204-206]. Ayrıca, VEGF üzerinden anjiyogenezi ve intratümöral damar yoğunluğunu artırmaktadır [204]. Ek olarak, regülatuar T hücrelerin CTLA-4 ekspresyonu ederek, antijen sunucu hücrelerdeki B7 proteinine bağlandığı ve bu yolla T hücrelerdeki CD28'in B7'ye bağlanmasını önlediği düşünülmektedir [207].

Tümör mikroçevresinde artmış regülatuar T lenfositlerin kötü prognostik faktör olduğu düşünülmektedir [208, 209]. Bununla birlikte, regülatuar T lenfositlerin farklı tümör tiplerinde farklı prognostik etkinlik gösterdiğini savunan çalışmalar da bulunmaktadır. Ladoire ve ark., 2011 yılındaki çalışmalarında regülatuar T lenfositlerin meme karsinomu gibi non-enfekte tümörlerde kötü prognostik; kolon karsinomu gibi enfekte tümörlerde ise iyi prognostik olduğunu savunmuştur [210]. Ladoire ve ark., neo-adjuvan terapi görmüş HER2-pozitif meme karsinomlarını inceledikleri bir diğer çalışmada ise FOXP3 ekspresyonunun yalnızca regülatuar T lenfositlerde değil, aynı zamanda tümör hücrelerinde de görüldüğünü ve tümör hücrelerindeki FOXP3 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olduğunu saptamıştır [211]. Lee ve ark. regülatuar T lenfositlerden zengin olguların daha uzun progresyonsuz ve genel sağkalıma sahip olduğunu ve daha iyi prognoz gösterdiğini saptamıştır [212]. Mahmoud ve ark. regülatuar T lenfositlerden zengin mikroçevreyi hormon reseptör negatifliği, HER2 overekspresyonu ve moleküler bazal subgrup ile ilişkili bulmuştur. Aynı çalışmada regülatuar T lenfositlerin tek değişkenli analizlerde kötü prognostik etkinliği saptanmakla birlikte çok değişkenli analizlerde prognozla ilişki bulunamamıştır [213]. TNMK olgularında regülatuar T lenfositlerden fakir ve sitotoksik T lenfositlerden zengin bir mikroçevrenin iyi prognozla ilişkili olduğu düşünülmektedir [214, 215].



Şekil 6. Regülatuar T lenfositlerde (sol üst) ve karsinom hücrelerinde (sağ üst) eksprese edilen FOXP3'ün IL-10 ve TGF- β gibi immünsüpresif sitokinleri uyararak anti-tümöral immün cevabı baskılayan etkisi. (Grimmig, T., et al., *The role of FOXP3 in disease progression in colorectal cancer patients. Oncoimmunology*, 2013. 2(6): p. e24521.)

2.8.3. PD1 / PD-L1 volağı

Tümör mikroçevresinde yer alan lenfositlerin anti-tümör etkinliğinde en önemli immünoregülatuar yolaklardan biri PD1/PD-L1 aksıdır. PD1; CD28/CTLA-4 ailesine üye ko-inhibitör bir molekül olup immün sistemin negatif düzenleyicisidir. PD1 T ve B lenfositlerin hücre membranında yer almaktadır. PD1; PD-L1 ile bağlı olmadığı tüm durumlarda, kendi reseptörüne bağlanır ve bu yolla sitotoksik yanıtı aktive eder [16, 17].

Fizyolojik şartlarda, PD1/PD-L1 aksı, periferal immünolojik tolerans kapsamında “anerji”nin sağlanmasında görevlidir [207]. PD1 aktivasyonu ile oluşacak sitotoksik yanıt nedeniyle self-yıkım meydana geleceğinden; olası self-yıkımı önlemek için PD-L1 molekülü PD1'e bağlanarak immünolojik toleransı sağlamaktadır. PD1 etkinliğinin aktivasyonu otoimmün hastalıklar ile ilişkili iken;

inaktivasyonu neoplastik progresyon ile ilişkili bulunmuştur [207]. TNMK de dahil olmak üzere, pek çok kanser türünde, tümör hücrelerinin yüksek miktarda PD-L1 eksprese ettiği son çalışmalarla ortaya koyulmuştur [15, 18-20] Tümör hücrelerinde eksprese edilen PD-L1 molekülü, T lenfositlerdeki PD1 molekülüne bağlanarak sitotoksik etkiyi inaktive etmektedir ve bu yolla tümör hücreleri immün sistemden kaçmaktadır [17].

Literatürde çeşitli histolojik tipleri içeren çalışmalarda meme karsinomlarının %8,7 – 38 kadarında tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu saptanmıştır [19, 216-218]. Meme karsinomlarında tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun genç yaş, ileri histolojik derece, hormon reseptör negatifliği, HER2 pozitifliği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [13, 19, 218-220]. Wang ve ark., TNMK olgularında, özellikle bazal benzeri grupta, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olabileceğini saptamıştır [19]. Guo ve ark., TNMK olgularında tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun yüksek histolojik derece ile ilişkili bulunurken; tümör boyutu, lenf nodu durumu ve histolojik tiplerle ilişkisiz olduğunu savunmuştur [216]. Muenst ve ark.; luminal B grubu, HER2 grubu ve bazal benzeri grupta yüksek PD-L1 ekspresyonunun genel sağkalım için kötü prognostik olduğunu bulmuştur [219]. Bertucci ve ark. inflamatuvar meme karsinomu olgularında tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkili bulmuştur [218]. Sabatier ve ark., meme karsinomlarında PD-L1 ekspresyonunu, diğer kötü prognostik parametrelerle ve adjuvan tedaviye iyi yanıtla ilişkili bulunurken; sağkalımla ilişkili bulunmamıştır [220]. Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun CD8(+) ve FOXP3(+) lenfosit infiltrasyonu ile korele olduğu düşünülmektedir [13, 19].

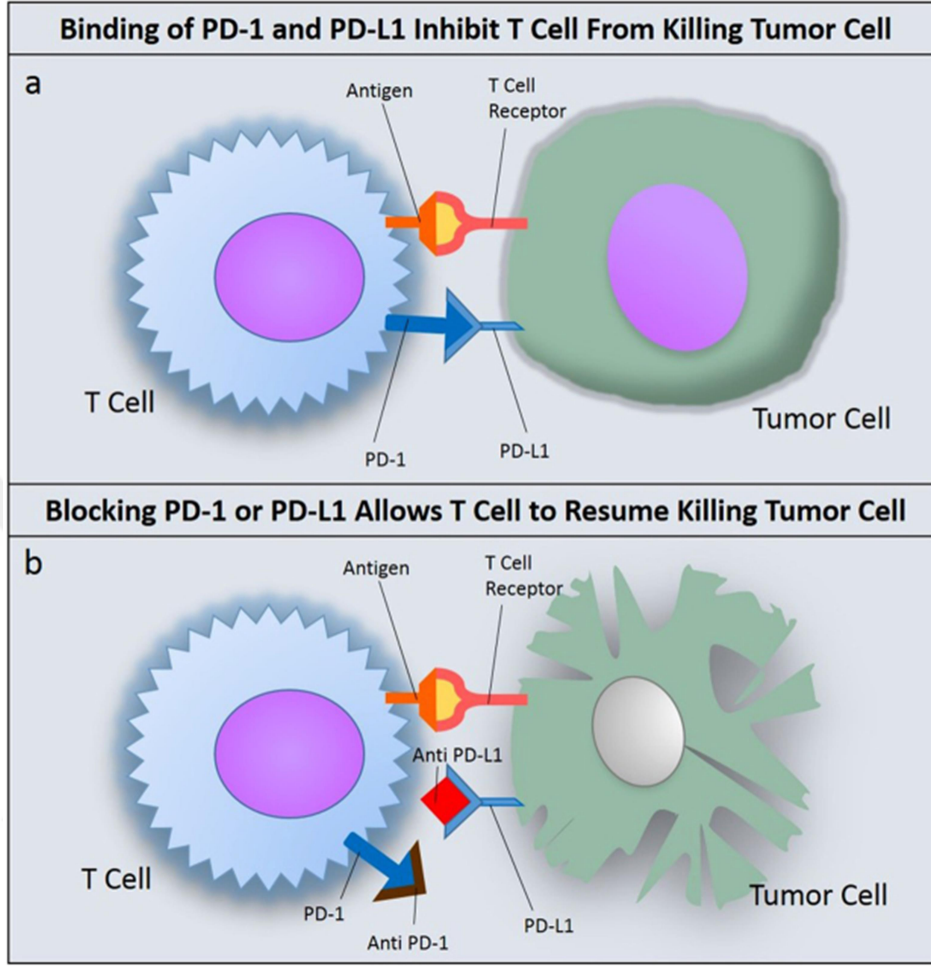
Hedefe yönelik anti-PD1 ve/veya anti-PD-L1 etkili immünoterapi ajanları PD1/PD-L1 yolağını bloke etmektedir. Böylece PD1/PD-L1 bağlantısı kesilmekte ve T lenfositlerin tümöre karşı sitotoksik etkisi devam etmektedir (Şekil 7) [17]. Anti-PD1ve/veya anti-PD-L1 etkili ajanlar küçük hücreli dışı akciğer kanseri, malign melanoma, mesane kanseri, böbrek hücreli karsinom, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomları, Merkel hücreli karsinom ve gastrik karsinom olgularında kullanıma girse de; yeterli literatür bilgisi bulunmadığından meme kanseri olgularında henüz rutin olarak kullanılmamaktadır [17, 21-25, 221].

2.8.4. M2 makrofajlar

Tümörün immünolojik mikroçevresinde lenfositlerden sonra ikinci önemli hücre grubu makrofajlardır. TİM aktive edici ve inhibe edici etkilere sahiptir. Aktive edici makrofajlar M1 tiptedir ve pro-inflamatuar anti-tümör etkinlik göstermektedir. İnhibe edici TİM tipi M2'dir. Tümör mikroçevresinde M2 makrofajların bulunması tümör invazyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi artırarak pro-tümörojenik etki etmektedir. TİM'in M1 ya da M2 yönünde polarizasyonu hücreler arası *cross-talk* mekanizması ile T lenfositler tarafından düzenlenmektedir [222].

M1 makrofajlar klasik yol denen *toll like receptor*, *tumor necrosing factor α* (TNF α) ve IFN- γ ile indüklenmektedir. İndüklenen M1 makrofajlar IL6, TNF α ve indüklenebilir Nitrik Oksit sentaz salgılamaktadır. M2 makrofajlar ise selektif yol denen IL4 ve IL13 ile indüklenmektedir. M2 makrofajlar TGF β , VEGF, IL10 gibi anti-inflamatuar molekülleri ve CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 gibi kemokinleri sekrete etmektedir. Böylece M2 makrofajlar hem pro-tümörojenik bir stroma oluşumunu desteklemekte, hem de regülatuar T lenfositler ve tip 2 yardımcı T lenfositler gibi anti-inflamatuar hücreleri uyarmaktadır [26, 223, 224].

Su ve ark. TİM'in meme karsinomlarında epitelyal-mezenkimal transizyon ve metastaz ile ilişkili olduğu saptamıştır [225]. TİM'den zengin meme karsinomlarının yüksek dereceli, hormon reseptör negatif ve kötü prognoza sahip olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [226-229]. Öte yandan Gwak ve ark. TİM'den zengin mikroçevrenin özellikle hormon reseptör pozitif karsinomlar için kötü prognostik bir parametre olduğunu savunmuştur [230]. Literatürde TİM tiplerini ayrı ayrı inceleyen az sayıdaki çalışmada, TNMK ve diğer meme karsinomlarında M1 makrofajdan zengin mikroçevrenin uzun sağkalım ile; M2 makrofajdan zengin mikroçevrenin ise kötü prognoz ile ilişkili olabileceği saptanmıştır [15, 26].



Şekil 7. PD1 / PD-L1 yolağı. a) Tümör hücresindeki PD-L1 ile T lenfositteki PD1 moleküllerinin bağlanması ve sitotoksik etkinin inhibisyonu. b) Anti-PD1 ve/veya anti-PD-L1 etkili immünoterapi ajanlarının PD1/PD-L1 aksını bloke ederek sitotoksik etkinin devamlılığını sağlaması. (Caldwell, C., Jr., et al., *Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors. Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 13682).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2012-2017 yılları arasında rezeksiyon spesmeni değerlendirilmiş, yaş, patolojik evre, histolojik derece, cerrahi sınır durumu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, peritümöral lenfositik yanıt (TİL) ve klinik takipleri ile ER, PR, HER2 ve Ki67 ekspresyon durumları bilinen, neoadjuvan terapi almamış 51 TNMK olgusunda CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 ekspresyonları immünohistokimya yöntemiyle araştırıldı.

Hastaların yaşları 32 – 84 arasında olup ortanca değer 52, ortalama değer 52,76 ve standart sapma 12,13'dür. Hastaların tamamı kadındır.

3.2. Etik Kurul

09.2017.665 protokol numaralı projemiz, 03.11.2017 sayılı yazı ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Projemiz, SAG-C-TUP-131217-0659 numarası ile Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Komisyonu'nun finansal desteği ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. Yöntem

3.3.1. İmmünohistokimya

3.3.1.1. CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163

Formalin fikse parafine gömülü dokulardan hazırlanan 3 µm kalınlıktaki kesitler elektrostatik yüklü lamlara alındı ve 70 °C'de en az 1 saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm immünohistokimyasal boyama süreci tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında (Ventana BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) gerçekleştirildi. İşlem için cihaza uygun, biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanıldı. Fare monoklonal CD8 (Klon C8/144B, Dako, Denmark), tavşan monoklonal FOXP3 (Klon EP340, Epitomics, USA), tavşan monoklonal PD-L1 (Klon SP263, Ventana, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) ve tavşan monoklonal CD163 (Klon EP324, Epitomics, USA) antikorları kullanıldı (Tablo 9). PD-L1 immünohistokimyası için çoğaltıcı etkili *amplifier* kullanıldı. Zıt boyaması boyama cihazında, hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılması ve lamel ile kapatılması aşamaları elde yapılarak işlem sonlandırıldı.

Dış kontrol olarak CD8 ve PD-L1 immünohistokimyası için tonsil, FOXP3 immünohistokimyası için Hodgkin lenfoma, CD163 immünohistokimyası için dalak dokusu kullanılmıştır.

3.3.1.2. ER, PR, HER2 ve Ki67

Meme karsinomu olgularında ER, PR, HER2 ve Ki67 immünohistokimyasaları bölümümüzde rutin olarak uygulanmaktadır. Rutinde ER, PR, HER2 ve Ki67 immünohistokimyasaları için formalin fikse parafine gömülü dokulardan hazırlanan 3 µm kalınlıktaki kesitler elektrostatik yüklü lamlara alınarak 70 °C'de en az 1 saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm immünohistokimyasal boyama süreci tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında (Ventana BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) gerçekleştirildi. İşlem için cihaza uygun, biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve DAB kromojeni içeren hazır kit (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanıldı. Tavşan monoklonal ER (Klon 6F11, Leica Biosystems, UK), tavşan monoklonal PR (Klon 16, Leica Biosystems, UK), tavşan monoklonal HER2 (Klon EP1045Y, Thermo Scientific™ Lab Vision™, USA) ve tavşan monoklonal Ki67 (Klon SP6, Biocare Medical, USA) antikorları kullanıldı (Tablo 9).

Tablo 9. İmmünohistokimyada kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Antikor	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	Sıcaklık
CD8	C8/144B	Kullanıma hazır	92 dakika	37 °C
FOXP3	EP340	1/100	60 dakika	37 °C
PD-L1	SP263	Kullanıma hazır	32 dakika	37 °C
CD163	EP324	1/100	32 dakika	37 °C
ER	6F11	1/100	60 dakika	37 °C
PR	16	1/100	60 dakika	37 °C
c-erbB2	EP1045Y	1/100	60 dakika	37 °C
Ki67	SP6	1/100	32 dakika	37 °C

ER, PR ve HER2 immünohistokimyası için dış kontrol olarak meme karsinomu; Ki67 immünohistokimyası için dış kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı.

Çalışmamızda olgulara ait rutinde uygulanmış olan ER, PR, HER2 ve Ki67 immünohistokimya lamalarına bölüm arşivinden, immünekspresyon sonuçlarına olguların hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşıldı.

3.3.2. HER2 in situ hibridizasyon

İmmünohistokimya ile 2+ HER2 ekspresyonu saptanan olgularda, in situ hibridizasyon yöntemiyle HER2 amplifikasyonu araştırılması *American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists (ASCO/CAP)* tarafından önerilmektedir [231, 232]. Bölümümüzde immünohistokimya ile 2+ HER2 ekspresyonu saptanan olgulara rutin olarak in situ hibridizasyon uygulanmaktadır. Çalışmamıza dahil olan 5 olguda rutinde immünohistokimya ile 2+ HER2 ekspresyonu izlenmiş olup floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile amplifikasyon saptanmamıştır.

Rutinde FISH için formalin fikse parafine gömülü dokulardan hazırlanan 3 µm kalınlıktaki kesitler elektrostatik yüklü lamlara alınmaktadır. Lamlar deparafinizasyon işlemi için 56 °C'lik etüvde bir gece boyunca inkübe edilmektedir. Deparafinizasyon işleminin devamı olarak lamlar 3x5 dakika ksilen ve 2x10 dakika etanol ile muamele edilmektedir. Ortamdan alkolü uzaklaştırmak için lamlar 2 dakika süre ile distile suda bekletilmektedir. Dokunun açılmasını sağlamak amacıyla 98 °C su banyosunda, Citrat tamponu içinde, dokunun yapısına göre değişmekle birlikte yaklaşık 25-30 dakika kadar bekletilmektedir. Ardından distile suda çalkalanmakta ve 1 dakika süreyle distile suda bekletilmektedir. Örnekler bağ doku proteinlerinin yıkımını sağlamak amacıyla hibridizasyon cihazında 37 °C'de 10 dakika pepsin solüsyonu ile muamele edilmektedir. Cihazdan alınan örnekler kit (ZytoVision FISH Tissue Implementation Kit) içerisindeki yıkama solüsyonunda 5 dakika

bekletilmekte ve yeniden distile su ile çalkalanarak 1 dakika distile suda bekletilmektedir. Lamalar %70 - %90 - %100'lük alkol serilerinden geçirilerek havada kurumaya bırakılmaktadır. Kuruyan dokunun üzerine yaklaşık 10 mikrolitre HER2 probu (ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe) damlatılmaktadır. Lamın üzeri probun yayılmasını sağlayacak şekilde lamel ile kapatılmakta ve dokunun hava almasını engellemek amacıyla lamelin etrafı Fixogum Rubber Cement ile yapıştırılmaktadır. Kapatılan lamalar hibridizasyon cihazında 75 °C'de 10 dakika denatüre edilmekte ve 37 °C'de 19-21 saat inkübe edilmektedir. Ertesi gün hibridizasyon cihazından alınarak lamellerin etrafındaki Fixogum Rubber Cement yapıştırıcısı sökülür ve lameller çıkarılmaktadır. Lamalar kit içerisindeki yıkama solüsyonuyla 3 x 5 dakika yıkanmaktadır. Bir dakika distile suda bekletildikten sonra; %70 - %90 - %100'lük alkol serilerinden geçirilerek havada kurumaya bırakılmaktadır. Kuruyan örnekler nükleusları boyamak amacıyla yaklaşık 25 mikrolitre DAPI solüsyonu damlatılarak lamaların üzeri büyük boy lamelle kapatılmaktadır. Otuz dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4 °C'ye alınan örnekler floresan mikroskopunda incelenmektedir.

Çalışmamızda olgulara ait FISH sonuçlarına hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşıldı.

3.4. Değerlendirme

3.4.1. Histopatolojik değerlendirme

Histopatolojik verilere olgulara ait hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı bulunan patoloji raporlarından ulaşıldı. Primer tümör ve lenf nodu evreleri *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) kılavuzuna göre belirlendi [136]. Histolojik derece Nottingham Elston & Ellis sistemine göre verildi [134]. Histolojik tümör tipi temel olarak Dünya Sağlık Örgütü önerilerine göre belirlenmekle birlikte; Dünya Sağlık Örgütü'nde "Medüller özellikler gösteren karsinom" olarak tanımlanan histolojik tip

için çalışmamızda “Lenfosit-baskın meme karsinomu” ismi kullanıldı [1, 9, 57]. Lenfatik, vasküler ve perinöral invazyon varlığı ayrı ayrı kaydedildi. Doku işaretleme boyasında invaziv ve/veya in situ karsinom hücresi varlığı durumunda cerrahi sınır pozitifliği olarak kabul edildi. Peritümöral lenfositik yanıt (tümörü infiltre eden lenfositler; TİL) değerlendirmesi, TİL Çalışma Grubu’nun önerilerine göre yapıldı [9]. Buna göre, Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda, invaziv tümör sınırları içinde kalan “hot spot” stromal alanlardaki mononükleer inflamatuvar hücreler TİL olarak değerlendirildi. TİL saptanan olgularda, TİL yoğunluğu semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve “hafif”, “orta”, “belirgin” olmak üzere kaydedildi.

3.4.2. CD8 immünohistokimyasal değerlendirme

CD8 immünohistokimyası ile sitotoksik TİL değerlendirildi. Değerlendirme TİL Çalışma Grubu’nun önerilerine göre yapıldı [9]. TİL Çalışma Grubu günlük pratikte Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda seçilecek uygun alandaki mononükleer inflamatuvar hücrelerin (lenfosit ve plazmasit) değerlendirilmesini önermektedir. Günlük pratikte özel immünohistokimyasal belirteçlerin Hematoksilen-Eozin boyasına üstün olmadığını savunmaktadır. Bununla birlikte araştırma çalışmalarında TİL sub-gruplarını değerlendirmek için CD8 ve FOXP3 gibi özel immünohistokimya boyalarının kullanımını desteklemektedir.

TİL Çalışma Grubu önerilerine göre, öncelikle invaziv tümör alanının sınırları belirlenmeli ve bu sınırlar içinde kalan TİL değerlendirilmelidir. Bu sınırlar içinde yer alan TİL intratümöral yerleşebileceği gibi tümör stromasında da yerleşebilir. İnatümöral TİL, arada stroma olmaksızın tümör hücrelerine doğrudan temas eden lenfositleri ifade etmektedir. Stromal TİL, tümör hücrelerine temas etmeden, tümör hücrelerinin arasındaki stromada yer alan lenfositleri tanımlamaktadır. TİL, canlı mikroçevrede hareket edebilen dinamik elemanlardır. Bu nedenle intratümöral – stromal TİL ayrımının artifisyel olabileceği düşünülmektedir. TİL Çalışma Grubu’na göre intratümöral TİL skorlamasının stromal TİL skorlamasına üstünlüğü yoktur. Bununla birlikte, günlük pratikte, Hematoksilen-

Eozin boyalı lamlarda, özellikle tümör hücrelerinin küçük boyutlu olduğu olgularda, patologlar intratümöral TİL skorlamasında hata yapabilmektedir. Bu nedenle, TİL Çalışma Grubu günlük pratikte yalnızca stromal TİL skorlamasını önermektedir. Araştırma çalışmaları için gerekirse ayrı ayrı intratümöral ve stromal TİL skorlaması yapılabileceği belirtilmiştir [9].

TİL Çalışma Grubu, TİL skorunun yüzde olarak belirtilmesini önermiştir. TİL yüzdesi belirlenirken “hot spot” alanlara odaklanılmamalı; tüm alanların ortalama yüzdesi verilmelidir. Yüzde değerleri, hücre sayımı yapmadan, TİL’in stromal veya intratümöral alanın yüzde kaçını kapladığı belirlenerek verilmelidir. Değerlendirme 200x – 400x büyütmede (10x oküler ve 20x – 40x objektif) yapılmalıdır. Nekroz ve/veya artefakt içeren alanlar değerlendirmeye alınmamalıdır. Eşlik eden lenfoid foliküller varsa, TİL skoruna dahil edilmemeli; lenfoid folikül varlığı ek parametre olarak bildirilmelidir [9].

Çalışmamızda CD8 boyalı immünohistokimya lamlarında öncelikle invaziv tümör alanının sınırları çizildi. Bu sınırlar içinde kalan tüm alanlar 200x büyütmede değerlendirildi. CD8 ile nükleer immünekspresyon gösteren sitotoksik TİL’lerin ortalama yüzdeleri belirlendi. Yüzdeler %0 ile %100 arasında sürekli veriler olarak intratümöral ve stromal TİL için ayrı ayrı kaydedildi.

TİL Çalışma Grubu, lenfosit-baskın meme karsinomlarını %50-60’dan fazla TİL içeren tümörler olarak tanımlamıştır [9]. Bu nedenle, literatürde meme karsinomlarında tümörü infiltre eden lenfositleri inceleyen çalışmalarda, “yüksek” ve “düşük” TİL grupları için sıklıkla %50 sınır değeri kullanılmıştır [57, 59, 233]. Bazı çalışmalarda %30 [57], %40 [58] ve %60 [61] sınır değerlerinin de kullanıldığı görülmüştür.

Ohtani ve ark. 2015 yılındaki çalışmalarında sınır değerini %30 ve %50 kabul ederek ayrı ayrı incelemiş; sınır değeri %50 kabul edildiğinde hastalısız sağkalımı %100 bulmuştur [57]. Hida ve ark. TİL yüzdelerini düşük (<%10), orta (%10-50) ve yüksek (>%50) olarak gruplamıştır [59]. Denkert ve ark. ise TİL yüzdelerini düşük (≤%10), orta (%11-59) ve yüksek (≥%60) olarak gruplamıştır [61].

Çalışmamızda, Hida ve ark.’ın çalışmasına benzer şekilde, CD8 immünekspresyonu göstermeyen olgular “negatif”, %1-9 oranında immünekspresyon

gösteren olgular “düşük”, %10-49 oranında immünekspresyon gösteren olgular “orta” ve \geq %50 oranında immünekspresyon gösteren olgular “yüksek” olarak gruplanmıştır.

Olgu serimizde, sağkalımı en iyi yansıtan CD8 ekspresyon değerleri (“cut-off”) log analizleri ile intratümöral alan için %20 ve stromal alan için %25 olarak bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak iki kategorili bir gruplama sistemi daha yapılmış ve olgular “düşük” ve “yüksek” ekspresyon gruplarına ayrılmıştır.

3.4.3. FOXP3 immünohistokimyasal değerlendirme

FOXP3 immünohistokimyası ile regülatuar-TİL değerlendirildi. Değerlendirme TİL Çalışma Grubu'nun önerilerine göre yapıldı [9]. TİL Çalışma Grubu'nun değerlendirme önerileri bölüm 3.4.1'de detaylı olarak tartışıldı. Çalışmamızda FOXP3 boyalı immünohistokimya lamalarında öncelikle invaziv tümör alanının sınırları çizildi. Bu sınırlar içinde kalan tüm alanlar 200x büyütmede değerlendirildi. FOXP3 ile nükleer immünekspresyon gösteren regülatuar TİL'lerin ortalama yüzdeleri belirlendi. Yüzdeler %0 ile %100 arasında sürekli veriler olarak intratümöral ve stromal regülatuar TİL için ayrı ayrı kaydedildi.

Stanton ve ark.'ın çalışmasına benzer şekilde, FOXP3 ekspresyon yüzdesi ortanca değer altındaki olgular “düşük”, ortanca değer ve üstündeki olgular “yüksek” olmak üzere iki gruba ayrılmak istendi [234]. Ancak, çalışmamızda FOXP3 ekspresyon yüzdelerinin oldukça düşük bulunması (intratümöral FOXP3 ekspresyonu ortanca değeri %1, stromal FOXP3 ekspresyonu ortanca değeri %2, FOXP3 ekspresyon dağılımı hem intratümöral hem de stromal kompartmanlarda %0 ile %10 arasında dağılım göstermekte) nedeniyle; bu gruplama sistemi kullanılmadı.

Olgu serimizde, sağkalımı en iyi yansıtan FOXP3 ekspresyon değerleri (“cut-off”) log analizleri ile intratümöral alan için %1 ve stromal alan için %5 olarak

bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak iki kategorili bir gruplama sistemi yapılmış ve olgular “düşük” ve “yüksek” ekspresyon gruplarına ayrılmıştır.

Literatürde meme karsinomlarında CD8/FOXP3 immünekspresyon oranını inceleyen çalışmalar bulunmaktadır [11, 183]. Çalışmamızda da sitotoksik T lenfositlerin regülatuar T lenfositlere oranı (CD8 immünekspresyon yüzdesi/FOXP3 immünekspresyon yüzdesi) hesaplanmıştır.

3.4.4. PD-L1 immünohistokimyasal değerlendirme

PD-L1 immünohistokimyası ile PD-L1 eksprese eden tümör hücreleri ve TİL değerlendirildi. Literatürde çeşitli çalışmalarda membranöz ekspresyon [235] veya membranöz ve sitoplazmik ekspresyon [13] pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda parsiyel veya komplet membranöz immünekspresyon gösteren hücreler pozitif olarak kabul edildi. Nekroz ve/veya artefakt içeren alanlar değerlendirmeye alınmadı. PD-L1 immünekspresyon yüzdeleri tümör hücreleri ve TİL için ayrı ayrı belirlendi. Yüzdeler %0 ile %100 arasında sürekli veriler olarak kaydedildi.

Literatürde PD-L1 immünekspresyonu için net bir sınır değeri bulunmamaktadır. PD-L1 immünohistokimyasının en yaygın kullanıldığı hastalık grubu küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarıdır. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında genellikle %1 ve üzeri ekspresyon pozitif olarak kabul edilmekle birlikte; bazı çalışmalar %10, %25 ve %50 gibi sınır değerleri kullanarak gruplar oluşturmanın anti-PD-L1 terapi yanıtı açısından daha anlamlı olabileceğini savunmuştur [22, 25, 121, 236, 237].

Literatürde meme karsinomlarında PD-L1 ekspresyonunu inceleyen çeşitli çalışmalarda farklı sınır değerleri kullanılarak gruplar oluşturulmuştur. Çalışmamızda, PD-L1 ekspresyon yüzdeleri, literatürde Karnik ve ark. tarafından da kullanılan, “üç kategorili sistem” ve “dört kategorili sistem” ile ayrı ayrı gruplandı [235]. Üç kategorili sistemde olgular “ekspresyon yok” (%0), “düşük ekspresyon”

(%1-%49) ve “yüksek ekspresyon” (%50-%100) gruplarına ayrıldı. Dört kategorili sistemde ise olgular “ekspresyon yok” (%0), “düşük ekspresyon (%1-9), “orta ekspresyon” (%10-49), “yüksek ekspresyon” (%50-%100) gruplarına ayrıldı. Ayrıca, literatürde Wang ve ark. tarafından önerildiği üzere, çalışmamızda elde ettiğimiz PDL1 yüzde verilerimizin ortanca değeri ve 75. percentil değeri sınır kabul edilerek iki farklı gruplama daha yapıldı [19]. Neoplastik kompartmanda ortanca değere göre üç grup oluşturuldu (0= PD-L1 ekspresyonu yok; 1= PD-L1 ekspresyonu %3’ün altında; 2= PD-L1 ekspresyonu %3 ve üzerinde). Neoplastik kompartmanda 75. percentil değerine göre üç grup oluşturuldu (0= PD-L1 ekspresyonu yok; 1= PD-L1 ekspresyonu %20’nin altında; 2= PD-L1 ekspresyonu %20 ve üzerinde). TİL kompartmanında ortanca değere göre üç grup oluşturuldu (0= PD-L1 ekspresyonu yok; 1= PD-L1 ekspresyonu %15’in altında; 2= PD-L1 ekspresyonu %15 ve üzerinde). TİL kompartmanında 75. percentil değerine göre üç grup oluşturuldu (0= PD-L1 ekspresyonu yok; 1= PD-L1 ekspresyonu %35’in altında; 2= PD-L1 ekspresyonu %35 ve üzerinde). Yukarıda tanımlanan “üç kategorili”, “dört kategorili”, “ortanca değer” ve “75.percentil” gruplama sistemleri hem neoplastik kompartman hem de TİL kompartmanı için ayrı ayrı uygulandı.

Olgu serimizde, sağkalımı en iyi yansıtan PD-L1 ekspresyon değerleri (“cut-off”) log analizleri ile neoplastik hücreler için %10 ve TİL için %5 olarak bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak iki kategorili bir gruplama sistemi daha yapılmış ve olgular “düşük” ve “yüksek” ekspresyon gruplarına ayrılmıştır.

Boyanma şiddeti “negatif” (0), “zayıf boyanma” (1), “orta şiddette boyanma” (2), “şiddetli boyanma” (3) olarak skorlandı. Boyanma şiddeti heterojen olan olgularda, yaygın görülen boyanma şiddetine göre skor verildi. Literatürde çeşitli çalışmalarda benzer boyanma şiddeti skorlaması kullanılmış olmakla birlikte [13, 19]; bazı çalışmalarda boyanma şiddeti değerlendirilmemiştir [235]. Çalışmamızda PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile boyanma şiddeti çarpılarak “PD-L1 immünekspresyon skoru” hesaplanmıştır. Ayrıca, Wang ve ark.’ın çalışmasında olduğu gibi, PD-L1 immünekspresyon skoru verilerimizin 75. percentil değeri sınır kabul edilerek gruplama yapıldı. Buna göre; neoplastik kompartman için, olgular negatif (PD-L1 immünekspresyon skoru=0), düşük skor (PD-L1 immünekspresyon skoru < 40), ve yüksek skor (PD-L1 immünekspresyon skoru \geq 40) olmak üzere üç gruba ayrıldı.

TİL kompartmanı için, negatif (PD-L1 immünoekspresyon skoru=0), düşük skor (PD-L1 immünoekspresyon skoru < 80), ve yüksek skor (PD-L1 immünoekspresyon skoru ≥ 80) olmak üzere üç gruba ayrıldı.

3.4.5. CD163 immünohistokimyasal değerlendirme

CD163 immünohistokimyası ile tümör ilişkili M2 makrofajlar (TİM) değerlendirildi. Sitoplazmik CD163 immünoekspresyonu gösteren makrofajlar pozitif kabul edildi. Literatürde meme karsinomlarında tümör ilişkili makrofajları inceleyen bazı çalışmalarda yalnızca stromal TİM değerlendirilirken [226, 229]; bazı çalışmalarda stromal ve intratümöral TİM değerlendirilmiştir [230, 238]. Çalışmamızda, Yang ve ark.'ın bazal benzeri meme karsinomlarında tümör ilişkili M2 makrofajları inceledikleri çalışmalarında kullandıkları yöntem kullanıldı [238]. CD163 immünohistokimya boyalı lamlarda öncelikle invaziv tümör alanının sınırları çizildi. Bu sınırlar içinde kalan tüm alanlar 100x büyütmede taranarak intratümöral ve stromal “hot spot” odaklar belirlendi. “Hot spot” odaklarda intratümöral ve stromal alanlarda ayrı ayrı 5 BBA’da (400x) CD163 immünoekspresyonu gösteren hücreler sayıldı. Nekroz ve/veya artefakt içeren alanlar değerlendirmeye alınmadı. Elde edilen sayılar beşe bölünerek BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı hesaplandı. Ortalama M2 makrofaj sayıları intratümöral ve stromal TİM için ayrı ayrı kaydedildi.

Literatürde CD163 ortanca değerinin altındaki olguları “düşük”, ortanca değer ve üstündeki olguları “yüksek” olmak üzere gruplara ayıran çalışmalar mevcuttur [226, 229, 238]. Çalışmamızda, intratümöral alanda BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı ortanca değerine göre üç grup oluşturuldu (Negatif= CD163 ekspresyonu yok; Düşük= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 7’den az; Yüksek= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 7 ve üzerinde). Stromal alanda BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı ortanca değerine göre de üç grup oluşturuldu (Negatif= CD163 ekspresyonu yok; Düşük= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 22’den az; Yüksek= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 22 ve üzerinde). Ek olarak, çalışmamızda olgular 75.persentil değerine göre de gruplandı.

Buna göre intratümöral BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 75.persentil değerine göre üç grup oluşturuldu (Negatif= CD163 ekspresyonu yok; Düşük= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 14'den az; Yüksek= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 14 ve üzerinde). Stromal BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 75.persentil değerine göre de üç grup oluşturuldu (Negatif= CD163 ekspresyonu yok; Düşük= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 38'den az; Yüksek= BBA başına ortalama M2 makrofaj sayısı 38 ve üzerinde).

Olgu serimizde, sağkalımı en iyi yansıtan CD163 ekspresyon değerleri (“cut-off”) log analizleri ile intratümöral alan için %20 ve stromal alan için %22 olarak bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak iki kategorili bir gruplama sistemi daha yapılmış ve olgular “düşük” ve “yüksek” ekspresyon gruplarına ayrılmıştır.

3.4.6. ER ve PR immünohistokimyasal değerlendirme

ER ve PR immünohistokimyasaları ile neoplastik hücrelerde nükleer Östrojen Reseptör ve Progesteron Reseptör immünekspresyonları değerlendirildi. Kılavuzlara göre neoplastik hücrelerde %1 ve üzerinde nükleer immünekspresyon görülen olgular pozitif olarak kabul edildi [239, 240]. Pozitif olgular çalışmamıza dahil edilmedi. Olgulara ait rutinde uygulanmış olan ER ve PR immünohistokimya lamalarına bölüm arşivinden, immünekspresyon sonuçlarına olguların hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşıldı.

3.4.7. HER2 immünohistokimya ve in situ hibridizasyon değerlendirmesi

HER2 immünohistokimyası ile neoplastik hücrelerdeki membranöz immünekspresyon kılavuzlara göre [231, 232, 240] değerlendirildi. Neoplastik hücrelerde immünekspresyon izlenmiyor veya %10'dan az neoplastik hücrede

inkomplet/silik membranöz immünekspresyon izleniyorsa skor 0; %10'dan fazla neoplastik hücrede inkomplet/silik membranöz immünekspresyon izleniyorsa skor 1 olarak skorlandı [231]. Skor 0 ve skor 1 olgular negatif olarak kabul edildi. %10'dan fazla neoplastik hücrede komplet/zayıf-orta membranöz immünekspresyon izleniyorsa; skor 2 olarak skorlandı [231]. Skor 2 olgular dual prob in situ hibridizasyon yöntemleriyle değerlendirildi. %10'dan fazla neoplastik hücrede komplet/intens membranöz immünekspresyon izlenen olgular ise skor 3 olarak skorlandı [231]. Skor 3 olgular pozitif kabul edildi ve çalışmaya dahil edilmedi.

Dual prob in situ hibridizasyon yöntemleriyle, HER2/CEP17 oranı <2 veya HER2 kopya sayısı <4 ise; olgu negatif olarak kabul edildi [231]. HER2/CEP17 oranı <2 ve HER2 kopya sayısı 4-6 olan olgular, HER2/CEP17 oranı <2 ve HER2 kopya sayısı ≥ 6 olan olgular, HER2/CEP17 oranı ≥ 2 ve HER2 kopya sayısı <4 olan olgular için ASCO/CAP kılavuzuna göre ek çalışmalar yapılarak yeniden değerlendirildi [231]. HER2/CEP17 oranı ≥ 2 ve HER2 kopya sayısı ≥ 4 ise olgu pozitif kabul edildi [231]. HER2-pozitif olgular çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmamızda olgulara ait rutinde uygulanmış olan HER2 immünohistokimya lamalarına bölüm arşivinden; immünekspresyon ve in situ hibridizasyon sonuçlarına olguların hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşıldı.

3.4.8. Ki67 immünohistokimyasal değerlendirme

Ki67 immünohistokimyası ile neoplastik hücrelerin proliferasyon indeksi değerlendirildi. Ki67 immünohistokimya boyalı lamın tamamı 100x büyütmede incelenerek semi-kuantatif “eye balling” yöntemiyle neoplastik hücrelerdeki nükleer immünekspresyon yüzdesi belirlendi. Çalışmamızda olgulara ait rutinde uygulanmış olan Ki67 immünohistokimya lamalarına bölüm arşivinden, immünekspresyon sonuçlarına olguların hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı patoloji raporlarından ulaşıldı. Ayrıca, Ki67 proliferasyon indeksi %19 ve altında bulunan olgular “düşük

proliferasyon indeksi”; %20 ve üzerinde bulunan olgular ise “yüksek proliferasyon indeksi” olarak gruplandı [145, 146, 148].

3.5. Patolojik Risk Skoru ve Kötü Prognoz Skoru

Patolojik prognostik parametrelere puan verilerek, 12 puan üzerinden değerlendirilen “Patolojik risk skoru” oluşturuldu. Patolojik risk skoru hesaplanırken;

- pT: Evre kadar puan (1-2-3-4)
- pN: Evre kadar puan (0-1-2-3)
- Ki67: Düşük (<%20) ise 0 puan; yüksek (\geq 20) ise 1 puan
- Cerrahi sınırdaki tümör: Yoksa 0 puan; varsa 1 puan
- Lenfatik invazyon: Yoksa 0 puan; varsa 1 puan
- Anjiyoinvazyon: Yoksa 0 puan; varsa 1 puan
- Perinöral invazyon: Yoksa 0 puan; varsa 1 puan verildi.

Çalışmamızda tüm olguların histolojik derecesi aynı olduğundan, patolojik risk skoruna histolojik derece dahil edilmedi.

Patolojik risk skoruna klinik kötü prognostik parametrelerin (eksitus, lokal nüks, uzak metastaz) eklenmesiyle 15 puan üzerinden değerlendirilen “kötü prognoz skoru” oluşturuldu. Kötü prognoz skoru hesaplanırken;

- Eksitus: Sağ ise 0 puan; Eksitus ise 1 puan
- Lokal nüks: Yoksa 0 puan; varsa 1 puan
- Uzak metastaz: Yoksa 0 puan; varsa 1 puan verildi.

3.6. İstatistik

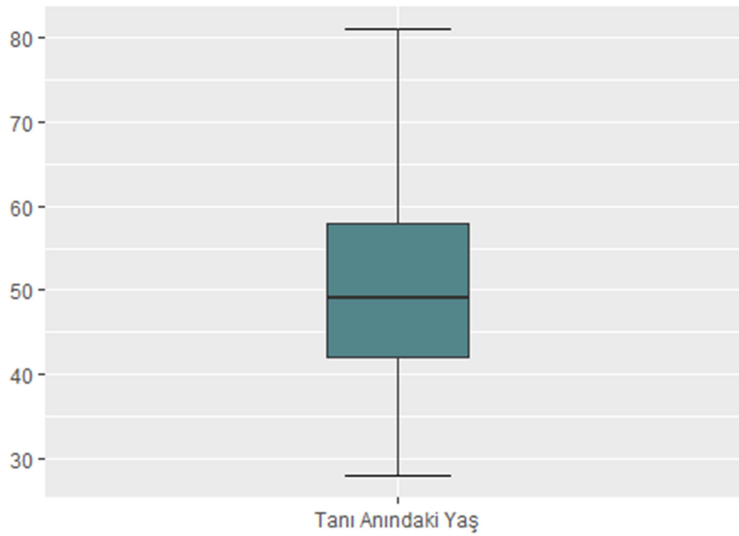
Çalışmamızda, istatistiksel analizler için R-3.4.3 programı kullanıldı. İmmünohistokimya boyaları için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Kategorik değişkenlerin arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı. Sürekli değişkenlerin ortalamalarının karşılaştırılmasında Pearson testi, sürekli ve kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında one-way ANOVA ve t-testi kullanılırken; non-parametrik karşılaştırmalarda iki grup için Mann-Whitney-U testi, ikiden fazla grup için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. CD8, PD-L1, FOXP3 ve CD163 ekspresyon gruplarının birbirleriyle ve diğer prognostik parametrelerle ilişkisi Spearman’s rank korelasyonu ile değerlendirildi. Sağkalım analizlerinde Kaplan-Meier, Log-rank, Cox-proportional-hazard testleri kullanıldı. Tüm istatistiksel testlerde p değerinin 0,05’in altında olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

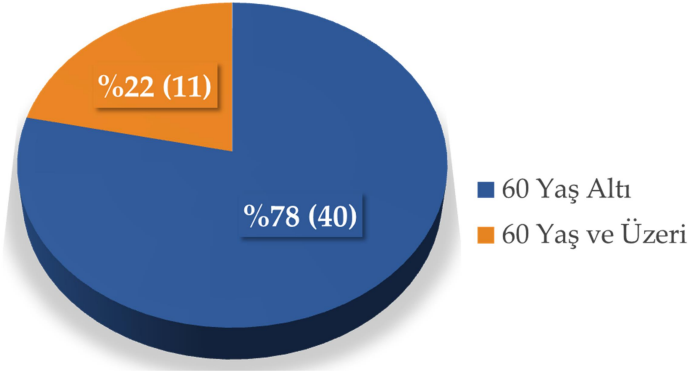
4.1. Demografik Veriler ve Klinik Takip Bulguları

Çalışmamızda yer alan 51 TNMK olgusunun yaş ortalaması 52,76'ydı (Ortanca: 52; SS: 12,13; minimum: 32; maksimum: 84). Olguların tanı anındaki yaş ortalaması 49,74'tü (Ortanca: 49; SS: 12; Minimum: 28; Maksimum: 81) (Şekil 8). Tanı anında 11 olgu (%21,6) 40 yaş altında, 16 olgu (%31,4) 40-49 yaş arasında, 13 olgu (%25,5) 50-59 yaş arasında, 9 olgu (%17,6) 60-69 yaş arasında, kalan 2 olgu (%3,9) ise 70 yaş üzerindekiydi. Olgular 60 yaş "cut-off" değeri ile gruplandırıldığında; 40 (%78) olgu 60 yaş altında, 11 (%22) olgu 60 yaş ve üzerindekiydi (Şekil 9). Olguların tamamı kadındı. Cerrahi işlem, olguların 34'ünde (%66,7) lumpektomi, 17'sinde (%33,3) mastektomiydi.

Olguların yıllara göre dağılımına bakıldığında, 10'u (%19,6) 2012 yılında, 13'ü (%25,4) 2013 yılında, 9'u (%17,6) 2014 yılında, 8'i (%15,6) 2015 yılında, 8'i (%15,6) 2016 yılında, 3'ü (%5,8) 2017 yılında başvurmuştu.



Şekil 8. Olguların tanı anındaki yaş dağılımı.



Şekil 9. Olguların tanı anındaki yaş grupları.

Çalışmamızda olguların tamamının klinik takip bilgileri elde edildi. Takip süresi ortalama 1450 gündü (48,3 ay) (Ortanca: 1469 gün; SS: 611,42; minimum: 103 gün; maksimum: 2512 gün). Olguların hiçbiri neo-adjuvan terapi almamıştı. Olguların tamamı adjuvan antrasiklin ve taksan bazlı kemoterapi aldı. Lumpektomi yapılan 34 olgunun tamamı kılavuzlar doğrultusunda post-operatif radyoterapi alırken; mastektomi yapılan 17 olgunun yalnızca 1'i (cerrahi sınır pozitifliği nedeniyle) post-operatif radyoterapi aldı. Klinik takip bilgilerine göre olguların;

- 9'u (%17,64) eksitus ile sonuçlanmıştı.
- 8'inde (%15,68) nüks gelişmişti.
- 5'inde (%9,80) uzak metastaz (1 olguda multiple sistemik metastaz, 2 olguda akciğer metastazı, 2 olguda kemik metastazı) tespit edilmişti.
- 1'inde karşı memede lobüler karsinoma in situ tespit edilmişti (Olgunun orijinal tanısı lenfosit-baskın meme karsinomuydu).
- 42'si (%82,35) sağ ve sağlıklıydı.
- Lenf nodu eksizyonu yapılan 47 olgunun 20'sinde (%42,5) tanı anında lenf nodu metastazı tespit edilmişti.

51 TNMK olgusunu içeren serimizde, olgularımızın 5 yıllık genel sağkalımı (*overall survival*) %75,6'ydı. Olgularımızın 5 yıllık hastalıksız sağkalımı (*disease-free survival*) %67,5'ti.

Eksitus olan 9 olguya ait klinik, patolojik ve immünohistokimyasal özellikler tablo 10'da özetlenmiştir. Bu olgularda, eksitus cerrahiden ortalama 950 gün (31,6 ay) sonra gerçekleşmişti [Ortanca: 827 gün (27,5 ay); SS: 522,75; minimum: 103 gün (3,4 ay); maksimum: 1740 (58 ay)]. Bir olgu post-operatif 1. yıl içinde, 3 olgu 2. yıl içinde, 2 olgu 3. yıl içinde, 1 olgu 4. yıl içinde ve kalan 2 olgu 5. yıl içinde eksitus olarak gözlemlenmişti. Eksitus olan olguların tanı anında yaş ortalaması 56,22'ydi (Ortanca: 57; SS: 8,61; minimum: 43; maksimum: 69).

Olgularımızın yaşlarını “<60 yaş” ve “≥60 yaş” olmak üzere ikiye ayırdığımızda; tüm eksitusların %66,6'sı 60 yaş altında görülürken, %33,3'ü 60 yaş ve üzerinde görülmüştü. Çalışmamızda, 60 yaş altı 5 yıllık genel sağkalım %77 olup 60 yaş ve üzeri 5 yıllık genel sağkalım %70'ydi. Nüks görülen 8 olguda; nüks, post-operatif ortalama 637,66 günde (21,2 ay) gerçekleşmişti [Ortanca: 534 gün (17,8 ay); SS: 422,90; minimum: 291 gün (9,7 ay); maksimum: 1463 gün (48,7 ay)]. Olguların 2'sinde post-operatif 1. yılda, 5'inde post-operatif 2. yılda, 1'inde post-operatif 5. yılda nüks gelişmişti. Nüks gelişen olgulardan 6'sı ilerleyen dönemde eksitus ile sonuçlanırken; 3'ünde uzak metastaz gelişmişti.

Klinik takip sürecinde, 5 olguda uzak metastaz tespit edilmişti. Bu olgularda, metastaz post-operatif ortalama 596,85 günde (19,8 ay) gelişmişti [Ortanca: 642 gün (21,4 ay); SS: 141,46; minimum: 392 gün (13 ay); maksimum: 711 gün (23,7 ay)]. Uzak metastaz görülen olgulardan 4'ü ilerleyen dönemde eksitus ile sonuçlanmıştı. Uzak metastaz görülen 5 olgudan 3'ünde nüks de mevcuttu.

Tablo 10. Eksitus ile sonuçlanan olguların klinik, patolojik ve immünohistokimyasal özellikleri.

Özellik	Olgu								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Yaş	50	60	69	57	59	43	67	48	53
Takip süresi	658	635	660	827	103	1740	1064	1233	163 4
Nüks	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var	Var	Var	Yok
Metastaz	Var	Var	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Tümör tipi	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
Derece	3	3	3	3	3	3	3	3	3
pT	1	4	2	2	2	2	2	2	2
pN	0	X	3	2	1	0	1	1	1
Lİ	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var	Yok	Var	Var
Aİ	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var	Yok	Var	Var
PNİ	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
CS	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
LF	Yok	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
HA	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok
LY	Hafif	Yok	Hafif	Orta	Hafif	Orta	Yok	Hafif	Orta
tCD8	%5	%0	%2	%20	%15	%5	%15	%1	%15
sCD8	%50	%25	%2	%20	%40	%20	%60	%6	%50
tFOXP3	%1	%0	%0	%0	%1	%1	%3	%0	%0
sFOXP3	%4	%3	%0	%1	%1	%4	%5	%1	%0
tPDL1	%0	%1	%0	%1	%8	%10	%5	%2	%10
tPDL1skor	0	1	0	1	24	10	10	2	20
tilPDL1	%1	%0	%0	%30	%5	%0	%30	%4	%20
tilPDL1skor	1	0	0	90	10	0	60	4	40
tCD163	2	12	1	6	14	20	9	1	2
sCD163	12	22	2,8	20	38	52	22	7	20
Ki67	%30	%60	%40	%50	%40	%60	%70	%60	%40

(Takip süresi: Eksitus tarihi ile operasyon tarihi arasındaki gün sayısı, NST: İnvaziv karsinom NST, Lİ: Lenfatik invazyon, Aİ: Anjiyoinvazyon, PNİ: Perinöral invazyon, CS: Cerrahi sınırda tümör varlığı, LF: Lenfoid folikül, HA: Histiyositik agregat, LY: Hematoksilen-eozin lamalarında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt, tCD8: İnatümöral CD8 yüzdesi, sCD8: Stromal CD8 yüzdesi, tFOXP3: İnatümöral FOXP3 yüzdesi, sFOXP3: Stromal FOXP3 yüzdesi, tPDL1: Tümör hücrelerinde PD-L1 yüzdesi, tPDL1skor: Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyon skoru, tilPDL1: Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 yüzdesi, tilPDL1skor: Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyon skoru, tCD163: İnatümöral BBA başına CD163 sayısı, sCD163: Stromal BBA başına CD163 sayısı.)

4.2. Histomorfolojik Veriler

4.2.1. Patolojik ve klinik evre

- Patolojik primer tümör evresi

Olgularımızın 18'i (%35,3) pT1, 28'i (%54,9) pT2, 4'ü (%7,8) pT3, 1'i (%2) pT4'tü. Beş yıllık sağkalım pT1 evreli olgularda %94 iken, pT2 evreli olgularda %65'e düşmüştü. Beş yıllık sağkalım pT3 evreli olgularda %100 olmakla birlikte, bu durumun pT3 olgu sayısı azlığından kaynaklandığı düşünüldü. pT4 evresinde yer alan tek olgumuz 2. yılda eksitus olduğundan, beş yıllık sağkalım %0'dı.

- Patolojik lenf nodu evresi

Çalışmamızda yer alan 51 TNMK olgusunun 47'sinde (%92,8) lenf nodu eksizyonu yapılmıştı. Patolojik lenf nodu evresi; 27 olguda (%52,9) pN0, 15 olguda (%29,4) pN1, 3 olguda (%5,9) pN2, 2 olguda (%3,9) pN3 ve 4 olguda (%7,8) pNX'ti. Beş yıllık sağkalım pN0 evresi için %85, pN1 evresi için %66, pN2 evresi için %66'ydı. Serimizde, pN3 evreli 2 olgu mevcuttur. Bunlardan ilki post-operatif 2. yılında eksitus ile sonuçlanmıştır. Diğer olgu ise henüz post-operatif 3. yılındadır. Bu nedenlerle pN3 evresi için beş yıllık sağkalım hesabı yapılamamıştır.

- Klinik evre

Olgularımızın klinik evre dağılımı tablo 11'de verilmiştir. On iki olgu (%23,5) evre IA, 32 olgu (%62,8) evre II (21 olgu evre IIA, 11 olgu evre IIB), kalan 7 olgu (%13,7) ise evre III'tü (4 olgu evre IIIA, 2 olgu evre IIIB, 1 olgu evre IIIC).

Yaşa göre klinik evreye baktığımızda; 60 yaş ve üstündeki olgular daha çok evre II ve III olup (%27 evre I; %36 evre II; %36 evre III) 60 yaş altındaki olgular daha çok evre I ve II'ydi (%22,5 evre I; %70 evre II; %7,5 evre III). Evre I olguların %75'i 60 yaş altında, %25'i 60 yaş üzerindedir. Evre III olguların %43'ü 60 yaş altında, %57'si 60 yaş üzerindedir.

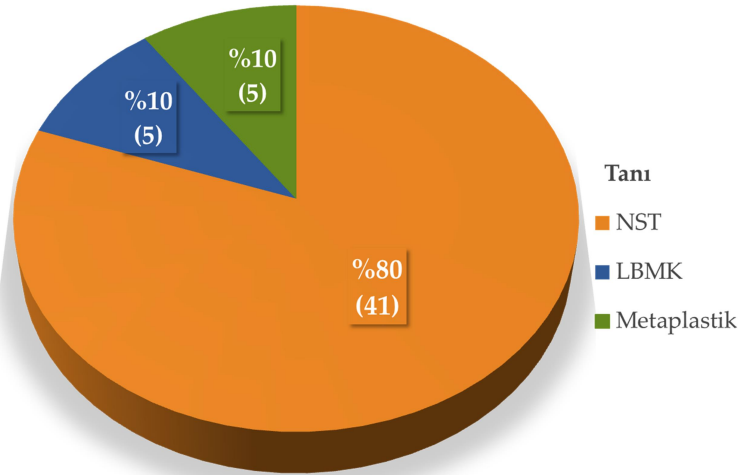
Eksitus ile sonuçlanan olguların klinik evrelerine bakıldığında; 1 olgu evre IA, 5 olgu evre II (4 olgu evre IIA, 1 olgu evre IIB), kalan 3 olgu evre III'tü (1 olgu evre IIIA, 1 olgu evre IIIB, 1 olgu evre IIIC).

Tablo 11. Klinik evrelerin dağılımı

Klinik Evre	Sayı (n)	Yüzde (%)
IA	12	23,5
IIA	21	41,2
IIB	11	21,6
IIIA	4	7,8
IIIB	1	2,0
IIIC	2	3,9
Toplam	51	100

4.2.2. Histolojik tümör tipi ve histolojik derece

Çalışmamıza dahil edilen 51 TNMK olgusunun 41'i (%80,4) invaziv karsinom, NST, 5'i (%9,8) lenfosit-baskın karsinom, 5'i (%9,8) metaplastik karsinomdu (Şekil 10). Eksitus olan olguların tamamı invaziv karsinom, NST tanısı almıştı. Uzak metastaz



Şekil 10. Histolojik tümör tiplerinin dağılımı. (NST: İnvaziv karsinom, NST; LBMK: Lenfosit baskın meme karsinomu; Metaplastik: Metaplastik karsinom).

ve/veya lokal nüks gelişen olguların hepsinin tanısı invaziv karsinom, NST idi. Çalışmamızdaki olguların tamamının histolojik derecesi 3'tü.

4.2.3. Cerrahi sınırlar

Olguların 46'sında (%90,2) cerrahi sınırlarda tümör görülmedi. Kalan 5 (%9,8) olguda ise cerrahi sınırlarda tümör saptandı. Cerrahi sınır pozitifliği görülen olguların 4'ünde cerrahi işlem lumpektomi iken, 1 olguda mastektomi idi. Klinik takip sürecinde, cerrahi sınırlarda tümör görülen olguların 1'inde nüks ve metastaz saptanmış olup bu olgu eksitus ile sonuçlanmıştı.

4.2.4. Proliferasyon indeksi

Olguların ortalama Ki67 proliferasyon indeksi %54,6 idi (Ortanca: %60; SS: 16,9; minimum: %15; maksimum: %80). Sınır değeri %20 alınarak proliferasyon indeksi iki gruba ayrıldığında; olguların 49'u (%96,1) yüksek proliferasyon, 2'si (%3,9) düşük proliferasyon göstermekteydi. Düşük proliferasyon gösteren iki olgunun da Ki67 değeri %15'ti.

Beş yıllık sağkalım, yüksek proliferasyon indeksine sahip olgularda %74 iken, düşük proliferasyon indeksine sahip 2 olguda %100'dü. Eksitus olan 9 olgunun Ki67 proliferasyon indeksi ortalama %50'ydü (Ortanca: %50; SS: 13,22; minimum: %30; maksimum: %70)

4.2.5. Anjiyo / lenfatik / perinöral invazyon

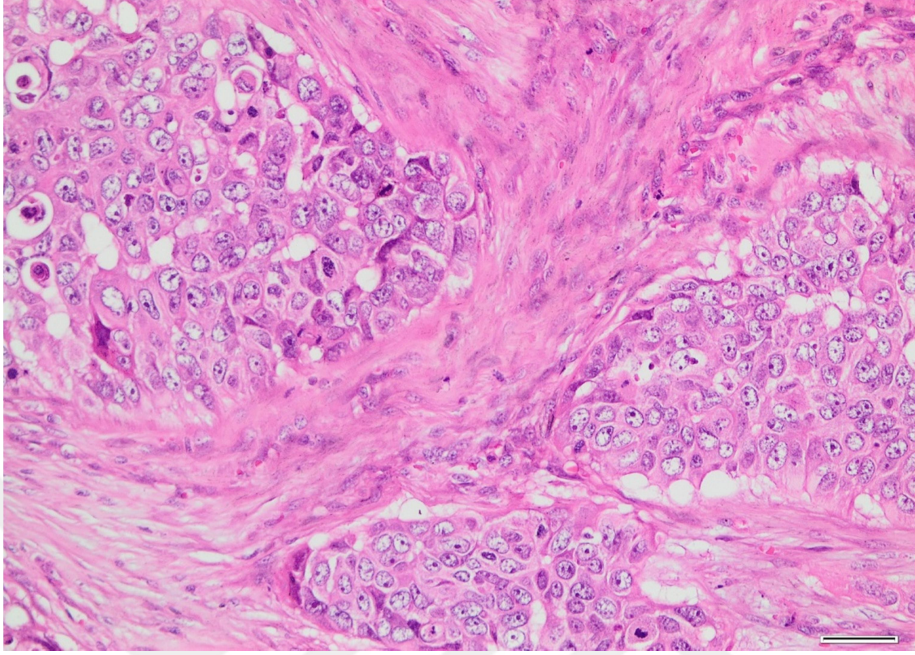
Oniki (%23,5) olguda anjiyoinvazyon, 23 (%45,1) olguda lenfatik invazyon, 5 (%9,8) olguda perinöral invazyon saptandı. Olgularımızdan eksitus ile sonuçlanan 9'u incelendiğinde; 5'inde lenfatik invazyon, 5'inde anjiyoinvazyon, 2'sinde ise perinöral invazyon görüldü. Beş yıllık sağkalım lenfatik invazyon görülen olgularda %67, görülmeyen olgularda %84'tü. Anjiyoinvazyon saptanan olgularda 5 yıllık sağkalım %51, anjiyoinvazyon görülmeyen olgularda %88'di. Perinöral invazyon izlenen olgularda 5 yıllık sağkalım %50 iken, perinöral invazyon saptanmayan olgularda %78'di.

4.2.6. Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL; peritümöral lenfositik yanıt)

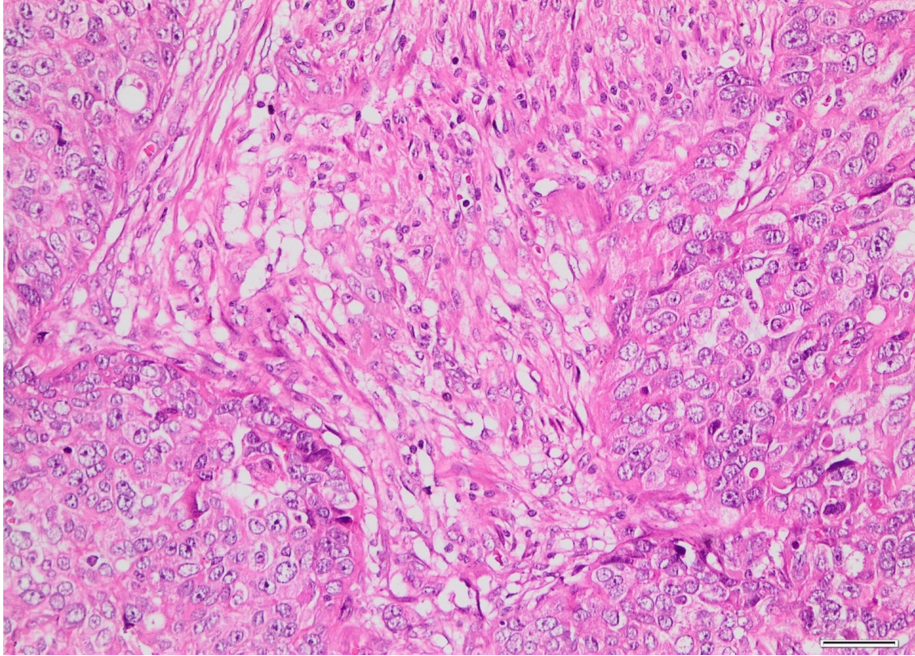
Lenfositik yanıt, TİL çalışma grubunun önerileri doğrultusunda değerlendirildi. TİL çalışma grubu, günlük pratikte Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda, invaziv tümör sınırları içinde kalan "hot spot" stromal alanlardaki mononükleer inflamatuvar hücrelerin değerlendirilmesini önermektedir. [9]. Çalışmamızda, Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda olguların 40'ında (%78,4) farklı derecelerde TİL izlendi.

TİL görülmeyen olgular "negatif", %1-9 oranında TİL görülen olgular "hafif", %10-49 oranında TİL görülen olgular "orta" ve \geq %50 oranında TİL görülen olgular "şiddetli" olarak gruplandı. Çalışmamızda TİL; olguların 14'ünde (%27,5) hafif derecede, 14'ünde (%27,5) orta derecede, 12'sinde (%23,5) şiddetli derecedeydi (Resim 3-4-5-6).

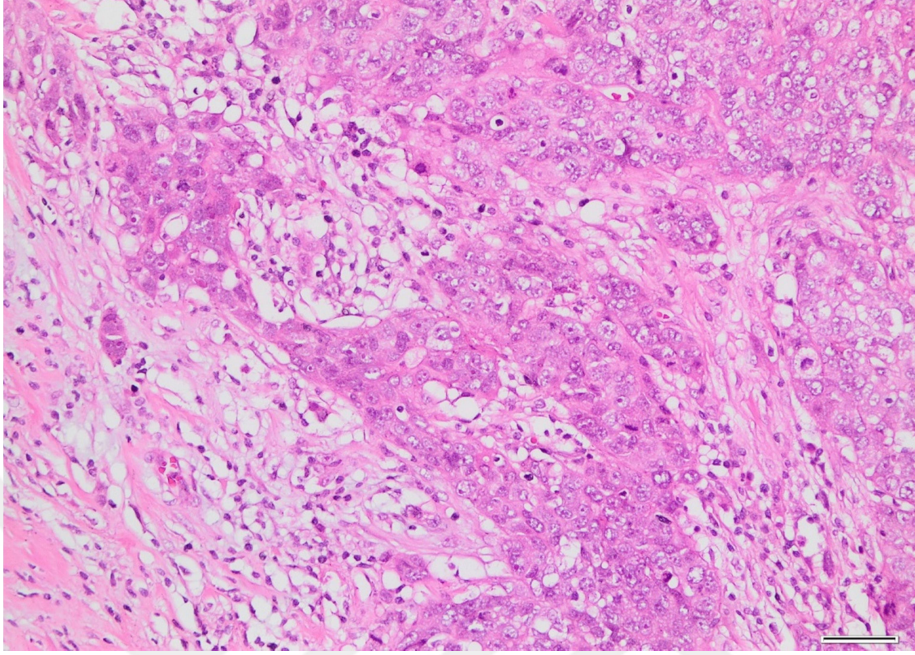
Çalışmamızda, eksitus olan olgulardan 2'sinde TİL görülmezken, 4'ünde hafif derecede, 3'ünde orta derecede TİL izlenmişti. Şiddetli derecede lenfositik yanıt saptanan olguların hiçbirinde eksitus görülmedi.



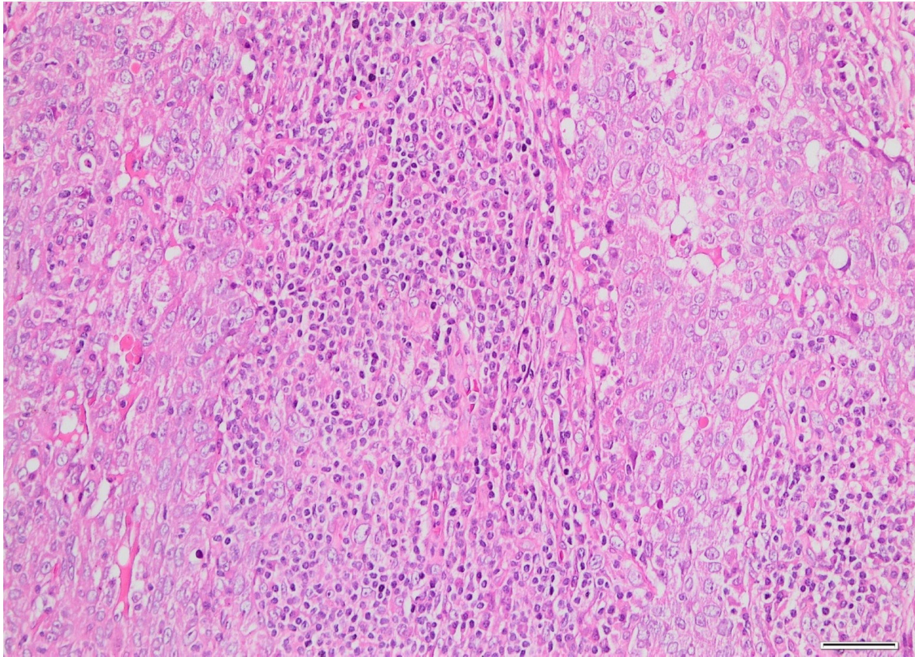
Resim 3. Tümörü infiltre eden lenfositler: Negatif



Resim 4. Tümörü infiltre eden lenfositler: Hafif.



Resim 5. Tümörü infiltre eden lenfositler: Orta.



Resim 6. Tümörü infiltre eden lenfositler: Şiddetli.

4.2.7. Lenfoid folikül ve histiyositik agregatlar

Olgularımızın 12'sinde (%23,5) peritümöral lenfoid folikül saptanmakla birlikte; 39'unda (%76,5) lenfoid folikül izlenmedi. Lenfoid folikül içeren 12 olgunun 6'sında tek lenfoid folikül, 6'sında ise 2 veya daha fazla sayıda lenfoid folikül görüldü. Eksitus olan 9 olgudan 1'inde tek lenfoid folikül, 1'inde 2'den fazla lenfoid folikül görülürken; kalan 7 olguda lenfoid folikül yapısı görülmedi.

Olgularımızın 7'sinde (%13,7) multiple histiyositik agregatlar mevcuttu. Kalan 44 olguda (%86,3) ise histiyositik agregat yapısı görülmedi. Çalışmamızda, eksitus olan 9 olgudan 1'inde histiyositik agregatlar saptanırken; diğer 8'inde histiyositik agregat yapısı izlenmedi.

4.3. İmmünohistokimyasal Veriler

4.3.1. CD8

Çalışmamıza dahil edilen 51 TNMK olgusunda intratümöral ve stromal CD8 ekspresyonu ayrı ayrı değerlendirildi.

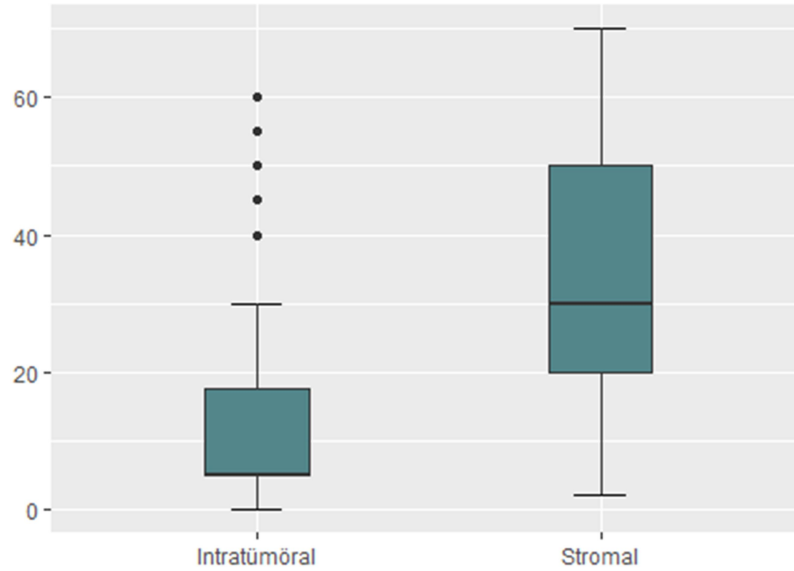
- İntratümöral CD8 ekspresyonu

İnatümöral CD8 immüekspresyonu ortalaması %13,8'di (Ortanca: %5; SS: 15,3; minimum: %0, maksimum: %60) (Şekil 11). Olgular intratümöral CD8 immüekspresyonlarına göre 4 gruba ayrıldığında; 1 olgu (%2) negatif, 27 olgu (%52,9) düşük, 20 olgu (%39,2) orta, 3 olgu (%5,9) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı (Resim 7-8-9-10) (Tablo 12). Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan CD8 ekspresyon "cut-off" değeri intratümöral alan için %20'ydi. Olgular bu "cut-off" değerine göre iki gruba ayrıldığında; 38 olgu (%74,5) düşük, 13 olgu (%25,5) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

İntratümöral CD8 ekspresyon gruplarında 5 yıllık genel sağkalıma baktığımızda; yüksek ekspresyon grubunda %100, orta ekspresyon grubunda %74, düşük ekspresyon grubunda %75, negatif grupta %0'dı. Eksitus görülen 9 olguya bakıldığında; intratümöral CD8 immüekspresyonu ortalaması %8,6'ydı (Ortanca: %5; SS: 7,53; minimum: 0; maksimum: %20).

- Stromal CD8 ekspresyonu

Stromal CD8 ekspresyonu ortalama %33,2'ydi (Ortanca: %30; SS: 18,6; minimum: %2; maksimum: %70) (Şekil 11). Çalışmamızda stromal CD8 ekspresyonu görülmeyen (negatif) olgu yoktu. Olgular stromal CD8 ekspresyonlarına göre 4 gruba ayrıldığında; 5 olgu (%9,8) düşük, 32 olgu (%62,7) orta, 14 olgu (%27,5) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı (Resim 11-12-13) (Tablo 12). Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan CD8 ekspresyon "cut-off" değeri stromal alan için %25 idi. Olgular bu "cut-off" değerine göre iki gruba ayrıldığında; 17 olgu (%33,3) düşük, 34 olgu (%66,7) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

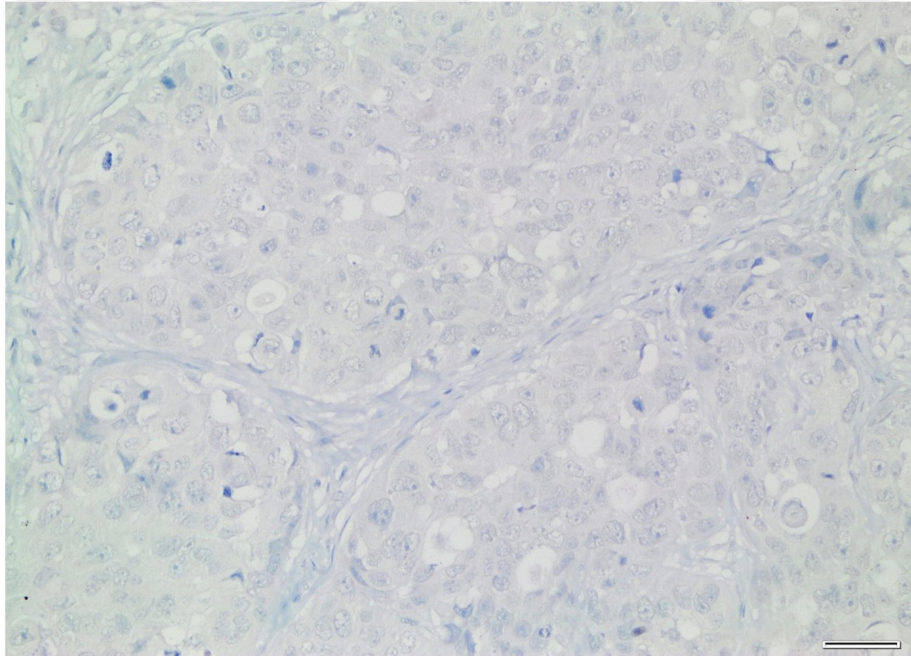


Şekil 11. İntratümöral ve stromal CD8 immüekspresyon dağılımı.

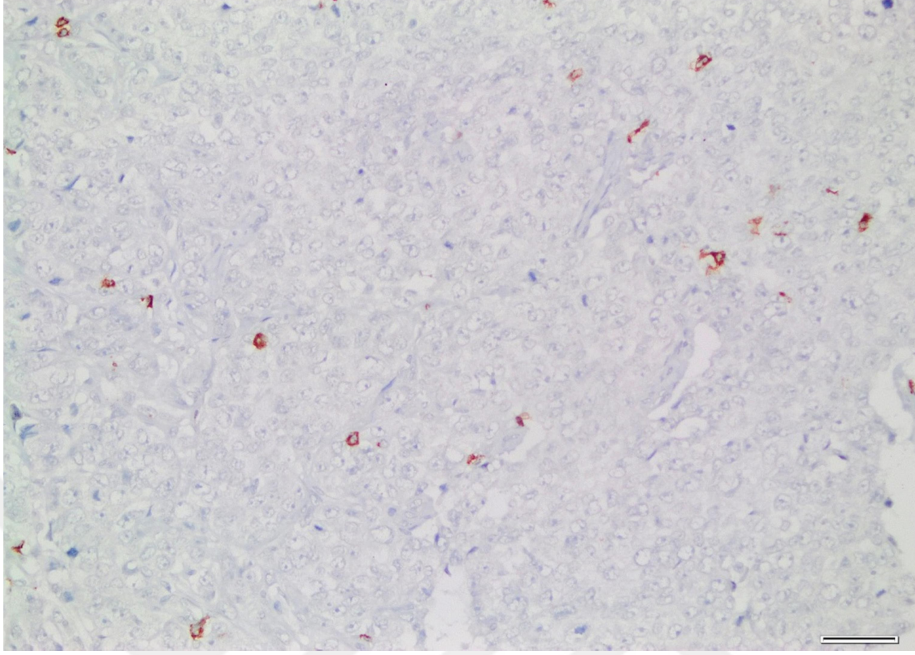
Tablo 12. İntratümöral ve stromal CD8 immünekspresyon grupları.

İmmünekspresyon	İntratümöral n (%)	Stromal n (%)
Negatif (%0)	1 (%2)	0 (%)
Düşük (%1-9)	27 (%52,9)	5 (%9,8)
Orta (%10-49)	20 (%39,2)	32 (%62,7)
Yüksek (\geq %50)	3 (%5,9)	14 (%27,5)
Toplam	51 (%100)	51 (%100)

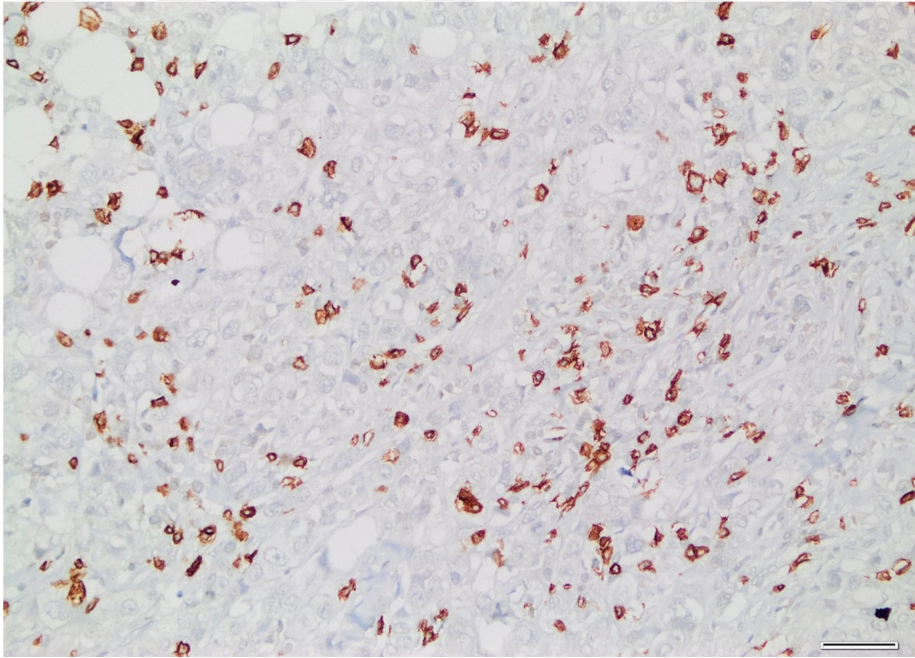
Stromal CD8 ekspresyon grupları için 5 yıllık sağkalım; yüksek ekspresyon grubunda %70, orta ekspresyon grubunda %81, düşük ekspresyon grubunda %53'tü. Stromal CD8 immünekspresyonu ortalaması ise %30,3'tü (Ortanca: %25; SS: 20,56; minimum: %2; maksimum: %60).



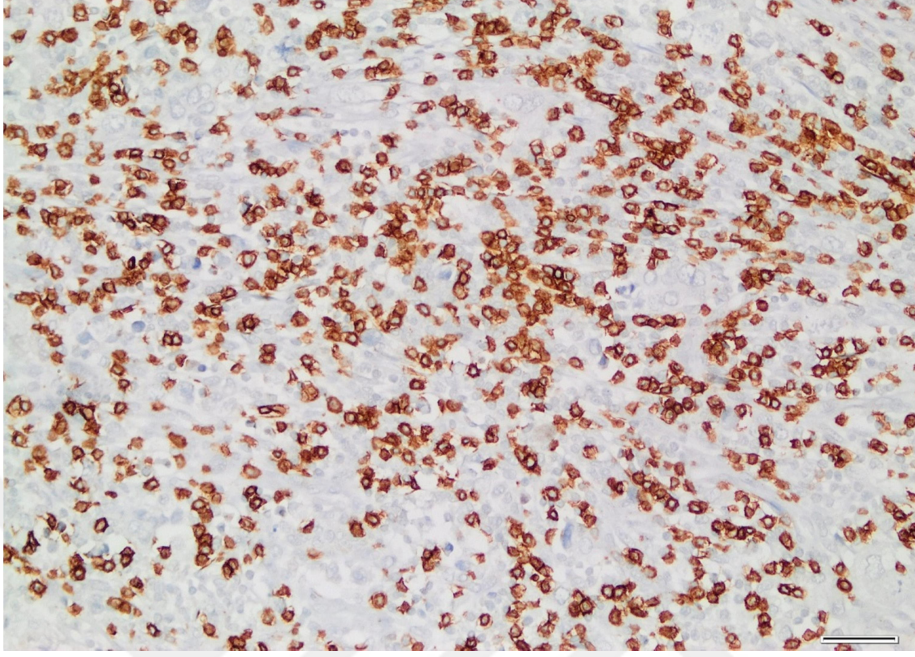
Resim 7. İntratümöral CD8 immünekspresyonu: Negatif.



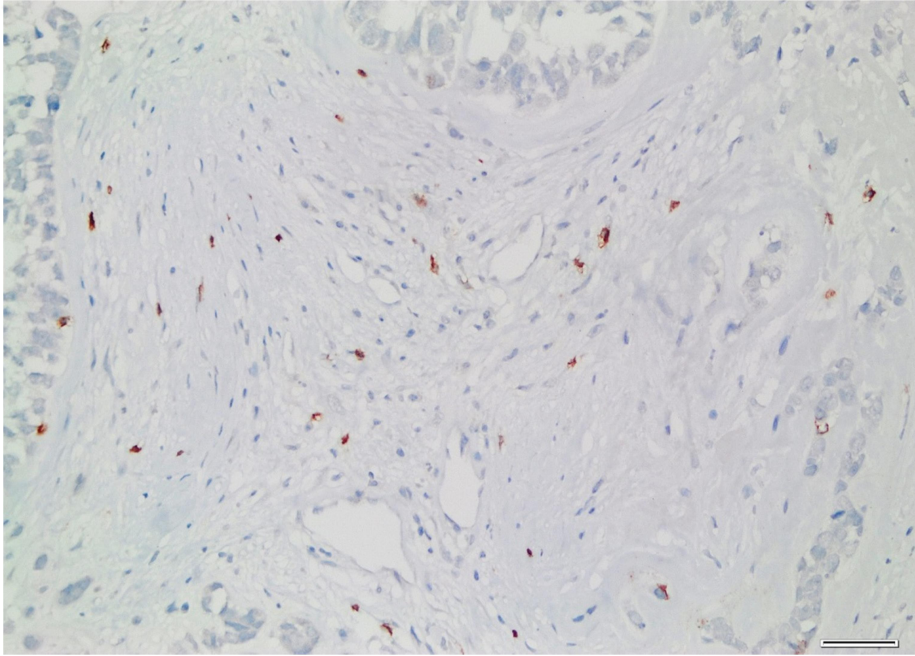
Resim 8. İnatümöral CD8 immünekspresyonu: Düşük.



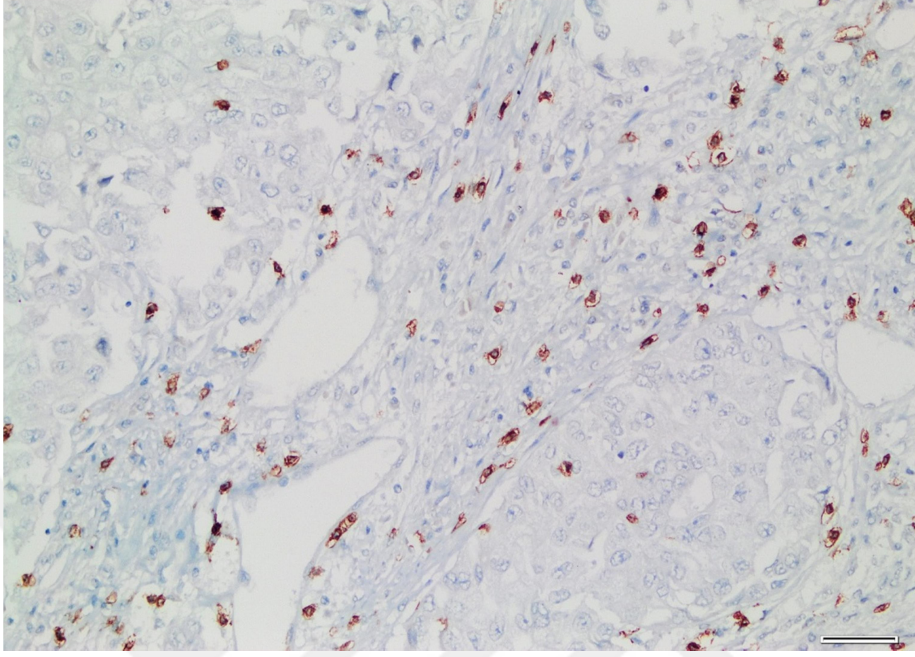
Resim 9. İnatümöral CD8 immünekspresyonu: Orta.



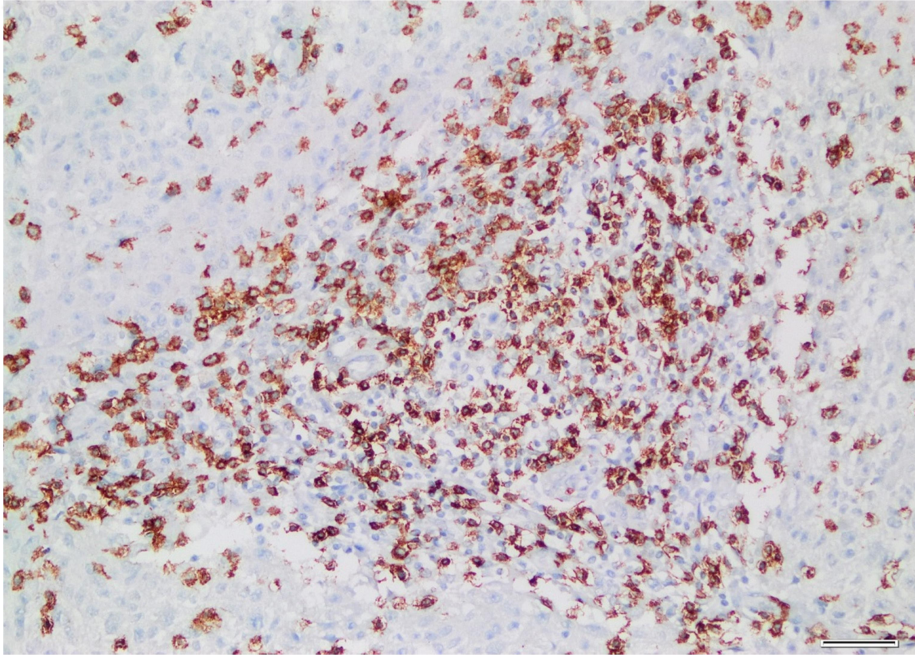
Resim 10. İnatümöral CD8 immünekspresyonu: Yüksek.



Resim 11. Stromal CD8 immünekspresyonu: Düşük.



Resim 12. Stromal CD8 immünoekspresyonu: Orta.



Resim 13. Stromal CD8 immünoekspresyonu: Yüksek.

Çalışmamızda, stromal sitotoksik-TİL düzeyi (ortalama: 33,2), intratümöral sitotoksik-TİL düzeyinden (ortalama: 13,8) daha yüksek olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$).

4.3.2. FOXP3

Olgularımızda FOXP3 immünekspresyonu intratümöral ve stromal kompartmanlar için ayrı ayrı değerlendirildi.

- İntratümöral FOXP3 ekspresyonu

İntratümöral FOXP3 immünekspresyon ortalaması %2,1'di (Ortanca: %1; SS: 2,6; minimum: %0; maksimum: %10) (Şekil 12). Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan FOXP3 intratümöral ekspresyon “cut-off” değeri %1'di. Olgular bu “cut-off” değerine göre iki gruba ayrıldığında; 18 (%35,3) olguda intratümöral FOXP3 ekspresyonu saptanmazken; kalan 33 (%64,7) olguda düşük veya yüksek immünekspresyon görüldü (Resim 14-15-16) (Tablo 13).

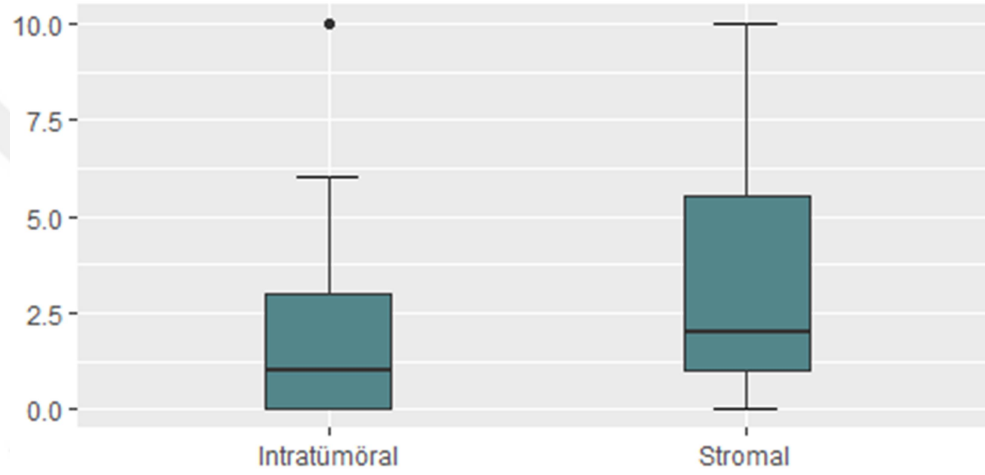
İntratümöral FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olgularda 5 yıllık sağkalım %67'yken, ekspresyon görülen olgularda %81'di. Eksitus olan 9 olgudan 4'ünde intratümöral FOXP3 immünekspresyonu saptandı.

- Stromal FOXP3 ekspresyonu

Stromal FOXP3 ekspresyonu ortalama %3,7 idi (Ortanca: %2; SS: 3,5; minimum: %0; maksimum: %10) (Şekil 12). Olguların 10'unda (%19,6) stromal FOXP3 ekspresyonu görülmezken; olguların 41'inde (%80,4) düşük veya yüksek stromal FOXP3 immünekspresyonu saptandı (Resim 17-18-19) (Tablo 13). Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan FOXP3 ekspresyon “cut-off” değeri stromal alan için %5

idi. Olgular bu “cut-off” değerine göre iki gruba ayrıldığında; 33 olgu (%64,7) düşük, 18 olgu (%35,3) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

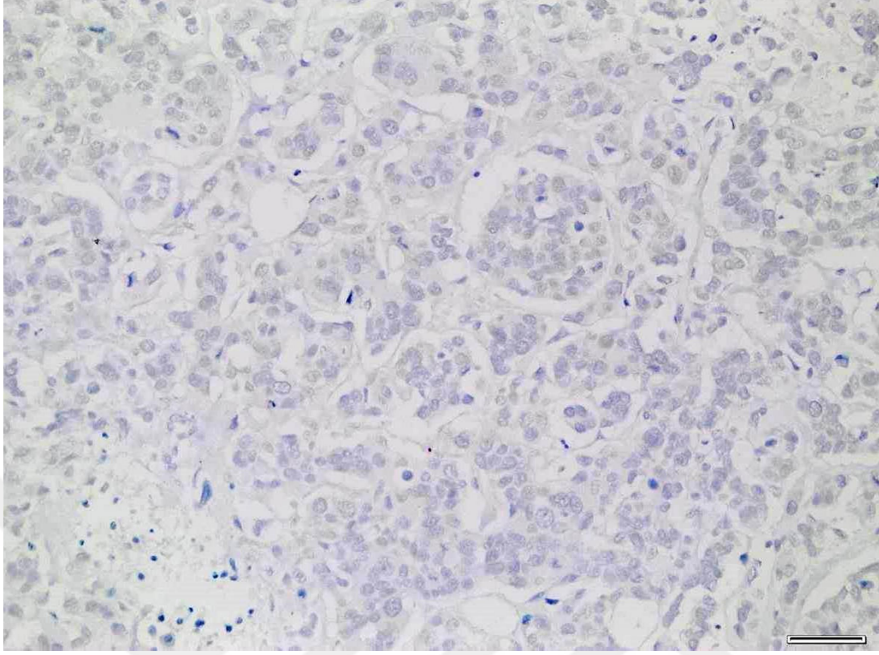
Stromal FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olgularda 5 yıllık sağkalım %72; ekspresyon görülen olgularda ise %76’ydi. Eksitus olan 9 olgudan 7’sinde stromal FOXP3 immünekspresyonu saptandı.



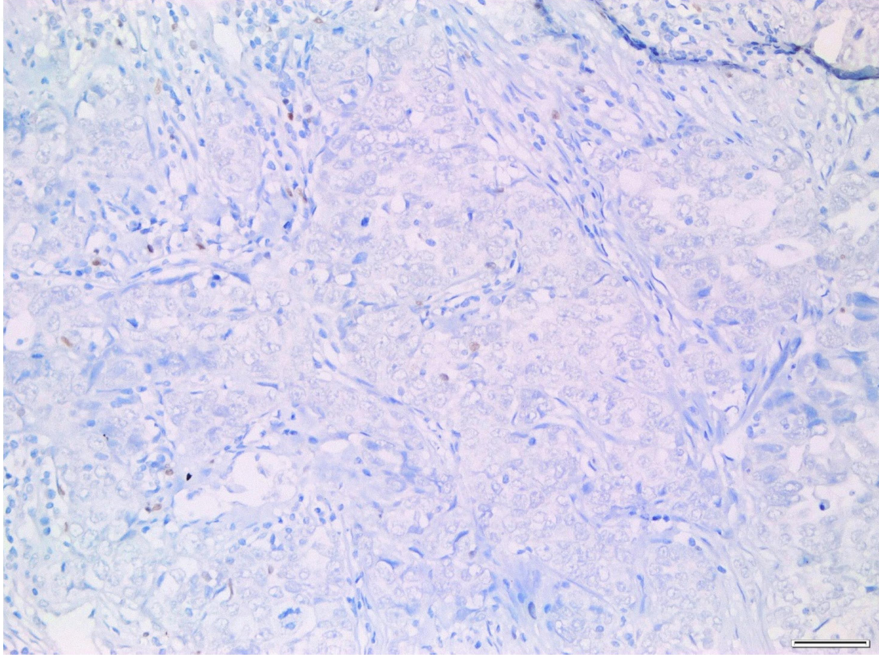
Şekil 12. İntratümöral ve stromal FOXP3 immünekspresyon dağılımı.

Tablo 13. İntratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyon grupları.

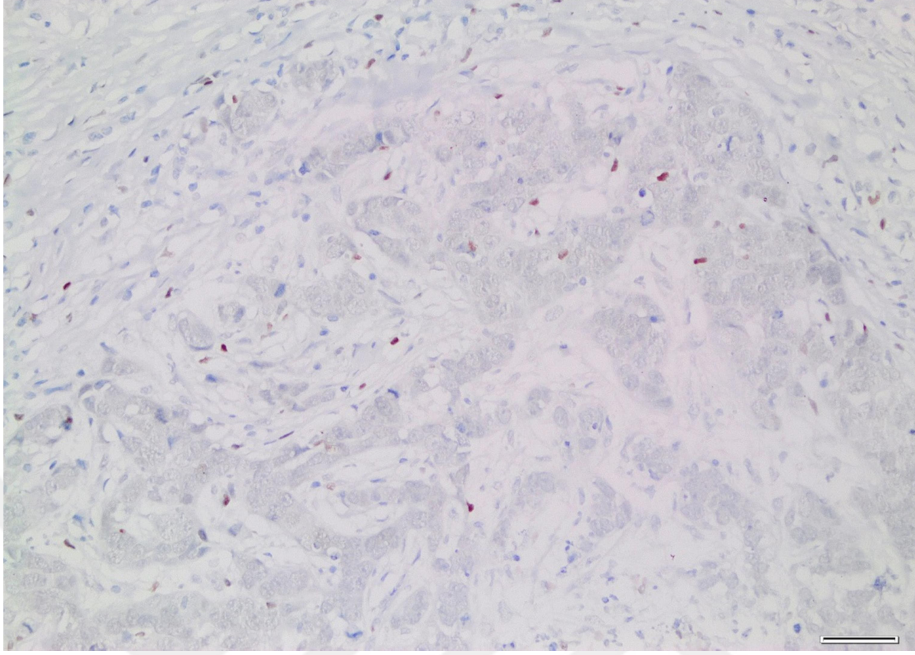
İmmünekspresyon	İntratümöral n (%)	Stromal n (%)
Negatif	18 (%35,3)	10 (%19,6)
Pozitif	33 (%64,7)	41 (%80,4)
Toplam	51 (%100)	51 (%100)



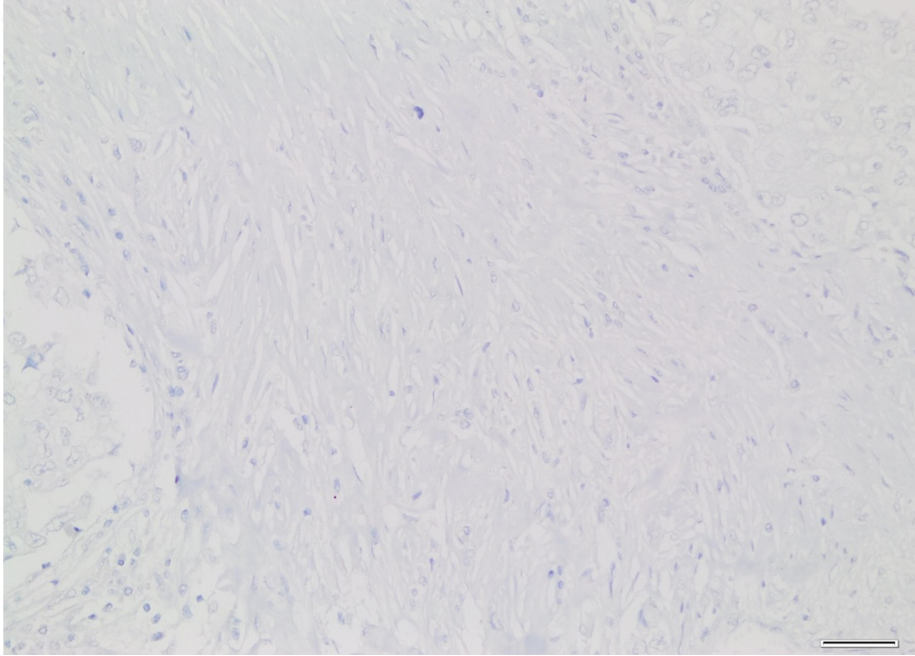
Resim 14. İnatümöral FOXP3 immünekspresyonu: Negatif.



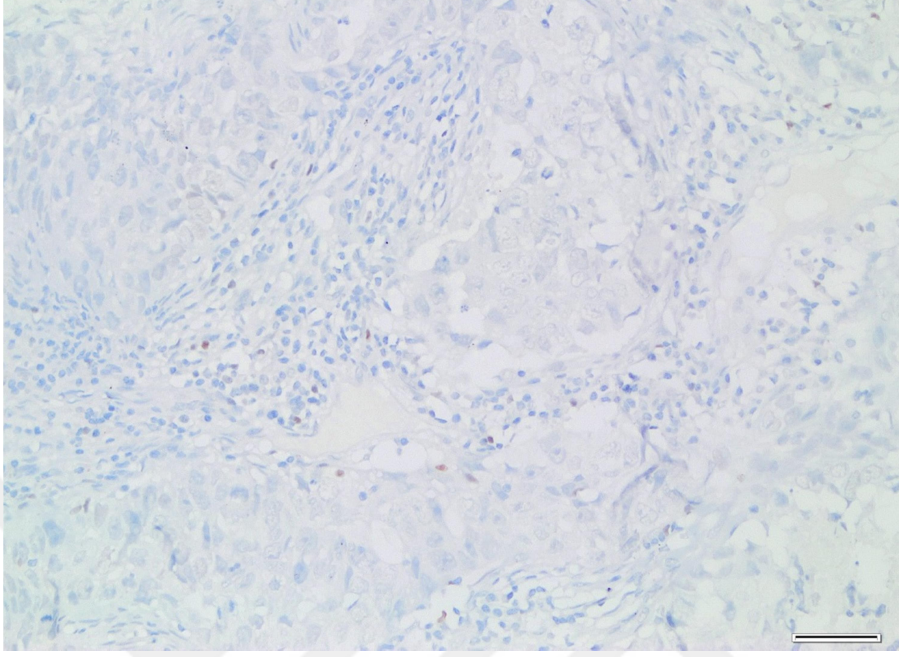
Resim 15. İnatümöral FOXP3 immünekspresyonu: Düşük.



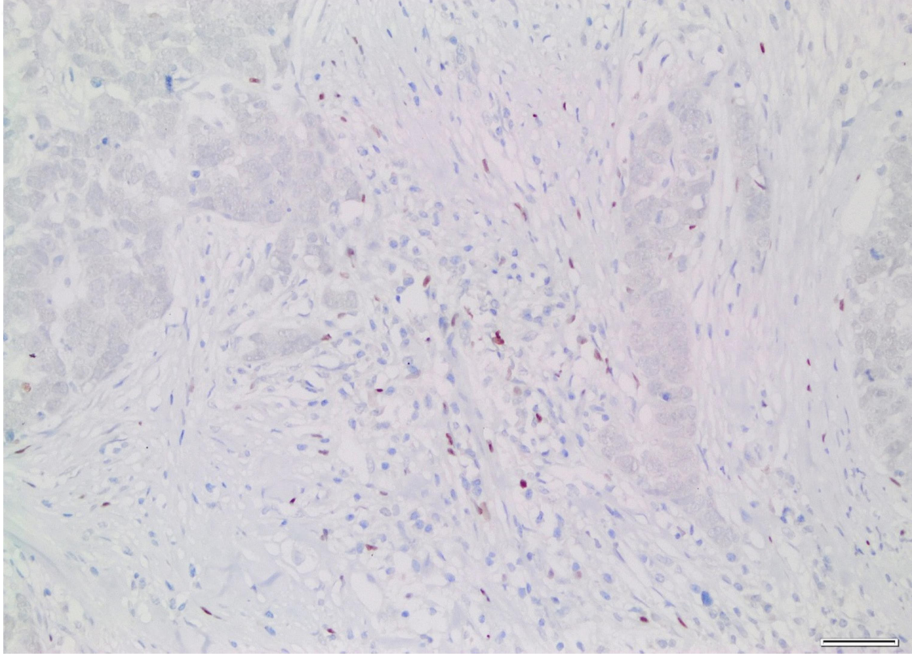
Resim 16. İnaträtümöral FOXP3 immünekspresyonu: Yüksek.



Resim 17. Stromal FOXP3 immünekspresyonu: Negatif.



Resim 18. Stromal FOXP3 immünekspresyonu: Düşük.



Resim 19. Stromal FOXP3 immünekspresyonu: Yüksek.

4.3.3. CD8/FOXP3 oranı

CD8/FOXP3 oranı intratümöral ve stromal alanlar için ayrı ayrı hesaplandı.

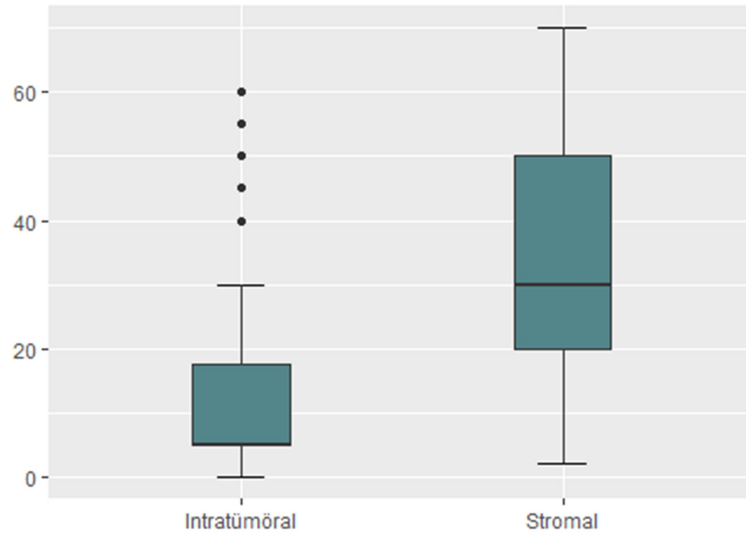
- İnaträtümöral CD8/FOXP3 oranı

Olgularımızda intratümöral CD8/FOXP3 oranı ortalama 6,6 bulundu (Ortanca: 5; 75.persentil: 7; SS: 7,3; minimum: 1; maksimum: 40) (Şekil 13).

- Stromal CD8/FOXP3 oranı

Stromal CD8/FOXP3 oranı ortalaması 14,7'ydi (Ortanca: 9; 75.persentil: 20; SS: 13,4; minimum: 2; maksimum: 60) (Şekil 13).

Stromal alanda CD8/FOXP3 oranı, intratümöral alana göre daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$).



Şekil 13. İnaträtümöral ve stromal CD8/FOXP3 oranı dağılımı.

4.3.4. PD-L1

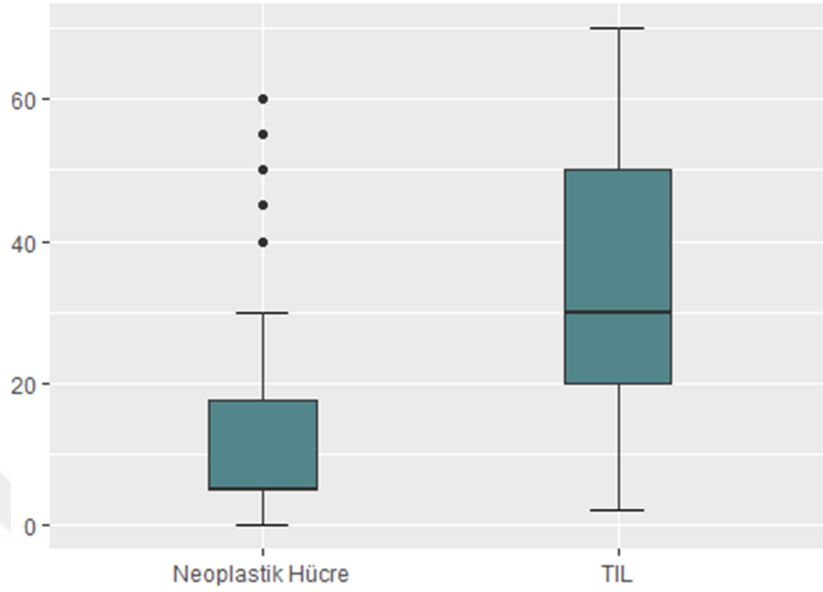
PD-L1 immünekspresyonu neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde ayrı ayrı değerlendirildi.

- Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu

Olgularımızın neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon ortalaması %12,3'tü (Ortanca: %3; 75.persentil: %20; SS: 18,6; minimum: %0; maksimum: %60) (Şekil 14).

Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyonu farklı gruplama sistemlerine göre gruplara ayrıldı (Tablo 14). Karnik ve ark. tarafından kullanılan üç kategorili sisteme göre gruplandırıldığında; olguların 13'ü (%25,5) negatif olup, 32'si (%62,7) düşük ekspresyon, 6'sı (%11,8) yüksek ekspresyon göstermekteydi. Yine Karnik ve ark. tarafından kullanılan dört kategorili sisteme göre gruplandırıldığında; olguların 13'ü (%25,5) negatif, 22'si (%43,1) düşük ekspresyon, 10'u (%19,6) orta ekspresyon, 6'sı (%11,8) yüksek ekspresyon göstermekteydi. Ortanca değere göre gruplama yapıldığında; olguların 13'ü (%25,5) negatifken, 11'inde (%21,6) düşük ekspresyon, 27'sinde (%52,9) yüksek ekspresyon saptandı. Wang ve ark. tarafından önerilen 75. persentile göre gruplar oluşturulduğunda; 13 (%25,5) olgu negatif, 25 (%49) olgu düşük ekspresyon, 13 (%25,5) olgu yüksek ekspresyon göstermekteydi. Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan PD-L1 ekspresyon "cut-off" değeri neoplastik hücreler için %10'du. Olgular bu "cut-off" değerine göre iki gruba ayrıldığında; 35 olgu (%68,6) düşük, 16 olgu (%31,4) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu izlenmeyen olguların 5 yıllık sağkalımı %84'tü. Neoplastik hücrelerde %1-%9 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %73; %10-%49 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %62'ydi. Neoplastik hücrelerde %50 ve üzerinde ekspresyon görülen olguların 5 yıllık sağkalımı %100 olmakla birlikte; bu grupta yalnızca 6 olgu vardı.



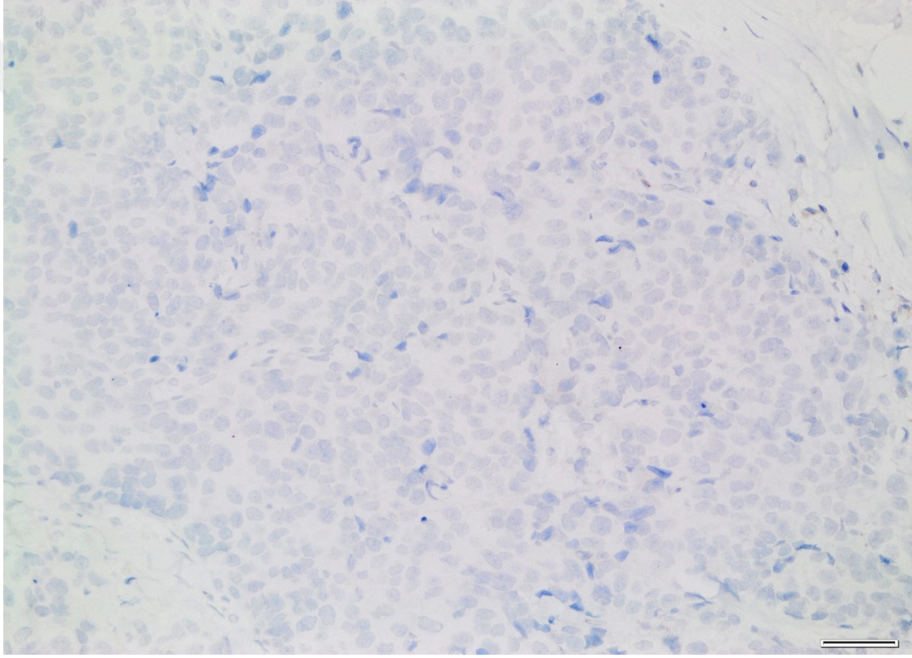
Şekil 14. Neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon dağılımı.

Tablo 14. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon grupları.

İmmünekspresyon		Sayı (n)	Yüzde (%)
Üç kategorili sistem	Negatif (%0)	13	25,5
	Düşük (%1-49)	32	62,7
	Yüksek (\geq %50)	6	11,8
Dört kategorili sistem	Negatif (%0)	13	25,5
	Düşük (%1-9)	22	43,1
	Orta (%10-49)	10	19,6
	Yüksek (\geq %50)	6	11,8
Ortanca değere göre gruplama sistemi	Negatif (%0)	13	25,5
	Düşük (%1-2)	11	21,6
	Yüksek (\geq %3)	27	52,9
75. persentile göre gruplama sistemi	Negatif (%0)	13	25,5
	Düşük (%1-19)	25	49,0
	Yüksek (\geq %20)	13	25,5

- Neoplastik hücrelerde PD-L1 boyanma şiddeti

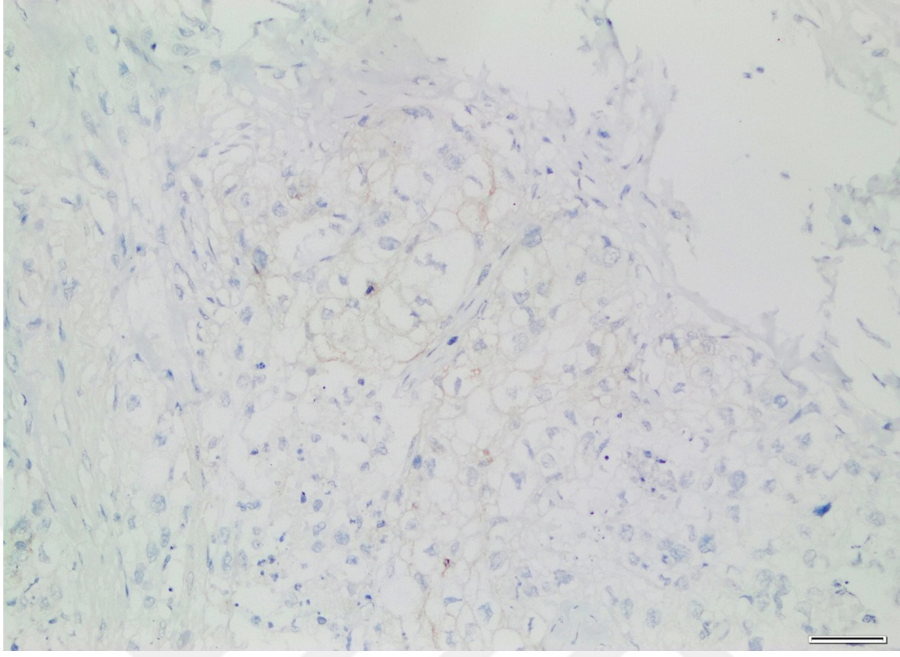
Neoplastik hücrelerde PD-L1 boyanma şiddeti; negatif, zayıf boyanma, orta şiddette boyanma ve şiddetli boyanma olmak üzere dört başlıkta değerlendirildi (Resim 20-21-22-23). Olguların 10'unda (%19,6) zayıf boyanma, 20'sinde (%39,2) orta şiddette boyanma, 8'inde (%15,7) şiddetli boyanma görülürken; 13 olgu (%25,5) negatifti (Tablo 15).



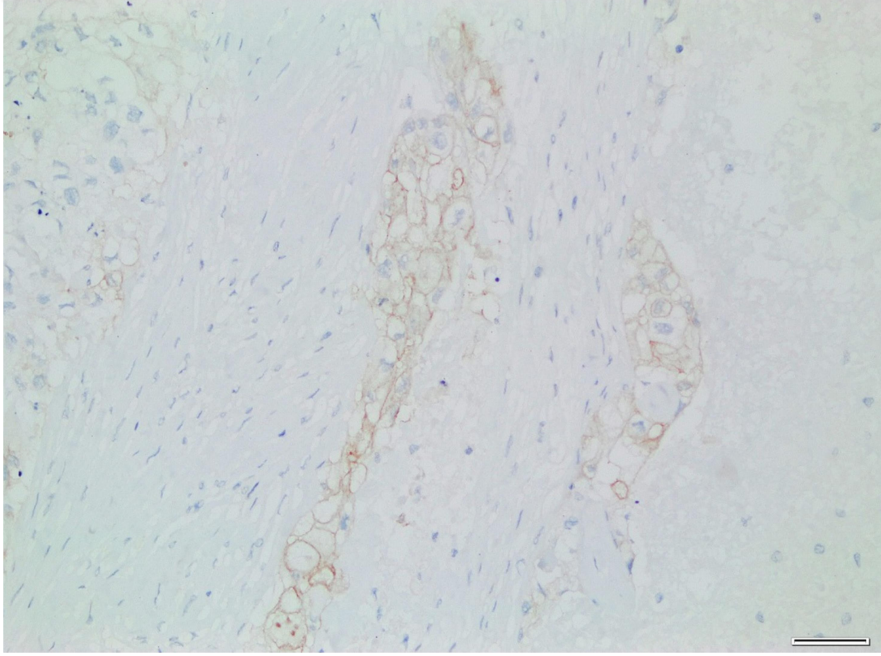
Resim 20. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon şiddeti: Negatif

- Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon skoru

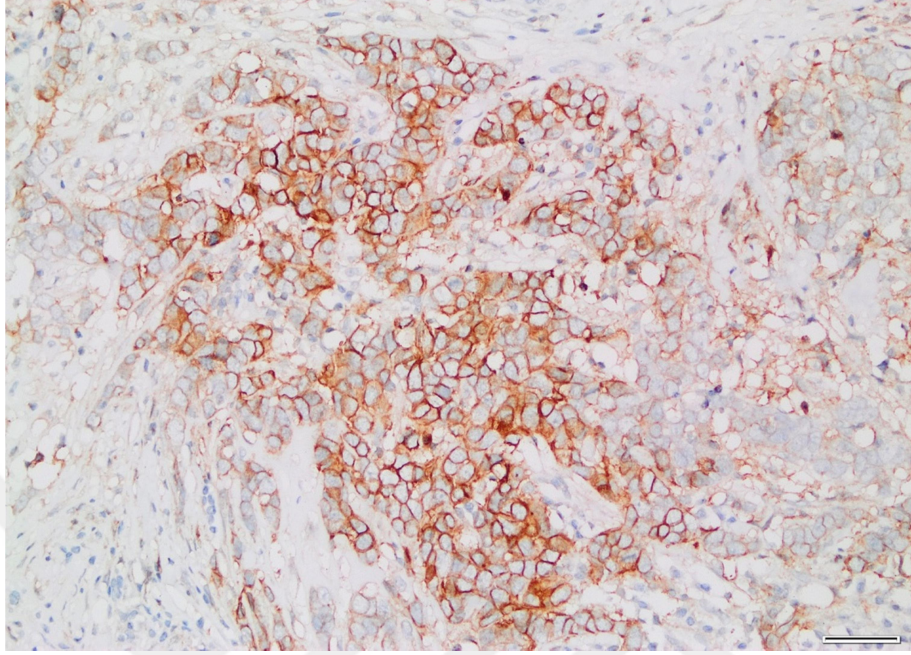
PD-L1 boyanma şiddeti ile yüzdesi çarpılarak immünoekspresyon skoru elde edildi. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon skoru ortalaması 25,5 bulundu (Ortanca: 5; 75.persentil: 40; SS: 47,8; minimum: 0; maksimum: 180) (Şekil 15). Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon skoru 75. persentil değerine göre gruplandırıldığında; 25 olgu (%49) düşük skor, 13 olgu (%25,5) yüksek skor alırken, 13 olgu (%25,5) negatifti (Şekil 16).



Resim 21. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Hafif.



Resim 22. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Orta.



Resim 23. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Şiddetli.

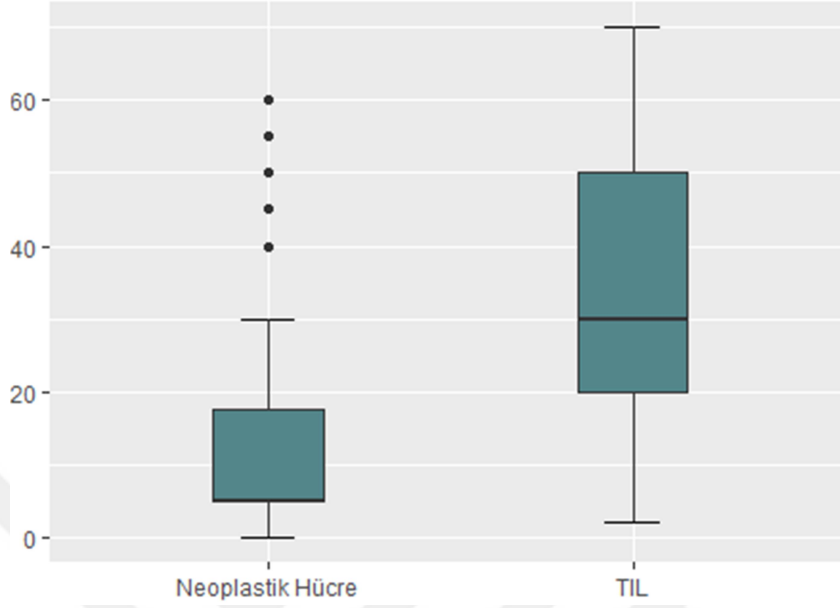
Tablo 15. Neoplastik hücrelerde PD-L1 boyanma şiddeti.

Boyanma Şiddeti	Sayı (n)	Yüzde (%)
Negatif	13	25,5
Zayıf boyanma	10	19,6
Orta şiddette boyanma	20	39,2
Şiddetli boyanma	8	15,7
Toplam	51	100

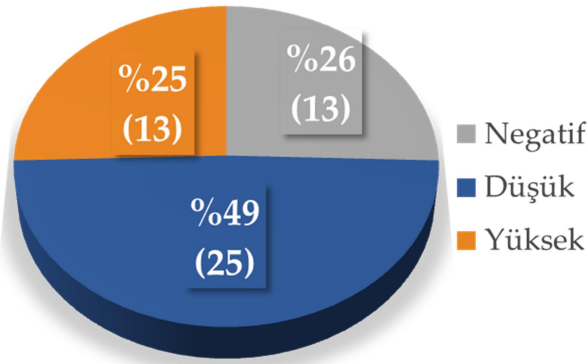
- Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyonu

Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyonu ortalaması %19,2'ydi (Ortanca: %15; 75persentil: %35; SS: 17,9; minimum: %0, maksimum: %60) (Şekil 14).

TİL'de izlenen PD-L1 immünekspresyonu farklı gruplama sistemlerine göre gruplara ayırdı (Tablo 16). Karnik ve ark. tarafından kullanılan üç kategorili sisteme göre gruplandığında; olguların 7'si (%13,7) negatif, 39'unda (%76,5) düşük



Şekil 15. Neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon skoru dağılımı.



Şekil 16. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünekspresyon skoru grupları.

ekspresyon, 5'inde (%9,8) yüksek ekspresyon saptandı. Yin Karnik ve ark. tarafından kullanılan dört kategorili sisteme göre gruplandırıldığında, 7 olgu (%13,7) negatifken; 16 olgu (%31,4) düşük ekspresyon, 23 olgu (%45,1) orta ekspresyon, 5 olgu (%9,8) yüksek ekspresyon göstermekteydi. Ortanca değere göre gruplama yapıldığında; olguların 7'si (%13,7) negatif olup 17'si (%33,3) düşük ekspresyon, 27'si (%52,9) yüksek ekspresyon gösterdi. Olgular, Wang ve ark. tarafından önerilen 75. percentile göre gruplandırıldığında; 31 olgu (%60,8) düşük ekspresyona, 13 olgu

Tablo 16. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon grupları.

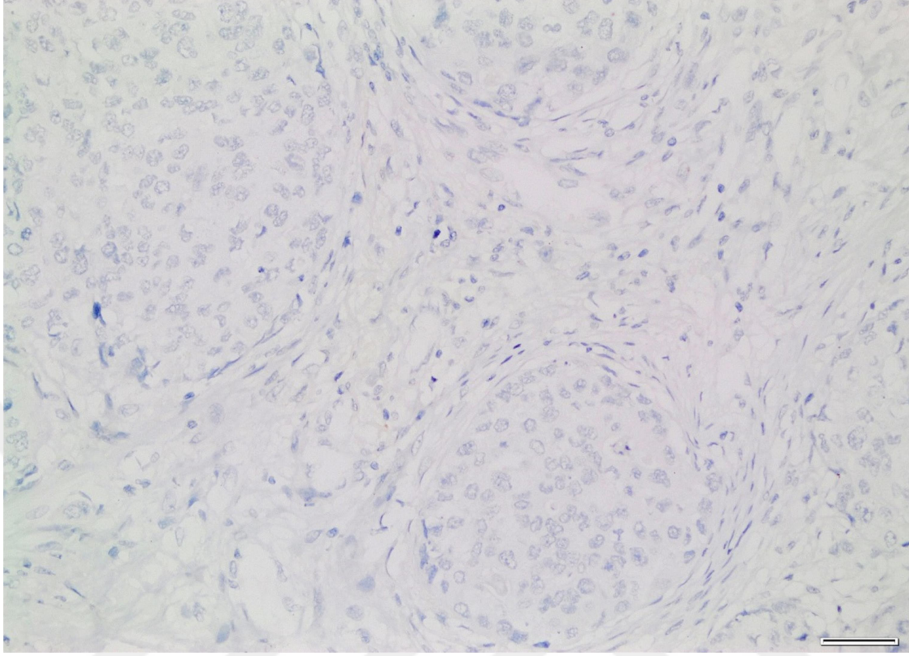
İmmünekspresyon		Sayı (n)	Yüzde (%)
Üç kategorili sistem	Negatif (%0)	7	13,7
	Düşük (%1-49)	39	76,5
	Yüksek (\geq %50)	5	9,8
Dört kategorili sistem	Negatif (%0)	7	13,7
	Düşük (%1-9)	16	31,4
	Orta (%10-49)	23	45,1
	Yüksek (\geq %50)	5	9,8
Ortanca değere göre gruplama sistemi	Negatif (%0)	7	13,7
	Düşük (%1-14)	17	33,3
	Yüksek (\geq %15)	27	52,9
75. persentile göre gruplama sistemi	Negatif (%0)	7	13,7
	Düşük (%1-34)	31	60,8
	Yüksek (\geq %35)	13	25,5

(%25,5) yüksek ekspresyona sahipken, kalan 7 olgu (%13,7) negatifti. Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan PD-L1 ekspresyon “cut-off” değeri TİL için %5 idi. Olgular bu “cut-off” değerine göre iki gruba ayrıldığında; 13 olgu (%25,5) düşük, 38 olgu (%74,5) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

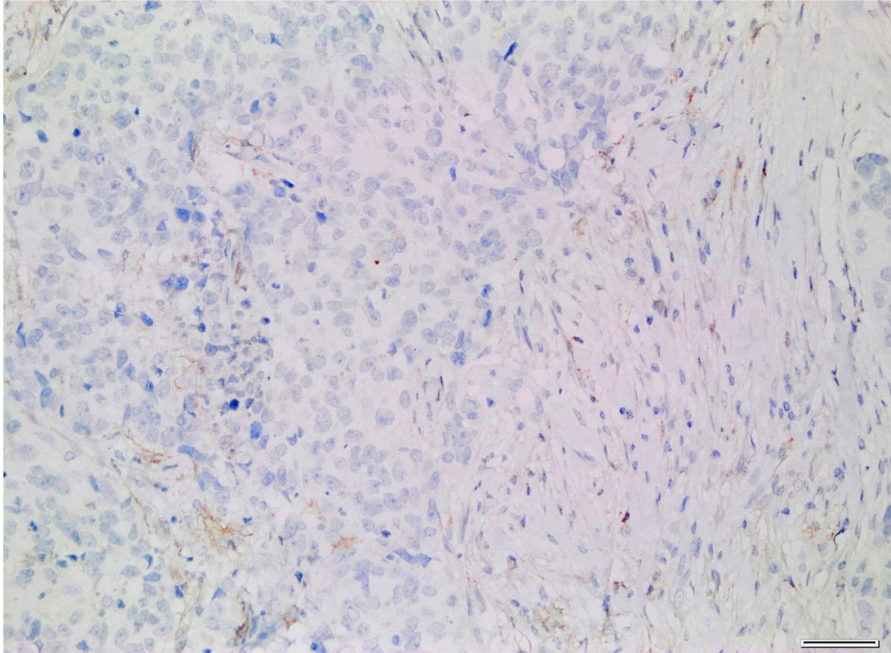
Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyonu bulunmayan 7 olgunun 5 yıllık sağkalımı %47 idi. TİL’de %1-%9 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %77; %10-%49 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %79’du. TİL’de %50 ve üzerinde ekspresyon görülen 5 olgunun 5 yıllık sağkalımı %100’dü.

- Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 boyanma şiddeti

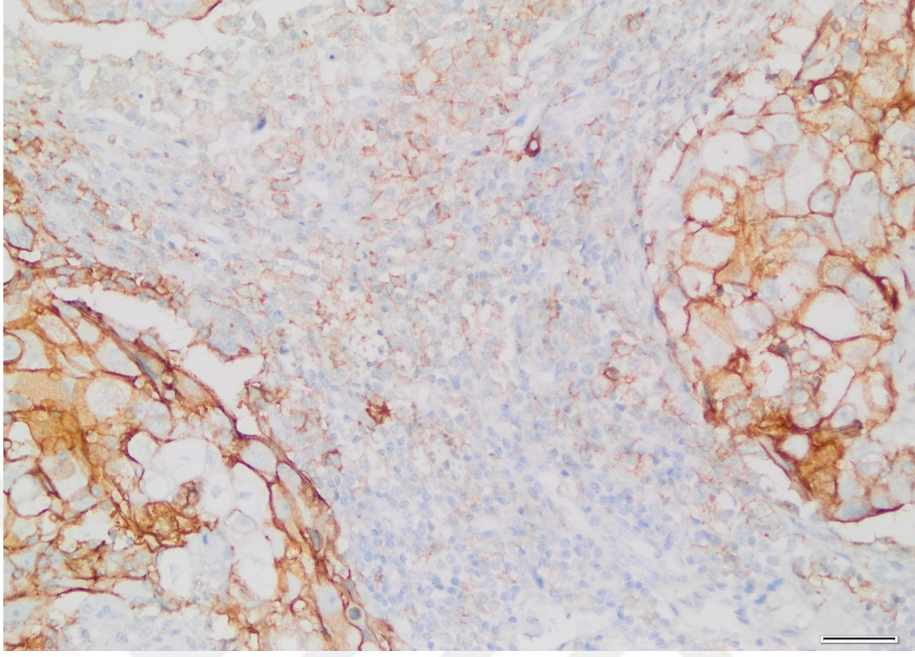
TİL’de PD-L1 boyanma şiddeti; negatif, zayıf boyanma, orta şiddette boyanma ve şiddetli boyanma olmak üzere dört başlıkta değerlendirildi (Resim 24-25-26-27). Olguların 9’unda (%17,6) zayıf boyanma, 29’unda (%56,9) orta şiddette boyanma, 6’sında (%11,8) şiddetli boyanma görülürken; 7 olgu (%13,7) negatifti (Tablo 17).



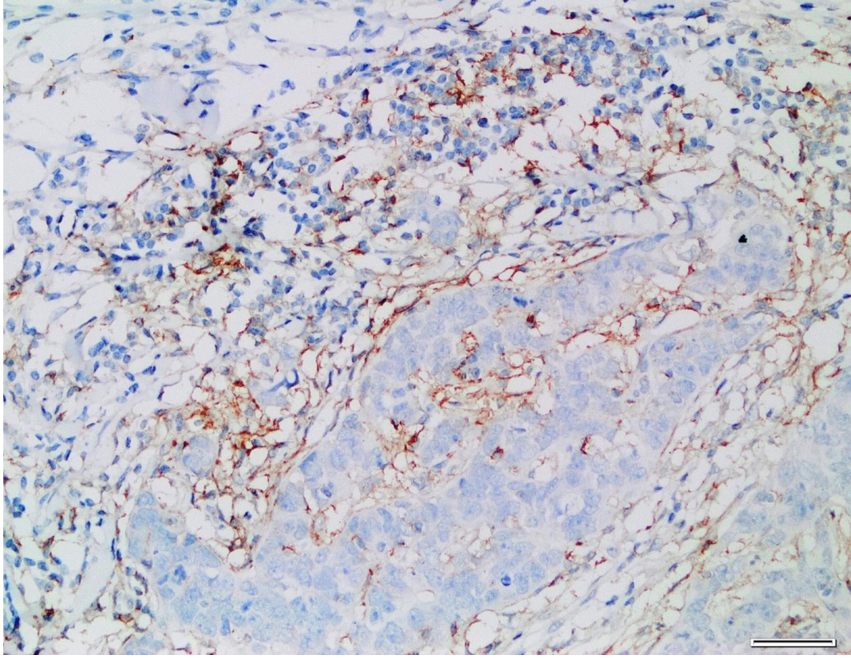
Resim 24. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Negatif



Resim 25. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Hafif.



Resim 26. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Orta.



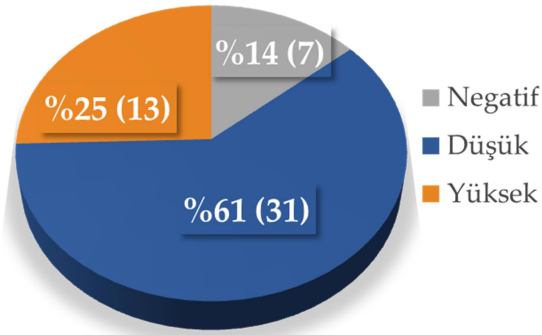
Resim 27. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon şiddeti: Şiddetli.

Tablo 17. Tümörü infiltrate eden lenfositlerde PD-L1 boyanma şiddeti.

Boyanma Şiddeti	Sayı (n)	Yüzde (%)
Negatif	7	13,7
Zayıf boyanma	9	17,6
Orta şiddette boyanma	29	56,9
Şiddetli boyanma	6	11,8
Toplam	51	100

- Tümörü infiltrate eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon skoru

PD-L1 boyanma şiddeti ile yüzdesi çarpılarak immünekspresyon skoru elde edildi. TİL için PD-L1 immünekspresyon skoru ortalama 41,7'ydi (Ortanca: 30; 75.persentil: 80; SS: 43,5; minimum: 0; maksimum: 180) (Şekil 15). TİL için PD-L1 immünekspresyon skoru 75. persentil değerine göre gruplandırıldığında; 31 olgu (%60,8) düşük skor, 13 olgu (%25,5) yüksek skor alırken, 7 olgu (%13,7) negatifi (Şekil 17).



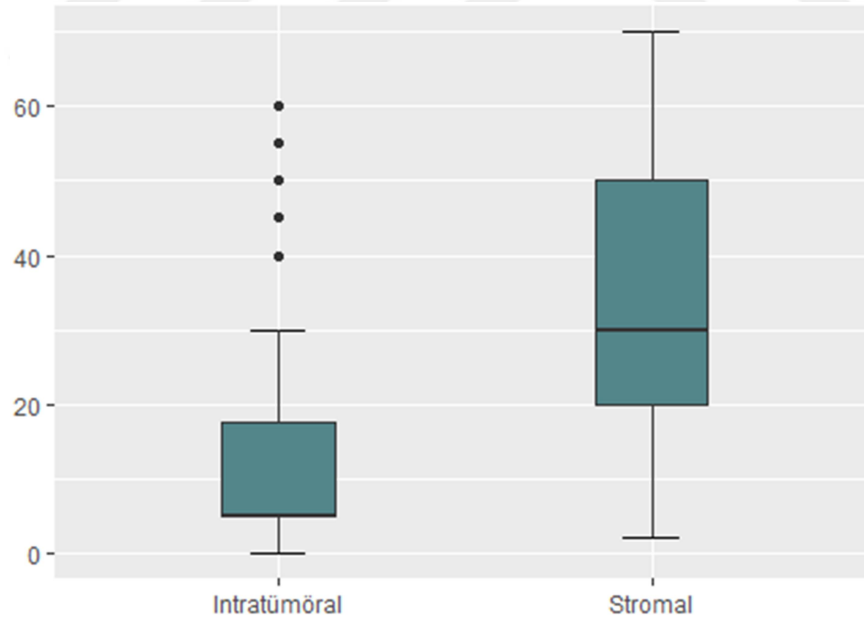
Şekil 17. Tümörü infiltrate eden lenfositlerde PD-L1 immünekspresyon skoru grupları.

4.3.5. CD163

Çalışmamızda, Yang ve ark.'ın çalışması ile benzer şekilde, intratümöral ve stromal “hot spot” alanlarında ayrı ayrı 5 BBA’da CD163 immünoekspresyonu gösteren makrofajlar sayıldı [238]. Elde edilen sayılar beşe bölünerek 1 BBA başına düşen M2 makrofaj sayısı bulundu.

- İntratümöral CD163 ekspresyonu

Olgularımızda intratümöral alanda CD163 eksprese eden makrofaj sayısı ortalaması 11,19’du (Ortanca: 7; 75.persentil: 14; SS:13,2; minimum: 0; maksimum: 56) (Şekil 18).



Şekil 18. İntratümöral ve stromal CD163 immünoekspresyonu dağılımı.

İnatümöral CD163 ekspresyonu ortanca değere göre gruplara ayrıldığında; 2 olgu (%3,9) negatif, 21 olgu (%41,2) düşük ekspresyon, 28 olgu (%54,9) yüksek ekspresyon göstermekteydi (Tablo 18). Olgular 75.persentil değerine göre

gruplandırıldığında, 2 olgu (%3,9) negatifken; 36 olgu (%70,6) düşük ekspresyona, 13 olgu (%25,5) yüksek ekspresyona sahipti (Tablo 18) (Resim 28-29-30). Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan CD163 ekspresyon “cut-off” değeri intratümöral alan için 20’ydi. Olgular bu “cut-off” değerine göre iki gruba ayrıldığında; 42 olgu (%82,4) düşük, 9 olgu (%17,6) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

İnatümöral CD163 ekspresyonu, ortanca değerden düşük olan olguların 5 yıllık sağkalımı %67 iken, yüksek olan olguların 5 yıllık sağkalımı %80’di.

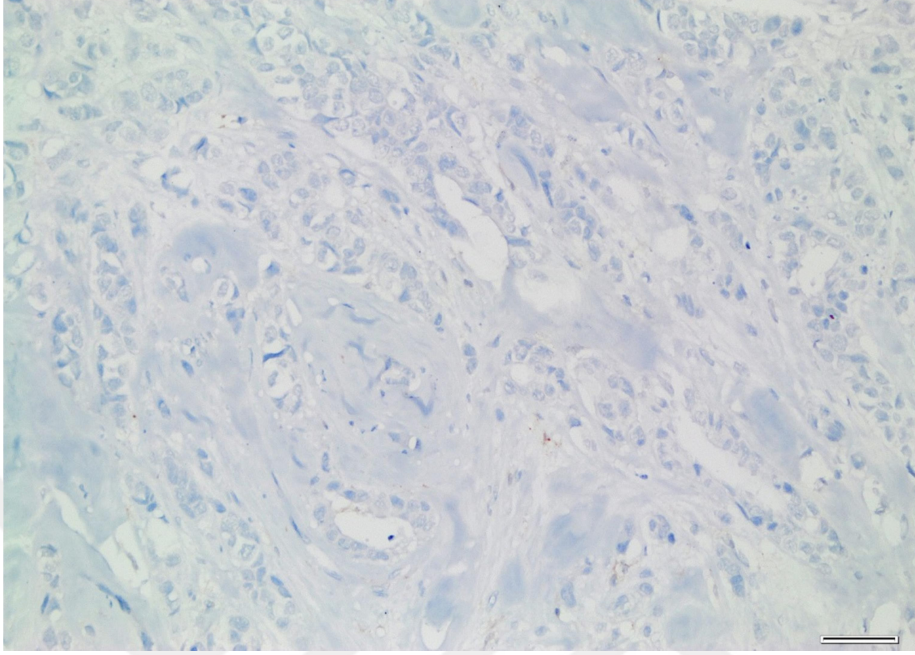
Tablo 18. İnatümöral CD163 immünekspresyon grupları.

İmmünekspresyon		Sayı (n)	Yüzde (%)
Ortanca değere göre gruplama sistemi	Negatif (%0)	2	3,9
	Düşük (%1-6)	21	41,2
	Yüksek (\geq %7)	28	54,9
75. persentile göre gruplama sistemi	Negatif (%0)	2	3,9
	Düşük (%1-13)	36	70,6
	Yüksek (\geq %14)	13	25,5

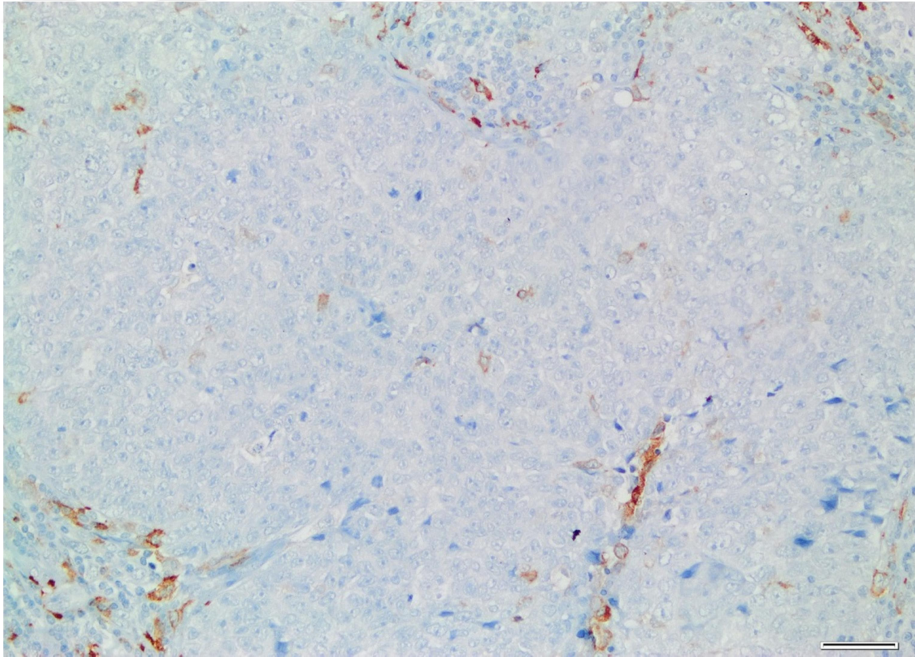
- Stromal CD163 ekspresyonu

Tümör stromasında, BBA başına CD163 eksprese eden makrofaj sayısı ortalama 26,1’di (Ortanca: 22; 75.persentil: 38; SS:18,7; minimum: 2; maksimum: 70) (Şekil 18). Stromasında CD163 immünekspresyonu görülmeyen (negatif) olgu yoktu.

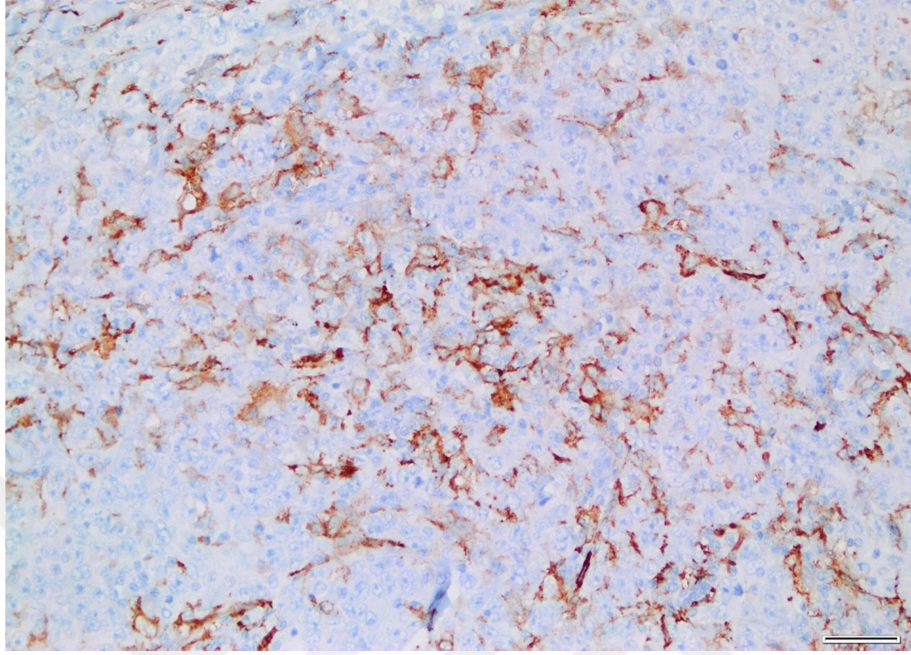
Stromal CD163 ekspresyonu ortanca değere göre gruplara ayrıldığında; 24 olgu (%47,1) düşük ekspresyon, 27 olgu (%52,9) yüksek ekspresyon göstermekteydi (Tablo 19). Olgular 75.persentile göre gruplandırıldığında ise; 38’i (%74,5) düşük ekspresyon, 13’ü (%25,5) yüksek ekspresyon gösterdi (Tablo 19) (Resim 31-32). Çalışmamızda sağkalımı en iyi yansıtan CD163 ekspresyon “cut-off” değeri stromal



Resim 28. İnatümöral CD163 immünekspresyonu: Negatif.



Resim 29. İnatümöral CD163 immünekspresyonu: Düşük.



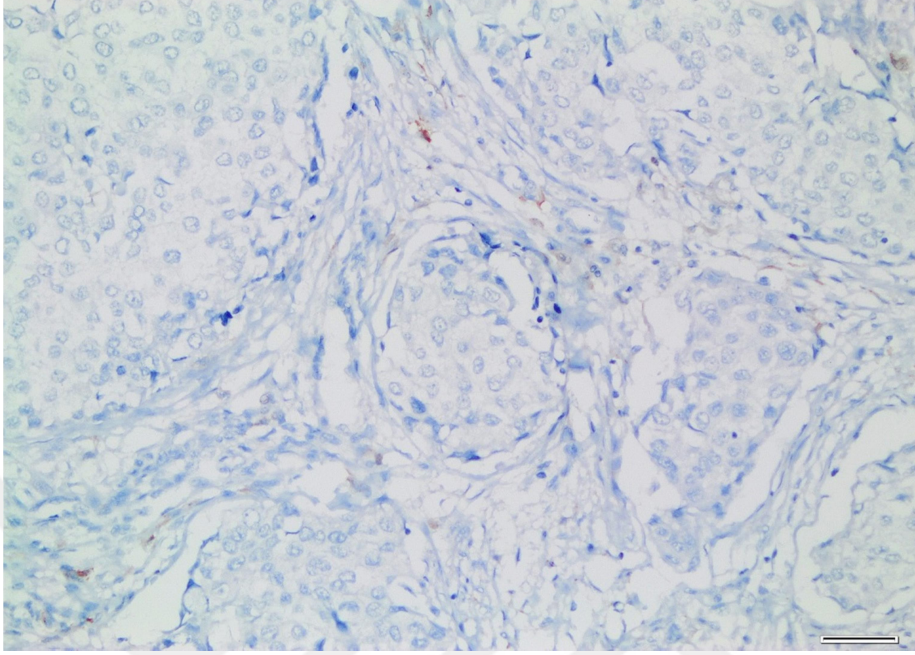
Resim 30. İntratümöral CD163 immünekspresyonu: Yüksek.

alan için 22'ydi. Olgular bu “cut-off” değerine göre iki gruba ayrıldığında; 24 olgu (%47,1) düşük, 27 olgu (%52,9) yüksek ekspresyon grubunda yer aldı.

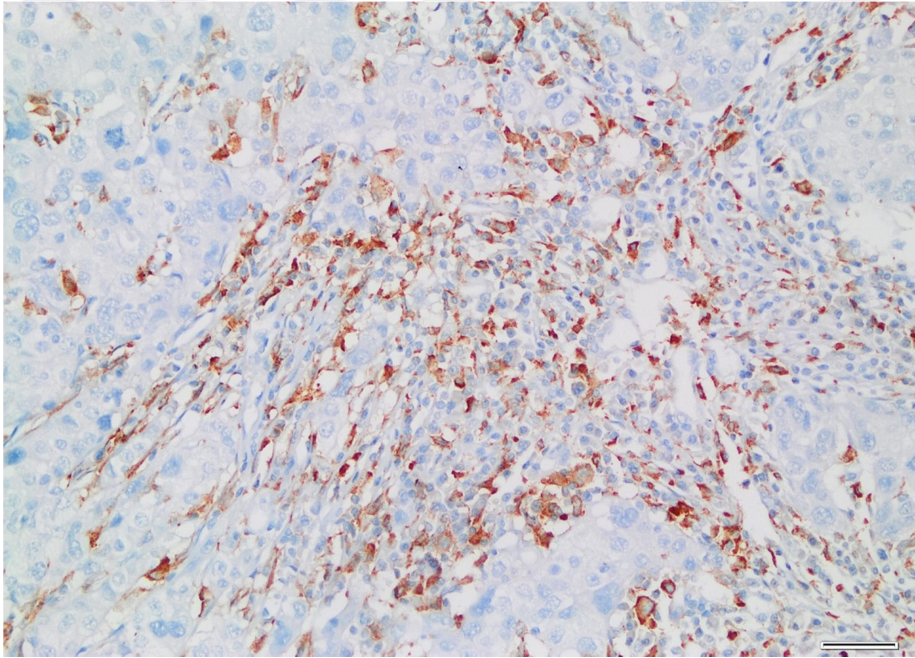
Stromal CD163 ekspresyonu, ortanca değerden düşük olan olguların 5 yıllık sağkalımı %67 iken, yüksek olan olguların 5 yıllık sağkalımı %80'di.

Tablo 19. İntratümöral CD163 immünekspresyon grupları.

İmmünekspresyon		Sayı (n)	Yüzde (%)
Ortanca değere göre gruplama sistemi	Düşük (%1-21)	24	47,1
	Yüksek (\geq %22)	27	52,9
75. persentile göre gruplama sistemi	Düşük (%1-37)	38	74,5
	Yüksek (\geq %38)	13	25,5



Resim 31. Stromal CD163 immünoekspresyonu: Düşük.



Resim 32. Stromal CD163 immünoekspresyonu: Yüksek.

4.4. Klinik ve Histomorfolojik Verilerin Prognostik Parametrelerle İlişkileri

4.4.1. Yaş

Yaşa göre, eksitus olan ve sağ kalan olgular arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,02$). Serimizde, hasta yaşı ilerledikçe eksitus oranı artmaktaydı. Altmış yaş altındaki olguların yalnızca %10'unda eksitus olurken, 60 yaş ve üzerindeki olguların %35'inde eksitus görüldü.

Altmış yaş altındaki olguların %12,5'inde, 60 yaş ve üzerindeki olguların %27'sinde nüks saptanmıştı. Olgularımızda, yaşa göre nüks yüzdeleri arasında farklılık var gibi görünmekle birlikte; bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Yaşa göre metastaz yüzdelerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,01$). Hasta yaşı arttıkça uzak metastaz artmaktaydı. Altmış yaş altındaki olguların %5'inde, 60 yaş ve üzerindeki olguların ise %27,2'sinde uzak metastaz gelişmişti.

Yaşa göre klinik evrelere bakıldığında, istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p=0,03$). Bu farkın major nedeni 60 yaş altı olguların evre II'de yığılmış olmasıydı. 60 yaş altı olguların 9'u (%22,5) evre I, 28'i (%70) evre II, 3'ü (%7,5) evre III'tü. 60 yaş üstü olgular ise üç klinik evreye dengeli olarak dağılmıştı. Olguların 3'ü (%27) evre I, 4'ü (%36) evre II, 4'ü (%36) evre III'tü. Yaşa göre klinik evreler arasında anlamlı fark bulunsa da, olguların klinik evre dağılımlarına bakıldığında yaş ile klinik evre arasında ilişkinin lineer olmadığı düşünüldü.

Yaşa ile perinöral invazyon ilişkisi incelendiğinde; perinöral invazyonun ileri yaş ile ilişkili olduğu görüldü ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,03$; Rho: 0,03).

Yaş ile histolojik tip, patolojik tümör evresi, patolojik lenf nodu evresi, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, lenfoid folikül varlığı, histiyositik agregat varlığı ve proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

4.4.2. Histolojik tip ve derece

Histolojik tümör tipine göre; eksitus, lokal nüks, uzak metastaz, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, pT evresi, pN evresi, histiyositik agregat varlığı, lenfoid folikül varlığı ve/veya proliferasyon indeksi arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Histolojik tümör tipi ile yaş arasındaki ilişki önceki bölümde verilmiştir.

Olgularımızın tamamının histolojik derecesi aynıydı (Derece 3). Bu nedenle histolojik derece ile prognostik ve/veya immünohistokimyasal değişkenler arasındaki ilişki değerlendirilemedi.

4.4.3. Patolojik ve klinik evre

• Patolojik primer tümör evresi

Patolojik primer tümör evresine göre sağkalımda anlamlı fark saptandı ($p=0,03$). Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %5'inde eksitus gelişirken; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların %24'ünde eksitus gelişmişti.

Patolojik primer tümör evresine göre lokal nüks varlığına baktığımızda; erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %11'inde; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların %18'inde nüks gelişmişti. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,08$).

Patolojik primer tümör evresi ile uzak metastaz arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,02$). Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %11'inde; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların ise %9'unda uzak metastaz gelişmişti.

Patolojik tümör evresi erken (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olan olguların hiçbirinde cerrahi sınırlarda tümör görülmezken; ileri evrede (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olan olguların %15'inde cerrahi sınırdaki tümör saptanmıştı ($p<0,01$).

pT evresine göre perinöral invazyonda anlamlı farklılık bulundu ($p=0,04$). Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %5,5'inde; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların ise %12'sinde perinöral invazyon görüldü.

Patolojik primer tümör evresi ile lenf nodu evresi, proliferasyon indeksi, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, lenfoid folikül avrılığı, histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

• Patolojik lenf nodu evresi

Lenf nodu evresine göre sağkalım arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,04$). Lenf nodu metastazı görülmeyen (pN0) olguların %92,6'sı hayatta iken; lenf nodu metastazı olan (pN1-2-3) olguların ancak %70'i hayattaydı.

Lenf nodu evresi ile lenfatik invazyon arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0,01$; Rho: 0,3). Lenfatik invazyon görülen olguların %60'ında metastatik lenf nodu varken (pN1/2/3), %40'ında metastatik lenf nodu yoktu (pN0).

Patolojik lenf nodu evresi ile nüks, metastaz, anjiyoinvazyon, perinöral invazyon, proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

• Klinik evre

Klinik evreye göre perinöral invazyonda anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Klinik evre I'deki olgularda perinöral invazyon izlenmezken; klinik evre II'deki olguların %6'sında, klinik evre III'teki olguların %43'ünde perinöral invazyon vardı.

Klinik evre ile anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, lenfoid folikül varlığı, histiyositik agregat varlığı, proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tüm evrelerin yaş, tümör histolojik tipi, tümör derecesi ile ilişkileri önceki bölümlerde verilmiştir.

4.4.4. Anjiyo / lenfatik / perinöral invazyon

- **Anjiyoinvazyon**

Anjiyoinvazyon ile sağkalım arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0,01$; Rho: 0,3). Anjiyoinvazyon izlenen olguların %42'sinde eksitus gelişirken; anjiyoinvazyon görülmeyen olguların yalnızca %10'unda eksitus gelişmişti.

Anjiyoinvazyon ile nüks arasında da anlamlı ilişki bulundu ($p=0,05$; Rho: 0,26). Anjiyoinvazyon izlenen olguların %33'ünde lokal nüks gelişirken; anjiyoinvazyon görülmeyen olguların yalnızca %10'unda gelişmişti.

Anjiyoinvazyon izlenen olguların %16'sında metastaz görülürken; anjiyoinvazyon görülmeyen olguların %7'sinde metastaz görülmüştü; ancak, anjiyoinvazyon ile metastaz varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Anjiyoinvazyon ile proliferasyon indeksi, lenfoid folikül varlığı, histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

- **Lenfatik invazyon**

Lenfatik invazyon ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı ilişki görüldü ($p<0,01$; Rho: 0,5). Anjiyoinvazyonun, lenfatik invazyon görülen olgularda saptanma ihtimali daha yüksekti. Serimizde, toplam 12 olguda anjiyoinvazyon saptanmış olup bunların 11'i lenfatik invazyon görülen olgulardı. Yalnızca 1 olguda lenfatik invazyon görülmeksizin anjiyoinvazyon gelişmişti.

Lenfatik invazyon ile eksitus, nüks, metastaz, perinöral invazyon, proliferasyon indeksi arasında ilişki yoktu ($p>0,05$).

- **Perinöral invazyon**

Perinöral invazyon ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0,04$; Rho: 0,3). Buna göre, perinöral invazyon, sıklıkla anjiyoinvazyon görülen olgularda bulunmaktaydı.

Perinöral invazyon ile nüks arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamakla birlikte ($p=0,1$); perinöral invazyon görülen olguların %40'ında, perinöral invazyon görülmeyen olguların ise yalnızca %13'ünde nüks geliştiği dikkati çekti. Perinöral invazyon ile metastaz arasında anlamlı ilişki görüldü ($p=0,01$; Rho: 0,33). Perinöral invazyon saptanan olguların %40'ında; perinöral invazyon saptanmayan olguların ise yalnızca %6,5'inde metastaz gelişmişti.

Perinöral invazyon ile sağkalım, proliferasyon indeksi arasında ilişki yoktu ($p>0,05$).

Lenfatik / anjiyo / perinöral invazyonların yaş, tümör tipi, tümör derecesi, patolojik ve klinik evre ile ilişkileri önceki bölümlerde verilmiştir.

4.4.5. Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL; peritümöral lenfositik yanıt)

TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olgularımızın %24'ünde eksitus olurken; orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların %11,5'inde eksitus olmuştu. TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olguların %20'sinde nüks görülmüştü; orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların ise %11,5'inde nüks gelişmişti. Uzak metastaz varlığına bakıldığında; TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olguların %16'sında, orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların ise %3,8'inde metastaz gelişmişti. Bu verilere bakıldığında, orta/bellirgin TİL görülen olgularda eksitus, nüks ve metastazın daha nadir geliştiği görülse de; bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Yaşa göre lenfositik yanıt incelendiğinde; lenfositik yanıtın genç yaş ile ilişkili olduğu görüldü ($p=0,03$; Rho: -0,3). TİL görülmeyen olguların yaş ortalaması

53'ken, herhangi bir şiddette TİL görülen olguların yaş ortalaması 48'di ($p=0,05$). Yaş gruplarına göre baktığımızda; TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olgularımızın %28'i 60 yaş ve üzeriyken; orta/bellirgin şiddette TİL görülen olgularımızın %15'i 60 yaş ve üzeriydi.

Histolojik tümör tipine göre TİL düzeyinde anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların %58'i lenfosit-baskın karsinomken; %38'i invaziv karsinom, NST ve %4'ü metaplastik karsinomdu.

TİL ile primer tümör ve lenf nodu evreleri, lenfatik/anjio/perinöral invazyonlar, peritümöral lenfoid folikül varlığı, histiyositik agregat varlığı ve/veya proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

4.4.6. Lenfoid folikül ve histiyositik agregat

Peritümöral lenfoid folikül varlığı ile sağkalım, nüks ve/veya metastaz arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Peritümöral lenfoid folikül varlığının yaş, tümör tipi, tümör ve lenf nodu evresi, lenfatik/anjio/perinöral invazyonlar, lenfositik yanıt ile ilişkileri önceki bölümlerde verilmiştir.

Peritümöral histiyositik agregat varlığı ile sağkalım, nüks ve/veya metastaz arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Peritümöral histiyositik agregat varlığının yaş, tümör tipi, tümör ve lenf nodu evresi, lenfatik/anjio/perinöral invazyonlar, lenfositik yanıt ile ilişkileri önceki bölümlerde verilmiştir.

4.4.7. Proliferasyon indeksi

Eksitus görülen olgularda Ki67 değerleri sağ kalan olgulara göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0,01$). Benzer ilişki uzak metastaz görülen ve görülmeyen olguların Ki67 değerleri arasında da mevcuttu ($p<0,01$). Aksine, nüks görülen

olguların Ki67 değerleri nüks görülmeyen olgulara kıyasla hafifçe daha yüksek ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$).

Prolifersyon indeksinin yaşı, tümör tipi, tümör ve lenf nodu evresi, lenfatik/anjiyo/perinöral invazyonlar, TİL, lenfoid folikül/histiyositik agregat varlığı ile ilişkileri önceki bölümlerde verilmiştir.

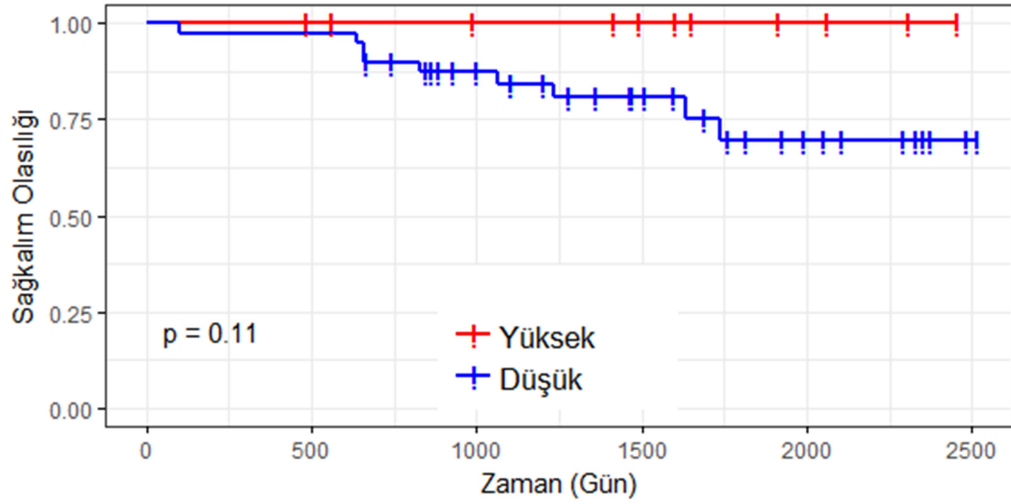
4.5. İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Prognostik Parametrelerle İlişkileri

4.5.1. CD8

- İnatümöral CD8 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

CD8 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan CD8 ekspresyon “cut-off” değeri inatümöral alan için %20’ydi. Bu “cut-off” değerlerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Yüksek inatümöral CD8 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,11$). Yüksek ve düşük inatümöral CD8 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (şekil 19).

İnatümöral CD8 ekspresyonu ile eksitus arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0,01$). Sağ olan olguların ortalama CD8 ekspresyonu %15, eksitus olan olguların ortalama CD8 ekspresyonu %8’di. İnatümöral CD8 ekspresyonu ile nüks ve metastaz arasında da anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Ortalama inatümöral-sitotoksik-TİL yüzdesi, nüks ve metastaz görülen olgularda sırasıyla %12 ve %5,6 iken; nüks ve metastaz görülmeyen olgularda sırasıyla %14 ve %15’ti.



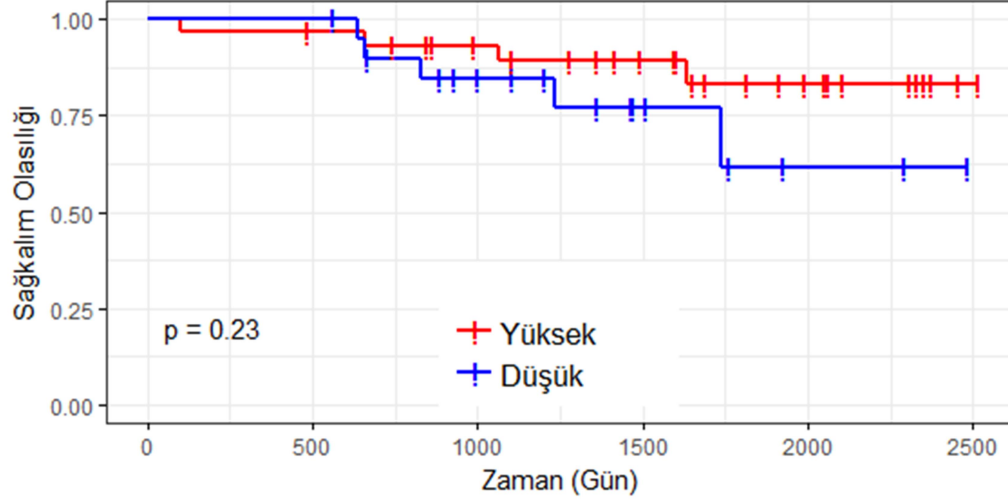
Şekil 19. İntratümöral CD8 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

- **Stromal CD8 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

Stromal CD8 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan stromal CD8 ekspresyon “cut-off” değeri %25’ti. Bu “cut-off” değerlerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Yüksek stromal CD8 ekspresyonu da uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü; ancak bu ilişki de istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,23$). Yüksek ve düşük stromal CD8 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 20).

Stromal CD8 ekspresyonu ile eksitus arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0,01$). Sağ olan olguların ortalama CD8 ekspresyonu %34, eksitus olan olguların ortalama CD8 ekspresyonu %30’dur. Stromal CD8 ekspresyonuna göre nüks görülen ve görülmeyen olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Ortanca stromal-sitotoksik-TİL yüzdesi, nüks görülen olgularda %22,5 iken; nüks görülmeyen olgularda %35’ti.

Metastaz görülen ve görülmeyen olguların stromal CD8 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,01$). Ortanca stromal-sitotoksik-TİL yüzdesi, metastaz görülen olgularda %20 iken; metastaz görülmeyen olgularda %32,5 idi.



Şekil 20. Stromal CD8 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

- **İntratümöral CD8 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Tümör tiplerine göre, intratümöral CD8 ekspresyonuna bakıldığında; istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,04$). Buna göre, LBMK olgularında intratümöral sitotoksik TİL miktarı; invaziv karsinom, NST ve metaplastik karsinom olgularına göre daha yüksekti.

İntratümöral sitotoksik TİL düzeyinin, pT evresine göre dağılımında anlamlı fark bulundu ($p=0,04$). İntratümöral CD8 ekspresyonu yüksek olan olgularda pT evresi (tümör boyutu) daha küçüktü. Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olgularda intratümöral CD8 ekspresyonu (ortalama: %14), ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu > 2 cm) olguların intratümöral CD8 ekspresyonuna göre (ortalama: %13) daha yüksekti.

İntratümöral CD8 ekspresyonuna göre anjiyoinvazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Ortanca intratümöral-sitotoksik-TİL miktarı anjiyoinvazyon görülen olgularda %5 iken, görülmeyen olgularda %8'di.

İntratümöral sitotoksik-TİL düzeylerine göre lenfatik invazyonda anlamlı ilişki görüldü ($p<0,01$). İntratümöral TİL düzeyi yüksek olan olgularda, lenfatik invazyon daha düşüktü. Lenfatik invazyon görülmeyen olguların intratümöral CD8 ekspresyonu (ortanca: %15), lenfatik invazyon görülen olgulara (ortanca: %5) göre daha yüksek saptandı.

İntratümöral sitotoksik-TİL düzeylerine göre Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda izlenen peritümöral lenfositik yanıt arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,03$). Bu farkın ilk sebebi; Hematoksilen-Eozin boyasında belirgin TİL olarak değerlendirilen olguların büyük kısmının, immünohistokimyada orta şiddette bulunmasıydı. Farkın bir diğer sebebi ise, Hematoksilen-Eozin boyasında negatif olarak değerlendirilen olguların bir kısmında, immünohistokimyada hafif şiddette ekspresyon bulunmasıydı. Öte yandan, intratümöral CD8 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda değerlendirilen lenfositik yanıt arasında; istatistiksel anlamlı ve kuvvetli pozitif korelasyon saptandı ($p<0,01$; Rho: 0,51).

İntratümöral sitotoksik TİL ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0,04$). İntratümöral sitotoksik TİL düzeyi arttıkça lenfoid folikül saptanma ihtimali artmaktaydı. Belirgin ($\geq\%50$) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %66'sında, orta derecede (%10-49) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %30'unda, hafif derecede (%1-9) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %15'inde peritümöral lenfoid folikül izlendi. İntratümöral sitotoksik TİL izlenmeyen olguda peritümöral lenfoid folikül yoktu.

İntratümöral sitotoksik-TİL ekspresyonuna göre peritümöral histiyositik agregat varlığında anlamlı farklılık saptandı ($p=0,04$). İntratümöral sitotoksik TİL düzeyi arttıkça peritümöral histiyositik agregat bulunma ihtimali artmaktaydı. İntratümöral sitotoksik TİL izlenmeyen olguda peritümöral histiyositik agregat yoktu. Hafif derecede (%1-9) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %3,7'sinde histiyositik agregat izlenirken; orta derecede (%10-49) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %30'unda histiyositik agregat izlendi. Belirgin

(\geq %50) intratümöral sitotoksik TİL görülen üç olguda histiyositik agregat izlenmemekle birlikte; bu durumun bu gruptaki olgu sayısının azlığından kaynaklandığı düşünüldü.

İnatatümöral CD8 ekspresyonuna göre hasta yaşı, pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksi, perinöral invazyonda farklılık saptanmadı ($p>0,05$)

- **Stromal CD8 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olgularda intratümöral CD8 ekspresyonu (ortalama: %39), ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların intratümöral CD8 ekspresyonuna göre (ortalama: %30) daha yüksekti ($p<0,01$).

Stromal CD8 ekspresyonuna göre anjiyoinvazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Ortanca stromal-sitotoksik-TİL miktarı anjiyoinvazyon görülen olgularda %27,5 iken, görülmeyen olgularda %35 idi.

Stromal sitotoksik-TİL düzeylerine göre lenfatik invazyonda anlamlı fark görüldü ($p=0,02$). Lenfatik invazyon görülmeyen olguların stromal CD8 ekspresyonu (ortanca: %40), lenfatik invazyon görülen olgulara (ortanca: %25) göre daha yüksek bulundu.

Stromal CD8 ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında da negatif bir ilişki görüldü. Stromal CD8 ekspresyonu düşük olan olgularda perinöral invazyon varken, stromal CD8 ekspresyonu yüksek olan olgularda perinöral invazyon yoktu. Fakat, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,06$). Daha geniş bir popülasyonda tekrar edildiğinde anlamlı sonuç elde edilebileceği düşünüldü.

Stromal sitotoksik-TİL ile Hematoksilin-Eozin boyasında izelenen TİL (peritümöral lenfositik yanıt) düzeyi arasında fark yoktu ($p>0,05$). Stromal sitotoksik TİL ile Hematoksilin-Eozin boyasındaki TİL arasında istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p<0,01$; Rho: 0,36).

Stromal sitotoksik-TİL düzeylerine göre peritümöral histiyositik agregat varlığında anlamlı fark saptandı ($p=0,04$). Belirgin ($\geq\%50$) stromal sitotoksik TİL görülen olguların $\%21,4$ 'ünde, orta derecede ($\%10-49$) stromal sitotoksik TİL görülen olguların $\%12,5$ 'inde peritümöral lenfoid folikül izlendi. Hafif derecede ($\%1-9$) stromal sitotoksik TİL görülen olgularda ise histiyositik agregat saptanmadı.

Stromal CD8 ekspresyonu ile tip, hasta yaşı ve pN evresi, lenfoid folikül varlığı, Ki67 proliferasyon indeksi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

- **İntratümöral ve stromal CD8 ekspresyonlarının diğer immünohistokimyasal belirteçlerle ilişkileri**

İntratümöral CD8 ekspresyonu ile stromal CD8 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulundu ($p<0,01$; Rho: 0,56). İntratümöral sitotoksik TİL yüksek olduğunda; stromal sitotoksik TİL de yüksek saptanmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda, intratümöral sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyonları arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,61 ve 0,40). Benzer şekilde; stromal sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,39 ve 0,45). İntratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda intratümöral sitotoksik-TİL ile neoplastik hücrelerdeki ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arasında da anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,49 ve 0,62). Benzer şekilde; stromal sitotoksik-TİL ile neoplastik hücrelerdeki ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,36 ve 0,52). İntratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları arttığında, neoplastik hücrelerdeki ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda intratümöral sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,54$ ve $0,42$). Benzer şekilde; stromal sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,38$ ve $0,44$). İntratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

4.5.2. FOXP3

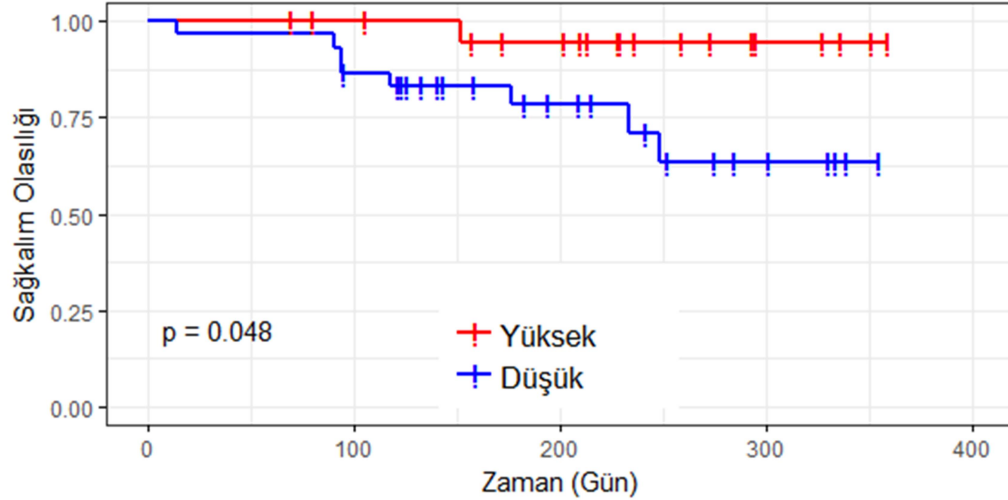
- **İntratümöral FOXP3 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

Sağkalım ile intratümöral FOXP3 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Hayatta olan olgularda intratümöral FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %1; 75.persentil: %4), eksitus olan olgulara göre (ortanca: %0; 75.persentil: %1) daha yüksekti.

İntratümöral FOXP3 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan intratümöral FOXP3 ekspresyon “cut-off” değeri %1’di. Bu “cut-off” değerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Yüksek intratümöral FOXP3 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,04$). Yüksek ve düşük intratümöral FOXP3 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 21).

Nüks ile intratümöral FOXP3 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Nüks görülmeyen olgularda intratümöral FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %1; 75.persentil: %3,5), nüks eden olgulara göre (ortanca: %0,5; 75.persentil: %2,2) daha yüksekti.

Metastaz görülen ve görülmeyen olguların intratümöral FOXP3 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Metastaz görülmeyen olgularda intratümöral FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %1; 75.persentil: %3,7), metastatik olgulara göre (ortanca: %0; 75.persentil: %1) daha yüksekti.



Şekil 21. İntratümöral FOXP3 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

- **Stromal FOXP3 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

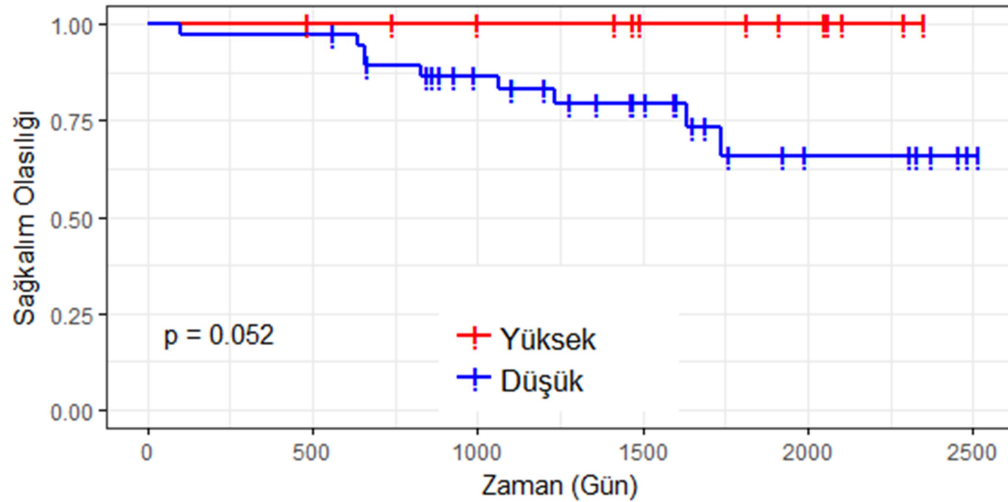
Sağkalım ile stromal FOXP3 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Hayatta olan olgularda stromal FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %2,5; 75.persentil: %6,7), eksitus olan olgulara göre (ortanca: %1; 75.persentil: %4) daha yüksekti.

Stromal FOXP3 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan stromal FOXP3 ekspresyon “cut-off” değeri %5’ti. Bu “cut-off” değerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Yüksek stromal FOXP3 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,05$).

Yüksek ve düşük stromal FOXP3 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 22).

Nüks görülen ve görülmeyen olguların stromal FOXP3 ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p < 0,01$). Nüks görülmeyen olguların stromal FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %2; 75.persentil: %6,5), nüks eden olgulara göre (ortanca: %3,5; 75.persentil: %5) farklı dağılım göstermekteydi. Ortanca ve 75.persentil değerlerine bakıldığında, stromal regülatuar-TİL miktarı ile nüks arasındaki ilişkinin doğrusal (lineer) olmadığı dikkati çekti

Metastaz görülen ve görülmeyen olguların stromal FOXP3 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p < 0,01$). Metastaz görülmeyen olgularda stromal FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %2,5; 75.persentil: %3), metastatik olgulara göre (ortanca: %01; 75.persentil: %6) daha yüksekti.



Şekil 22. Stromal FOXP3 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

- **İntratümöral FOXP3 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

İntratümöral FOXP3 ekspresyonu ile yaş arasında negatif bir ilişki görüldü. Hasta yaşı arttıkça intratümöral FOXP3 ekspresyonu azalmaktaydı. Ancak, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,06$; Rho: $-0,25$). Bu durumun olgu sayımızın azlığından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Tümör tipine göre intratümöral FOXP3 ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu ($p=0,01$). LBMK olgularında intratümöral regülatuar-TİL sayısı; invaziv karsinom, NST ve metaplastik karsinom olgularına göre daha yüksekti. İntratümöral regülatuar-TİL saptanan olguların %58'i LBMK ve %40'ı invaziv karsinom, NST iken; intratümöral regülatuar-TİL saptanmayan olguların %22'si LBMK ve %56'sı invaziv karsinom, NST'ydi.

İntratümöral regülatuar-TİL ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon görülmeyen olgularda intratümöral FOXP3 ekspresyonu (ortanca: %1; 75.persentil: %4), anjiyoinvazyon görülen olgulara göre (ortanca: %0; 75.persentil: %1,2) daha yüksekti.

İntratümöral FOXP3-pozitif-TİL düzeyine göre lenfatik invazyon arasında istatistiksel anlamlı fark vardı ($p<0,01$). Lenfatik invazyon görülen olgularda intratümöral FOXP3-pozitif TİL düzeyi (ortanca: %0, 75.persentil: %1), lenfatik invazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: %3, 75.persentil: %5) daha düşüktü.

İntratümöral regülatuar-TİL düzeyi ile perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlı fark vardı ($p<0,01$). Perinöral invazyon görülen olgularda intratümöral regülatuar-TİL düzeyi (ortanca: %0; 75.persentil: %2), perinöral invazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: %1; 75.persentil: %3) daha düşüktü.

İntratümöral FOXP3 ekspresyonuna göre peritümöral histiyositik agregatta anlamlı fark saptandı ($p=0,01$). İntratümöral regülatuar-TİL görülen olguların %21'inde histiyositik agregat vardı. FOXP3 ekspresyonu görülmeyen (negatif) olguların hiçbirinde histiyositik agregat yoktu.

İntratümöral regülatuar-TİL düzeylerine göre peritümöral lenfoid folikül arasında fark saptandı ($p<0,01$). İntratümöral FOXP3 ekspresyonu görülen olguların %24'ünde lenfoid folikül varken; intratümöral FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olguların %22'sinde, peritümöral lenfoid folikül izlendi.

İntratümöral FOXP3 ekspresyonu saptanan olgularda, Ki67 proliferasyon indeksi daha yüksek bulundu ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,03$; Rho: 0,30).

İntratümöral FOXP3 ekspresyonuna göre pT ve pN evrelerinde anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

- **Stromal FOXP3 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Tümör tipine göre stromal FOXP3 ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu ($p=0,02$). LBMK olgularında regülatuar TİL sayısı; invaziv karsinom, NST ve metaplastik karsinom olgularına göre daha yüksekti. Stromal regülatuar-TİL saptanan olguların %54'ü LBMK ve %36'sı invaziv karsinom, NST iken; stromal regülatuar-TİL saptanmayan olguların %10'u LBMK ve %80'i invaziv karsinom, NST'ydi.

Stromal regülatuar-TİL ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Stromal FOXP3 ekspresyonu anjiyoinvazyon görülmeyen olgularda (ortanca: %3; 75.persentil: %8), anjiyoinvazyon görülen olgulara göre (ortanca: %1; 75.persentil: %4) daha yüksekti.

Stromal FOXP3-pozitif TİL düzeyi ile lenfatik invazyon arasında istatistiksel anlamlı fark vardı ($p<0,01$). Lenfatik invazyon görülen olgularda stromal regülatuar-TİL düzeyi (ortanca: %1; 75.persentil: %2), lenfatik invazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: %4,5; 75.persentil: %10) daha düşüktü.

Stromal regülatuar-TİL düzeyi ile perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlı fark vardı ($p<0,01$). Stromal regülatuar-TİL düzeyi de perinöral invazyon

görülen olgularda (ortanca: %1; 75.persentil: %2), perinöral invazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: %3; 75.persentil: %6) daha düşüktü.

Stromal FOXP3 ekspresyonuna göre peritümöral histiyositik agregat varlığında anlamlı fark saptandı (sırasıyla, $p=0,01$ ve $p=0,02$). Stromal regülatuar-TİL görülen olguların %17'sinde histiyositik agregat vardı. FOXP3 ekspresyonu görülmeyen (negatif) olguların hiçbirinde histiyositik agregat yoktu.

Stromal regülatuar-TİL düzeylerine göre peritümöral lenfoid foliküllerde anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Stromal FOXP3 ekspresyonu görülen olguların %24,4'ünde lenfoid folikül izlenirken; FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olguların %20'sinde peritümöral lenfoid folikül vardı.

Stromal FOXP3 ekspresyonuna göre; yaş, proliferasyon indeksi, pT ve pN evresinde farklılık görülmedi ($p>0,05$).

• İntratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyonlarının diğer immünohistokimyasal belirteçlerle ilişkileri

Çalışmamızda intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal sitotoksik-TİL arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,61$ ve $0,40$). Benzer şekilde; stromal FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal CD8 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,39$ ve $0,45$). İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları da artmaktadır (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile neoplastik hücrelerde ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,54$ ve $0,58$). Benzer şekilde; stromal FOXP3 ekspresyonu ile neoplastik hücrelerde ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,47$ ve $0,44$). Buna göre, intratümöral ve/veya

stromal FOXP3 ekspresyonları arttığında, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal M2 makrofajlar arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,43 ve 0,50). Benzer şekilde; stromal FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal M2 makrofajlar arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,26 ve 0,36). İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktadır (Ko-ekspresyon).

4.5.3. CD8/FOXP3 oranı

• İntratümöral CD8/FOXP3 oranınının eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi

Sağkalıma göre intratümöral CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı (75.persentil: 15), hayatta olan olgulardan (75.persentil: 6) daha yüksekti.

Nüks varlığına göre intratümöral CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Nüks olan olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 4,5), nüks olmayan olgulardan (ortanca: 5) daha düşüktü.

Metastaza göre intratümöral CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Metastatik olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 2), metastaz görülmeyen olgulardan (ortanca: 5) daha düşüktü.

• Stromal CD8/FOXP3 oranınının eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi

Sağkalıma göre stromal CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda stromal CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 12), hayatta olan olgulardan (75.persentil: 8,5) daha yüksekti.

Nüks varlığına göre stromal CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Nüks olan olgularda stromal CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 7), nüks olmayan olgulardan (ortanca: 10) daha yüksekti.

Metastaza göre stromal CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Metastatik olgularda stromal CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 13), metastaz olmayan olgulardan (ortanca: 8,5) daha yüksekti.

• İntratümöral CD8/FOXP3 oranınının histopatolojik parametrelerle ilişkisi

İntratümöral CD8/FOXP3 oranı ile lenfatik invazyon arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Lenfatik invazyon olan olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı (75.persentil: 6), lenfatik invazyon olmayan olgulara göre (75.persentil: 6,5) hafif düşüktü.

İntratümöral CD8/FOXP3 oranı ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon olan olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı (75.persentil: 5,5), anjiyoinvazyon olmayan olgulara göre (75.persentil: 7) hafif düşüktü.

İntratümöral CD8/FOXP3 oranı ile perinöral invazyon arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Perinöral invazyon olan olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 3), perinöral invazyon olmayan olgulara göre (ortanca: 5) hafif düşüktü.

İntratümöral CD8/FOXP3 oranına göre ile hasta yaşı, tümör tipi, pT ve pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksi, lenfoid folikül veya histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki yoktu ($p>0,05$).

• Stromal CD8/FOXP3 oranının histopatolojik parametrelerle ilişkisi

Stromal CD8/FOXP3 oranına göre; lenfatik invazyonu olan ve olmayan olgular arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Lenfatik invazyon görülen olguların stromal CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 20), lenfatik invazyon görülmeyen olguların (ortanca: 7,5) yaklaşık üç katıydı.

Stromal CD8/FOXP3 oranına göre; anjiyoinvazyon olan ve olmayan olgular arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon görülen olguların stromal CD8/FOXP3 oranı (75. persentil: 26), anjiyoinvazyon görülmeyen olgulardan (75. persentil: 19) daha yüksekti.

Stromal CD8/FOXP3 oranı ile perinöral invazyon arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Perinöral invazyon olan olgularda stromal CD8/FOXP3 oranı (ortanca: 10), perinöral invazyon olmayan olgulara göre (ortanca: 8,5) yüksekti.

pN evresine göre, stromal CD8/FOXP3 oranında anlamlı farklılık saptandı ($p=0,02$). Stromal CD8/FOXP3 oranı yüksek olan olgularda lenf nodu metastazı daha nadirdi. Lenf nodu metastazı izlenmeyen (pN0) olguların stromal CD8/FOXP3 oranı (ortalama: 19,9); lenf nodu metastazı saptanan (pN1-2-3) olgulara (ortalama: 10,9) göre daha yüksekti.

Stromal CD8/FOXP3 oranına göre hasta yaşı, tümör tipi, pT evresi, Ki67 proliferasyon indeksi, lenfoid folikül veya histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

4.5.4. PD-L1

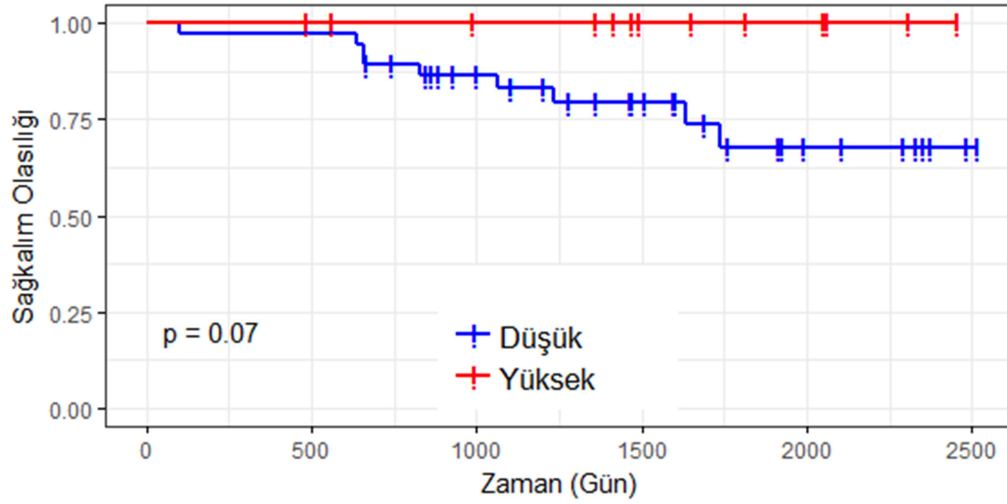
- **Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

Sağkalıma göre neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunda anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Hayatta olan olgularda PD-L1 ekspresyonu (ortanca: %4) daha yüksek iken; eksitus olan olgularda ekspresyon (ortanca: %2) daha düşüktü. Aynı analiz gruplu veriler ile (üç kategorili, dört kategorili, mediana göre, 75.persentile göre) yapıldığında ise anlamlı fark saptanmadı.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan PD-L1 ekspresyon “cut-off” değeri neoplastik hücreler için %10'du. Bu “cut-off” değerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Neoplastik hücrelerdeki yüksek PD-L1 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,07$). Neoplastik hücrelerde yüksek ve düşük PD-L1 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 23).

Nüks ile neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Nüks görülmeyen olgularda PD-L1 ekspresyonu (ortanca: 5; 75.persentil: 20), nüks görülen olgulara (ortanca: 1,5; 75.persentil: 6) göre daha yüksekti.

Metastaz göre neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Metastatik olgularda (ortanca: 0; 75.persentil: 1) ekspresyon, metastaz görülmeyen olgulara göre (ortanca:5; 75.persentil: 20) daha düşüktü.



Şekil 23. Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

- **TİL’de PD-L1 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

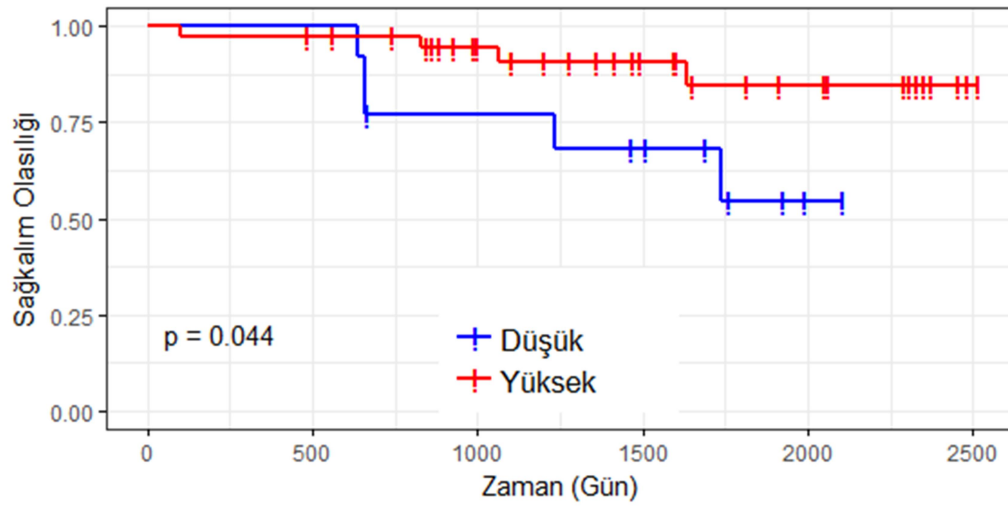
Sağkalıma göre tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonunda anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$). Hayatta olan olgularda TİL’de PD-L1 ekspresyonu (ortanca: %17,5) daha yüksek iken; eksitus olan olgularda ekspresyon (ortanca: %4) daha düşüktü. Aynı analiz gruplu veriler (üç kategorili, dört kategorili, mediana göre, 75.persentile göre) ile yapıldığında; üç kategorili grup ile 75.persentile göre oluşturulan grupta istatistiksel anlamlı fark saptanırken (sırasıyla, $p=0,04$ ve $p=0,01$), diğer gruplama sistemlerinde anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$). Buna göre, TİL’de PD-L1 ekspresyonu %50’den büyük olan olguların tamamı, %1-49 arasında olan olguların %85’i, ekspresyon görülmeyen olgularınsa %57’si sağdı ($p=0,04$). 75.persentile göre grupladığımızda ise; TİL’de PD-L1 ekspresyonu %35’den büyük olan olguların tamamı, %1-34 arasında olan olguların %80’i, ekspresyon görülmeyen olgularınsa %57’si sağdı ($p=0,01$).

TİL’deki PD-L1 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan PD-L1 ekspresyon “cut-off” değeri TİL için %5’ti. Bu “cut-off” değerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. TİL’deki yüksek PD-L1 ekspresyonu da uzun genel

sağkalımla ilişkili görüldü ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,04$). TİL'de yüksek ve düşük PD-L1 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 24).

Nüks ile tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Nüks olan olgularda PD-L1 ekspresyonu (ortanca: 14,5; 75.persentil: 30), nüks olmayan olgulara göre (ortanca: 15; 75.persentil: 37,5) daha düşüktü.

Metastaz göre tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Metastatik olgularda (ortanca: 1; 75.persentil: 5) ekspresyon, metastaz görülmeyen olgulara göre (ortanca: 17,5; 75.persentil: 35) daha düşüktü.



Şekil 24. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

- **Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Yaşa göre neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyon yüzdesine bakıldığında; yaş arttıkça PD-L1 ekspresyonunun azaldığı görüldü. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı

değildi ($p=0,07$; Pearson's $r: -0,25$). Bu durumun olgu sayımızın azlığından kaynaklanabileceği düşünöldü. Daha geniş bir popölyasyonda tekrar edildiğinde; neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı bir ilişki saptanabilir.

Tümör tiplerine göre, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna bakıldığında; istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,02$). Buna göre, invaziv karsinom, NST olgularında PD-L1 ekspresyonu daha düşük iken; LBMK olgularında daha yüksekti.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna göre, anjiyoinvazyon varlığında anlamlı farklılık göröldü ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon olan olgularda ekspresyon (ortanca: 2,5; 75.persentil: 6), anjiyoinvazyon görölmeyen olgulara göre (ortanca: 5; 75.persentil: 20) daha düşöktü.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna göre, lenfatik invazyon varlığında anlamlı farklılık göröldü ($p<0,01$). Lenfatik invazyon olan olgularda ekspresyon (ortanca: 2; 75.persentil: 7,5), lenfatik invazyon görölmeyen olgulara göre (ortanca: 5; 75.persentil: 20) daha düşöktü.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna göre, perinöral invazyon varlığında anlamlı farklılık göröldü ($p<0,01$). Perinöral invazyon olan olgularda ekspresyon (ortanca: 2; 75.persentil: 5), perinöral invazyon görölmeyen olgulara göre (ortanca: 4; 75.persentil: 17,5) daha düşöktü.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile peritümöral lenfoid foliköl varlığı arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0,05$). Lenfoid foliköl görölen olgularda neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ortalama %19'ken, lenfoid foliköl görölmeyen olgularda ortalama %10'du.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyasında izlenen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon mevcuttu ($p<0,01$; Rho: 0,41). TİL miktarı yüksek olan olgularda PD-L1 ekspresyonu daha yüksek bulundu. Hematoksilen-Eozin boyasında izlenen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi ile neoplastik hücrelerdeki PD-L1 boyanma şiddeti arasında da benzer ilişki saptandı ($p<0,01$).

Neoplastik hücrelerin PD-L1 ekspresyonuna göre pT evresi, pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksi, histiyositik agregat arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

- **TİL’de PD-L1 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Yaşın, tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyon yüzdesiyle ilişkisine bakıldığında; istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p=0,03$; Pearson’s r: $-0,27$; Rho: $-0,29$). Yaş arttıkça TİL’deki PD-L1 ekspresyonunun azaldığı görüldü.

TİL’deki PD-L1 ekspresyonuna göre, anjiyoinvazyon varlığında anlamlı farklılık görüldü ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon olan olgularda ekspresyon (ortanca: 6; 75.persentil: 21), anjiyoinvazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: 15; 75.persentil: 37,5) daha düşüktü.

TİL’deki PD-L1 ekspresyonuna göre, lenfatik invazyon varlığında anlamlı farklılık görüldü ($p<0,01$). Lenfatik invazyon olan olgularda ekspresyon (ortanca: 5; 75.persentil: 30), lenfatik invazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: 20; 75.persentil: 36) daha düşüktü.

TİL’deki PD-L1 ekspresyonuna göre, perinöral invazyon varlığında anlamlı farklılık görüldü ($p<0,01$). Perinöral invazyon olan olgularda ekspresyon (ortanca: 30; 75.persentil: 40), perinöral invazyon görülmeyen olgulara göre (ortanca: 15; 75.persentil: 30) daha yüksekti.

Tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu ile histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0,05$). Buna göre, TİL’deki PD-L1 ekspresyonu median değer üzerinde ($\geq\%15$) bulunan olguların $\%22$ ’sinde; TİL’deki PD-L1 ekspresyonu $\%1-14$ bulunan olguların $\%6$ ’sında histiyositik agregat görülürken; TİL’de PD-L1 ekspresyonu izlenmeyen (negatif) olguların hiçbirinde histiyositik agregat izlenmedi.

Tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu ile Hematoksilin-Eozin boyasında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon mevcuttu ($p<0,01$; Rho: $0,42$). TİL miktarı yüksek olan

olgularda PD-L1 ekspresyonu daha yüksek olmaktadır. Hematoksilen-Eozin boyasında izlenen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi ile PD-L1 boyanma şiddeti arasında da benzer ilişki saptandı ($p<0,01$).

Tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonuna göre pT evresi, pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksi ve peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

- **Neoplastik hücrelerde ve TİL'de PD-L1 ekspresyon yüzdesinin boyanma şiddeti ile ilişkisi**

Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile PD-L1 boyanma şiddeti arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,01$; Rho: 0,78). Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu arttıkça, boyanma şiddeti de artmaktaydı. Benzer şekilde; TİL'deki PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile boyanma şiddeti arasında da anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0,01$; Rho: 0,72).

- **Neoplastik hücrelerde ve TİL'de PD-L1 ekspresyonunun diğer immünohistokimyasal belirteçlerle ilişkisi**

Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonuyla TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulundu ($p<0,01$; Rho: 0,6). TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arttıkça neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal sitotoksik-TİL ile arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,49 ve 0,62). Benzer şekilde; TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal sitotoksik-TİL ile arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,36 ve 0,52). Neoplastik hücrelerdeki ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,54 ve 0,58). Benzer şekilde TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL arasında da anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,47 ve 0,44). Buna göre, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal M2 makrofajlar arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,42 ve 0,49). Benzer şekilde TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal M2 makrofaj arasında da anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,43 ve 0,55). Buna göre, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

4.5.5. PD-L1 ekspresyon skoru

- **Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunda sağkalıma göre anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda skor (ortanca: 2; 75.persentil: 10), sağ olan olgulardan (ortanca: 5; 75.persentil: 40) daha düşüktü.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunda nükse göre anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Nüks olan olgularda skor (ortanca: 1,5; 75.persentil: 10), nüks görülmeyen olgulardan (ortanca: 5; 75.persentil: 40) daha düşüktü.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunda metastaza göre anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Metastaz görülen olgularda skor (ortanca: 0; 75.persentil: 1), metastaz görülmeyen olgulardan (ortanca: 8; 75.persentil: 40) daha düşüktü.

- **TİL'deki PD-L1 ekspresyon skorunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

TİL'deki PD-L1 ekspresyon skorunda sağkalıma göre anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda skor (ortanca: 4; 75.persentil: 40), hayatta olan olgulardan (ortanca: 35; 75.persentil: 80) daha düşüktü.

TİL'deki PD-L1 ekspresyon skorunda nükse göre anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Nüks olan olgularda skor (ortanca: 32; 75.persentil: 78), nüks görülmeyen olgulardan (ortanca: 30; 75.persentil: 75) hafif yüksekti.

TİL'deki PD-L1 ekspresyon skorunda metastaza göre anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Metastaz görülen olgularda skor (ortanca: 1; 75.persentil: 10), metastaz görülmeyen olgulardan (ortanca: 35; 75.persentil: 79) daha düşüktü.

- **Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunun, histolojik tümör tiplerine göre dağılımına bakıldığında; istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,02$). Buna göre, LBMK olgularında PD-L1 skoru (ortanca: 70); invaziv karsinom, NST (ortanca: 3) ve metaplastik karsinom (ortanca: 2) olgularına göre daha yüksekti.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skoru ile Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon mevcuttu ($p<0,01$). TİL miktarı yüksek olan olgularda PD-L1 ekspresyon skoru daha yüksek olmaktadır.

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skoruna göre; yaş, pT evresi, pN evresi, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, Ki67 proliferasyon indeksi, lenfoid folikül / histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

- **TİL'deki PD-L1 ekspresyon skorunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoru ile Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon mevcuttu ($p<0,01$). TİL miktarı yüksek olan olgularda PD-L1 ekspresyon skoru daha yüksek olmaktadır.

TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoruna göre; yaş, histolojik tip, pT evresi, pN evresi, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, Ki67 proliferasyon indeksi, lenfoid folikül / histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

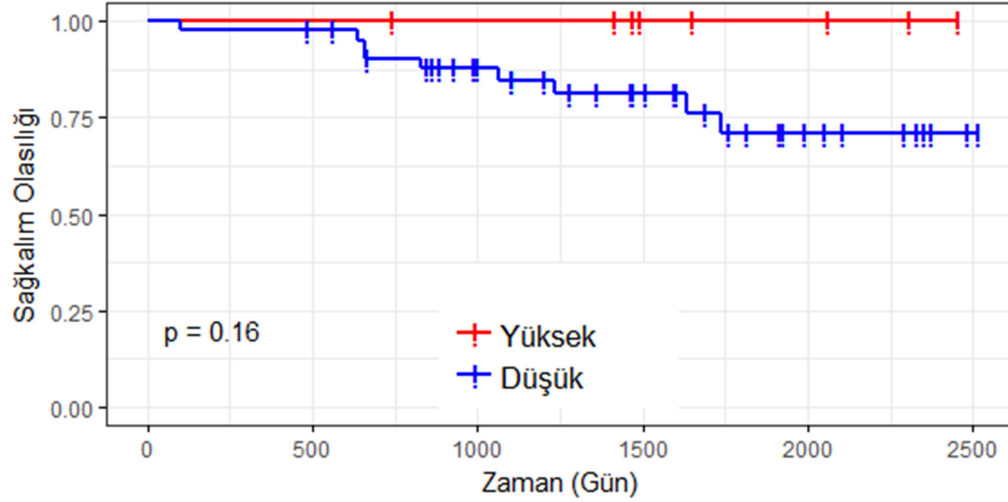
4.5.6. CD163

- **İnatümöral CD163 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre sağkalımda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda ekspresyon (ortanca: 6; 75.persentil: 12), hayatta olan olgulara göre (ortanca: 7,5; 75.persentil: 14) hafif düşüktü.

İnatümöral CD163 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan CD163 ekspresyon “cut-off” değeri inatümöral alanda BBA başına

20'ydı. Bu “cut-off” değerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Yüksek intratümöral CD163 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,1$). Yüksek ve düşük intratümöral CD163 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 25).



Şekil 25. İnatümöral CD163 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre nükste anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Nüks olan olgularda ekspresyon (ortanca: 7,5; 75.persentil: 14), nüks görülmeyen olgulara göre (ortanca: 7; 75.persentil: 13,5) hafif yüksekti.

İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre metastazda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Metastatik olgularda ekspresyon (ortanca: 2; 75.persentil: 6), metastaz görülmeyen olgulara göre (ortanca: 8; 75.persentil: 14) düşüktü.

- **Stromal CD163 ekspresyonunun eksitus, nüks, metastaz ile ilişkisi**

Stromal CD163 ekspresyonuna göre sağkalımda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda ekspresyon (ortanca: 20; 75.persentil: 22), hayatta olan olgulara göre (ortanca: 24; 75.persentil: 39) daha düşüktü.

Stromal CD163 ekspresyonu için en uygun “cut-off” değerleri sensitivite ve spesifitenin maksimize edildiği Roc eğrileri ile belirlendi. Buna göre, sağkalımı en iyi yansıtan CD163 ekspresyon “cut-off” değeri stromal alanda BBA başına 22’ydi. Bu “cut-off” değerine eşit veya büyük olan olgular “yüksek ekspresyon”, küçük olan olgular “düşük ekspresyon” olarak gruplandı. Yüksek stromal CD163 ekspresyonu da uzun genel sağkalımla ilişkili görüldü ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,04$). Yüksek ve düşük stromal CD163 ekspresyonunun sağkalımla ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 26).

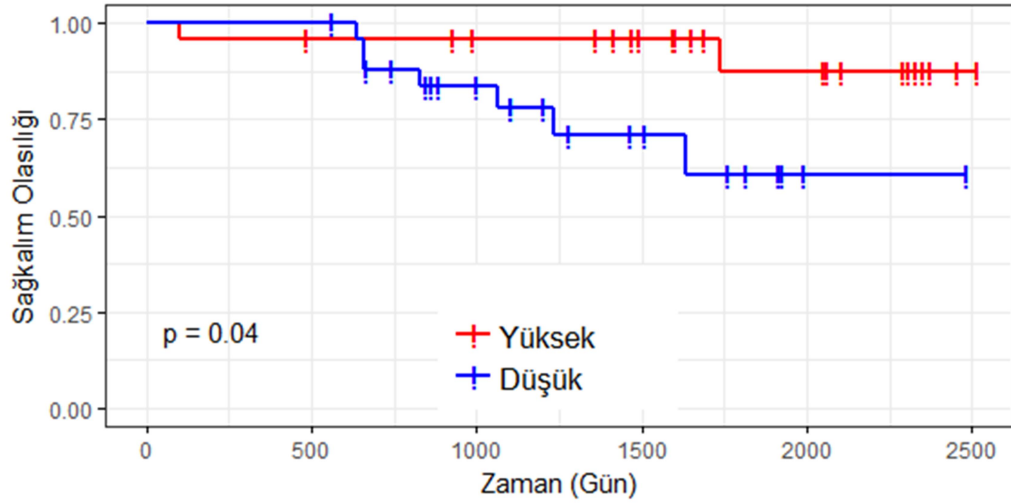
Stromal CD163 ekspresyonuna göre nükste anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Nüks olan olgularda ekspresyon (ortanca: 21; 75.persentil: 28), nüks olmayan olgulara göre (ortanca: 24; 75.persentil: 38) daha düşüktü.

Stromal CD163 ekspresyonuna göre metastazda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Metastaz olan olgularda ekspresyon (ortanca: 12; 75.persentil: 20), metastaz görülmeyen olgulara göre (ortanca: 24; 75.persentil: 39) daha düşüktü.

- **İntratümöral CD163 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

İntratümöral CD163 ekspresyonuna göre anjiyoinvazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon görülen olgularda ekspresyon (ortanca: 3,5; 75.persentil: 7,7), görülmeyen olgulara göre (ortanca: 8; 75.persentil: 15) daha düşüktü.

İntratümöral CD163 ekspresyonuna göre lenfatik invazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Lenfatik invazyon görülen olgularda ekspresyon (ortanca: 6;



Şekil 26. Stromal CD163 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

75.persentil: 10), görülmeyen olgulara göre (ortanca: 8,5; 75.persentil: 20) daha düşüktü.

İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre perinöral invazyonda anlamlı fark görüldü ($p < 0,01$). Perinöral invazyon görülen olguların ekspresyonu (ortanca: 6; 75.persentil: 14) ile görülmeyen olguların ekspresyonu (ortanca: 7,5; 75.persentil: 13) farklıydı; ancak, ilişkinin doğrusal olmadığı görüldü.

İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre pT evresinde anlamlı fark görüldü ($p < 0,01$). Erken evrede (pT1; tümör boyutu < 2 cm) ekspresyon (ortanca: 6; 75.persentil: 12), ileri evreye göre (pT2-3-4; tümör boyutu > 2 cm) (ortanca: 8; 75.persentil 14) daha düşüktü.

Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi ile intratümöral M2 makrofajlar arasında anlamlı ve pozitif ilişki görüldü ($p = 0,02$; Rho: 0,30). TİL'den zengin olgularda intratümöral M2 makrofaj sayısı da fazla olmaktaydı.

İnatümöral CD163 ekspresyonu ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı ilişki bulundu ($p < 0,01$). İnatümöral BBA başına CD163-pozitif

makrofaj sayısı lenfoid folikül görülen olgularda (ortalama 21,4); lenfoid folikül görülmeyen olgulara (ortalama 8,05) göre daha yüksekti.

Hasta yaşı, histolojik tip, pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksi ve peritümöral histiyositik agregat varlığında intratümöral CD163 ekspresyonuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

- **Stromal CD163 ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle ilişkisi**

Stromal CD163 ekspresyonuna göre anjiyoinvazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon görülen olgularda ekspresyon (ortanca: 18; 75.persentil: 29), görülmeyen olgulara göre (ortanca: 24; 75.persentil: 41) daha düşüktü.

Stromal CD163 ekspresyonuna göre lenfatik invazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Lenfatik invazyon görülen olgularda ekspresyon (ortanca: 18; 75.persentil: 33,5), görülmeyen olgulara göre (ortanca: 24; 75.persentil: 39) daha düşüktü.

Stromal CD163 ekspresyonuna göre perinöral invazyonda anlamlı fark görüldü ($p<0,01$). Perinöral invazyon görülen olgularda ekspresyon (ortanca: 20; 75.persentil: 27), görülmeyen olgulara göre (ortanca: 23; 75.persentil: 38) daha düşüktü.

Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi ile stromal M2 makrofajlar arasında anlamlı ve pozitif ilişki görüldü ($p= 0,01$; Rho: 0,33). TİL'den zengin olgularda stromal M2 makrofaj sayısı da fazla olmaktaydı.

Stromal CD163 ekspresyonu ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında da anlamlı ilişki bulundu ($p<0,01$). Stromal BBA başına CD163 ekspresyonu 75.persentile göre gruplandığında; yüksek ekspresyon (≥ 38) bulunan olguların %24'ünde; düşük ekspresyon (1-37) bulunan olgularınsa %13'ünde lenfoid folikül görüldü ($p<0,01$).

Stromal M2 makrofaj sayısı ile peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0,02$). Stromal BBA başına M2 makrofaj sayısı

histiyositik agregat görülen olgularda (ortalama 17), histiyositik agregat görülmeyen olgulara (ortalama 10) göre daha yüksekti.

Stromal CD163 ekspresyonuna göre; hasta yaşı, histolojik tip, pT ve pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksinde anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

- **İntratümöral ve stromal CD163 ekspresyonunun diğer immünohistokimyasal belirteçlerle ilişkileri**

İntratümöral CD163 ekspresyonu ile stromal CD163 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki görüldü ($p<0,01$; Rho: 0,65). İntratümöral alanda BBA başına CD163-pozitif makrofaj sayısı arttıkça, stromal alanda da BBA başına CD163-pozitif makrofaj sayısı artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda, intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları ile intratümöral sitotoksik-TİL arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,54 ve 0,42). Benzer şekilde; intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları stromal sitotoksik-TİL arasında da anlamlı ve pozitif ilişki bulundu ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,38 ve 0,44). Buna göre; intratümöral ve/veya stromal sitotoksik-TİL'den zengin olgularda intratümöral ve/veya stromal M2 makrofaj sayısı da yüksek bulunmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda, intratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile intratümöral FOXP3 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif ilişki görüldü ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,43 ve 0,50). Benzer şekilde; intratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile stromal FOXP3 ekspresyonu arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,26 ve 0,36). İntratümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL sayısı arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktaydı (Ko-ekspresyon).

Çalışmamızda, intratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,42 ve 0,49). İntratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında da anlamlı pozitif ilişki saptandı ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,43 ve 0,55). Buna göre, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları

yüksek olan olgularda intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da yüksek bulunmaktaydı (Ko-ekspresyon).

4.5.7. Çok değişkenli analizler

İmmünohistokimyasal belirteçlerin sağkalıma etkisini değerlendirmek amacıyla; her bir immünohistokimyasal belirteç ile patolojik risk skorunun (primer tümör evresi, lenf nodu evresi, proliferasyon indeksi, cerrahi sınırlarda tümör varlığı ve anjiyo/lenfatik/perinöral invazyonlar) bir arada incelendiği çok değişkenli analizler yapıldı.

Tümörü infiltre eden lenfositlerdeki yüksek PD-L1 ekspresyonunun sağkalım üzerinde istatistiksel anlamlı pozitif etkisi saptandı (Risk oranı: 0,25; Etki katsayısı: -1,36; $p=0,04$). Buna göre, tümörü infiltre eden lenfositlerde yüksek PD-L1 ekspresyonu saptanan olgularda eksitus riski, diğer olgulara göre %25 daha azdı.

Stromal alanda CD163 ekspresyonu yüksek olan olgularda eksitus riskinin, diğer olgulara göre daha az olduğu görüldü (Risk oranı: 0,24; Etki katsayısı: -1,41; $p=0,06$). Bu bulgu $p=0,05$ kabul edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı değilken; $p=0,01$ kabul edildiğinde anlamlı olduğu dikkati çekti.

İnatümöral alanda FOXP3 ekspresyonu yüksek olan olgularda eksitus riskinin, diğer olgulara göre daha az olduğu görüldü (Risk oranı: 0,16; Etki katsayısı: -1,78; $p=0,08$). Bu bulgu $p=0,05$ kabul edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı değilken; $p=0,01$ kabul edildiğinde anlamlı olduğu dikkati çekti.

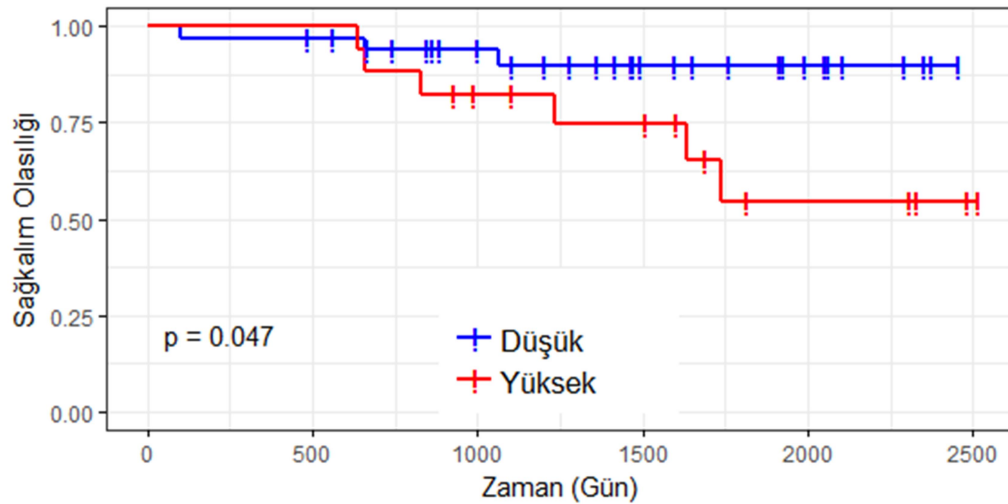
Çok değişkenli analizlerde tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu, intratümöral CD163 ekspresyonu, stromal FOXP3 ekspresyonu, intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonu ile sağkalım arasında ilişki saptanmadı.

4.6. Patolojik Risk Skoru

Olgularımızın patolojik risk skoru ortanca 4'tü (Ortalama: 4; SS: 1,8; Minimum: 1; Maksimum: 9). Yüksek patolojik risk skoru ile sağkalım ($p=0,01$; Rho: 0,33) ve nüks ($p=0,05$; Rho: 0,26) arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı. Patolojik risk skoru yüksek bulunan olgularda eksitus ve nüks daha fazlaydı. Metastaz ile patolojik risk skoru arasında ise istatistiksel anlamlı ilişki görülmedi.

Patolojik risk skoru için "cut-off" değeri 4 alındığında; sağkalımı %67 sensitivite ve %74 spesifite (Roc alanı: 0,75; Doğru sınıflama başarısı: %73) ile doğru tahmin ettiği saptandı ($p=0,09$). Olgularımızın 34'ünde (%66,7) patolojik risk skoru ≤ 4 olup olgularımızın 17'sinde (%33,3) patolojik risk skoru >4 'tü. Yüksek patolojik risk skoru, kısa genel sağkalım ile ilişkiliydi ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,04$). Yüksek ve düşük patolojik risk skorunun genel sağkalım ile ilişkisi Kaplan-Meier grafiği ile gösterildi (Şekil 27).

Patolojik risk skorunun, yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında; <60 yaş grubunda olguların yalnızca %28'inin patolojik risk skoru yüksekken (Skor >4); ≥ 60 yaş grubunda olguların %55'inin patolojik risk skoru yüksekti (Skor >4). Ancak, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,09$).



Şekil 27. Patolojik risk skorunun sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier grafiği).

Patolojik risk skoru ile tümör tipi, HE boyasında değerlendirilen TİL düzeyi, lenfoid folikül/histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Patolojik risk skoru patolojik evre (pT, pN), lenfatik/anjiyo/perinöral invazyon, proliferasyon indeksi kullanılarak hesaplandığından; bu değişkenler ile ilişkisi değerlendirme dışı bırakıldı.

Patolojik risk skoru ile hem intratümöral ($p=0,01$; Rho: $-0,32$) hem de stromal ($p=0,02$; Rho: $-0,32$) FOXP3 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulundu. İnatümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL düzeyi yüksek olan olgularda patolojik risk skoru daha düşüktü. Bu bulgu, FOXP3 ekspresyonunun prognostik ve patolojik risk skoru üzerinde prediktif etkisi olduğunu düşündürdü.

Patolojik risk skoru ile diğer immünohistokimyasal belirteçler (inatümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonu, intratümöral ve/veya stromal CD8/FOXP3 oranı, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonu, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 boyanma şiddeti, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoru, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonu) arasında ilişki görülmedi ($p>0,05$).

4.7. Kötü Prognoz Skoru

Olgularımızın kötü prognoz skoru ortanca 4'tü (Ortalama: 4,5; SS: 2,35; Minimum: 1; Maksimum: 12). Eksitus olan olgularda kötü prognoz skoru ortanca 7 bulunurken; nüks gelişen olgularda ortanca 7,5 ve metastaz gelişen olgularda ortanca 9 idi. Sağ ve sağlıklı olgularda ise kötü prognoz skoru ortanca 4'tü.

Kötü prognoz skoru ile yaş, histolojik tümör tipi, peritümöral lenfositik yanıt, lenfoid folikül/histiyositik agregat varlığı arasında ilişki yoktu ($p>0,05$). Kötü prognoz skoru eksitus, nüks, metastaz, pT ve pN evresi, lenfatik/anjiyo/perinöral invazyon ve proliferasyon indeksi kullanılarak hesaplandığından; bu değişkenler ile ilişkisi değerlendirme dışı bırakıldı.

Kötü prognoz skoru ile hem intratümöral ($p=0,02$; Rho: $-0,32$) hem de stromal ($p=0,02$; Rho: $-0,31$) FOXP3 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon bulundu. İntratümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL düzeyi yüksek olan olgularda kötü prognoz skoru daha düşüktü. Bu bulgu, olgularımızdaki FOXP3 ekspresyonunun prognostik ve prediktif rolünü desteklemekteydi.

Kötü prognoz skoru ile diğer immünohistokimyasal belirteçler (intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonu, intratümöral ve/veya stromal CD8/FOXP3 oranı, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonu/boyanma şiddeti/ekspresyon skoru, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonu) arasında ise ilişki görülmedi ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Kadınlarda en sık görülen kanser tipi olan meme kanseri; kadınlarda kansere bağlı ölüm sebepleri arasında da birinci sıradadır [1, 2, 4, 29]. ER, PR ve HER2 eksprese etmeyen meme kanserini olguları TNMK olarak adlandırılmaktadır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si triple negatiftir. TNMK, farklı histolojik alt-tipleri kapsayan heterojen bir ailedir ve triple negatif dışı meme kanseri olgularına göre daha kötü prognoza sahiptir [7, 92, 94, 95, 125]. Çalışmamızda, 51 TNMK olgusu yer almaktadır ve olguların tamamı kadındır.

5.1. Klinik Veriler

5.1.1. Yaş

Triple negatif kanserlerin, triple negatif dışı kanserlere göre daha genç yaşta görüldüğü bilinmektedir [94, 96]. Bauer ve arkadaşlarının 6370 TNMK olgusundan oluşan serisinde (Kaliforniya çalışması), tanı anında ortalama yaş değeri 53'tür ve tanı anında olguların %63'ü 60 yaşından gençtir [99]. Kaplan ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınlanan, 771 TNMK olgusunu içeren serisinde, tanı anında ortalama yaş 53 olup olguların %79'u 25-64 yaş arasında, %13'ü 65-74 yaş arasında, %8'i ise 75 yaş ve üzerindedir [241]. 2017 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada 90 olgudan oluşan TNMK serisinin ortalama yaşı 53,67'dir [242]. Plasilova ve arkadaşlarının, 2016 yılında yayınlanan ve 38813 TNMK olgusunu içeren çalışmasında; TNMK olgularının %56'sı 60 yaşından, %29'u 50 yaşından, %9'u 40 yaşından gençtir. Königsberg ve ark., 254 TNMK olgusundan oluşan serilerinde, olguların yaş ortalamasını 54,1 bulmuştur ve olguların %75,6'sının 65 yaşından genç olduğunu rapor etmiştir [88]. Dent ve arkadaşlarının 180 TNMK olgusundan oluşan serilerinde tanı anında yaş ortalaması 53'tür [85]. Lin ve ark., 2569 TNMK olgusunun ortalama yaşını 52 bulmuştur [109]. Pan ve arkadaşlarının serisinde ise TNMK olgularının tanı

anındaki yaş ortalaması 51'dir [243]. Leon-ferre ve arkadaşlarının 605 TNMK olgusundan oluşan serisinde, olguların %67'si 50 yaşın üzerindedir [181]. Rubovszky ve ark., 295 TNMK olgusunun %48,3'ünü 55 yaşından genç, %51,7'sini 55 yaş ve üzerine bulmuştur [244]. O'Loughlin ve arkadaşlarının serisinde tanı anında yaş ortalaması 48'dir [60]. Pruneri ve ark., 897 triple negatif karsinom olgusundan oluşan serilerinde yaş ortalamasını 49 bulmuştur [245].

Çalışmamızda yer alan olguların yaşları 32 ile 84 arasında dağılım göstermekte olup yaş ortalaması 52,76'dır. Olgularımızın tanı anındaki yaş ortalaması 49,74'tür ve tanı anındaki yaşları 28 ile 81 arasında dağılım göstermektedir. Tanı anında, olgularımızın 11'i (%21,6) 40 yaş altında, 16'sı (%31,4) 40-49 yaş arasında, 13'ü (%25,5) 50-59 yaş arasında, 9'u (%17,6) 60-69 yaş arasında, kalan 2'si (%3,9) ise 70 yaş üzerindedir. Yaş ortalaması ve yaş gruplarının dağılımına bakıldığında; 51 TNMK olgusundan oluşan serimiz, literatürdeki diğer serilere göre daha genç bir popülasyondan oluşmakla birlikte, verilerimiz literatürle uyumludur. Ülkemizde meme kanseri tarama programına 40 yaşından itibaren tüm kadınlar dahil edilirken; Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tarama programları 50 yaş ve üzerindeki kadınları kapsamaktadır. Bu nedenle, ülkemizde meme kanseri olguları, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri kaynaklı literatüre kıyasla daha genç yaşta yakalanmaktadır.

Triple negatif meme karsinomlarında yaşın prognostik önemi incelendiğinde; Cheung ve ark., genç ve ileri yaşlı olguların genel ve nüksüz sağkalım sürelerini benzer bulmuştur [246]. Thike ve ark., genç yaşın kısa genel sağkalım ve kısa hastalısız sağkalım ile ilişkili olduğunu saptamıştır [247]. Kaliforniya çalışmasına göre genç yaş triple negatif meme karsinomlarında kötü prognostik bir faktördür [99]. Aapro ve ark., TNMK olgularında ileri hasta yaşının kötü prognozla ilişkili olduğunu savunmuş ve bu durumun ileri yaştaki olgulara yeterince adjuvan terapi verilmemesinden kaynaklanabileceğini belirtmiştir [248].

Çalışmamızda, yaş ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,02$). Hasta yaşı ilerledikçe eksitus oranı artmaktadır. Yaş gruplarına göre baktığımızda; 60 yaş altındaki olguların %10'unda, 60 yaş ve üzerindeki olguların %35'inde eksitus gelişmiştir.

Çalışmamızda, yaş ile nüks arasında anlamlı ilişki görülmüştür ($p=0,05$). Serimizde, hasta yaşı arttıkça nüks de artmaktadır. 60 yaş altındaki olguların %5,4'ünde, 60 yaş ve üzerindeki olguların ise %28,55'inde nüks saptanmıştır.

Çalışmamızda, yaş ile uzak metastaz arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,01$). Hasta yaşı arttığında uzak metastaz da artmaktadır. Altmış yaş altındaki olguların %5'inde, 60 yaş ve üzerindeki olguların ise %27,2'sinde uzak metastaz gelişmiştir.

Çalışmamızda, yaşa göre klinik evrelerde istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,03$). Bu farkın major nedeni 60 yaş altı olguların evre II yoğunlukta olmasıdır. 60 yaş altı olguların %22,5'i evre I, %70'i evre II, %7,5'i evre III'tür. 60 yaş üstü olguların ise %27'si evre I, %36'sı evre II, %36' evre III'tür. Yaşa göre klinik evre arasında anlamlı farklılık saptanmasına rağmen, pT evresi ve pN evresi ile yaş arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.

Çalışmamızda, yaş ile perinöral invazyon varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,03$; Rho: 0,03). Perinöral invazyon varlığı ileri yaş ile ilişkilidir. Çalışmamızda diğer klinik ve histolojik prognostik parametrelerle yaş arasında ilişki saptanmamıştır.

5.1.2. Klinik Evre

Triple negatif karsinomlar, agresif seyirli olup ileri evre ile ilişkilidir [99]. TNMK olguları, tüm evrelerde -klinik evre IA olduğunda bile- triple negatif dışı karsinoma göre yüksek nüks ve mortalite riski taşımaktadır [99, 249]. Stark ve ark'a göre, yüksek klinik evre ve yüksek histolojik dereceye sahip olguların triple negatif olma ihtimali, düşük klinik evre ve düşük histolojik dereceye sahip olgulardan 16 kat fazladır [250].

Kaliforniya çalışmasında, olguların %33'ü evre I, %49'u evre II, %11'i evre III, %4'ü ise evre IV'tür [99]. Lin ve arkadaşlarının çalışmasında, olguların %33'ü evre I, %50'i evre II, %18'i evre III'tür [109]. Kaplan ve arkadaşlarının 771 TNMK

olgusunu içeren çalışmada, TNMK olgularının %33,5'i evre I, %43,8'i evre II, %22'si evre III'tür [241]. Aynı çalışmada 65 yaş altı olguların %31'i evre I, %45'i evre II, %24'ü evre III olup 65 yaş üstü olguların %45'i evre I, %37'si evre II, %24'ü evre III'tür. Yine aynı çalışmada, pT ve pN evreleri ile yaş arasında anlamlı ilişki bulunmamakla birlikte; klinik evre ile yaş arasında ilişki saptanmıştır. Evre I olguların %31'i 65 yaş altında, %69'u 65 yaş üzerindedir. Kaplan ve ark.'a göre, ileri yaştaki hastaların düşük klinik evrede olma ihtimali, genç hastalara göre daha yüksektir.

Çalışmamızda olgularımızın %23,5'i evre I, %62,8'i evre II, %13,7'si ise evre III'tür. Literatürdeki geniş serilere kıyasla, çalışmamızda, olguların daha çok evre II'de yer aldığı görülmektedir. Çalışmamızda, yaşa göre klinik evrenin dağılımında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,03$). Buna göre, 60 yaş üstü olgular daha çok evre II ve III olup (%27 evre I; %36 evre II; %36 evre III) 60 yaş altı olgular daha çok evre I ve II'dir (%22,5 evre I; %70 evre II; %7,5 evre III). Evre I olguların %75'i 60 yaş altında; %25'i 60 yaş üzerindedir. Evre III olguların %43'ü 60 yaş altında; %57'si 60 yaş üzerindedir. Çalışmamıza göre genç hastaların düşük klinik evrede yakalanma ihtimali, yaşlı hastalara göre daha fazladır. Bu bulgu Kaplan ve ark.'ın serisi ile uyumsuzdur.

Çalışmamızda, klinik evre ile perinöral invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,01$). Klinik evre I'deki olgularda perinöral invazyon izlenmezken; klinik evre II'deki olguların %6'sında, klinik evre III'teki olguların ise %43'ünde perinöral invazyon vardır. Klinik evre ve yaş arasındaki ilişki önceki bölümde bildirilmiştir. Çalışmamızda diğer klinik ve histolojik prognostik parametrelerle klinik evre arasında ilişki saptanmamıştır.

5.1.3. Sağkalım, nüks ve metastaz

TNMK olgularında, prognoz kötü olup nüks ve mortalite riski triple negatif dışı meme karsinomlarına göre daha yüksektir. Kaliforniya çalışmasına göre; TNMK olgularında triple negatif dışı karsinomlara göre relatif 5 yıllık sağkalım beyaz

kadınlarda %36, Hispanik kadınlarda %37, Afroamerikan kadınlarda %14'tür [99]. Kaplan ve arkadaşlarının 771 TNMK olgusundan oluşan serisinde, olguların %16,3'ünde hastalığa bağlı eksitus geilmıştır [241]. Königsberg ve ark., 254 TNMK olgusunu içeren serilerinde; genç kadınlarda sağkalımı %75,5 bulurken, ileri yaşlı kadınlarda sağkalımı %70,9 bulmuştur [88]. Dent ve arkadaşlarının serisinde, 180 TNMK olgusunun %42,2'si eksitus ile sonuçlanmıştır [85].

Çalışmamızda beş yıllık sağkalım %75,6'dır. Olgularımızın %85,35'i sağ ve sağlıklı iken; %17,64'ünde eksitus gerçekleşmiştir. Olgularımızın sağkalım ve eksitus sonuçları Königsberg ve ark. ile Kaplan ve ark.'ın bulgularıyla benzerdir. Dent ve arkadaşlarının çalışması ile kıyaslandığında; serimizde eksitus daha azdır. Serimizin tanı anındaki yaş ortalamasının (49,7) Dent ve ark.'ın serisine (53) göre hafifçe düşük olması ve serimizde lenfosit-baskın karsinomların görece fazla oluşu bu farkı açıklayabilir. Öte yandan, Dent ve ark.'ın serisinde neoadjuvan terapi alan ve almayan TNMK olguları birlikte yer alırken, çalışmamıza yalnızca neoadjuvan terapi almayan olguların dahil edildiği akılda tutulmalıdır.

Königsberg ve ark., genç ve ileri yaşlı TNMK olgularının özelliklerini kıyasladıkları yayınlarında, meme kanserine bağlı eksitusu genç kadınların %24,5'inde, ileri yaşlı kadınların ise %27,4'ünde görmüştür [88]. Kaplan ve ark.'ın serisinde; genç kadınların %18'inde, ileri yaşlı kadınların %11'inde eksitus görülmüş olup beş yıllık sağkalımın ileri yaşla birlikte azaldığı bildirilmiştir [241]. Çalışmamızda, olgularımızı genç yaş (<60) ve ileri yaş (≥60) olarak ikiye ayırdığımızda; genç kadınların %15'inde ileri yaşlı kadınların ise %27,5'inde eksitus gelişmiştir. Çalışmamızda, ileri yaşlı olgularda eksitus daha yüksek olarak görülmektedir. Çalışmamızda, 60 yaş ve üzerindeki olgularda eksitus yüzdesi (%27,5), Königsberg ve arkadaşlarının bulgularıyla (%27,4) benzerken; Kaplan ve arkadaşlarının bulgularına göre (%11) yüksektir. Genç kadınların eksitus yüzdesi (%15) ise Königsberg ve arkadaşlarının bulgularına göre (%24,5) daha düşükken; Kaplan ve arkadaşlarının bulgularıyla (%18) benzerdir. Bu farklılıkların, çalışmalardaki farklı neoadjuvan terapi rejimleriyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

TNMK olgularında, mortalite riski tanı sonrası ilk 5 yılda; nüks ve metastaz riski tanı sonrası ilk 3 yılda en fazladır [85]. İlerleyen dönemlerde mortalite ve nüks

riskleri giderek azalmakta ve triple negatif dışı karsinomlar ile benzer düzeylere gelmektedir [114]. Königsberg ve ark., cerrahiden eksitusa kadar geçen sürenin ortanca değerini genç kadınlarda 47 ay, ileri yaşlı kadınlarda 25 ay olarak bulmuştur [88]. Dent ve arkadaşlarının çalışmasında cerrahiden eksitusa kadar geçen süre 4,2 yıldır [85].

Çalışmamızda eksitus ile sonuçlanan 9 olguda, cerrahiden eksitusa kadar geçen süre ortalama 31,6 aydır (Ortanca: 27,5 ay). Bir olgu post-operatif 1. yıl içinde, 3 olgu 2. yıl içinde, 2 olgu 3. yıl içinde, 1 olgu 4. yıl içinde ve kalan 2 olgu 5. yıl içinde eksitus olmuştur. Çalışmamızda olgularımızın 8'inde (%15,68) lokal nüks görülmüştür. Bu olgularda, nüks cerrahiden ortalama 21,2 ay (Ortanca: 17,8 ay) sonra gerçekleşmiştir. Olguların 2'sinde post-operatif 1. yılda, 5'inde post-operatif 2. yılda, 1'inde post-operatif 5. yılda nüks gelişmiştir. Çalışmamızda olgularımızın 5'inde (%9,80) uzak metastaz görülmüştür. Bu olgularda, metastaz cerrahiden ortalama 19,8 ay (Ortanca: 21,4 ay) sonra gerçekleşmiştir. Olguların tümünde metastaz post-operatif 2. yılda gelişmiştir.

Çalışmamızda, olgularımızın cerrahi sonrası eksitus ve nüks geliştirme süreleri literatürle uyumludur.

5.2. Histopatolojik Veriler

5.2.1. Patolojik evre

Patolojik tümör evresi, tümör boyutuna göre belirlenmektedir. Triple negatif karsinomlarda tümör boyutu ve pT evresi, triple negatif dışı meme karsinomlarına göre daha büyük olmaktadır. Kaliforniya çalışmasında, TNMK olgularında tümör boyutu ortanca değeri 2,2 cm olup triple negatif dışı olgulara (1,7 cm) göre yüksektir [99].

Dent ve ark., triple negatif olgularda tümör boyutunu 3 cm bulurken, triple negatif dışı olgularda tümör boyutunu 2,1 cm bulmuştur [85]. Aynı çalışmada,

TNMK olgularının %37'si pT1, %56'sı pT2, %8'i pT3'tür. Konisberg ve ark., tümör boyutunu, olguların %50'sinde ≤ 2 cm, %35'inde 2-5 cm, %10'unda >5 cm bulmuş olup tümör boyutu ile yaş arasında ilişki saptamamıştır [88]. Plasilova ve ark.'ın serisinde, TNMK olgularının %47'si pT1, %38'i pT2, %8'i pT3 ve %7'si pT4'tür [94]. Lin ve ark., triple negatif karsinomların %46'sını pT1, %40'ını pT2, %7'sini pT3 ve %6'sını pT4 evresinde bulmuştur [109]. Leon-Ferre ve arkadaşlarının 605 TNMK olgusundan oluşan serisinde, olguların %51'i pT1, %43,5'i pT2, %5'i pT3'tür [181].

Çalışmamızda, olguların %35,3'ü pT1, %54,9'u pT2, %7,8'i pT3 ve %2'si pT4'tür. Beş yıllık sağkalım pT1 evreli olgularda %94'ken, pT2 evreli olgularda %65'e düşmüştür. Beş yıllık sağkalım pT3 evreli olgularda %100 olmakla birlikte, bu durumun pT3 olgu sayısı azlığından kaynaklandığı düşünülmüştür. pT4 evresinde yer alan tek olgumuz 2. yılda eksitus olduğundan, beş yıllık sağkalım %0'dır.

Çalışmamızda, patolojik primer tümör evresine göre sağkalımda anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,03$). Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %5'inde eksitus gelişirken; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların %24'ünde eksitus gelişmiştir. Çalışmamızda, erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %11'inde; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların %18'inde nüks gelişmiştir. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,08$). Öte yandan, pT evresi ile uzak metastaz arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,02$). Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %11'inde; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların ise %9'unda uzak metastaz gelişmiştir.

Çalışmamızda, patolojik tümör evresi erken (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olan olguların hiçbirinde cerrahi sınırlarda tümör görülmezken; ileri evrede (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olan olguların %15'inde cerrahi sınırdaki tümör saptanmıştır ($p<0,01$). Bu durum, büyük boyutlu tümörlerde total tümör rezeksiyonunun küçük boyutlu tümörlere göre daha zor olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda, pT evresi ile perinöral invazyon arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,04$). Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olguların %5,5'inde; ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların ise %12'sinde perinöral invazyon görülmüştür.

Patolojik lenf nodu evresi, metastatik lenf nodu sayısına ve yerleşimine göre belirlenmektedir. Triple negatif karsinomlar lenf nodu tutulumu yapmadan uzak metastaz yapma eğilimindedir [1, 107, 108]. TNMK, aynı tümör boyutu ve histolojik derecedeki triple negatif dışı karsinomlarla karşılaştırıldığında; lenf nodu metastazı yapma ihtimali daha düşüktür [94, 109].

Konisberg ve arkadaşlarının serisinde, olguların %62,5'inde lenf nodu metastazı yokken; olguların %17'si pN1, %8'i pN2, %7'si pN3'tür ve pN ile yaş arasında ilişki saptanmamıştır [88]. Dent ve ark., TNMK olgularının %48'inde lenf nodu pozitifliği bildirmiştir [85]. Plasilova ve ark., triple negatif karsinomların %72'sini pN0, %20'sini pN1, %5'ini pN3, %3'ünü ise pN3 evresinde bulmuştur [94]. Lin ve arkadaşlarının çalışmasında, olguların %62'sinde lenf nodu pozitifliği saptanmazken, %38'inde pozitif lenf nodu görülmüştür [109]. Leon-ferre ve ark., triple negatif karsinomların %35,4'ünde lenf nodu metastazı saptamıştır [181].

Çalışmamızda yer alan 51 TNMK olgusunun %92,8'inde lenf nodu eksizyonu yapılmıştır. Olguların %52,9'u pN0, %29,4'ü pN1, %5,9'u pN2 ve %3,9'u pN3'tür. Çalışmamızda lenf nodu pozitifliği (%47,1); Dent ve arkadaşlarının bulgularıyla (%48) benzer olmakla birlikte, diğer çalışmalara (%28-%38) göre hafif yüksektir.

Çalışmamızda eksitus görülen 9 olgudan 2'si pN0, 4'ü pN1, 1'i pN2, 1'i pN3, ve kalan 1'i pNX'tir. Beş yıllık sağkalım pN0 evresi için %85, pN1 evresi için %66, pN2 evresi için %66'ydı. pN3 evreli 2 olgumuzdan biri post-operatif 2. yılında eksitus olmuştur. Diğer olgu ise henüz post-operatif 3. yılında olduğundan; pN3 evresi için beş yıllık sağkalım hesabı yapılmamıştır.

Çalışmamızda, lenf nodu evresi ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,04$; Rho: 0,3). Eksitus görülen olguların %75'inde lenf nodu metastazı varken (pN1/2/3), %25'inde lenf nodu metastazı yoktur (pN0). Lenf nodu metastazı olan olguların %30'u eksitus ile sonuçlanırken, %70'i hayattadır.

Çalışmamızda, lenf nodu evresi ile lenfatik invazyon arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,01$; Rho: 0,3). Lenfatik invazyon görülen olguların %60'ında metastatik lenf nodu varken (pN1/2/3), %40'ında metastatik lenf nodu yoktur (pN0).

Patolojik evreler ile yaş arasındaki ilişkiler önceki bölümlerde tartışılmıştır. Çalışmamızda diğer klinik ve histolojik prognostik parametrelerle patolojik evreler arasında ilişki saptanmamıştır.

5.2.2. Histolojik tümör tipi ve histolojik derece

Triple negatif karsinomların çoğunu invaziv karsinom, NST olguları oluşturmaktadır [111]. Bununla birlikte; lenfosit-baskın, metaplastik, apokrin, adenoid kistik karsinomlar gibi bazı özel meme karsinomu histolojik tiplerinin triple negatif olma olasılığı, diğer histolojik tiplere göre daha yüksektir [1].

Plasilova ve ark., inceledikleri 38813 meme kanseri olgusu içinde; adenoid kistik karsinomların %78'inde, metaplastik karsinomların %76'sında, medüller özellikler gösteren lenfosit-baskın karsinomların %60'ında, apokrin karsinomların %56'sında ve duktal karsinomların %15'inde triple negatif özellik saptamıştır [94]. Plasilova ve ark., 50 yaş altı TNMK olgularının %87,2'sini invaziv duktal karsinom, %1,8'ini metaplastik karsinom, %1,5'ini lenfosit-baskın karsinom olarak saptamıştır [94]. Aynı çalışmada, 50 yaş üstü TNMK olgularının %83,5'i invaziv duktal karsinom, %2,7'si metaplastik karsinom, %2,7'si mikst karsinom, %1,7'si lobüler karsinomdur.

Konisberg ve ark.'ın 254 TNMK olgusundan oluşan serisinde, olguların %90'ı invaziv karsinom, NST'dir. Kalan %10'luk grup ileri yaşlı hastalarda lobüler karsinom (%72) ve apokrin karsinomdan (%28) oluşmakta iken; genç hastalarda lobüler karsinom (%60), medüller özellikler gösteren lenfosit-baskın karsinom (%10), apokrin karsinom (%10), adenoid kistik karsinomdan (%10) oluşmaktadır [88].

Lin ve arkadaşlarının çalışmasında, triple negatif karsinomların %93'ünü duktal, %2'sini lobüler, %2'sini mikst, kalan %3'ünü diğer spesifik tipler (LBMK ve adenoid kistik gibi) oluşturmaktadır [109].

Pan ve ark., %90,4 olguyu duktal karsinom, %7,1 olguyu lobüler karsinom, %2,5 olguyu lenfosit-baskın karsinom olarak bildirmiştir [243]. Leon-ferre ve

arkadaşlarının 2017 yılında yayınlanan 605 triple negatif karsinomdan oluşan serilerinde, olguların %70'i invaziv karsinom, NST iken; %17'si medüller benzeri lenfosit-baskın karsinom, %7'si metaplastik karsinom, %6'sı apokrin karsinomdur [181].

Rubovszky ve ark., TNMK olgularını histolojik tümör tipine göre iki gruba ayırmıştır. Buna göre duktal, lobüler, papiller, apokrin ve metaplastik karsinomlar grup 1'de; medüller benzeri (LBMK), adenoid kistik, nöroendokrin karsinomlar grup 2'de yer almaktadır. Çalışmaya göre olguların %96'sı grup 1, %4'ü grup 2'dir [244].

Çalışmamızda yer alan 51 TNMK olgusunun %80,4'ü invaziv karsinom, NST; %9,8'i lenfosit-baskın karsinom; %9,8'i metaplastik karsinomdur. Çalışmamızda LBMK olguları literatüre göre daha fazladır. Bu durum hastalarımızın yaş ortalamasının literatürdeki diğer serilere göre daha genç olmasıyla ve çalışmamıza sadece neoadjuvan terapi almamış olguların dahil edilmiş olmasıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda tümör tipi ile sağkalım, nüks, metastaz ve diğer prognostik parametreler (yaş, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, pT evresi, pN evresi, lenf nodu metastazı, proliferasyon indeksi) arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Triple negatif karsinomlar, genellikle yüksek dereceli karsinomlardır. Histolojik derecesi 3 olan karsinomların, aynı evredeki derece 1-2 karsinomlara kıyasla, triple negatif olma ihtimali 31 kat daha fazladır [96]. Kaliforniya çalışmasında olguların %71'i derece 3, %15'i derece 2, %3'ü derece 1'dir [99]. Konisberg ve ark., TNMK olgularının %72'sini derece 3, %21'ini derece 2, %6'sını ise derece 1 bulmuştur [88]. Dent ve arkadaşlarının serisinde, triple negatif karsinomların %66'sı derece 3, %24'ü derece 2, %10'u derece 1'dir [110]. Plasilova ve ark., TNMK olgularının %80'ini derece 3, %18'ini derece 2, %2,4'ünü ise derece 1 olarak saptamıştır [94].

Çalışmamızda olguların tamamı derece 3'tür. Bu durum, serimizin invaziv karsinom, NST, lenfosit-baskın karsinom ve metaplastik karsinom gibi yüksek dereceli TNMK olgularından oluşmasıyla açıklanabilir. Serimizde adenoid kistik karsinom gibi genellikle düşük-orta dereceli olan TNMK olgularının bulunmadığı akılda tutulmalıdır. Olgularımızın tamamının histolojik derecesi aynı olduğundan;

histolojik derece ile prognostik ve/veya immünohistokimyasal değişkenler arasında ilişki değerlendirilememiştir.

5.2.3. Lenfatik / anjiyo / perinöral invazyon

Plasilova ve ark., triple negatif karsinomların %25'inde lenfovasküler invazyon izlemiş olup triple negatif karsinomların, HER2-pozitif karsinomlarla birlikte, en fazla lenfovasküler invazyon görülen karsinomlar olduğunu bildirmiştir [94]. Dent ve ark., TNMK olgularının %39,6'sında lenfovasküler invazyon saptamıştır [85]. Lin ve arkadaşlarının TNMK serisinde %26 olguda lenfovasküler invazyon görülmüştür [109]. Ugras ve ark., triple negatif karsinomların %32'sinde lenfovasküler invazyon saptamıştır [251]. Rubovszky ve ark., TNMK olgularının %48'inde vasküler invazyon, %15'inde perinöral invazyon izlemiştir [244]. Aynı çalışmada, vasküler invazyon kısa sağkalımla ve büyük tümör boyutuyla ilişkili bulunmakla birlikte; perinöral invazyon sağkalımla ilişkili bulunmamıştır.

Çalışmamızda olguların %45,1'inde lenfatik invazyon, %23,5'inde anjiyoinvazyon, %9,8'inde perinöral invazyon saptanmıştır. Beş yıllık sağkalım lenfatik invazyon görülen olgularda %67, görülmeyen olgularda %84'tür. Anjiyoinvazyon saptanan olgularda 5 yıllık sağkalım %51, anjiyoinvazyon görülmeyen olgularda %88'dir. Perinöral invazyon izlenen olgularda 5 yıllık sağkalım %50'yken, perinöral invazyon saptanmayan olgularda %78'dir.

Çalışmamızda, anjiyoinvazyon ile eksitus arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,01$; Rho: 0,3). Anjiyoinvazyon izlenen olguların %42'sinde eksitus gelişirken; anjiyoinvazyon görülmeyen olguların yalnızca %10'unda eksitus gelişmiştir. Anjiyoinvazyon ile nüks arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,05$; Rho: 0,26). Anjiyoinvazyon izlenen olguların %33'ünde lokal nüks gelişirken; anjiyoinvazyon görülmeyen olguların yalnızca %10'unda gelişmiştir. Çalışmamızda, anjiyoinvazyon izlenen olguların %16'sında, anjiyoinvazyon görülmeyen olguların ise %7'sinde

metastaz gelişmiştir; ancak, anjiyoinvazyon ile metastaz varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Perinöral invazyon ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,04$; Rho: 0,3). Buna göre, perinöral invazyon, sıklıkla anjiyoinvazyon görülen olgularda bulunmaktadır.

Çalışmamızda, perinöral invazyon görülen olguların %40'ında, perinöral invazyon görülmeyen olguların ise yalnızca %13'ünde nüks geliştiği dikkati çekmiştir. Ancak, perinöral invazyon ile nüks arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Perinöral invazyon ile metastaz arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,01$; Rho: 0,33). Perinöral invazyon saptanan olguların %40'ında; perinöral invazyon saptanmayan olguların ise yalnızca %6,5'inde metastaz gelişmiştir.

Lenfatik invazyon ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı ilişki görülmüştür ($p<0,01$; Rho: 0,5). Anjiyoinvazyonun, lenfatik invazyon görülen olgularda saptanma ihtimali daha yüksektir. Serimizde, toplam 12 olguda anjiyoinvazyon saptanmış olup bunların 11'i lenfatik invazyon görülen olgulardır. Yalnızca 1 olgumuzda lenfatik invazyon görülmeksizin anjiyoinvazyon gelişmiştir.

Çalışmamızda, anjiyoinvazyon ile proliferasyon indeksi, peritümöral lenfoid folikül varlığı, histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki yoktur ($p>0,05$). Lenfatik invazyon ile sağkalım, nüks, perinöral invazyon, proliferasyon indeksi arasında ilişki yoktur ($p>0,05$). Perinöral invazyon ile sağkalım, proliferasyon indeksi arasında ilişki yoktur ($p>0,05$). Lenfatik/anjiyo/perinöral invazyonların yaş, tümör tipi, tümör derecesi, patolojik ve klinik evre ile ilişkileri önceki bölümlerde tartışılmıştır.

5.2.4. Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL; peritümöral lenfositik yanıt)

Belirgin peritümöral lenfositik yanıt, genellikle medüller özellikler gösteren / lenfosit-baskın karsinomların bir bulgusu olarak bilinse de; başta invaziv karsinom, NST olmak üzere diğer histolojik tiplerde de belirgin peritümöral lenfositik yanıt görülebilmektedir. TİL çalışma grubu, Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda seçilecek uygun alandaki mononükleer inflamatuvar hücrelerin (lenfosit ve plazmasit) değerlendirilmesini önermektedir [9]. Günlük pratikte özel immünohistokimyasal belirteçlerin Hematoksilen-Eozin boyasına üstün olmadığını savunmaktadır. TİL Çalışma Grubu'na göre intratümöral TİL skorlamasının stromal TİL skorlamasına üstünlüğü yoktur. Bununla birlikte, Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda, özellikle tümör hücrelerinin küçük boyutlu olduğu olgularda, patoloğlar intratümöral TİL skorlamasında hata yapabilmektedir. Bu nedenle, TİL Çalışma Grubu günlük pratikte yalnızca stromal TİL skorlamasını önermektedir [9].

Meme karsinomlarında belirgin TİL varlığının uzun sağkalım ve neoadjuvan/adjuvan kemoterapiye iyi yanıtla ilişkili olduğu düşünülmektedir [120, 181, 185, 187-190]. TNMK olgularının önemli bir kısmı TİL'den zengindir ve bu olgularda yüksek TİL miktarı pozitif prognostik bir faktördür [9, 92, 181, 187-189]. Bir çalışmada, belirgin lenfositik yanıt TNMK'larının %30'unda saptanmış olup bu oran luminal ve HER2-pozitif karsinoma göre oldukça yüksektir [61].

Adams ve arkadaşlarının 2018 yılındaki TNMK serisinde, yüksek TİL içeriği uzun sağkalımla ilişkili bulunmuştur [15]. Rubovszky ve ark., Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda TNMK olgularının %18'inde stromal TİL saptamamakla birlikte, %55'inde hafif-orta derecede, %27'sinde belirgin TİL bulmuştur [244]. Aynı çalışmada, TİL ile sağkalım arasında ilişki bulunmamıştır.

O'Loughlin ve arkadaşlarının 2018 yılında yayınlanan ve neoadjuvan terapi almış triple negatif karsinom olgularının içeren çalışmalarında; Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda olguların %47'sinde negatif/hafif (%0-10), %42'sinde orta (%10-50), %12'sinde ise yüksek (\geq %50) stromal TİL saptanmıştır [60].

Denkert ve ark., 2018 yılındaki serilerinde; Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda TNMK olgularının %29'unda negatif/hafif (%0-10), %41'inde orta (%11-60), %30'unda ise şiddetli (\geq %60) stromal lenfositik yanıt görmüştür [61]. Denkert ve ark. ile O'Loughlin ve ark.'ın serilerinde, neoadjuvan terapiye tam yanıtın en sık görüldüğü grup yüksek TİL içeren triple negatif karsinomlar olmuştur [60, 61]. Ayrıca, Denkert ve ark., yüksek lenfositik yanıt görülen TNMK olgularında sağkalımı, düşük lenfosit yanıt görülenlere göre daha uzun bulmuştur [61].

Leon-ferre ve ark., Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda lenfositik yanıtı belirlerken intratümöral ve stromal alanları ayrı ayrı değerlendirmiştir [181]. Buna göre, neoadjuvan terapi almamış olgularda stromal TİL; olguların %35'inde negatif/hafif (%0-10), %45'inde orta (%11-40), %20'sinde ise belirgindir (\geq %40). Aynı çalışmada, terapi almamış olgularda intratümöral TİL, olguların %77'sinde negatif/hafif (%0-10), %17'sinde orta (%11-30), %2'sinde belirgindir (\geq %30). Leon-ferre ve ark., belirgin stromal ve intratümöral lenfositik yanıtı uzun sağkalımla ilişkili bulmuştur [181].

Loi ve ark., 2014 yılındaki çalışmalarında, Hematoksilen-Eozin boyasında saptanan yüksek TİL düzeyinin; yüksek histolojik derece, büyük tümör boyutu, lenf nodu metastazı, yüksek proliferasyon indeksi ve HER2-pozitifliği/triple negatif özellik ile ilişkisini saptamıştır [252]. Aynı çalışmada, yüksek TİL düzeyi yalnızca TNMK olgularında iyi prognostik etkili bulunmuştur.

Loi ve ark., 2019 yılında yayınlanan, dokuz farklı çalışmadaki 2148 olguyu içeren çalışmalarında ise; erken evre TNMK olgularında düşük TİL düzeyi ile ileri hasta yaşı, büyük tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve düşük histolojik dereceyi ilişkili bulmuştur [185]. Aynı çalışmada, yüksek TİL düzeyi iyi prognozla ve adjuvan kemoterapi sonrası uzun sağkalımla ilişkili bulunmuştur [185].

Pruneri ve ark., 897 TNMK olgusundan oluşan serilerinde, olguların %21,9'unda belirgin (\geq %50) stromal TİL saptamış ve TİL miktarı arttıkça sağkalımın diğer prognostik parametrelerden bağımsız şekilde uzadığını bulmuştur [245].

Çalışmamızda lenfositik yanıt değerlendirilirken, TİL Çalışma Grubu'nun önerileri doğrultusunda, Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda stromal TİL varlığına

bakılmıştır. Değerlendirme yapılırken, stromal TİL içeren (pozitif) olgular hafif/orta/belirgin olmak üzere derecelendirilmiştir. Olgularımızın %21,6'sında TİL görülmezken (negatif); %78,4'ünde farklı derecelerde stromal TİL izlenmiştir (pozitif). TİL miktarı, olgularımızın %27,5'inde hafif derecede, %27,5'inde orta derecede, %23,5'inde ise şiddetli derecededir. Bulgularımız, literatürle uyumludur.

Çalışmamızda, TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olgularımızın %24'ünde eksitus olurken; orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların %11,5'inde eksitus olmuştur. TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olguların %20'sinde, orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların ise %11,5'inde nüks gelişmiştir. Uzak metastaz varlığına bakıldığında; TİL görülmeyen ya da hafif şiddette görülen olguların %16'sında, orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların ise %3,8'inde metastaz gelişmiştir. Bu bulgular ışığında, orta/belirgin TİL görülen olgularda eksitus, nüks ve metastazın daha nadir geliştiği görülse de; bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çalışmamızda, yaşa göre lenfositik yanıt incelendiğinde; lenfositik yanıtın genç yaş ile ilişkili olduğu görülmüştür ($p=0,03$; $Rho: -0,3$). TİL görülmeyen (negatif) olguların yaş ortalaması 53'ken, herhangi bir şiddette TİL görülen (pozitif) olguların yaş ortalaması 48'dir ($p=0,05$). Bu bulgu, Loi ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumludur.

Çalışmamızda, histolojik tümör tipine göre TİL düzeyinde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$). Orta/bellirgin şiddette TİL görülen olguların %58'i LBMK iken; %38'i invaziv karsinom, NST ve %4'ü metaplastik karsinomdur. LBMK olgularında TİL'in diğer histolojik tiplere göre daha yüksek olması beklenen bir bulgudur.

Çalışmamızda TİL ile tümör ve lenf nodu evresi, lenfatik/anjio/perinöral invazyonlar peritümöral lenfoid folikül/histiyoitik agregat varlığı ve/veya proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda, intratümöral ve stromal CD8 ekspresyonları ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda izlenen lenfositik yanıt arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bu farkın ilk sebebi; Hematoksilen-Eozin boyasında belirgin lenfositik yanıt olarak değerlendirilen olguların büyük kısmının, immünohistokimya orta şiddette

bulunmasıdır. Bu durum, Hematoksilen-Eozin boyasında tüm lenfosit sub-grupları ve plazmasitler değerlendirilirken, CD8 ile yalnızca sitotoksik T lenfositlerin değerlendirilmesinden kaynaklanmaktadır. Farkın bir diğer sebebi ise, Hematoksilen-Eozin boyasında negatif olarak değerlendirilen olguların bir kısmında, immünohistokimyada hafif şiddette de olsa ekspresyon görülmesidir. Bu durum minimal/hafif lenfositik yanıtın Hematoksilen-Eozin boyasında neoplastik hücreler arasında gözden kaçabileceğini göstermektedir.

5.2.5. Lenfoid folikül ve histiyositik agregatlar

TİL çalışma grubu, meme karsinomlarına eşlik eden peritümöral lenfoid foliküllerin TİL skoruna dahil edilmeden raporda ek parametre olarak bildirilmesini önermektedir [9]. Olgularımızın %23,5'inde (n=12) peritümöral lenfoid folikül saptanmıştır. Lenfoid folikül içeren 12 olgunun 6'sında tek lenfoid folikül, 6'sında ise 2 veya daha fazla sayıda lenfoid folikül görülmüştür. Olgularımızın %13,7'sinde ise peritümöral histiyositik agregatlar saptanmıştır.

Peritümöral lenfoid folikül varlığı ve/veya peritümöral histiyositik agregat varlığı ile sağkalım, nüks, metastaz ve/veya proliferasyon indeksi arasında ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). Peritümöral lenfoid folikül ve peritümöral histiyositik agregat varlığının yaş, tümör tipi, tümör ve lenf nodu evresi, lenfatik/anjiyo/perinöral invazyonlar, lenfositik yanıt ile ilişkileri önceki bölümlerde tartışılmıştır. Literatürde meme karsinomlarında peritümöral lenfoid folikül ve/veya histiyositik agregatları inceleyen çalışma görülmemiştir.

5.2.6. Proliferasyon indeksi

Ki67 proliferasyon indeksi TNMK olgularında triple negatif dışı karsinomlara göre daha yüksek bulunmaktadır [6, 84, 149]. Yüksek proliferasyon indeksi izlenen

olgularda genel ve hastaliksız sağkalım daha düşüktür [151, 152]. Pan ve ark., triple negatif karsinomlarda Ki67 ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında; olguların %83'ünde yüksek proliferasyon ($Ki67 \geq 14$), %17'sinde düşük proliferasyon ($Ki67 < 14$) saptamıştır [243]. Aynı çalışmada, yüksek Ki67 proliferasyon indeksi genç yaş ve yüksek histolojik derece ile ilişkili bulunmuştur. Leon-ferre ve ark., TNMK olgularının %24,5'inde proliferasyon indeksini düşük ($Ki67 \leq 15$), %74,5'inde proliferasyon indeksini yüksek ($Ki67 > 15$) bulmuştur [181].

Çalışmamızda, olguların ortalama Ki67 proliferasyon indeksi %54,6'dır. Sınır değeri %20 alınarak proliferasyon indeksi iki gruba ayrıldığında; olguların %96,1'i yüksek proliferasyon, %3,9'u düşük proliferasyon göstermektedir. Düşük proliferasyon gösteren iki olgunun da Ki67 değeri %15'dir ve sınır değerinin %14 olarak belirlenmesi halinde, iki olgu da yüksek proliferasyon grubuna geçecektir. Çalışmamızda proliferasyon indeksinin diğer serilere göre yüksek olması LBMK olgularının görece daha fazla olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda, eksitus görülen olgularda Ki67 değerleri sağ kalan olgulara göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktür ($p < 0,01$). Bu durumun, proliferasyon indeksi yüksek olan olguların adjuvan kemoterapiye daha iyi yanıt vermesiyle ilgili olabileceği düşünülmüştür. Benzer ilişki uzak metastaz görülen ve görülmeyen olguların Ki67 değerleri arasında da mevcuttur ($p < 0,01$). Aksine, nüks görülen olguların Ki67 değerleri nüks görülmeyen olgulara kıyasla hafifçe daha yüksek saptanmıştır ($p < 0,01$).

Proliferasyon indeksinin yaş, tümör tipi, tümör ve lenf nodu evresi, lenfatik/anjiyo/perinöral invazyonlar, TİL, lenfoid folikül/histiyoitik agregat varlığı ile ilişkileri önceki bölümlerde verilmiştir.

5.3. İmmünohistokimyasal Veriler

5.3.1. CD8

TNMK olgularında, tümör mikroçevresinde izlenen TİL miktarı ve içerdiği hücre tipi prognozda oldukça önemlidir [9, 10]. Tümör mikroçevresinde yer alan sitotoksik T lenfositlerin iyi prognoz, uzun sağkalım ve tedaviye iyi yanıt ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [182, 184, 196, 197].

Matsumoto ve ark., 2016 yılındaki, TNMK olgularında CD4 ve CD8 ile pozitif TİL düzeylerini inceledikleri çalışmalarında; stromal ve/veya intratümöral yerleşimli CD8-pozitif TİL düzeyinin bağımsız pozitif prognostik faktör olduğunu savunmuştur [202].

Baker ve ark., ER ekspresyonu ve histolojik derecenin sitotoksik TİL miktarı ile ilişkisini inceledikleri çalışmada; hem intratümöral hem de stromal sitotoksik TİL miktarını ER-negatif yüksek dereceli tümörlerde en yüksek bulmuştur [199]. Aynı çalışmada, yüksek stromal ve intratümöral sitotoksik TİL düzeyleri ER-negatif karsinomlarda bağımsız iyi prognostik bir faktör olarak bulunmakla birlikte; ER-pozitif karsinomlarda yüksek intratümöral sitotoksik TİL düzeyi kötü prognostik, yüksek stromal TİL düzeyi ise prognoza etkisiz bulunmuştur.

Mahmoud ve ark., moleküler alttıpleri ayırmaksızın toplam 1334 meme karsinomunda CD8-pozitif TİL düzeyini incelemiş ve yüksek sitotoksik TİL düzeyini genç yaş, yüksek histolojik derece, ER/PR-negatifliği ve uzun sağkalımla ilişkili bulmuştur [196].

Liu ve arkadaşlarının 2011 yılındaki serisinde, intratümöral sitotoksik TİL ortanca değeri %15'ken stromal sitotoksik TİL ortanca değeri %77'dir [183]. Yüksek total sitotoksik TİL düzeyi, yüksek histolojik derece ve ER/PR-negatifliği ile ilişkili bulunmuştur. Öte yandan, sitotoksik TİL düzeyleri ile hasta yaşı, tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve sağkalım arasında ilişki görülmemiştir.

Liu ve ark., 2012 yılındaki çalışmalarında; yüksek intratümöral sitotoksik TİL düzeyini genç yaş, yüksek histolojik derece, medüller histoloji ve bazal moleküler subgrup ile ilişkili bulmuştur [201]. Aynı çalışmaya göre, yüksek intratümöral sitotoksik TİL düzeyi genç yaş ve ER-negatif olgularda uzun sağkalım; ileri yaş ve ER-pozitif olgularda kısa sağkalım ile ilişkilidir. Tümör histolojik derecesi ile intratümöral sitotoksik TİL arasında ilişki saptanmamıştır. Yüksek stromal sitotoksik TİL düzeyi de genç yaş, büyük tümör boyutu, yüksek histolojik derece, medüller histoloji ve bazal moleküler subgrup ile ilişkili olup sağkalıma etkisi intratümöral TİL ile benzerdir [201].

Ali ve ark., intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonu izlenen ER-negatif karsinomlarda 5 yıllık sağkalımı (%77), intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonu izlenmeyenlerdeki 5 yıllık sağkalıma (%66) göre uzun bulmuştur [198].

Chen ve ark., değerlendirdikleri 50 TNMK olgusunda yüksek sitotoksik TİL düzeyini uzun sağkalım ve küçük tümör boyutu ile ilişkili bulurken; hasta yaşı, histolojik derece, lenf nodu tutulumu ve proliferasyon indeksi ile ilişki saptamamıştır [200].

Mao ve ark., 2016 yılındaki meta-analiz çalışmasında, stromal ve/veya intratümöral sitotoksik TİL varlığını triple negatif karsinomlarda uzun sağkalımla ilişkili bulmuştur [190]. Aynı çalışmada, ER-pozitif karsinomlarda ise sitotoksik TİL ile sağkalım arasındaki ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda, intratümöral CD8 immüekspresyonu ortalaması %13,8 ve ortanca değeri %5'tir. Olgularımız intratümöral sitotoksik TİL miktarına göre 4 gruba ayrıldığında; %2'si negatif, %52,9'u düşük, %39,2'si orta ve %5,9'u yüksek ekspresyon grubunda yer almaktadır. Çalışmamızda, stromal CD8 ekspresyonu ortalaması %33,2 ve ortanca değeri %30'dur. Olgularımız stromal sitotoksik TİL miktarına göre 4 gruba ayrıldığında; %9,8'i düşük, %62,7'si orta, %27,5'i yüksek ekspresyon grubunda yer almaktadır. Çalışmamızda, stromal CD8 ekspresyonu görülmeyen olgu yoktur. Çalışmamızda, literatür ile uyumlu şekilde, stromal sitotoksik TİL düzeyi (ortalama: 33,2), intratümöral sitotoksik TİL düzeyinden (ortalama: 13,8) yüksektir ($p<0,01$).

Çalışmamızda, intratümöral CD8 ekspresyon gruplarında 5 yıllık sağkalıma baktığımızda, yüksek ekspresyon grubunda %100, orta ekspresyon grubunda %74, düşük ekspresyon grubunda %75 iken; negatif grupta 5 yıl sonunda sağ olan hasta yoktur.

Çalışmamızda, Kaplan-Meier grafiklerine göre, yüksek intratümöral CD8 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görülmekle birlikte; bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. İntratümöral CD8 ekspresyonu ile nüks arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

İnatümöral CD8 ekspresyonlarına göre uzak metastaz varlığı incelendiğinde; istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p=0,05$). Literatürle uyumlu olarak, metastaz görülen olgularda intratümöral-sitotoksik-TİL miktarı, metastaz görülmeyen olgulara göre daha düşüktür.

Çalışmamızda, stromal CD8 ekspresyon grupları için 5 yıllık sağkalım; yüksek ekspresyon grubunda %70, orta ekspresyon grubunda %81, düşük ekspresyon grubunda %53'tür.

Çalışmamızda, Kaplan-Meier grafiklerine göre, yüksek stromal CD8 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görülmüştür; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p=0,2$).

Stromal CD8 ekspresyonuna göre nüks görülen ve görülmeyen olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,01$). Literatürle uyumlu olarak, nüks görülen olgularda stromal-sitotoksik-TİL yüzdesi, nüks görülmeyen olgulara göre daha düşüktür.

Çalışmamızda, metastaz görülen ve görülmeyen olguların stromal CD8 ekspresyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,01$). Literatürle uyumlu olarak, stromal-sitotoksik-TİL miktarı; metastatik olgularda, metastaz görülmeyen olgulara göre daha düşüktür.

Çalışmamızda, intratümöral CD8 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda değerlendirilen lenfositik yanıt arasında anlamlı fark saptanmış olup bu farkın sebepleri bölüm 5.2.4'te tartışılmıştır. Öte yandan, intratümöral CD8 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda değerlendirilen lenfositik yanıt

arasında; istatistiksel anlamlı ve kuvvetli pozitif korelasyon saptanmıştır ($p<0,01$; Rho: 0,51). Stromal sitotoksik TİL ile Hematoksilen-Eozin boyasında karar verilen TİL arasında ise fark olmayıp; istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($p<0,01$; Rho: 0,36).

Çalışmamızda, intratümöral ve stromal CD8 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,01$; Rho: 0,56). İntratümöral sitotoksik TİL yüksek olduğunda; stromal sitotoksik TİL de yüksek görülmektedir.

Çalışmamızda, intratümöral sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyonları arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,61 ve 0,40). Benzer şekilde; stromal sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,39 ve 0,45). İntratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları da artmaktadır. Benzer şekilde; çalışmamızda, intratümöral sitotoksik-TİL ile neoplastik hücrelerdeki ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arasında da anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,49 ve 0,62). Benzer şekilde; stromal sitotoksik-TİL ile neoplastik hücrelerdeki ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,36 ve 0,52). İntratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları arttığında, neoplastik hücrelerdeki ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları da artmaktadır. Ayrıca; çalışmamızda, intratümöral sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,54 ve 0,42). Benzer şekilde; stromal sitotoksik-TİL ile intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,38 ve 0,44). İntratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktadır. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, immünohistokimyasal belirteçler arasında ko-ekspresyon varlığı dikkati çekmiştir.

Tümör tiplerine göre intratümöral CD8 ekspresyonuna bakıldığında; istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,04$). Literatürle uyumlu olarak, LBMK olgularında intratümöral sitotoksik TİL miktarı; invaziv karsinom, NST ve metaplastik karsinom olgularına göre daha yüksek olup bu beklenen bir bulgudur.

Çalışmamızda, stromal CD8 ekspresyonu ile histolojik tipi arasında ise anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$).

Çalışmamızda, intratümöral sitotoksik TİL düzeyinin, pT evresine göre dağılımında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,04$). İntratümöral CD8 ekspresyonu yüksek olan olgularda pT evresi (tümör boyutu) daha küçüktür. Erken evredeki (pT1; tümör boyutu ≤ 2 cm) olgularda intratümöral CD8 ekspresyonu (ortalama: %14), ileri evredeki (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) olguların intratümöral CD8 ekspresyonuna göre (ortalama: %13) yüksektir. Literatürde, yüksek sitotoksik TİL düzeyi Liu ve ark.'ın çalışmasında büyük tümör boyutu ile, Chen ve ark.'ın çalışmasında ise küçük tümör boyutu ile ilişkili bulunmuştur. Çalışmamızda CD8 ekspresyonu yüksek olan olgularda pT evresi (tümör boyutu) daha küçük olduğundan; bu bulgu Chen ve ark.'ın bulguları ile benzerdir. Çalışmamızda stromal CD8 ekspresyonu ile pT evresi arasında ise ilişki yoktur ($p>0,05$).

İnatümöral ve stromal sitotoksik TİL ile lenfatik invazyon arasında anlamlı negatif ilişki görülmüştür (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p=0,02$). İntratümöral ve/veya stromal sitotoksik TİL düzeyi yüksek olan olgularda, lenfatik invazyon daha nadir görülmektedir. Lenfatik invazyon görülmeyen olguların intratümöral CD8 ekspresyonu, lenfatik invazyon görülen olgulara göre daha yüksek saptanmıştır. Benzer şekilde, lenfatik invazyon görülmeyen olguların stromal CD8 ekspresyonu (ortanca: %40), lenfatik invazyon görülen olgulara (ortanca: %25) göre daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda, stromal CD8 ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında negatif bir ilişki görülmüştür. Stromal CD8 ekspresyonu düşük olan olgularda perinöral invazyon sıklıkla, stromal CD8 ekspresyonu yüksek olan olgularda perinöral invazyon nadirdir. Fakat, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,06$). İntratümöral CD8 ekspresyonu ile perinöral invazyon arasında bir ilişki saptanmamıştır.

İnatümöral sitotoksik TİL ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,04$). İntratümöral sitotoksik TİL düzeyi arttıkça lenfoid folikül saptanma ihtimali artmaktadır. Belirgin (≥ 50) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %66'sında, orta derecede (%10-49) intratümöral

sitotoksik TİL görülen olguların %30'unda, hafif derecede (%1-9) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %15'inde peritümöral lenfoid folikül izlenmiştir. İntratümöral sitotoksik TİL izlenmeyen (negatif) olguda peritümöral lenfoid folikül yoktur. Stromal sitotoksik TİL ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında ise ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

İntratümöral sitotoksik TİL ile peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,04$). İntratümöral sitotoksik TİL düzeyi arttıkça peritümöral histiyositik agregat bulunma ihtimali artmaktadır. İntratümöral sitotoksik TİL izlenmeyen (negatif) olguda peritümöral histiyositik agregat yoktur. Hafif derecede (%1-9) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %3,7'sinde histiyositik agregat izlenirken; orta derecede (%10-49) intratümöral sitotoksik TİL görülen olguların %30'unda histiyositik agregat izlenmiştir. Belirgin ($\geq\%50$) intratümöral sitotoksik TİL görülen üç olguda histiyositik agregat izlenmemekle birlikte; bu durumun bu gruptaki olgu sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Stromal sitotoksik TİL ile peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında da anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,04$). Belirgin ($\geq\%50$) stromal sitotoksik TİL görülen olguların %21,4'ünde, orta derecede (%10-49) stromal sitotoksik TİL görülen olguların %12,5'inde peritümöral histiyositik agregat izlenmiştir. Hafif derecede (%1-9) stromal sitotoksik TİL görülen olgularda ise histiyositik agregat saptanmamıştır.

Çalışmamızda intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonu ile aksiller lenf nodu tutulumu, Ki67 proliferasyon indeksi, anjiyovazyon varlığı arasında bir ilişki bulunmamıştır.

5.3.2. FOXP3

Anti-inflamatuar ve pro-tümörogenik etkinlik gösterdiği düşünülen özel bir yardımcı T lenfosit alt grubu olan regülatuar lenfositler, spesifik olarak FOXP3

immünohistokimyası ile gösterilebilmektedir. Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 ekspresyonunun prognoza etkileri konusunda literatürde farklı bulgular vardır. Yüksek FOXP3-pozitif TİL miktarı, literatürdeki çoğu çalışmada kötü prognostik bir faktör olarak bulunurken; bazı çalışmalarda uzun sağkalım ve iyi prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bazı çalışmalarda ise FOXP3-pozitif TİL miktarı prognoz ile ilişkisiz bulunmuştur.

Bates ve ark., tümör mikroçevresinde artmış regülatuar T lenfosit düzeyini, ER ekspresyonunda bağımsız olarak, kısa sağkalım ile ilişkili bulmuştur [208]. Ek olarak, ER-negatif karsinomlarda artmış regülatuar T lenfosit düzeyi, yüksek histolojik derece ile ilişkili bulunmuştur.

Mahmoud ve ark., TİL'de FOXP3 ekspresyonunu genç yaş, yüksek histolojik derece, büyük tümör boyutu, hormon reseptör negatifliği, HER2-pozitifliği ve moleküler bazal subgrup ile ilişkili bulmuştur [213]. Aynı çalışmada, tek değişkenli analizlerde regülatuar T lenfositlerin kötü prognostik etkisi saptanmakla birlikte; çok değişkenli analizlerde prognoza etkisi bulunmamıştır.

Ladoire ve ark., 2008 yılındaki çalışmalarında; meme karsinomu olgularında, neoadjuvan terapi öncesi ve sonrası FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarını incelemiştir [214]. Neoadjuvan terapi öncesinde, regülatuar ve sitotoksik lenfositlerden zengin TİL; yüksek histolojik derece, lenf nodu metastazı, ER/PR-negatifliği ile ilişkili bulunmuştur. Neoadjuvan terapi sonrasında, terapiye iyi yanıt veren olgularda CD8-pozitif TİL düzeyleri sabit kalırken; FOXP3-pozitif TİL düzeylerinin düştüğü görülmüştür. Terapiye yanıtı kötü olan olgularda ise CD8 ve FOXP3 düzeyleri yüksek ve sabit kalmaktadır.

Miyashita ve ark., 2015 yılındaki çalışmalarında, TNMK olgularında neoadjuvan terapi sonrası FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarını incelemiştir [215]. Bu çalışmada, yüksek sitotoksik TİL düzeyi ve yüksek CD8/FOXP3 oranı ile uzun sağkalım arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

Lee ve ark., 86 TNMK olgusununda oluşan serilerinde; yüksek FOXP3-pozitif TİL düzeyini yüksek histolojik derece, lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve uzun genel sağkalımla ilişkili bulmuştur [212].

Ali ve ark., hem triple negatif hem de triple negatif dışı karsinomları kapsayan çalışmalarında, tümörü infiltrate eden lenfositlerde FOXP3 ekspresyonunu incelemiş olup prognozla ilişkisiz bulmuştur [198].

Liu ve ark., 2011 yılındaki yayınlarında, ortalama stromal regülatuar-TİL sayısını, intratümöral regülatuar TİL sayısından yüksek bulmuştur [183]. Aynı çalışmaya göre, intratümöral ve stromal alanlarda yüksek FOXP3 ekspresyonu; yüksek histolojik derece, ER/PR-negatifliği, HER2-pozitifliği ile ilişkilidir. Liu ve ark., hasta yaşı, tümör boyutu ve lenf nodu durumu ile FOXP3 ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır. Aynı çalışmada, meme karsinomu alt-gruplarına bakıldığında; regülatuar-T hücre miktarı triple negatif ve HER2-pozitif karsinomlarda, luminal karsinoma göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada, yüksek FOXP3 ekspresyonu görülen olgularda sağkalımın daha kısa olduğu ve bu ilişkinin diğer prognostik parametrelerden bağımsız olduğu saptanmıştır [183].

Liu ve ark., 2014 yılındaki çalışmalarında, yüksek FOXP3-pozitif TİL düzeyini; genç yaş, yüksek histolojik derece, yüksek CD8 ekspresyonu, ER-negatifliği ile ilişkili bulmuştur [197]. Çalışmaya göre, FOXP3 ekspresyonu ER-pozitif ve düşük sitotoksik TİL içeren olgularda kısa sağkalımla; ER-pozitif/HER2-pozitif ve yüksek sitotoksik TİL içeren olgularda uzun sağkalımla ilişkilidir. Ancak, çalışmada olgular triple negatif özelliğe göre gruplanmadığından; TNMK olgularında FOXP3 ekspresyonu hakkında bilgi yoktur.

Ladoire ve ark., 2011 yılındaki çalışmalarında; FOXP3 ekspresyonunun yalnızca regülatuar T lenfositlerde değil, aynı zamanda tümör hücrelerinde de görüldüğünü ve tümör hücrelerindeki FOXP3 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olduğunu saptamıştır [211].

Takenaka ve ark., FOXP3 ekspresyonunu hem tümör hücreleri (sitoplazmik ve/veya nükleer ekspresyon) hem de lenfoid hücreler için değerlendirmiştir [253]. Çalışmaya göre, lenfoid hücrelerde FOXP3 ekspresyonu varlığı, tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu yokluğu ile ilişkilidir. Lenfoid hücrelerde FOXP3 ekspresyonunu; yüksek histolojik derece, ER-negatifliği, HER2-pozitifliği, triple negatiflik, kısa sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmaya göre, tümör hücrelerindeki sitoplazmik FOXP3 ekspresyonu büyük tümör boyutu, metastatik lenf

nodu varlığı, kısa sağkalım ile ilişkiliyken; tümör hücrelerindeki nükleer FOXP3 ekspresyonu ER-pozitifliği, borderline/uzun sağkalım ile ilişkilidir [253].

Merlo ve ark., meme karsinomlarında FOXP3 ekspresyonunu yalnızca tümör hücrelerinde değerlendirdikleri çalışmalarında; yüksek ekspresyon düzeyini lenf nodu metastazı, yüksek proliferasyon indeksi ve kısa sağkalım ile ilişkili bulmuştur [209]. Ancak, bu çalışmada olgular triple negatif özelliğe göre gruplanmadığından; TNMK olgularında tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu hakkında bilgi yoktur.

Mao ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınlanan meta analizinde; TİL'de FOXP3 ekspresyonu, ER-negatif karsinomlar için iyi bir prognostik faktör olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, triple negatif karsinomlarda FOXP3 düzeyini inceleyen az sayıda çalışma olduğundan, bu bulguya dikkatli yaklaşılması gerektiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, intratümöral alanda görülen FOXP3 ekspresyonu ER-pozitif karsinomlarda kısa sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. [190]

Çalışmamızda, intratümöral alanda FOXP3 immünekspresyon ortalaması %2,1'dir (Ortanca: %1; SS: 2,6; minimum: %0; maksimum: %10). Stromal FOXP3 ekspresyonu ortalama %3,7'dir (Ortanca: %2; SS: 3,5; minimum: %0; maksimum: %10). Çalışmamızda tümör hücrelerinde sitoplazmik ve/veya nükleer FOXP3 ekspresyonu görülmemiştir

Çalışmamızda, intratümöral FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olgularda 5 yıllık sağkalım %67'yken, ekspresyon görülen olgularda %81'dir. Yüksek intratümöral FOXP3 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur ($p=0,04$). Hayatta olan olguların intratümöral FOXP3 ekspresyonu; eksitus gelişen olgulara göre daha yüksektir. Lokal nüks ve uzak metastaz ile intratümöral FOXP3 ekspresyonu arasında da anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,01$). Nüks ve/veya metastaz görülmeyen olgularda intratümöral FOXP3 ekspresyonu; görülen olgulara göre daha yüksektir.

Çalışmamızda, stromal FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olgularda 5 yıllık sağkalım %72; ekspresyon görülen olgularda ise %76'dır. Yüksek stromal FOXP3 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görülmüştür ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,05$). Hayatta olan olguların stromal FOXP3 ekspresyonu; eksitus gelişen olgulara göre daha yüksektir. Nüks görülen ve görülmeyen olguların

stromal FOXP3 ekspresyonlarında da istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,01$). Ancak, bu fark doğrusal (lineer) olmadığından, stromal regülatuar-TİL miktarı ile nüks varlığı arasındaki ilişkinin yönü hakkında yorum yapılamamaktadır. Metastaz görülen ve görülmeyen olguların stromal FOXP3 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Metastaz görülmeyen olgularda stromal FOXP3 ekspresyonu, metastatik olgulara göre daha yüksekti.

Literatürde çoğu çalışmada yüksek FOXP3 düzeyi kısa sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Çalışmamızda, literatürün genelinden farklı olarak; yüksek FOXP3 düzeyi uzun genel ve metastazsız sağkalımla ilişkilidir. Bulgularımız Lee ve ark.'ın bulguları ile uyumludur.

Çalışmamızda, intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda değerlendirilen lenfositik yanıt arasında; istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif korelasyon saptanmıştır ($p=0,01$; Rho: 0,33). Stromal FOXP3 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyasında karar verilen TİL arasında ise anlamlı ilişki görülmemiştir.

Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, immünohistokimyasal belirteçler arasında ko-ekspresyon varlığı dikkati çekmiştir. Buna göre; intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal sitotoksik-TİL arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,61 ve 0,40). Benzer şekilde; stromal FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal CD8 ekspresyonları arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,39 ve 0,45). İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları da artmaktadır. Çalışmamızda intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile neoplastik hücrelerde ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,54 ve 0,58). Benzer şekilde; stromal FOXP3 ekspresyonu ile neoplastik hücrelerde ve TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,47 ve 0,44). Buna göre, intratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları arttığında, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları da artmaktadır. Çalışmamızda, intratümöral FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal M2 makrofajlar arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,43 ve 0,50). Benzer şekilde; stromal FOXP3 ekspresyonu ile intratümöral ve stromal M2 makrofajlar

arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,26 ve 0,36). İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktadır; ancak FOXP3 ile CD163 arasındaki ilişki gücü (r değeri) diğer belirteçlere göre daha zayıftır.

İnatümöral FOXP3 ekspresyonu ile yaş arasında negatif bir ilişki görülmüştür. Hasta yaşı arttıkça intratümöral FOXP3 ekspresyonu azalmaktadır. Bu bulgu, Liu ve ark. ile Mahmoud ve ark.'ın bulguları ile uyumludur. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,06$; Rho: -0,25). Bu durumun olgu sayımızın azlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Daha geniş bir popülasyonda tekrar edildiğinde istatistiksel anlamlı sonuç elde edilebileceği düşünülmektedir. Yaş ile stromal FOXP3 ekspresyonu arasında ise ilişki görülmemiştir.

Tümör tipine göre hem intratümöral hem de stromal FOXP3 ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı fark mevcuttur (sırayla, $p=0,01$ ve $p=0,02$). LBMK olgularında intratümöral ve stromal FOXP3-pozitif TİL sayısı; invaziv karsinom, NST ve metaplastik karsinom olgularına göre daha yüksek olup bu beklenen bir bulgudur.

İnatümöral ve stromal regülatuar-TİL ile anjiyoinvazyon arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (sırasıyla, $p=0,01$ ve $p=0,02$). İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olgularda anjiyoinvazyon daha sıkken; FOXP3 ekspresyonu görülen olgularda anjiyoinvazyon daha nadirdir.

İnatümöral ve stromal FOXP3-pozitif TİL düzeyi ile lenfatik invazyon arasında istatistiksel anlamlı ilişki vardır (her ikisi için $p<0,01$). İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonu pozitif olan olgularda lenfatik invazyon daha nadirken; FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olgularda lenfatik invazyon sıklıdır. Bu bulgu Lee ve ark.'ın çalışmasından farklıdır; Lee ve ark., yüksek regülatuar-TİL düzeyi olan olgularda anjiyoinvazyonu daha sık bulmuştur.

İnatümöral ve stromal regülatuar-TİL ile peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında ilişki saptanmıştır (sırasıyla, $p=0,01$ ve $p=0,02$). İntratümöral regülatuar-TİL görülen olguların %21'inde, stromal regülatuar-TİL görülen olguların %17'sinde histiyositik agregat varken; FOXP3 ekspresyonu görülmeyen olguların hiçbirinde histiyositik agregat yoktur.

İntratümöral FOXP3 ekspresyonu saptanan olgularda, Ki67 proliferasyon indeksi daha yüksek bulunmuştur ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,03$; Rho: 0,30). Stromal FOXP3 ekspresyonu ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında ise anlamlı ilişki görülmemiştir ($p>0,05$).

İntratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonu ile pT evresi, pN evresi, perinöral invazyon, lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

5.3.3. CD8/FOXP3 oranı

Liu ve arkadaşlarının 2011 yılındaki serisinde, CD8/FOXP3 oranı stromal alanda (ortanca: 1,87) intratümöral alana göre (ortanca: 1,44) daha yüksek bulunmuştur [183]. Aynı çalışmaya göre, luminal karsinomlarda CD8/FOXP3 oranı; triple negatif ve HER2-pozitif karsinomlardan daha yüksektir. Mao ve ark., 2016 yılındaki çalışmalarında CD8/FOXP3 oranını sağkalım ve prognozla ilişkili bulmamıştır [190].

Çalışmamızda, intratümöral CD8/FOXP3 oranı ortalama 6,6'dır (Ortanca: 5; 75.persentil: 7; SS: 7,3; minimum: 1; maksimum: 40). Stromal CD8/FOXP3 oranı ortalaması 14,7'dir (Ortanca: 9; 75.persentil: 20; SS: 13,4; minimum: 2; maksimum: 60). Literatürle uyumlu olarak, stromal alanda CD8/FOXP3 oranı, intratümöral alana göre daha yüksektir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,01$).

Çalışmamızda, sağkalıma göre intratümöral CD8/FOXP3 oranında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,01$). Eksitus olan olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı, hayatta olan olgulardan daha yüksektir. Öte yandan; nüks ve/veya uzak metastaz görülen olgularda intratümöral CD8/FOXP3 oranı, görülmeyen olgulara göre daha düşüktür ($p<0,01$).

Çalışmamızda; eksitus, nüks, ve/veya metastaz görülen olguların stromal CD8/FOXP3 oranı, sağ ve sağlıklı olan olgulardan daha yüksektir. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0,01$).

Çalışmamızda, intratümöral CD8/FOXP3 oranı ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda değerlendirilen TİL düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p=0,01$; Rho: 0,32). Stromal CD8/FOXP3 oranı ile Hematoksilen-Eozin boyalı lamlarda değerlendirilen TİL düzeyi arasında ise ilişki bulunmamıştır.

Çalışmamıza göre, düşük intratümöral CD8/FOXP3 oranı; lenfatik invazyon, anjiyoinvazyon ve/veya perinöral invazyon varlığı ile ilişkilidir ($p<0,01$). Stromal kompartmana bakıldığında, bu ilişkinin yönünün değiştiği dikkati çekmiştir. Yüksek stromal CD8/FOXP3 oranı; lenfatik invazyon, anjiyoinvazyon ve/veya perinöral invazyon varlığı ile ilişkil bulunmuştur ($p<0,01$).

pN evresine göre, stromal CD8/FOXP3 oranında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,02$). Lenf nodu metastazı izlenmeyen (pN0) olguların stromal CD8/FOXP3 oranı; lenf nodu metastazı saptanan (pN1-2-3) olgulara göre daha yüksektir. İntratümöral CD8/FOXP3 oranı ile pN evresi arasında ise ilişki yoktur ($p>0,05$).

Çalışmamızda intratümöral ve/veya stromal CD8/FOXP3 oranı ile hasta yaşı, tümör tipi, pT evresi, Ki67 proliferasyon indeksi, peritümöral lenfoid folikül ve histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki görülmemiştir.

5.3.4. PD-L1

Tümör mikroçevresinde yer alan lenfositlerin anti-tümör etkinliğinde en önemli mekanizmalardan biri PD1/PD-L1 aksıdır. T ve B lenfositlerin hücre membranında yer alan bir molekül olan PD1; kendi reseptörüne bağlandığında sitotoksik yanıtı aktive etmektedir [16, 17]. TNMK da dahil olmak üzere, pek çok kanser türünde, neoplastik hücrelerin ve TİL'in PD-L1 eksprese edebildiği son çalışmalarla ortaya koyulmuştur [15, 18-20]. Neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'de eksprese edilen PD-L1 molekülü, T lenfositlerdeki PD1 molekülüne bağlanarak sitotoksik etkiyi inaktive etmektedir [17]. Literatürde, çeşitli histolojik tümör tiplerini içeren çalışmalarda meme karsinomlarının %8,7–%38 kadarında PD-L1 ekspresyonu saptanmıştır [19, 216-218]. Meme karsinomlarında tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun genç yaş, ileri histolojik derece, hormon reseptör negatifliği, HER2 pozitifliği ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [13, 19, 218-220]. Öte yandan, Pd-

L1 ekspresyonunu uzun genel ve nüksüz sağkalımla ilişkili bulan çalışmalar da vardır [19, 220].

Wang ve ark., 2017 yılında, 35'i triple negatif non-bazal ve 69'u bazal moleküler grupta olmak üzere toplam 443 meme karsinomu olgusunda doku *microarray* yöntemi ile neoplastik hücrelerde membranöz PD-L1 (klon: SP142) ekspresyonunu incelemiştir [19]. PD-L1 ekspresyonu 75.persentilin üzerinde olan olgular pozitif kabul edilmiştir. Buna göre, tüm popülasyonun %16,5'inde, triple negatif non-bazal grubun %31'inde, bazal moleküler grubun ise %33'ünde PD-L1 pozitifdir. PD-L1 ekspresyonu genç yaş, yüksek derece ve ER-negatifliği ile ilişkili bulunmuştur. PD-L1 ekspresyonu ile sağkalım arasında total popülasyonda ilişki saptanmamıştır. TNMK olgularında, özellikle bazal benzeri moleküler grupta, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu uzun nüksüz sağkalımla ilişkili saptanmıştır. Aynı çalışmada, PD-L1-pozitif neoplastik hücreler ve intratümöral CD8-pozitif TİL'ler bir arada (kombine) değerlendirildiğinde uzun genel ve nüksüz sağkalımla ilişkili saptanmıştır.

Guo ve ark., 183 TNMK olgusunda neoplastik hücrelerde ve TİL'de membranöz ve/veya sitoplazmik PD-L1 (klon: SP142) ekspresyonunu incelemiştir [216]. Olguların %14'ünde neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'de PD-L1 ekspresyonu görülmüştür. Olguların %8,7'sinde neoplastik hücrelerde, %4,9'unda TİL'de PD-L1 ekspresyonu vardır. Guo ve ark., PD-L1 ekspresyonunu yüksek histolojik derece ile ilişkili bulurken; tümör boyutu, lenf nodu durumu, histolojik tip ve sağkalımla ilişkisiz bulmuştur.

Muenst ve ark., 127'si bazal moleküler grup olmak üzere toplam 650 meme karsinomu olgusunda doku *microarray* yöntemi ile neoplastik hücrelerde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 (klon: abb58810) ekspresyonunu incelemiştir [219]. PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve boyanma şiddeti çarpılarak hesaplanan H-skor değerinin ≥ 100 olması halinde olgu pozitif kabul edilmiştir. Çalışmada yer alan tüm olguların %23'ü, bazal grubun ise %30'u PD-L1 pozitifdir. Çalışmaya göre; PD-L1 pozitifliği ileri yaş, ileri pT evresi, ileri pN evresi, yüksek histolojik derece, ER-negatifliği, HER2-pozitifliği ve yüksek proliferasyon indeksi ile ilişkiliyken; moleküler gruplar ile ilişkili değildir. Çalışmada, PD-L1 ile sağkalım ilişkisine bakıldığında; PD-L1

pozitifliği bazal grup, luminal B grubu ve HER2 grubunda kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu bulunmuştur.

Thompson ve ark., 47 lobüler karsinom olgusunda doku *microarray* yöntemi ile neoplastik hücrelerde ve TİL'de membranöz PD-L1 (klon: SP142) ekspresyonunu incelemiştir [217]. Lobüler karsinomların %17'sinde PD-L1 ekspresyonu görülmüştür. Bu çalışmada neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'de izlenen ekspresyon ile histolojik derece, ER durumu, HER2 durumu arasında ilişki görülmemiştir. Yalnızca TİL ve sitotoksik-TİL yoğunlukları ile TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon görülmüştür.

Bertucci ve ark., 112 inflamatuvar meme karsinomu olgusunda PD-L1 mRNA ekspresyonuna bakmıştır [218]. Yüksek PD-L1 düzeyi ER-negatifliği, HER2-pozitifliği, triple negatiflik ve kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada, PD-L1 mRNA düzeyi ile sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır.

Sabatier ve ark., 5454 meme karsinomu olgusunda PD-L1 mRNA ekspresyonunu incelemiştir [220]. Genel popülasyonun %20'sinde ve bazal moleküler grubun %38'inde yüksek PD-L1 mRNA düzeyi görülmüştür. Yüksek PD-L1 ekspresyonu büyük tümör boyutu, yüksek histolojik derece, yüksek proliferasyon indeksi, iyi sitotoksik kemoterapi yanıtı, ER-negatifliği, HER2-pozitif moleküler grup ve bazal benzeri moleküler grup ile ilişkili bulunmuştur. Sağkalım ile genel popülasyondaki PD-L1 ekspresyonu arasında görülmezken; bazal benzeri moleküler gruptaki yüksek PD-L1 ekspresyonu uzun sağkalım ile ilişkilidir.

Botti ve ark., triple negatif meme karsinomu olgularında doku *microarray* yöntemi ile neoplastik hücrelerde ve TİL'de PD-L1 (klon: SP142) ekspresyonunu incelemiştir [254]. Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu yüksek proliferasyon indeksi ve uzun hastalıklı sağkalım ile ilişkili bulunurken; TİL'de PD-L1 ekspresyonu yüksek proliferasyon indeksi ve diyabetes mellitus hastalığı ile ilişkili bulunmuştur.

Li ve ark., 91'i bazal benzeri moleküler grupta olmak üzere toplam 501 meme karsinomu olgusunda neoplastik hücrelerde sitoplazmik ve/veya membranöz PD-L1 (klon: abb58810) ve intratümöral TİL'de FOXP3 ekspresyonunu incelemiştir [13]. Yüksek PD-L1 ekspresyonu ve yüksek FOXP3-pozitif TİL sayısı; yüksek histolojik

derece, ER-negatifliği, bazal moleküler grup ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, her iki belirteç de bazal benzeri grup için kısa sağkalım ve kötü prognoz ile ilişkili saptanmıştır.

Wu ve ark., 2019 yılında yayınlanan, farklı hormon reseptör ve HER2 profillerine sahip meme karsinomu olgularında neo-adjuvan kemoterapi öncesi tru-cut biyopsilerde neoplastik hücrelerde PD-L1 (klon: E1L3N) ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında; yüksek PD-L1 ekspresyonunu kısa hastalıksız sağkalım ve neo-adjuvan terapiye patolojik tam yanıt ile ilişkili bulmuştur [255].

Uhercik ve ark., farklı hormon reseptör ve HER2 profillerine sahip meme karsinomu olgularında polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile PD-L1 düzeyini incelemiştir [256]. Buna göre, metastaz ve nüks görülen olguların PD-L1 düzeyleri daha düşüktür. Yüksek PD-L1 düzeyleri uzun genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkilidir.

Ghebeh ve ark., 62 meme karsinomu olgusunda TİL'de membranöz PD-L1 (klon: MIH1) ekspresyonu ile TİL'de FOXP3 ekspresyonunu *costaining* yöntemi ile incelemiştir [257]. Çalışmaya göre, PD-L1 ve FOXP3 ekspresyonları genellikle aynı olgularda bulunmaktadır (*co-existence*). Yüksek PD-L1 ekspresyonu ve yüksek FOXP3-pozitif TİL sayısı; yüksek histolojik derece, ER-negatifliği ve belirgin TİL varlığı ile ilişkili bulunmuştur.

Brockhoff ve ark., TNMK olgularında immünohistokimya (klon: ab205921) ve FISH yöntemleriyle PD-L1 düzeylerini inceledikleri çalışmalarında; neoplastik hücrelerde ve TİL'deki PD-L1 düzeylerini korele bulmuştur [258]. Aynı çalışmada, TİL'de yüksek PD-L1 ekspresyonu uzun genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkili iken; neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu sağkalımla ilişkili bulunmamıştır.

Karnik ve ark., 2018 yılındaki yayınlarında, farklı hormon ekspresyon profillerine sahip 136 invaziv karsinom, NST olgusunda PD-L1 ekspresyonunu üç farklı antikor (Ventana SP263, Dako 22C3, and BioCare RbMCAL10) ile değerlendirmiştir [235]. Çalışmaya göre, klon SP263 ve klon RbMCAL10 ileri derecede uyumludur. Klon 22C3 ise ilk ikisinden hafif düşük ekspresyon göstermekle birlikte yine de uyumludur. Her üç klon ile yüksek PD-L1 ekspresyonu

yüksek histolojik derece, yüksek proliferasyon indeksi, ER-negatifliği ve triple negatiflik ile ilişkilidir.

Çalışmamızda, neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon ortalaması %12,3'tür (Ortanca: %3; 75.persentil: %20; SS: 18,6; minimum: %0; maksimum: %60). Olguların 10'unda (%19,6) zayıf boyanma, 20'sinde (%39,2) orta şiddette boyanma, 8'inde (%15,7) şiddetli boyanma görülürken; 13 olgu (%25,5) negatiftir. Neoplastik hücrelerde PD-L1 immünoekspresyon skoru ortalaması 25,5 bulunmuştur (Ortanca: 5; 75.persentil: 40; SS: 47,8; minimum: 0; maksimum: 180)

Çalışmamızda, PD-L1 immünoekspresyonu TİL için ortalama %19,2'dir (Ortanca: %15; 75persentil: %35; SS: 17,9; minimum: %0, maksimum: %60). Olguların 9'unda (%17,6) zayıf boyanma, 29'unda (%56,9) orta şiddette boyanma, 6'sında (%11,8) şiddetli boyanma görülürken; 7 olgu (%13,7) negatiftir. TİL için PD-L1 immünoekspresyon skoru ortalama 41,7'dir (Ortanca: 30; 75.persentil: 80; SS: 43,5; minimum: 0; maksimum: 180).

Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu izlenmeyen olgularımızın 5 yıllık sağkalımı %84'tür. Neoplastik hücrelerde %1-%9 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %73; %10-%49 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %62'dir. Neoplastik hücrelerde %50 ve üzerinde ekspresyon görülen olguların 5 yıllık sağkalımı %100 olmakla birlikte; bu grupta yalnızca 6 olgu olduğu akılda tutulmalıdır. Tümörü infiltre eden lenfositlerde PD-L1 ekspresyonu bulunmayan 7 olgunun 5 yıllık sağkalımı %47'dir. TİL'de %1-%9 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %77; %10-%49 ekspresyon varlığında 5 yıllık sağkalım %79'dur. TİL'de %50 ve üzerinde ekspresyon görülen olguların 5 yıllık sağkalımı %100 olsa da; bu grupta yalnızca 5 olgu bulunduğu dikkat edilmelidir.

Çalışmamızda, hayatta olan olgularda neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu daha yüksek iken; eksitus olan olgularda ekspresyon daha düşüktür. Kaplan-Meier grafiklerinde, neoplastik hücrelerdeki yüksek PD-L1 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görülmüştür; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,07). Nüks ve metastaz ile neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptanmıştır (p<0,01). Buna göre, nüks ve/veya

metastaz görülmeyen olgularda PD-L1 ekspresyonu, görülen olgulara göre daha yüksektir.

Çalışmamızda, hayatta olan olgularda TİL'de PD-L1 ekspresyonu, eksitus olan olgulardan daha yüksektir. TİL'deki yüksek PD-L1 ekspresyonu da uzun genel sağkalımla ilişkili bulunmuştur ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,04$). Nüks ve metastaz ile tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,01$). Nüks ve/veya metastaz görülen olgularda TİL'de PD-L1 ekspresyonu, görülmeyen olgulara göre daha düşüktür.

Çalışmamızda yüksek PD-L1 düzeyleri, uzun genel ve hastalısız sağkalım ile ilişkili görülmektedir ve bulgularımız literatür ile uyumludur.

Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile PD-L1 boyanma şiddeti arasında anlamlı pozitif ilişki bulunmuştur ($p<0,01$; Rho: 0,78). Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonu arttıkça, boyanma şiddeti de artmaktadır. Benzer şekilde; TİL'deki PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile boyanma şiddeti arasında da anlamlı pozitif ilişki bulunmuştur ($p<0,01$; Rho: 0,72).

Neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonuyla TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0,01$; Rho: 0,6). TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arttıkça neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu da artmaktadır.

Çalışmamızda, hem neoplastik hücrelerdeki hem de TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen TİL düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon mevcuttur ($p<0,01$; sırasıyla, Rho: 0,41 ve 0,42). TİL miktarı yüksek olan olgularda PD-L1 ekspresyonu daha yüksek olmaktadır. Benzer ilişki, Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen TİL düzeyi ile neoplastik hücrelerde ve TİL'deki PD-L1 boyanma şiddeti ve ekspresyon skoru ile de saptanmıştır ($p<0,01$).

Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal sitotoksik-TİL ile arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,49 ve 0,62). Benzer şekilde; TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal sitotoksik-TİL ile arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,36 ve 0,52). Neoplastik

hücrelerdeki ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD8 ekspresyonları da artmaktadır. Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,54$ ve $0,58$). Benzer şekilde TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL arasında da anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,47$ ve $0,44$). Buna göre, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal FOXP3 ekspresyonları da artmaktadır. Bu bulgu, Ghebeh ve ark.'ın sonuçlarıyla benzerdir. Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal M2 makrofajlar arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,42$ ve $0,49$). Benzer şekilde TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile intratümöral ve/veya stromal M2 makrofaj arasında da anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, $r: 0,43$ ve $0,55$). Buna göre, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktadır. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, immünohistokimyasal belirteçler arasında ko-ekspresyon varlığı dikkati çekmiştir.

Çalışmamızda, yaşın tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisine bakıldığında; istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,03$; $r: -0,27$; Rho: $-0,29$). Genç yaşta TİL'deki PD-L1 ekspresyonu yüksek olup ileri yaşta ekspresyon azalmaktadır. Yaşa göre neoplastik hücrelerde PD-L1 ekspresyonuna bakıldığında; genç yaşta PD-L1 ekspresyonunun yine daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak, neoplastik hücrelerdeki ekspresyon ile yaş arasındaki bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,07$; Pearson's $r: -0,25$). Bu durumun olgu sayımızın azlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda yaş ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki literatürde Wang ve ark.'ın sonuçlarıyla benzerken; Muenst ve ark.'ın bulgularına göre terstir.

Çalışmamızda, tümör tiplerine göre, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna bakıldığında; istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$). Buna göre, invaziv karsinom, NST olgularında PD-L1 ekspresyonu daha düşük iken; LBMK olgularında daha yüksektir. Tümör tipine göre TİL'deki PD-L1 ekspresyonunda ise anlamlı farklılık yoktur.

Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonuna göre; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve perinöral invazyon arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve/veya perinöral invazyon saptanan olguların PD-L1 ekspresyonu; saptanmayan olgulara göre daha düşüktür. Benzer şekilde, TİL'deki PD-L1 ekspresyonu da anjiyoinvazyon ve/veya lenfatik invazyon saptanan olgularda daha düşük bulunmuştur ($p<0,01$). Öte yandan, TİL'deki PD-L1 ekspresyonu ile perinöral invazyonunun ilişkisini incelediğimizde; yüksek ekspresyon saptanan olgularda perinöral invazyonun daha sık olduğu dikkati çekmiştir ($p<0,01$).

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,05$). Lenfoid folikül görülen olgularda neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu, lenfoid folikül görülmeyen olgulardan daha yüksektir. Peritümöral lenfoid folikül varlığı ile TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda, tümörü infiltre eden lenfositlerdeki PD-L1 ekspresyonu ile histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,05$). Buna göre, TİL'deki PD-L1 ekspresyonu yüksek olan olgularda, düşük olanlara göre daha çok histiyositik agregat saptanmıştır. Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda neoplastik hücrelerin ve/veya TİL'in PD-L1 ekspresyonu ile pT evresi, pN evresi, Ki67 proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda, neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunda eksitus, nüks ve metastaz varlığına göre anlamlı fark görülmüştür ($p<0,01$). Eksitus, nüks, ve/veya metastaz görülen olgularda skor; sağ ve sağlıklı olan daha düşüktür. Benzer şekilde; eksitus ve/veya metastaz olan olgularda TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoru da daha düşük bulunmuştur ($p<0,01$). Bununla birlikte; nüks görülen olgularda TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoru, nüks görülmeyen olgulara kıyasla daha yüksektir ($p<0,01$).

Neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyon skorunun, histolojik tümör tiplerine göre dağılımına baktığımızda; istatistiksel anlamlı farklılık vardır ($p=0,01$).

Buna göre, LBMK olgularında PD-L1 skoru; invaziv karsinom, NST ve metaplastik karsinom olgularına göre daha yüksektir. Tümör tipine göre TİL'deki PD-L1 ekspresyon skorunda farklılık yoktur.

Çalışmamızda, hem neoplastik hücrelerdeki hem de TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoru ile Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen peritümöral lenfositik yanıt (TİL) düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon mevcuttur ($p<0,01$). Peritümöral TİL miktarı yüksek olan olgularda, PD-L1 ekspresyon skoru daha yüksek saptanmaktadır.

Çalışmamızda yaş, pT evresi, pN evresi, anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, Ki67 proliferasyon indeksi, lenfoid folikül/histiyositik agregat varlığı ile neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyon skoru arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

5.3.5. CD163

Tümör mikroçevresinde lenfositlerden sonra ikinci önemli hücre grubu makrofajlardır. Tümör ilişkili makrofajlar, T lenfositlerden gelen uyarılarla M1 ya da M2 yönünde polarizasyon geçirmektedir [222]. M2 makrofajlar hem protümorogenik bir stroma oluşumunu desteklemekte, hem de regülatuar T lenfositler ve tip 2 yardımcı T lenfositler gibi anti-inflamatuar hücreleri uyarmaktadır [26, 223, 224]. Meme karsinomlarında M2 makrofajdan zengin mikroçevrenin kötü prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Adams ve arkadaşlarının 2018 yılındaki çalışmasında, 180 triple negatif meme karsinomunda doku *microarray* yöntemi ile CD163 ekspresyonu araştırılmıştır [15]. Aynı çalışmada, PD-L1 (Cell Signaling) ve FOXP3 ekspresyonları da incelenmiştir. CD163, PD-L1 ve FOXP3 ekspresyonlarını birbiriyle korele bulunmuştur (Ko-ekspresyon). Yüksek CD163, PD-L1 ve FOXP3 ekspresyonları kısa sağkalım ile ilişkili saptanmıştır.

Zhao ve ark., 2017 yılındaki meta-analizlerinde 4541 meme karsinomu olgusunda TİM düzeylerini incelemiştir [26]. Meta-analizde yer alan çalışmalardan bir kısmında yalnız CD163, bir kısmında yalnız CD68, bir kısmında ise CD163 ve CD68 belirteçlerinin kullanıldığı dikkati çekmiştir. Yüksek TİM düzeyi ile genç yaş, büyük tümör boyutu, yüksek histolojik derece, hormon reseptör negatifliği, vasküler invazyon ve kısa sağkalım arasında ilişki bulunmuştur.

Zhang ve ark., 172 meme karsinomunda TİM düzeylerini inceledikleri çalışmalarında; TİM düzeyini ortanca değeri sınır kabul ederek iki gruba ayırmıştır [226]. Buna göre, yüksek TİM düzeyi ile kısa sağkalım ve yüksek histolojik derece arasında ilişki saptamıştır. Bu çalışmada makrofaj belirteci olarak CD68 kullanılmış olup çalışmanın M2 makrofaj seçiciliği yoktur.

Medrek ve ark., 121 meme karsinomunda intratümöral ve stromal makrofajları CD163 ve CD68 belirteçleri ile incelemiştir [228]. Stromal alanda izlenen CD163-pozitif makrofajların yüksek histolojik derece, büyük tümör boyutu, yüksek proliferasyon indeksi, hormon reseptör negatifliği, triple negatiflik ve kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Stromal alandaki CD68-pozitif makrofajlar da büyük tümör boyutu ve kısa sağkalımla ilişkili bulunmuştur. İntraütümöral makrofajlar prognostik parametrelerle ilişkili bulunmamıştır.

Yuan ve ark., 287 triple negatif meme karsinomunda doku *microarray* yöntemi ile stromal TİM düzeylerini araştırmıştır [229]. Çalışmada makrofaj belirteci olarak CD68 kullanıldığından M2 makrofaj seçiciliği yoktur. Yüksek TİM görülen olguların uzak metastaz yapma riski daha yüksek ve sağkalımı daha kısa bulunmuştur.

Gwak ve ark., meme karsinomu olgularında stromal ve intratümöral TİM düzeylerini doku *microarray* yöntemi ile CD68 immünohistokimyası kullanarak araştırmıştır [230]. Hem intratümöral hem stromal yüksek TİM düzeyleri; yüksek histolojik derece, yüksek proliferasyon indeksi, yüksek P53 ekspresyonu ve hormon reseptör negatifliği ile ilişkili saptanmıştır. TİM'den zengin olgularda vimentin, düz kas aktini, β -katenin over-ekspresyonu izlenmiştir. TİM ile sağkalım ilişkisine bakıldığında, TİM'den zengin mikroçevrenin hormon reseptör pozitif karsinomlar

için bağımsız kötü prognostik bir parametre olduğu; bununla birlikte, hormon reseptör negatif olgularda prognostik etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Yang ve ark., 2018 yılında yayınlanan 200 adet bazal benzeri karsinom olgusundan oluşan serilerinde, intratümöral ve stromal CD163 ve CD68 ekspresyonlarını incelemiştir [238]. Stromal CD163 ve CD68 pozitif makrofajlar; büyük tümör boyutu, yüksek histolojik derece, yüksek nüks ve yüksek mortalite ile ilişkili bulunmuştur. Çok değişkenli analizlerde stromal CD163 ekspresyonu kısa sağkalım için bağımsız prognostik bir parametre olarak saptanmakla birlikte; CD68 ekspresyonunun sağkalım için prognostik bir etkisi görülmemiştir. Çalışmada intratümöral CD163 ve/veya CD8 ekspresyonu ile diğer prognostik parametreler arasında ilişki bulunmamıştır.

Çalışmamızda, intratümöral alanda BBA başına CD163-pozitif makrofaj sayısı ortalama 11,19'dur (Ortanca: 7; 75.persentil: 14; SS:13,2; minimum: 0; maksimum: 56). Tümör stromasında, BBA başına M2 makrofaj sayısı ortalama 26,1'dir (Ortanca: 22; 75.persentil: 38; SS:18,7; minimum: 2; maksimum: 70). Stromasında CD163 immünekspresyonu görülmeyen (negatif) olgumuz yoktur. Çalışmamızda neoplastik hücrelerde CD163 ekspresyonu izlenmemiştir. İntratümöral ve/veya stromal M2 makrofaj sayısı düşük olan olguların 5 yıllık sağkalımı %67 iken, yüksek olan olguların 5 yıllık sağkalımı %80'dir.

Çalışmamızda, intratümöral CD163 ekspresyonu ile stromal CD163 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; Rho: 0,65). İntratümöral alanda BBA başına M2 makrofaj sayısı yüksek olan olgularda; stromal alanda da BBA başına M2 makrofaj sayısı yüksektir.

Çalışmamızda, intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları ile intratümöral sitotoksik-TİL arasında anlamlı ve kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,54 ve 0,42). Benzer şekilde; intratümöral ve stromal CD163 ekspresyonları stromal sitotoksik-TİL arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,38 ve 0,44). İntratümöral ve/veya stromal sitotoksik-TİL'den zengin intratümöral ve/veya stromal M2 makrofaj sayısı da artmaktadır. Çalışmamızda, intratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile intratümöral FOXP3 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r :

0,43 ve 0,50). Benzer şekilde; intratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile stromal FOXP3 ekspresyonu arasında da anlamlı ve pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,26 ve 0,36). İnatümöral ve/veya stromal regülatuar-TİL sayısı arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktadır. Bu bulgu, Adams ve ark.'ın sonuçları ile uyumludur. Çalışmamızda, intratümöral ve stromal M2 makrofajlar ile neoplastik hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,42 ve 0,49). İnatümöral ve stromal M2 makrofajlar ile TİL'deki PD-L1 ekspresyonu arasında da anlamlı pozitif ilişki saptanmıştır ($p<0,01$; sırasıyla, r : 0,43 ve 0,55). Buna göre, neoplastik hücrelerde ve/veya TİL'deki PD-L1 ekspresyonları arttığında, intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonları da artmaktadır. Bu bulgu, Adams ve ark.'ın sonuçları ile uyumludur.

Çalışmamızda, eksitus olan olgularda intratümöral CD163 ekspresyonu, hayatta olan olgulara göre düşüktür. Yüksek intratümöral CD163 ekspresyonu uzun genel sağkalımla ilişkili görülmektedir; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre metastazda anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,01$). Metastatik olgularda ekspresyon, metastaz görülmeyen olgulara göre düşüktür. İnatümöral CD163 ekspresyonuna göre nükste anlamlı fark görülmüştür ($p<0,01$). Nüks olan olgularda intratümöral CD163 ekspresyonu, nüks görülmeyen olgulara göre yüksektir. Bu diskordansın nedeni incelendiğinde; nüks görülen ve intratümöral CD163 ekspresyonu yüksek olan olguların, diğer olgulara kıyasla daha genç yaşta olduğu ve intratümöral FOXP3 ekspresyonlarının daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Ek olarak, çalışmamızda, yüksek intratümöral CD163 ekspresyonu ileri pT evresi ile de ilişkili bulunmuş olup bu durumun lokal nüksü artırdığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda, eksitus olan olgularda stromal CD163 ekspresyonu, hayatta olan olgulara göre daha düşük bulunmuştur. Yüksek stromal CD163 ekspresyonu da uzun genel sağkalımla ilişkilidir ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,04$). Stromal CD163 ekspresyonuna göre nüks ve metastaz varlığında da anlamlı fark görülmüştür ($p<0,01$). Nüks ve/veya metastaz görülen olgularda ekspresyon, görülmeyen olgulara göre daha düşüktür.

Çalışmamızda, intratümöral M2 makrofajlar uzun genel ve metastazsız sağkalım ile ilişkili bulunmuş; stromal M2 makrofajlar da uzun genel, nüksüz ve metastazsız sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Bulgularımız literatürle uyumlu değildir. Çalışmamızda, düşük intratümöral M2 makrofaj miktarı nüksüz sağkalımla ilişkili bulunmuş olup bu bulgu literatürle uyumludur.

Çalışmamızda, intratümöral CD163 ekspresyonuna göre anjiyoinvazyon ve lenfatik invazyonda anlamlı fark görülmüştür ($p<0,01$). Anjiyoinvazyon ve/veya lenfatik invazyon görülen olgularda ekspresyon, görülmeyen olgulara göre daha düşüktür. Benzer şekilde, anjiyoinvazyon görülen olgularda stromal CD163 ekspresyonu, anjiyoinvazyon görülmeyen olgulara göre daha düşüktür ($p<0,01$). Aynı ilişki stromal CD163 ekspresyonu ile lenfatik invazyon ve perinöral invazyonlar arasında da saptanmıştır ($p<0,01$).

Çalışmamızda, intratümöral CD163 ekspresyonu ileri tümöre evresi ile ilişkili bulunmuştur. İntratümöral CD163-pozitif makrofaj miktarı erken evrede (pT1; tümör boyutu <2 cm), ileri evreye göre (pT2-3-4; tümör boyutu >2 cm) daha düşük saptanmıştır ($p<0,01$).

Çalışmamızda, Hematoksilen-Eozin boyasında değerlendirilen TİL düzeyi ile hem intratümöral hem de stromal M2 makrofajlar arasında anlamlı ve pozitif ilişki görülmüştür (sırasıyla, $p=0,02$ ve $0,01$; Rho: $0,30$ ve $0,33$). TİL'den zengin olgularda intratümöral ve stromal M2 makrofaj sayısı da fazla olmaktadır.

Tümör tipine göre intratümöral CD163 ekspresyonunda istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,01$). Buna göre, invaziv karsinom, NST olgularında ekspresyon daha düşükken, lenfosit-baskın karsinomlarda daha yüksektir. Tümör histolojik tipine göre stromal CD163 ekspresyonunda ise farklılık yoktur ($p>0,05$).

İnatümöral ve stromal CD163 ekspresyonu ile peritümöral lenfoid folikül varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,01$). İntratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonu yüksek olan olgularda; daha fazla lenfoid folikül saptanmıştır ($p<0,01$).

Stromal M2 makrofaj sayısı ile peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,02$). Stromal BBA başına M2 makrofaj

sayısı histiyositik agregat görülen olgularda, histiyositik agregat görülmeyen olgulara göre daha yüksektir. İntratümöral CD163 ekspresyonu ile peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında ise anlamlı ilişki görülmemiştir.

Hasta yaşı, pN evresi ve Ki67 proliferasyon indeksi ile intratümöral ve/veya stromal CD163 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).



6. SONUÇ

Çalışmamızda,

- İleri hasta yaşı; eksitus, uzak metastaz ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.
- İleri primer tümör (pT) evresi (büyük tümör boyutu); eksitus, lokal nüks, uzak metastaz, cerrahi sınırdaki tümör varlığı ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.
- Aksiller lenf nodu tutulumu (≥ 1 metastatik lenf nodu); eksitus ile ilişkili bulundu.
- Anjiyoinvazyon varlığı; eksitus, lokal nüks, uzak metastaz, lenfatik invazyon ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.
- Lenfatik invazyon varlığı; aksiller lenf nodu tutulumu ile ilişkili bulundu.
- Perinöral invazyon varlığı; uzak metastaz ile ilişkili bulundu.
- Peritümöral lenfositik yanıt varlığı ve yoğunluğu; genç hasta yaşı ve LBMK histolojik tipi ile ilişkili bulundu.
- Yüksek patolojik risk skoru; eksitus ve lokal nüks ile ilişkili bulundu.
- Yüksek intratümöral **CD8** ekspresyonu; genel sağkalım, metastazsız sağkalım, düşük primer tümör evresi (küçük tümör boyutu), LBMK histolojik tipi, peritümöral lenfoid folikül varlığı ve peritümöral histiyositik agregat varlığı ile ilişkili bulundu.
- Düşük intratümöral **CD8** ekspresyonu; anjiyoinvazyon ve lenfatik invazyon ile ilişkili bulundu.
- Yüksek stromal **CD8** ekspresyonu; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, düşük primer tümör evresi (küçük tümör boyutu) ve peritümöral histiyositik agregat varlığı ile ilişkili bulundu.
- Düşük stromal **CD8** ekspresyonu; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.
- Yüksek intratümöral **FOXP3** ekspresyonu; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, genç hasta yaşı, yüksek proliferasyon indeksi, LBMK histolojik tipi, düşük patolojik risk skoru, peritümöral lenfoid folikül varlığı ve peritümöral histiyositik agregat varlığı ile ilişkili bulundu.

- Düşük intratümöral **FOXP3** ekspresyonu; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, yüksek patolojik risk skoru ve yüksek kötü prognoz skoru ile ilişkili bulundu.

- Yüksek stromal **FOXP3** ekspresyonu; genel sağkalım, metastazsız sağkalım, peritümöral lenfoid folikül varlığı ve peritümöral histiyositik agregat varlığı ile ilişkili bulundu.

- Düşük stromal **FOXP3** ekspresyonu; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, yüksek patolojik risk skoru ve yüksek kötü prognoz skoru ile ilişkili bulundu.

- Yüksek intratümöral **CD8/FOXP3** oranı; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım ile ilişkili bulundu.

- Düşük intratümöral **CD8/FOXP3** oranı; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon, perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.

- Yüksek stromal **CD8/FOXP3** oranı; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.

- Düşük stromal **CD8/FOXP3** oranı; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım ve aksiller lenf nodu pozitifliği ile ilişkili bulundu

- Neoplastik hücrelerde yüksek **PD-L1** ekspresyonu; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, genç hasta yaşı, LBMK histolojik tipi, peritümöral lenfositik yanıt yoğunluğu ve peritümöral lenfoid folikül varlığı ile ilişkili bulundu.

- Neoplastik hücrelerde düşük **PD-L1** ekspresyonu; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.

- Neoplastik hücrelerde yüksek **PD-L1** ekspresyon skoru; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, LBMK histolojik tipi ve peritümöral lenfositik yanıt yoğunluğu ile ilişkili bulundu.

- Tümörü infiltre eden lenfositlerde yüksek **PD-L1** ekspresyonu; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, genç hasta yaşı, perinöral invazyon, peritümöral lenfositik yanıt ve peritümöral histiyositik agregat varlığı ile ilişkili bulundu.

- Tümörü infiltre eden lenfositlerde düşük **PD-L1** ekspresyonu; anjiyoinvazyon ve lenfatik invazyon ile ilişkili bulundu.

- Tümörü infiltre eden lenfositlerde yüksek **PD-L1** ekspresyon skoru; sağkalım, metastazsız sağkalım ve peritümöral lenfositik yanıt ile ilişkili bulundu.
- Neoplastik hücrelerde ve tümörü infiltre eden lenfositlerde **PD-L1** ekspresyonu (%), boyanma şiddeti ile korele bulundu.
- Yüksek intratümöral **CD163** ekspresyonu; genel sağkalım, metastazsız sağkalım, ileri primer tümör evresi (büyük tümör boyutu), peritümöral lenfositik yanıt yoğunluğu ile ilişkili bulundu. Öte yandan, düşük intratümöral **CD163** ekspresyonu; nüksüz sağkalım, anjiyoinvazyon ve lenfatik invazyon ile ilişkili bulundu.
- Yüksek stromal intratümöral **CD163** ekspresyonu; genel sağkalım, nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, peritümöral lenfositik yanıt yoğunluğu, peritümöral lenfoid folikül varlığı, peritümöral histiyositik agregat varlığı arasında ilişki bulundu.
- Düşük stromal intratümöral **CD163** ekspresyonu; anjiyoinvazyon, lenfatik invazyon ve perinöral invazyon ile ilişkili bulundu.
- CD8, FOXP3, CD163, PD-L1 immünohistokimyasal belirteçleri arasında; tüm ekspresyon sahalarında (intratümöral ve/veya stromal, neoplastik hücrelerde ve/veya tümörü infiltre eden lenfositlerde) ko-ekspresyon bulundu.

Sonuç olarak; çalışmamızda, triple negatif meme karsinomlarında immünojenik mikroçevrenin prognostik ve prediktif önemi saptandı. İmmünojenik mikroçevreyi değerlendirmede CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 immünohistokimyasalarının güvenilir belirteçler olduğu görüldü. İmmünojenik mikroçevreyi oluşturan hücre tipi, yoğunluğu ve yerleşim yerinin; sağkalım ve diğer prognostik parametreler ile ilişkili olduğu bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Lakhani SR, E.I., Schnitt SJ, Tan PH, Vijyer MJ, WHO Classification of Tumors of the Breast. 4th Ed. pp. 8-75, 2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
2. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394-424.
3. Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. 65(2): p. 87-108.
4. Şencan İ., K.B., Türkiye Kanser İstatistikleri. 2017, Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu,
5. Ozmen V., Ozmen T., Dogru V., Breast cancer in Turkey: Analyses of 20.000 patients. pp. 22-47, 2017, Cinius Yayınevi, Istanbul.
6. Hoda S., B.E., Koerner F., Rosen P., Rosen's Breast Pathology 4th Ed. pp. 1-13, 2014: Lippincott Williams & Wilkins.
7. Lehmann, B.D., et al., Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011. 121(7): p. 2750-67.
8. Mittal, D., et al., New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*, 2014. 27: p. 16-25.
9. Salgado, R., et al., The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*, 2015. 26(2): p. 259-71.
10. Castaneda, C.A., et al., Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *World J Clin Oncol*, 2016. 7(5): p. 387-394.
11. Lee, K.H., et al., Expression of epithelial-mesenchymal transition driver brachyury and status of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Tumour Biol*, 2017. 39(6): p. 1010428317710575.

12. Romagnoli, G., et al., Morphological Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) to Investigate Invasive Breast Cancer Immunogenicity, Reveal Lymphocytic Networks and Help Relapse Prediction: A Retrospective Study. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(9).
13. Li, Z., et al., PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J Cancer*, 2016. 7(7): p. 784-93.
14. Allaoui, R., et al., Infiltration of gammadelta T cells, IL-17+ T cells and FoxP3+ T cells in human breast cancer. *Cancer Biomark*, 2017. 20(4): p. 395-409.
15. Adams, T.A., et al., Composite analysis of immunological and metabolic markers defines novel subtypes of triple negative breast cancer. *Mod Pathol*, 2018. 31(2): p. 288-298.
16. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 2010. 236: p. 219-42.
17. Caldwell, C., Jr., et al., Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 13682.
18. Beckers, R.K., et al., Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology*, 2016. 69(1): p. 25-34.
19. Wang, Z.Q., et al., PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. *Oncotarget*, 2017. 8(31): p. 51641-51651.
20. Lou, J., et al., Relationship Between PD-L1 Expression and Clinical Characteristics in Patients with Breast Invasive Ductal Carcinoma. *Open Med (Wars)*, 2017. 12: p. 288-292.
21. Lin, Y.M., et al., High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0142656.
22. Ilie, M., et al., Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch*, 2016. 468(5): p. 511-25.
23. Brahmer, J.R., et al., Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 2012. 366(26): p. 2455-65.

24. Ottaviano, M., S. De Placido, and P.A. Ascierto, Recent success and limitations of immune checkpoint inhibitors for cancer: a lesson from melanoma. *Virchows Arch*, 2019. 474(4): p. 421-432.
25. Savic Prince, S. and L. Bubendorf, Predictive potential and need for standardization of PD-L1 immunohistochemistry. *Virchows Arch*, 2019. 474(4): p. 475-484.
26. Zhao, X., et al., Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*, 2017. 8(18): p. 30576-30586.
27. Dawson, S.J., E. Provenzano, and C. Caldas, Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*, 2009. 45 Suppl 1: p. 27-40.
28. Jemal, A., et al., Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 2009. 59(4): p. 225-49.
29. Kara F., I.H., Keskinilic B., Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015. pp. 20-44, 2018, Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü.
30. Stewart BW, Wild CP, editors (2014). *World Cancer Report* . pp. 16-17, 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
31. Moore KL, P.T., Torchia MG *Embriyoloji ve Doğum Defektleri: Biz Doğmadan Önce*. 7. ed. pp. 295-296, 2009, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
32. Sternlicht, M.D., Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*, 2006. 8(1): p. 201.
33. Mills SE., *Histology for Pathologists*, 4th ed., Ed: MillsSE. pp. 67-75, 2012, Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins.
34. Schnitt SJ, C.L., *Biopsy Interpretation of the Breast*, 2nd Ed. pp. 2-9, 2013, Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins.
35. Shaaban, A.M., et al., Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 2003. 27(12): p. 1502-12.
36. Liu, H., et al., Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 2012. 138(1): p. 57-64.

37. Hulka, B.S. and P.G. Moorman, Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*, 2001. 38(1): p. 103-13; discussion 113-6.
38. Thompson, W.D., Genetic epidemiology of breast cancer. *Cancer*, 1994. 74(1 Suppl): p. 279-87.
39. Blackwood, M.A. and B.L. Weber, BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol*, 1998. 16(5): p. 1969-77.
40. Xie, Y., et al., The role of BRCA status on prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 2017. 8(50): p. 87151-87162.
41. Domagala, P., et al., Immunophenotypic predictive profiling of BRCA1-associated breast cancer. *Virchows Arch*, 2011. 458(1): p. 55-64.
42. Sharma, P., et al., Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. 145(3): p. 707-14.
43. Hoyer, J., et al., Addition of triple negativity of breast cancer as an indicator for germline mutations in predisposing genes increases sensitivity of clinical selection criteria. *BMC Cancer*, 2018. 18(1): p. 926.
44. Newman, B., R.C. Millikan, and M.C. King, Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev*, 1997. 19(1): p. 69-79.
45. Wu, A.H., et al., Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am J Clin Nutr*, 1998. 68(6 Suppl): p. 1437S-1443S.
46. Garland, M., et al., Antioxidant micronutrients and breast cancer. *J Am Coll Nutr*, 1993. 12(4): p. 400-11.
47. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C., Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet*, 1996. 347(9017): p. 1713-27.
48. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 1997. 350(9084): p. 1047-59.
49. Colditz, G.A., et al., The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 1995. 332(24): p. 1589-93.

50. Boyd, N.F., et al., Mammographic densities and breast cancer risk. *Breast Dis*, 1998. 10(3-4): p. 113-26.
51. Fitzgibbons, P.L., D.E. Henson, and R.V. Hutter, Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. Cancer Committee of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 1998. 122(12): p. 1053-5.
52. Humeniuk, V., et al., Elastosis and primary breast cancer. *Cancer*, 1983. 52(8): p. 1448-52.
53. Winchester, D.J., et al., A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg*, 1998. 186(4): p. 416-22.
54. Tan, P.H., et al., Histiocytoid breast carcinoma: an enigmatic lobular entity. *J Clin Pathol*, 2011. 64(8): p. 654-9.
55. Page, D.L., et al., Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology*, 1983. 7(4): p. 525-36.
56. Louwman, M.W., et al., Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands. *Int J Cancer*, 2007. 121(1): p. 127-35.
57. Ohtani, H., et al., Defining lymphocyte-predominant breast cancer by the proportion of lymphocyte-rich stroma and its significance in routine histopathological diagnosis. *Pathol Int*, 2015. 65(12): p. 644-51.
58. Herrero-Vicent, C., et al., Predictive and prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ecancermedalscience*, 2017. 11: p. 759.
59. Hida, A.I., et al., Prognostic and predictive impacts of tumor-infiltrating lymphocytes differ between Triple-negative and HER2-positive breast cancers treated with standard systemic therapies. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. 158(1): p. 1-9.
60. O'Loughlin, M., et al., Reproducibility and predictive value of scoring stromal tumour infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a multi-institutional study. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. 171(1): p. 1-9.
61. Denkert, C., et al., Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*, 2018. 19(1): p. 40-50.

62. Ragazzi, M., et al., Oncocytic carcinoma of the breast: frequency, morphology and follow-up. *Hum Pathol*, 2011. 42(2): p. 166-75.
63. Perou, C.M., et al., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000. 406(6797): p. 747-52.
64. Selfors, L.M., et al., Identification of cancer genes that are independent of dominant proliferation and lineage programs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. 114(52): p. E11276-E11284.
65. Shackney, S.E. and J.F. Silverman, Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol*, 2003. 10(5): p. 278-90.
66. Simpson, P.T., et al., Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*, 2005. 205(2): p. 248-54.
67. Roylance, R., et al., Allelic imbalance analysis of chromosome 16q shows that grade I and grade III invasive ductal breast cancers follow different genetic pathways. *J Pathol*, 2002. 196(1): p. 32-6.
68. Casasent, A.K., M. Edgerton, and N.E. Navin, Genome evolution in ductal carcinoma in situ: invasion of the clones. *J Pathol*, 2017. 241(2): p. 208-218.
69. Tang, P., K.A. Skinner, and D.G. Hicks, Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol*, 2009. 18(3): p. 125-32.
70. Sorlie, T., et al., Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(19): p. 10869-74.
71. Hergueta-Redondo, M., et al., "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol*, 2008. 10(12): p. 777-85.
72. Nielsen, T.O., et al., Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(16): p. 5367-74.
73. Badve, S., et al., Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*, 2011. 24(2): p. 157-67.
74. Sarrio, D., et al., Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*, 2008. 68(4): p. 989-97.

75. Herschkowitz, J.I., et al., The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(5): p. R75.
76. Farmer, P., et al., Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 2005. 24(29): p. 4660-71.
77. Herschkowitz, J.I., et al., Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 2007. 8(5): p. R76.
78. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(2): p. 131-42.
79. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 5991-5; discussion 5995.
80. Prat, A., et al., Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(5): p. R68.
81. Korsching, E., et al., Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*, 2002. 82(11): p. 1525-33.
82. Olopade, O.I. and T. Grushko, Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med*, 2001. 344(26): p. 2028-9.
83. Laakso, M., et al., Basolumental carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(14 Pt 1): p. 4185-91.
84. Kumar, P. and R. Aggarwal, An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 2016. 293(2): p. 247-69.
85. Dent, R., et al., Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(15 Pt 1): p. 4429-34.
86. Arslan, C., O. Dizdar, and K. Altundag, Pharmacotherapy of triple-negative breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 2009. 10(13): p. 2081-93.
87. Chacon, R.D. and M.V. Costanzo, Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010. 12 Suppl 2: p. S3.

88. Konigsberg, R., et al., Tumor characteristics and recurrence patterns in triple negative breast cancer: a comparison between younger (<65) and elderly (>=65) patients. *Eur J Cancer*, 2012. 48(16): p. 2962-8.
89. Sporikova, Z., et al., Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 2018. 18(5): p. e841-e850.
90. Li, X., G.M. Oprea-Ilies, and U. Krishnamurti, New Developments in Breast Cancer and Their Impact on Daily Practice in Pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 2017. 141(4): p. 490-498.
91. Perou, C.M., Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 2011. 16 Suppl 1: p. 61-70.
92. Hubalek, M., T. Czech, and H. Muller, Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 2017. 12(1): p. 8-14.
93. Le Du, F., et al., Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget*, 2015. 6(15): p. 12890-908.
94. Plasilova, M.L., et al., Features of triple-negative breast cancer: Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (Baltimore)*, 2016. 95(35): p. e4614.
95. Yam, C., S.A. Mani, and S.L. Moulder, Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist*, 2017. 22(9): p. 1086-1093.
96. Ray, M. and B.N. Polite, Triple-negative breast cancers: a view from 10,000 feet. *Cancer J*, 2010. 16(1): p. 17-22.
97. Couch, F.J., et al., Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*, 2015. 33(4): p. 304-11.
98. Morris, G.J., et al., Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*, 2007. 110(4): p. 876-84.
99. Bauer, K.R., et al., Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 2007. 109(9): p. 1721-8.

100. Hahnen, E., et al., Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 2017. 12(1): p. 15-19.
101. Brouckaert, O., et al., Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *Int J Womens Health*, 2012. 4: p. 511-20.
102. Esteller, M., et al., Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(7): p. 564-9.
103. Wei, M., et al., BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 10692-9.
104. Valencia, O.M., et al., The Role of Genetic Testing in Patients With Breast Cancer: A Review. *JAMA Surg*, 2017. 152(6): p. 589-594.
105. Jhan, J.R. and E.R. Andrechek, Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*, 2017. 18(17): p. 1595-1609.
106. Dogan, B.E., et al., Multimodality imaging of triple receptor-negative tumors with mammography, ultrasound, and MRI. *AJR Am J Roentgenol*, 2010. 194(4): p. 1160-6.
107. Yaman, S., et al., Lymphatic and capillary invasion patterns in triple negative breast cancer. *Am Surg*, 2012. 78(11): p. 1238-42.
108. Liu, N., et al., Lymph node status in different molecular subtype of breast cancer: triple negative tumours are more likely lymph node negative. *Oncotarget*, 2017. 8(33): p. 55534-55543.
109. Lin, N.U., et al., Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*, 2012. 118(22): p. 5463-72.
110. Dent, R., et al., Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. 115(2): p. 423-8.
111. Elsayaf, Z. and H.P. Sinn, Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations. *Breast Care (Basel)*, 2011. 6(4): p. 273-278.
112. Davis, D.G., et al., GATA-3 and FOXA1 expression is useful to differentiate breast carcinoma from other carcinomas. *Hum Pathol*, 2016. 47(1): p. 26-31.
113. Ni, Y.B., et al., GATA-3 is superior to GCDFP-15 and mammaglobin to identify primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. 169(1): p. 25-32.

114. Liedtke, C., et al., Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008. 26(8): p. 1275-81.
115. Yu, Q., et al., Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol*, 2011. 22(6): p. 1288-94.
116. Astvatsaturyan, K., et al., Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features. *PLoS One*, 2018. 13(6): p. e0197827.
117. Davis, M., et al., AR negative triple negative or "quadruple negative" breast cancers in African American women have an enriched basal and immune signature. *PLoS One*, 2018. 13(6): p. e0196909.
118. Burstein, M.D., et al., Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(7): p. 1688-98.
119. Kim, S., et al., Feasibility of Classification of Triple Negative Breast Cancer by Immunohistochemical Surrogate Markers. *Clin Breast Cancer*, 2018. 18(5): p. e1123-e1132.
120. Denkert, C., et al., Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2010. 28(1): p. 105-13.
121. Topalian, S.L., et al., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012. 366(26): p. 2443-54.
122. Marty, B., et al., Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(6): p. R101.
123. He, J., et al., Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol*, 2012. 29(2): p. 406-10.
124. Safarpour, D. and F.A. Tavassoli, A targetable androgen receptor-positive breast cancer subtype hidden among the triple-negative cancers. *Arch Pathol Lab Med*, 2015. 139(5): p. 612-7.
125. Lehmann, B.D., J.A. Pietenpol, and A.R. Tan, Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015: p. e31-9.

126. Shah, S.P., et al., The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 2012. 486(7403): p. 395-9.
127. Zawacka-Pankau, J. and G. Selivanova, Pharmacological reactivation of p53 as a strategy to treat cancer. *J Intern Med*, 2015. 277(2): p. 248-259.
128. Hu, Z., et al., A compact VEGF signature associated with distant metastases and poor outcomes. *BMC Med*, 2009. 7: p. 9.
129. Clark, G.M., Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*, 1994. 30(2): p. 117-26.
130. Elston, C.W., I.O. Ellis, and S.E. Pinder, Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999. 31(3): p. 209-23.
131. Dawson, P.J., D.J. Ferguson, and T. Karrison, The pathological findings of breast cancer in patients surviving 25 years after radical mastectomy. *Cancer*, 1982. 50(10): p. 2131-8.
132. Dixon, J.M., et al., Long-term survivors after breast cancer. *Br J Surg*, 1985. 72(6): p. 445-8.
133. Galea, M.H., et al., The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1992. 22(3): p. 207-19.
134. Elston, C.W. and I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991. 19(5): p. 403-10.
135. Carey, L.A., et al., Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006. 295(21): p. 2492-502.
136. Fitzgibbons PL, B.S., Chen Y, Connolly JL, Baca ME, Edgerton M, Hayes DF, Hill KA, Kleer C, Lester SC, O'Malley FP, Page DL, Simpson JF, Simpson R, Smith BL, Tan LK, Weaver DL, Winer E, American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual 8th ed. 2018.
137. Rosen, P.P. and S. Groshen, Factors influencing survival and prognosis in early breast carcinoma (T1N0M0-T1N1M0). Assessment of 644 patients with median follow-up of 18 years. *Surg Clin North Am*, 1990. 70(4): p. 937-62.
138. Veronesi U, G.V., Zurrada S, Merson M, Luini GA, Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. *The Breast*, 1993. 2(4): p. 224-228.

139. Roses, D.F., et al., Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (TINOMO) breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1982. 78(6): p. 817-20.
140. Abramowitz, M.C., et al., Dermal lymphatic invasion and inflammatory breast cancer are independent predictors of outcome after postmastectomy radiation. *Am J Clin Oncol*, 2009. 32(1): p. 30-3.
141. Karak, S.G., et al., Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. *Conn Med*, 2010. 74(1): p. 17-21.
142. Gerdes, J., et al., Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 1984. 133(4): p. 1710-5.
143. Kamel, O.W., et al., Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. *Am J Pathol*, 1989. 134(1): p. 107-13.
144. Goldhirsch, A., et al., Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 2009. 20(8): p. 1319-29.
145. Goldhirsch, A., et al., Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*, 2011. 22(8): p. 1736-47.
146. Goldhirsch, A., et al., Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 2013. 24(9): p. 2206-23.
147. Aleskandarany, M.A., et al., MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 127(3): p. 591-9.
148. Bustreo, S., et al., Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. 157(2): p. 363-371.
149. Munzone, E., et al., Prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with node-negative, triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. 134(1): p. 277-82.
150. Trihia, H., et al., Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer*, 2003. 97(5): p. 1321-31.

151. Pierga, J.Y., et al., Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1996. 37(1): p. 57-64.
152. Sahin, A.A., et al., Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer*, 1991. 68(3): p. 549-57.
153. Hammond, M.E., et al., American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*, 2010. 6(4): p. 195-7.
154. Anderson, W.F., et al., Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat*, 2002. 76(1): p. 27-36.
155. Clark, G.M., C.K. Osborne, and W.L. McGuire, Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol*, 1984. 2(10): p. 1102-9.
156. Fisher, B., et al., Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol*, 1988. 6(7): p. 1076-87.
157. Bardou, V.J., et al., Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*, 2003. 21(10): p. 1973-9.
158. Slamon, D.J., et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989. 244(4905): p. 707-12.
159. Rakha, E.A., et al., Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol*, 2015. 68(2): p. 93-9.
160. Kallioniemi, O.P., et al., Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer*, 1991. 49(5): p. 650-5.
161. Bhargava, R., et al., EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol*, 2005. 18(8): p. 1027-33.

162. DiGiovanna, M.P., et al., Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 2005. 23(6): p. 1152-60.
163. Chen, S., et al., FGFR1 and HER1 or HER2 co-amplification in breast cancer indicate poor prognosis. *Oncol Lett*, 2018. 15(6): p. 8206-8214.
164. Gilchrist, K.W., et al., Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node-positive breast cancer: a 10-year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol*, 1993. 11(10): p. 1929-35.
165. Dabbs, D.J., Ductal carcinoma of breast: nuclear grade as a predictor of S-phase fraction. *Hum Pathol*, 1993. 24(6): p. 652-6.
166. Lipponen, P., et al., Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*, 1994. 30A(14): p. 2068-73.
167. Berardo, M.D., et al., bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer*, 1998. 82(7): p. 1296-302.
168. Zhang, G.J., et al., The role of bcl-2 expression in breast carcinomas (Review). *Oncol Rep*, 1998. 5(5): p. 1211-6.
169. Roos, G., et al., Telomerase activity in relation to p53 status and clinicopathological parameters in breast cancer. *Int J Cancer*, 1998. 79(4): p. 343-8.
170. Lu, L., et al., Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Res*, 2011. 13(3): p. R56.
171. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010. 140(6): p. 883-99.
172. Shankaran, V., et al., IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 2001. 410(6832): p. 1107-11.
173. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(11): p. 836-48.
174. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011. 331(6024): p. 1565-70.

175. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 137-48.
176. Vesely, M.D., et al., Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 2011. 29: p. 235-71.
177. Diamond, M.S., et al., Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med*, 2011. 208(10): p. 1989-2003.
178. Teng, M.W., et al., Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res*, 2012. 72(16): p. 3987-96.
179. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 2011. 480(7378): p. 480-9.
180. Mantovani, A. and A. Sica, Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*, 2010. 22(2): p. 231-7.
181. Leon-Ferre, R.A., et al., Impact of histopathology, tumor-infiltrating lymphocytes, and adjuvant chemotherapy on prognosis of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. 167(1): p. 89-99.
182. Gu-Trantien, C., et al., CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*, 2013. 123(7): p. 2873-92.
183. Liu, F., et al., CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 130(2): p. 645-55.
184. Seo, A.N., et al., Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer*, 2013. 109(10): p. 2705-13.
185. Loi, S., et al., Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol*, 2019: p. JCO1801010.
186. Yang, X., et al., Evaluation of the Predictive and Prognostic Values of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in HER2-Positive Breast Cancers treated with neoadjuvant chemotherapy. *Target Oncol*, 2018. 13(6): p. 757-767.
187. Adams, S., et al., Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*, 2014. 32(27): p. 2959-66.

188. Loi, S., et al., Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*, 2013. 31(7): p. 860-7.
189. Garcia-Tejido, P., et al., Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin Med Insights Oncol*, 2016. 10(Suppl 1): p. 31-9.
190. Mao, Y., et al., The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 2016. 11(4): p. e0152500.
191. Bilik, R., et al., Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 1989. 28(2): p. 143-7.
192. Horny, H.P. and H.A. Horst, Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1986. 409(2): p. 275-86.
193. Whiteside, T.L., et al., Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltrating human breast carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*, 1986. 23(3): p. 169-78.
194. Whitford, P., et al., Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer*, 1990. 62(6): p. 971-5.
195. Patel, D.A., et al., Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of survival in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2019.
196. Mahmoud, S.M., et al., Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2011. 29(15): p. 1949-55.
197. Liu, S., et al., Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res*, 2014. 16(5): p. 432.
198. Ali, H.R., et al., Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*, 2014. 25(8): p. 1536-43.
199. Baker, K., et al., Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology*, 2011. 58(7): p. 1107-16.

200. Chen, Z., et al., Intratumoral CD8(+) cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e95475.
201. Liu, S., et al., CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2012. 14(2): p. R48.
202. Matsumoto, H., et al., Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. 156(2): p. 237-47.
203. Teles, A., et al., Origin of Foxp3(+) cells during pregnancy. *Am J Clin Exp Immunol*, 2013. 2(3): p. 222-33.
204. Gupta, S., et al., Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol*, 2007. 46(6): p. 792-7.
205. Grimmig, T., et al., The role of FOXP3 in disease progression in colorectal cancer patients. *Oncoimmunology*, 2013. 2(6): p. e24521.
206. Dennis, K.L., et al., Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol*, 2013. 25(6): p. 637-45.
207. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Perkins, J. A., Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th ed. ed. 2015.
208. Bates, G.J., et al., Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, 2006. 24(34): p. 5373-80.
209. Merlo, A., et al., FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2009. 27(11): p. 1746-52.
210. Ladoire, S., F. Martin, and F. Ghiringhelli, Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. 60(7): p. 909-18.
211. Ladoire, S., et al., Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 125(1): p. 65-72.
212. Lee, S., et al., Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. *Acta Oncol*, 2013. 52(1): p. 73-81.

213. Mahmoud, S.M., et al., An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 127(1): p. 99-108.
214. Ladoire, S., et al., Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(8): p. 2413-20.
215. Miyashita, M., et al., Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res*, 2015. 17: p. 124.
216. Guo, L., et al., PD-L1 expression and CD274 gene alteration in triple-negative breast cancer: implication for prognostic biomarker. Springerplus, 2016. 5(1): p. 805.
217. Thompson, E.D., et al., PD-L1 expression and the immune microenvironment in primary invasive lobular carcinomas of the breast. *Mod Pathol*, 2017. 30(11): p. 1551-1560.
218. Bertucci, F., et al., PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. *Oncotarget*, 2015. 6(15): p. 13506-19.
219. Muenst, S., et al., Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. 146(1): p. 15-24.
220. Sabatier, R., et al., Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(7): p. 5449-64.
221. Wockel, A., et al., Update Breast Cancer 2018 (Part 3) - Genomics, Individualized Medicine and Immune Therapies - in the Middle of a New Era: Prevention and Treatment Strategies for Early Breast Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2018. 78(11): p. 1110-1118.
222. DeNardo, D.G., et al., CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 2009. 16(2): p. 91-102.

223. Singla, R.D., J. Wang, and D.K. Singla, Regulation of Notch 1 signaling in THP-1 cells enhances M2 macrophage differentiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. 307(11): p. H1634-42.
224. Mantovani, A., et al., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004. 25(12): p. 677-86.
225. Su, S., et al., A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2014. 25(5): p. 605-20.
226. Zhang, Y., et al., High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e76147.
227. Campbell, M.J., et al., Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 128(3): p. 703-711.
228. Medrek, C., et al., The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, 2012. 12: p. 306.
229. Yuan, Z.Y., et al., High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther*, 2014. 7: p. 1475-80.
230. Gwak, J.M., et al., Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0125728.
231. Wolff, A.C., et al., Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*, 2018.
232. Wolff, A.C., et al., Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 2013. 31(31): p. 3997-4013.

233. Dieci, M.V., et al., Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol*, 2015. 26(8): p. 1698-704.
234. Stanton, S.E. and M.L. Disis, Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*, 2016. 4: p. 59.
235. Karnik, T., et al., PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. *Hum Pathol*, 2018. 72: p. 28-34.
236. Garon, E.B., et al., Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2015. 372(21): p. 2018-28.
237. Silva, M.A., et al., PD-L1 immunostaining scoring for non-small cell lung cancer based on immunosurveillance parameters. *PLoS One*, 2018. 13(6): p. e0196464.
238. Yang, M., et al., Stromal Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Conferring Poor Prognosis of Patients with Basal-Like Breast Carcinoma. *J Cancer*, 2018. 9(13): p. 2308-2316.
239. Hammond, M.E., et al., American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2010. 28(16): p. 2784-95.
240. Fitzgibbons, P.L., et al., Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*, 2014. 138(5): p. 595-601.
241. Kaplan, H.G., J.A. Malmgren, and M.K. Atwood, Triple-negative breast cancer in the elderly: Prognosis and treatment. *Breast J*, 2017. 23(6): p. 630-637.
242. Darouich, S., et al., Triple negative breast cancer: A clinico-epidemiological and histopronostic study of 90 cases. *Tunis Med*, 2017. 95(1): p. 37-44.
243. Pan, Y., et al., P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. *PLoS One*, 2017. 12(2): p. e0172324.
244. Rubovszky, G., et al., Significance of histomorphology of early triple-negative breast cancer. *Pathol Oncol Res*, 2012. 18(4): p. 823-31.
245. Pruneri, G., et al., Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 2016. 27(2): p. 249-56.

246. Cheung, K., et al., Clinical outcome of triple-negative primary breast cancer in older women: Comparison with their younger counterparts. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. 29(15_suppl): p. 1057-1057.
247. Thike, A.A., et al., Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol*, 2010. 34(7): p. 956-64.
248. Aapro, M. and H. Wildiers, Triple-negative breast cancer in the older population. *Ann Oncol*, 2012. 23 Suppl 6: p. vi52-5.
249. Kaplan, H.G., J.A. Malmgren, and M. Atwood, T1N0 triple negative breast cancer: risk of recurrence and adjuvant chemotherapy. *Breast J*, 2009. 15(5): p. 454-60.
250. Stark, A., et al., Advanced stages and poorly differentiated grade are associated with an increased risk of HER2/neu positive breast carcinoma only in White women: findings from a prospective cohort study of African-American and White-American women. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. 107(3): p. 405-14.
251. Ugras, S., et al., Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status predict lymphovascular invasion and lymph node involvement. *Ann Surg Oncol*, 2014. 21(12): p. 3780-6.
252. Loi, S., et al., Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*, 2014. 25(8): p. 1544-50.
253. Takenaka, M., et al., FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol*, 2013. 1(4): p. 625-632.
254. Botti, G., et al., Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Tumor Expression Is Associated with a Better Prognosis and Diabetic Disease in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(2).
255. Wu, Z., et al., Predictive and prognostic value of PDL1 protein expression in breast cancer patients in neoadjuvant setting. *Cancer Biol Ther*, 2019. 20(6): p. 941-947.
256. Uhercik, M., et al., Clinical Significance of PD1 and PDL1 in Human Breast Cancer. *Anticancer Res*, 2017. 37(8): p. 4249-4254.

257. Ghebeh, H., et al., FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 57.

258. Brockhoff, G., et al., The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget*, 2018. 9(5): p. 6201-6212.



