



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. A. Büge ÖZ**

# **MEME KARSİNOMLARINDA PD-L1 EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Reha AKPINAR**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Şennur İLVAN**

**İSTANBUL - 2019**

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, Őekil, fotoęraf ve tablolardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hųkųmlerine tabiidir.

Bu tez İstanbul Őniversitesi Bilimsel AraŐtırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiŐtir.

(Proje Kodu:TTU-2018-30597)

## ÖNSÖZ

*İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca;*

*Liderliği, özverisi ve bilgi birikimiyle her daim destek ve örnek olan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. A. Büge Öz'e,*

*Eğitimimin ve tezimin her aşamasında özverisi, bilgi birikimi, çalışma azmi ve motivasyonu ile her daim destek ve örnek olan tez danışmanım Prof. Dr. Şennur İlvan'a,*

*Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini özveri ve sabırla aktaran, bana patolojiyi sevdiren tüm değerli hocalarıma ve uzmanlarıma,*

*Her biriyle ayrı ayrı pek çok anı biriktirdiğim, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma,*

*Eğitimim ve tez sürecinde benden yardımlarını esirgemeyen Banu-Bülent Tata'ya ve birlikte çalıştığım diğer tüm laboratuvar çalışanlarımıza,*

*Tüm hasta kabul ve rapor sekreterlerimize, idari sekreterimiz İlker Koca'ya,*

*Eğitim süresi boyunca yardımcı olan personellerimize,*

*Eğitimimde katkısı olan tüm öğretmenlerime,*

*Samimi, vefalı arkadaşlarıma, yıllanmış dostlarıma,*

*Doğumumdan bugüne kadar, özveriyle pek çok açıdan yetiştirmemi sağlayan, her daim yanımda ve destek olan annem ve babam Nilda - Ahmet Akpınar'a,*

*Yolumu aydınlatan ve her daim yanımda olan abilerim Op. Dr. Aykut Akpınar ve Op. Dr. Ayhan Akpınar'a,*

*Patolojiyi seçmemde ve sevmemde katkısı olan ablam Dr. Eda Akpınar'a,*

*Bana enerji veren biricik yeğenlerim Ayda ve Kutay'a,*

*Schatz'a..*

*Hayatıma rengini katan herkese*

*Teşekkür ederim.*

*Saygılarımla*  
*Dr. Reha AKPINAR*

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|  |     |
|--|-----|
| ÖNSÖZ.....   | I   |
| İÇİNDEKİLER .....  | II  |
| KISALTMALAR .....  | V   |
| TABLO LİSTESİ .....  | VII |
| ŞEKİL LİSTESİ.....   | IX  |
| RESİM LİSTESİ.....   | X   |
| GRAFİK LİSTESİ .....   | XI  |
| ÖZET.....  | XII |
| ABSTRACT .....   | XIV |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....  | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....  | 3   |
| 2.1. MEME EMBRİYOLOJİSİ VE GELİŞİMİ.....                                 | 3   |
| 2.2. MEME ANATOMİSİ .....  | 3   |
| 2.3. MEME HİSTOLOJİSİ .....  | 4   |
| 2.4. İNVAZİV MEME KARSİNOMLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ VE<br>ETİYOLOJİSİ..... | 6   |
| 2.5. MEME KARSİNOMLARINDA PROGNOSTİK PARAMETRELER.....                   | 6   |
| 2.5.1. İnvaziv Meme Karsinomlarında WHO Sınıflaması .....                | 7   |
| 2.5.1.1. İnvaziv Karsinom - Spesifiye Edilemeyen Tip.....                | 7   |
| 2.5.1.2. İnvaziv Karsinomların Özel Alt Tipleri.....                     | 10  |
| 2.5.1.2.1. İnvaziv Lobüler Karsinom.....                                 | 10  |
| 2.5.1.2.2. Tübüler Karsinom.....   | 10  |
| 2.5.1.2.3. Kribriform Karsinom.....                                      | 10  |
| 2.5.1.2.4. Medüller Özellikler Gösteren Karsinomlar .....                | 11  |
| 2.5.1.2.5. Metaplastik Karsinom.....                                     | 11  |
| 2.5.1.2.6. Apokrin Diferansiyasyon Gösteren Karsinom.....                | 12  |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5.1.2.7. Müsinöz Karsinom.....   | 12        |
| 2.5.1.2.8. Taşlı Yüzük Hücre Diferansiasyonu Gösteren Karsinom .....                   | 12        |
| 2.5.1.2.9. Nöroendokrin Özellikler Gösteren Karsinom.....                              | 13        |
| 2.5.1.2.10. İnvaziv Papiller Karsinom.....   | 13        |
| 2.5.1.2.11. İnvaziv Mikropapiller Karsinom.....  | 13        |
| 2.5.1.2.12. Nadir Görülen Meme Karsinomu Tipleri.....                                  | 13        |
| 2.5.1.2.13. İnflamatuar Karsinom .....   | 13        |
| 2.5.1.2.14. Bilateral Meme Karsinomu .....   | 14        |
| 2.5.2. Meme Karsinomlarında Evreleme.....  | 14        |
| 2.5.2.1. Tümör (T).....  | 14        |
| 2.5.2.2. Bölgesel Lenf Nodları (N) .....   | 16        |
| 2.5.2.3. Metastaz (M):.....  | 18        |
| 2.5.3. Histolojik Grade'in Belirlenmesi.....   | 18        |
| 2.5.4. ER ve PR Ekspresyonu .....  | 19        |
| 2.5.5. HER2 Ekspresyonu.....   | 19        |
| 2.5.6. Ki-67 Proliferasyon İndeksi .....   | 20        |
| 2.5.7. Meme Karsinomlarında Gen Ekspresyon Profili.....                                | 21        |
| 2.6. TÜMÖR VE İMMUNİTE .....   | 22        |
| 2.6.1. Tümör ve İmmun Düzenlenme.....  | 24        |
| 2.6.2. Tümör ve Mikroçevresi .....   | 24        |
| 2.6.3. İmmun Kontrol Noktaları .....   | 26        |
| 2.6.3.1. CTLA-4 Yolağı.....  | 27        |
| 2.6.3.2. PD-1 Üretimi ve Düzenlenimi .....   | 28        |
| 2.6.3.3. PD-L1 Üretimi ve Düzenlenimi.....   | 30        |
| 2.6.4. T ve B Lenfositlerinde PD-1/PD-L1 Mekanizması.....                              | 34        |
| 2.7. PD-L1'İN SAPTANMASI VE PD-L1 ANTİKORUNUN ÖZELLİKLERİ.....                         | 35        |
| 2.8. MEME KARSİNOMLARINDA TEDAVİ.....  | 38        |
| <b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>   | <b>40</b> |
| 3.1. OLGULARIN SEÇİMİ VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ .....            | 40        |
| 3.2. OLGULARDAN ÖRNEK ALINMASI, DOKU DİZİNİ OLUŞUMU VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA..... | 41        |
| 3.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....                              | 42        |
| 3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....   | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. BULGULAR .....</b>   | <b>45</b> |
| 4.1. GENEL BULGULAR.....   | 45        |
| 4.2. PD-L1 İMMUNHİSTOKİMYA BULGULARI.....                        | 50        |
| 4.3. PD-L1 BULGULARI İLE HASTALARA AİT PARAMETRELERİN İLİŞKİSİ.. | 54        |
| 4.4. HASTALARIN YAŞAMLARIYLA İLGİLİ PARAMETRELERİN ANALİZİ ....  | 59        |
| 4.4.1. Toplam Sağ Kalım İle İlgili Sonuçlar.....                 | 60        |
| 4.4.2. Hastalısız Sağ Kalım İle İlgili Sonuçlar .....            | 63        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>   | <b>66</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>85</b> |



## KISALTMALAR

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>AJCC</b>                    | : American Joint Committee on Cancer - Amerikan Birleşik Kanser Komitesi                              |
| <b>AR</b>                      | : Androgen receptor – androjen reseptörü  |
| <b>ASH</b>                     | : Antijen sunan hücre   |
| <b>BBA</b>                     | : Büyük büyütme alanı   |
| <b>BCR</b>                     | : B cell receptor – B hücre reseptörü   |
| <b>BRCA</b>                    | : Breast cancer susceptibility  |
| <b>Breg</b>                    | : Regulatory B cell – regülatuar B hücresi  |
| <b>CTLA-4</b>                  | : Cytotoxic T lymphocyte associated protein4 – sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4               |
| <b>DCIS</b>                    | : Ductal carcinoma in situ – İn situ duktal karsinom  |
| <b>EGF</b>                     | : Epidermal growth factor – epidermal büyüme faktörü  |
| <b>EGFR</b>                    | : Epidermal growth factor receptor –epidermal büyüme faktörü reseptörü                                |
| <b>ER</b>                      | : Estrogen Receptor -Östrojen reseptörü   |
| <b>GCDFP-15</b>                | : Gross cystic disease fluid protein-15   |
| <b>GM-SFC</b>                  | : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor - granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör        |
| <b>HER2</b>                    | : Human epidermal growth factor receptor 2  |
| <b>HIF-1</b>                   | : Hipoksi inducible factor-1  |
| <b>IASLC</b>                   | : International association for the study of lung cancer - Uluslararası akciğer kanseri çalışma grubu |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | : İnterferon gamma  |
| <b>Ig</b>                      | : Immunglobulin   |
| <b>IL</b>                      | : Interleukin   |
| <b>IRF-1</b>                   | : Interferon regulatory factor 1  |
| <b>ISH</b>                     | : In situ hybridization – in situ hibridizasyon   |
| <b>ITIM</b>                    | : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif - immünoreseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi     |
| <b>ITSM</b>                    | : Immunoreceptor tyrosine-based switch motif - immünoreseptör tirozin bazlı anahtarı motifi           |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>İDK-SET</b> | : Invasive ductal carcinoma-no special type - invaziv duktal karsinom-<br>spesifiye edilemeyen tip |
| <b>İHK</b>     | : İmmunhistokimya  |
| <b>MAPK</b>    | : Mitogen activated protein kinase   |
| <b>MDSC</b>    | : Myeloid derived supressor cells - myeloid kökenli süpresör hücreler                              |
| <b>MHC</b>     | : Major histocompatibility complex   |
| <b>miRNA</b>   | : mikro RNA  |
| <b>MMP</b>     | : Matrix metalloproteinase – matriksmetalloproteinaz   |
| <b>mRNA</b>    | : messenger ribonükleit asit   |
| <b>NF-κB</b>   | : Nuclear factor-κB -  |
| <b>NK</b>      | : Natural killer – doğal öldürücü  |
| <b>PD-1</b>    | : Programmed cell death-1 - programlanmış hücre ölümü-1  |
| <b>PD-L1</b>   | : Programmed death ligand-1 - programlanmış hücre ölüm ligandı-1                                   |
| <b>PI3K</b>    | : Phosphoinositide-3-kinase  |
| <b>PR</b>      | : Progesterone Receptor- Progesteron reseptörü   |
| <b>SHP-I</b>   | : Src homolog fosfataz-I   |
| <b>SHP-II</b>  | : Src homolog fosfataz-II  |
| <b>SISH</b>    | : Silver in situ hybridization   |
| <b>STAT</b>    | : Signal transducer and activator of transcription   |
| <b>STL</b>     | : Sitotoksik T lenfosit  |
| <b>TCR</b>     | : T cell receptor – T hücre reseptörü  |
| <b>TDLÜ</b>    | : Terminal Duktal Lobuler Ünite  |
| <b>TGF-β</b>   | : Transforming growth factor-β   |
| <b>Th</b>      | : T helper lenfosit  |
| <b>TİL</b>     | : Tümörle ilişkili lenfosit  |
| <b>TLS</b>     | : Tertiary lenfoid structure - tersiyer lenfoid yapı   |
| <b>TNF-α</b>   | : Tumor necrosis factor-α  |
| <b>Treg</b>    | : Regulatory T cell – reglutar T hücre   |
| <b>VEGF</b>    | : Vascular endothelial growth factor - vasküler endotelial büyüme<br>faktörü                       |
| <b>WHO</b>     | : World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü  |



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 1:</b> Meme tümörlerinin sınıflaması (WHO-2012) .....  | 9  |
| <b>Tablo 2:</b> Patolojik ve klinik olarak T evrelemesi .....   | 15 |
| <b>Tablo 3:</b> Patolojik olarak N evrelemesi.....  | 17 |
| <b>Tablo 4:</b> Uzak metastaz evrelemesi.....   | 18 |
| <b>Tablo 5:</b> Modifiye Bloom Richardson grade'leme sistemine göre skorlama.....                                     | 19 |
| <b>Tablo 6:</b> Modifiye Bloom Richardson grade'leme sistemine göre grade değeri .....                                | 19 |
| <b>Tablo 7:</b> İmmunhistokimya ile HER2'nin değerlendirilmesi.....   | 20 |
| <b>Tablo 8:</b> Dual prob ISH ile yapılmış HER2 sonuçlarının yorumlanması .....                                       | 20 |
| <b>Tablo 9:</b> Single prob ISH ile yapılmış HER2 sonuçlarının yorumlanması .....                                     | 20 |
| <b>Tablo 10:</b> PD-L1 immünohistokimya boyaları ve ilaçları .....  | 37 |
| <b>Tablo 11:</b> Diğer PD-L1 antikorlarının firmalara göre listesi.....   | 37 |
| <b>Tablo 12:</b> Çalışmaya alınan vakaların histolojik tümör tipleri.....   | 46 |
| <b>Tablo 13:</b> Histolojik grade açısından vakaların dağılımı .....  | 46 |
| <b>Tablo 14:</b> Tümörde stromal ve iltihabi yanıt dereceleri.....  | 47 |
| <b>Tablo 15:</b> Olgularda perinöral ve lenfatik invazyon görülme oranları.....                                       | 47 |
| <b>Tablo 16:</b> HER2 immünohistokimya sonuçları.....   | 48 |
| <b>Tablo 17:</b> Vakaların ER, PR ve HER2 ekspresyonlarına göre dağılımı .....  | 48 |
| <b>Tablo 18:</b> Tanı yıllarına göre vaka sayısı .....  | 49 |
| <b>Tablo 19:</b> Tümör hücreleri ve tümörle ilişkili immün hücrelerde PD-L1 sonuçları .....                           | 53 |
| <b>Tablo 20:</b> PD-L1 boyanma şiddetlerinin heterojen dağılımı.....  | 53 |
| <b>Tablo 21:</b> Histolojik grade ve parametrelerin skoruna göre PD-L1 ekspresyonunun dağılımı.....                   | 55 |
| <b>Tablo 22:</b> Stromal ve iltihabi hücre yanıtı ile PD-L1'in ilişkisi.....  | 55 |
| <b>Tablo 23:</b> PD-L1 ekspresyonu ile perinöral, lenfatik invazyon ve bölgesel lenf nodu metastazının ilişkisi ..... | 56 |
| <b>Tablo 24:</b> PD-L1 ekspresyonu ile ER, PR ve HER2 durumunun ilişkisi.....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 25:</b> ER, PR, HER2 ekspresyon durumuna göre gruplanan vakaların PD-L1 ile boyanma oranları .....                    | 57 |
| <b>Tablo 26:</b> Tanı yıllarına göre PD-L1 ekspresyonunun dağılımı .....   | 58 |
| <b>Tablo 27:</b> Gruplanmış tanı yıllarına göre PD-L1 pozitif vakaların dağılımı.....  | 58 |
| <b>Tablo 28:</b> PD-L1 pozitifliği ile diğer parametrelerin ilişkisi .....   | 59 |
| <b>Tablo 29:</b> Olgulara ait nüks ve sağkalım bilgileri .....   | 60 |
| <b>Tablo 30:</b> PD-L1 ekspresyonuna göre sağ kalım durumu.....  | 60 |
| <b>Tablo 31:</b> Cox regresyon analizi .....   | 61 |
| <b>Tablo 32:</b> Tümör boyutu ile sağ kalım korelasyonu .....  | 62 |
| <b>Tablo 33:</b> Sağ kalım ile perinöral, lenfatik invazyon korelasyonu .....  | 62 |
| <b>Tablo 34:</b> Nüks ve PD-L1 ekspresyon durumuna göre vakaların dağılımı.....  | 63 |
| <b>Tablo 35:</b> Tümör boyutu ile hastalısız sağ kalım ilişkisi .....  | 64 |
| <b>Tablo 36:</b> Hastalısız sağ kalım durumuna göre vakaların histolojik grade ve pleomorfizm-mitoz skorlarının dağılımı ..... | 64 |
| <b>Tablo 37:</b> Hastalısız sağ kalım ile perinöral ve lenfatik invazyon ilişkisi .....  | 65 |
| <b>Tablo 38:</b> Cox regresyon analizi .....   | 65 |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 1:</b> İmmun sistemin tümör antijenlerine yanıtı .....   | 22 |
| <b>Şekil 2:</b> Antijen sunan hücre ve T lenfosit yüzeyinde immün yanıtın aktivasyonu ya da inhibisyonunun belirlenmesinde rol alan reseptörler ..... | 23 |
| <b>Şekil 3:</b> İmmun düzenlenme süreci.....  | 24 |
| <b>Şekil 4:</b> Tümör hücreleri ve mikroçevresi arasındaki sinyal ağları .....  | 25 |
| <b>Şekil 5:</b> CTLA-4 ve PD-L1 etki mekanizmaları.....   | 27 |
| <b>Şekil 6:</b> PD-1 ekspresyonunda rol alan sinyal yolakları.....  | 29 |
| <b>Şekil 7:</b> PD-L1 ekspresyonunda rol alan sinyal yolakları .....  | 31 |
| <b>Şekil 8:</b> Ekzomlardaki moleküllerin PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkileri .....   | 34 |
| <b>Şekil 9:</b> T ve B lenfositlerde PD-1/PD-L1 mekanizmasının inhibe ettiği sinyaller .....  | 35 |

# RESİM LİSTESİ

## Sayfa No

|  |    |
|--|----|
| <b>Resim 1:</b> Normal meme dokusunda terminal duktal lobuler ünitelerin histolojik görünümü.....  | 5  |
| <b>Resim 2:</b> Parafin blok doku dizini oluşumu .....   | 41 |
| <b>Resim 3:</b> PD-L1 antikoru (SP263) ile tonsil dokusundaki farklı boyama şiddetleri.....  | 43 |
| <b>Resim 4:</b> PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör hücrelerinde sitoplazmik membranda komplet ve inkomplet pozitif boyanma.....  | 51 |
| <b>Resim 5:</b> PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör hücrelerinde orta şiddette ve kuvvetli boyanma. ....  | 52 |
| <b>Resim 6:</b> Tümör dokusunda PD-L1 antikoru (SP263) ile heterojen boyanma paterni...  | 52 |
| <b>Resim 7:</b> PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör ilişkili immun hücrelerde orta ve zayıf şiddette boyanma. Mavi ok: Zayıf boyanan immun hücreler.....  | 53 |
| <b>Resim 8:</b> PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör ilişkili immun hücrelerde orta şiddette ve kuvvetli boyanma. Kırmızı ok: Orta şiddette boyanan immun hücreler, sarı ok: Kuvvetli boyanan immun hücreler ..... | 54 |

# GRAFİK LİSTESİ

## Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| <b>Grafik 1:</b> PD-L1 sonuçlarına göre vakaların dağılımı .....        | 50 |
| <b>Grafik 2:</b> PD-L1 ekspresyon durumuna göre toplam sağ kalım .....  | 61 |
| <b>Grafik 3:</b> PD-L1 durumuna göre hastalıksız sağ kalım grafiği..... | 63 |



## ÖZET

Meme karsinomu kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kansere bağılı ölümlerin en sık sebebidir. Tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, östrojen reseptörü (estrogen receptor - ER), progesteron reseptörü (progesterone receptor - PR) ve “human epidermal growth factor receptor 2” (HER2) durumuna göre hormonal tedavi ve hedefe yönelik ajanlar uygulanmaktadır. Günümüzde bazı kanser türlerinde onaylanmış ilaçları bulunan, immun kontrol noktalarını hedef alan immunoterapi ile tedavi şekli özellikle bazı meme karsinomu alt tiplerinde gündeme gelmektedir. Ancak hangi hastaların bu tedaviye uygun olduğunu belirlemek için hastadaki tümörün, vücudun immun yanıtıyla olan ilişkisini anlamak gerekmektedir. Tümörün immuniteden kaçışında rol alan programlanmış hücre ölümü-1 (programmed cell death-1 - PD-1) ve sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 - CTLA-4), ilk bulunan ve üzerinde pek çok araştırmanın yapıldığı moleküllerdir.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirilmiş ve meme karsinomu tanısı almış vakalarda, immunhistokimyasal olarak belirlenen programlanmış hücre ölüm ligandı-1 (programmed death ligand-1 - PD-L1)'in ekspresyon durumu ile nüks, sağ kalım bilgileri ve diğer prognostik parametrelerin korelasyonunu araştırmak ve immunoterapi tedavisine uygun hastaların seçimine yardımcı olmak amaçlanmıştır.

Çalışmamıza 2000-2012 yılları arasında, fiksasyondan raporlanma aşamasına kadar tamamen bölümümüzde incelenmiş, tümörün tamamı çıkarılmış, neoadjuvan tedavi almamış, en az 5 yıllık takip bilgilerine ulaşılan, 0,4 cm'den daha büyük boyutta tümörü ve tümöre ait en az iki parafin bloğu olan 358 vaka dahil edildi. Patoloji raporlarından hastanın tanı yaşı, tanı yılı, rezeksiyon tipi, tümör çapı, tümör tipi, histolojik grade'i , Modifiye Bloom Richardson grade'leme sistemine göre skorlama puanları, stromal reaksiyon ve iltihabi hücre yoğunluğu, perinöral ve lenfatik invazyonun durumu, eşlik eden in situ karsinomunun olup olmaması, sentinel lenf nodu ve aksilla lenf nodlarının durumu, tümörün ER, PR, HER2 ekspresyon durumu, ve var

olan Ki-67 sonuçları kaydedildi. Hastaların klinikteki takip dosyalarından en son takibe geldikleri tarih, nüks veya metastaz durumu, varsa nüks veya metastaz tarihi öğrenildi. Vakalara ait H&E boyalı lamlar mikroskopta incelenerek çalışmamıza uygun invaziv tümör alanları işaretlendi. İşaretlenen alanlara ait parafin bloklardan 0,4 cm çapında örnekler alındı ve bu örnekler haritalandırılarak doku dizinleri oluşturuldu. İmmunhistokimyasal olarak PD-L1 antikoru (SP263) uygulanan lamlar mikroskopta incelenerek, tümörde ve immün hücrelerdeki boyanma oranları ve şiddetleri not edildi. PD-L1 sonuçları prognostik parametreler ile karşılaştırıldı ve PD-L1'in toplam ve hastalısız sağ kalım üzerine etkisi araştırıldı.

Değerlendirilen vakaların 90'ında (%24,8) PD-L1 ile tümörde veya tümörle ilişkili lenfosit ve makrofaj gibi immün hücrelerde pozitif boyanma saptandı. Bu vakaların 35'inde hem tümör hem de immün hücrelerde pozitiflik varken, 55'inde sadece immün hücrelerde pozitiflik görüldü. Boyanma görülen tüm vakalarda heterojen bir boyanma paterni saptandı. Toplam ve hastalısız sağ kalım ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. Prognostik parametrelerle PD-L1 ekspresyon durumu karşılaştırıldığında; histolojik grade'in yüksek, pleomorfizm ve mitozun yüksek skor aldığı, stromal yanıtın hafif derecede, iltihabi hücre yanıtının yoğun olduğu, perinöral invazyonun görüldüğü, lenf nodu metastazı olmayan, ER ve PR negatif, HER2 pozitif, KI-67 skoru yüksek vakalarda PD-L1 ekspresyonunun daha fazla olduğu saptandı.

Elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu olarak, özellikle triple negatif ve HER2 eksprese eden meme karsinomlarında, luminal tipe göre PD-L1'in daha çok eksprese edildiğini gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Meme karsinomu, PD-L1, İmmunoterapi

## **ABSTRACT**

Breast carcinoma has the highest incidence among women cancers and the highest mortality due to cancer. The therapy consists of surgery, chemotherapy, radiotherapy and dependent on expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) hormonal therapy treatment. Especially in some breast cancer types established checkpoint targeting immunotherapy strategies are important nowadays. But the right election of patients for these kinds of therapy is dependent from the knowledge of the relation between the tumors and the immunologic response of the patient. Programmed cell death-1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 (CTLA-4), that have an important role for the tumor's escape from immune system, are the first discovered and well studied molecules.

The purpose of our study was to examine the incidence of survival, recurrence and other prognostic factors under immunohistochemically applied PD-L1 and its expression and the consecutive right choice of patients for immunotherapy in Istanbul University-Cerrahpasa, Cerrahpasa Medical School Department of Pathology for breast cancer diagnosed patients.

In this study 358 cases between 2000-2012 completely in our department fixed and examined, completely resected tumors, without neoadjuvant therapy, with more than 5 years of oncologic follow up, tumors bigger than 0,4 cm and consisting of at least 2 paraffin blocks have been examined. The data comprises the age of the patients, the diagnosis date, the resection type, tumor size, tumor type, histologic grade, modified Bloom Richardson score, density of stromal reaction and immune cells infiltration, perineural and lymphatic invasion, incidence of in situ carcinomas, sentinel lymph nodes, axillar lymph nodes, tumors ER, PR and HER2 expression status, and if done Ki-67 results. From the follow up folders of the patients, the last follow up dates, recurrences and metastasis and their dates have been recorded. The H&E slides of the cases have been reviewed under the microscope and the areas with suitable invasive tumors have been marked. Marked areas' samples have been taken from the paraffin



blocks. Samples have been mapped in a configuration and tissue arrays have been created. Immunohistochemically with PD-L1 antibody (SP263) stained slides have been reviewed under the microscope, and staining darkness and percentage in tumor and tumor related immun cells have been noted. PD-L1 results have been compared to prognostic parameters and the impact of PD-L1 on overall survival and disease free survival has been examined.

In 90 cases (%24,8) PD-L1 expression was detected in tumor or tumor related immunocells like lymphocytes and macrophages. While 35 of these cases were positive to tumor and tumor related immun cells, 55 cases were positive only in tumor related immun cells. All positive cases had a heterogenic staining pattern. There wasn't a significant result at statistical analysis between overall survival, disease free survival and PD-L1 expression. Concerning prognostic parameters high histologic grade, high scores in pleomorphism and mitosis, mild stromal reaction, heavy immun cell infiltration, perineural invasion, absence of lymph node metastasis, negativity of ER and PR, HER2 expression, high Ki-67 results had a significant relationship with PD-L1 expression.

Consistently with literature, our results showed, that PD-L1 expression at triple negative and HER2 overexpressed types is more than in luminal type in breast cancers.

**Keywords:** Breast carcinoma, PD-L1, Immunotherapy

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnvaziv meme karsinomları kadınlarda en sık görülen tümör olup, Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization - WHO) verilerine göre de kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer almaktadır (1). Meme karsinomunun prognozunda tümörün histolojik alt tipinin yanı sıra, hastanın yaşı, tümör boyutu, deri ve göğüs duvarı invazyonu, lenfovasküler invazyon, evre, histolojik grade, lenf nodu tutulumu, hormon reseptör durumu, histolojik tip, "human epidermal growth factor receptor 2" (HER2) onkogen aşırı sentezi gibi faktörler de rol almaktadır (2).

Meme karsinomu tedavisinde cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri kullanılır. Hedefe yönelik tedavide östrojen reseptörü (estrogen receptor - ER), progesteron reseptörü (progesterone receptor - PR) durumu ve HER2 onkogen tayini büyük öneme sahiptir. Hormon reseptör ve HER2 ekspresyon durumuna göre, meme karsinomları moleküler alt tiplere ayrılmaktadır. Bunlar luminal A, luminal B, HER2 eksprese eden tip ve triple negatif alt tiplerdir (3).

Son yıllarda bazı kanser türlerinin tedavisinde uygulanan ve üzerinde çok sayıda çalışmanın yapıldığı immunoterapi kanser hastaları için umut vericidir (4). İmmunoterapi, dokuda farklı lokalizasyonlarda bulunan çeşitli immun hücrelerin etkisini artırmayı hedefleyen ajanların kullanıldığı yeni bir tedavi şeklidir (5).

İmmunoterapide hedeflenen kontrol noktası blokerleridir. Bunlar sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 - CTLA-4) ve programlanmış hücre ölüm ligandı-1 (programmed death ligand-1 - PD-L1) molekülleridir. İmmun kontrol noktası blokerleri, kanser hücrelerinin immun sistem hücrelerinden kaçışını sağlayan, immun hücrelerin aktivitesini azaltan mekanizmaları bloke eden moleküllerdir. CTLA-4, B7 molekülüne yerine geçerek T hücre aktivasyonundaki ikincil sinyalin oluşumunu inhibe eder. CTLA-4 inhibitörleri ile bu blokaj inhibe olur ve T hücre aktivasyonu sağlanır. T hücre aktivasyonunu ilk adımda engelleyen CTLA-4'ten farklı olarak, PD-L1 tümör hücrelerine karşı gelişmiş immun yanıtı azaltır. PD-L1'in yüksek oranda bulunması anerji yaratır ve tümör hücrelerinin çoğalmasına uygun ortam sağlar. Pek çok kanserde

programlanmış hücre ölümü-1 (programmed cell death-1 - PD-1), tümörü infiltre eden lenfositlerin yüzeyinde; bunun ligandı olan PD-L1 de tümör hücrelerinin yüzeyinde yüksek oranda bulunmuştur. PD-1 – PD-L1 aksını inhibe eden, yeni bulunan moleküllerin kullanımıyla inflamatuvar sitokinler artar ve tümör hücrelerine karşı immün yanıtta artış sağlanır (6).

Meme karsinomlarında yapılan araştırmalarda, triple negatif ve HER2 eksprese eden alt tiplerde PD-L1 ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur. Kötü gidişli olarak bilinen triple negatif ve HER2 eksprese eden tip meme karsinomu grupları immünoterapiye aday hasta gruplarıdır (7-10).

Bu çalışmamızda, bölümümüzde tanı almış çalışma kriterlerine uygun vakalarda, immunhistokimya (İHK) boyama yöntemiyle PD-L1 varlığını araştırmak, PD-L1'in prognostik önemini ve tümör tipi, tümör çapı, hasta yaşı, aksilla lenf nodu durumu, histolojik grade, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, ER, PR, HER2 ekspresyon durumu gibi parametrelerle ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.MEME EMBRİYOLOJİSİ VE GELİŞİMİ

Meme bezleri süt çizgisi olarak da adlandırılan ektodermdaki kalınlaşma yerinden gelişir. Erken gebelik dönemlerinde meme bezlerinin gelişimi seks hormonlarının etkisinden bağımsızdır. Mezenkim hücreleri meme tomurcuğunun olduğu bölgede birikmeye başlar. Ektodermden gelişen epitelyal sütunlar, meme tomurcuğunda biriken mezenkim hücreleri içinde gelişir; Böylece loblar ve segmentler oluşur (11). 32. haftadan sonra epitelyal sütunlar kanalize olmaya başlar ve dallanır; duktal-lobüler üniteler şekillenmeye başlar. Puberteye kadar meme dokusu kısmen dallanmış laktiferöz duktuslardan oluşur. Ancak asiner diferansiasyon görülmemektedir. Ancak yine de rudimenter olarak bazı lobüller kalabilir. Erkek memesinde ise asinus yapısı görülmez (12).

Puberte döneminde kız çocuklarındaki meme dokusu menstrüel siklusun dönemine göre değişiklik göstermektedir. Östrojen etkisindeki dönemde duktuslarda uzama, dallanma, duktus epitellerinde kalınlaşma ve periduktal bağ dokusunda artış görülür. Progesteron döneminde ise lobüloasiner yapılarda ve bağ dokusunda artış meydana gelmektedir. Meme diskindeki büyüme ve yağ dokusunun da artışıyla meme bezleri protrüde hale gelir. Erişkin kadında ise meme dokusu terminal duktal lobuler ünitelerden (TDLÜ) oluşur. Meme asinuslarında gerçekleşen terminal diferansiasyon sadece gebelikte meydana gelir (12).

### 2.2.MEME ANATOMİSİ

Meme bezleri vücudun anteriorunda, bilateral olarak süt çizgisi üzerinde gelişen ağırlığı 30 gr ile 1000 gr arasında kişiye göre değişen yağ dokusundan zengin yapılardır. Kostaların ön yüzünde yer alan pectoralis majör kasının üzerinde, süperfisial ve derin fasyalar arasında yerleşmektedir. Süperfisial fasya, servikal süperior fasya ve Cooper ligamanının inferiorundaki süperfisial abdominal fasya ile devam etmektedir. Vertikal olarak 2. – 6. kostaların, horizontal olarak sternum kenarıyla midaksiller çizginin arasında yer almaktadır. Kaslarda ise lateralinde serratus anterior kası, inferiorunda eksternus

obliquus kası ve rektus kılıfının üst kısmı yer almaktadır. Cooper ligamanlarıyla ilişkili olan meme dokusu içindeki fibröz bağ dokusu memeyi yapısını destekler (13).

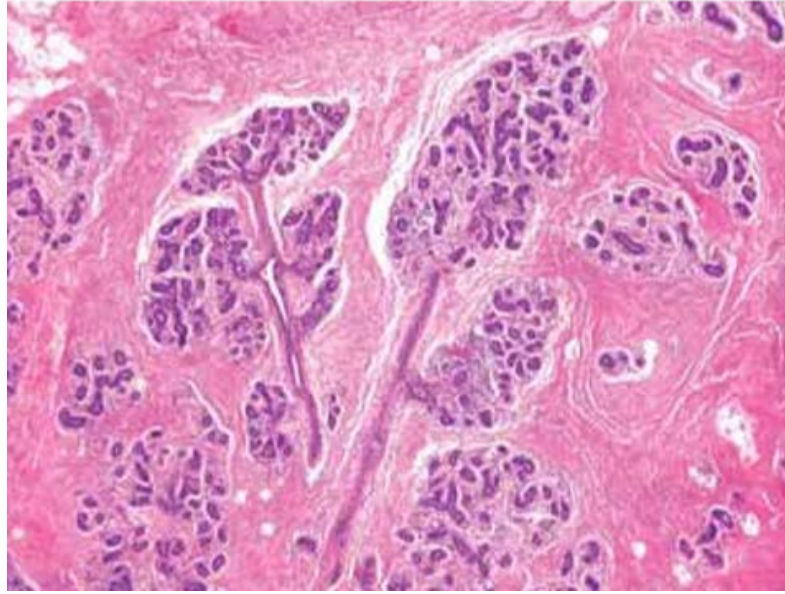
Memenin kuyruk bölgesi aksillaya uzanabilmektedir. Pektoral fasyada mikroskopik olarak da yer alabilmektedir. Bu nedenle bazı vakalarda mastektomi yeterli olamayabilmektedir.

Memenin kanlanması arteria mammaria interna, arteria mammaria eksterna ve arteria interkostalisler ile sağlanmaktadır. Venöz dönüşü de arterlere paralel seyretmekte olup vena mammaria interna, vena mammaria eksterna ve vena interkostalisler ile sağlanmaktadır. Memenin dokusunun duyuşsal innervasyonu 2-6. interkostal sinirinin cutaneus anterior ve cutaneus lateralis dalları ile supraklaviküler sinirden gelen dallardan sağlanır. Memenin lenfatik drenajı ise yüzeyel, aksiller, internal torasik ve posterior interkostal lenfatikler olmak üzere dört ana yolla sağlanır. Aksiller lenf nodları bu drenajın %75'ini sağlar (13).

### **2.3.MEME HİSTOLOJİSİ**

Erişkin erkeklerde meme dokusu kollajen ve adipöz doku içinde dallanan duktuslardan oluşur, lobül yapısı içermez. Pubertede ve sonrasında erkek meme dokusu fibroadipöz dokudan ve alçak küboidal epitel ile döşeli duktuslardan oluşmaktadır (12).

Erişkin kadınlarda meme dokusu; iki tip epitelyal hücre ve iki tip stroma içermektedir. Yapı olarak TDLÜ'lerden oluşmaktadır (Resim1). Ünitelerden meme başına doğru uzanan duktuslar, meme başının altında daha büyük duktuslar ve laktiferöz sinüsü oluşturmaktadır. Lobül yapıları arasında interlobüler stroma ve lobül içinde de intralobüler stroma mevcuttur. Duktus lümenin iç yüzünü ve asinüsleri döşeyen luminal hücreler ile luminal hücrelerin hemen altında myoepitel hücreleri yer almaktadır (12).



**Resim 1:**Normal meme dokusunda terminal duktal lobuler ünitelerin histolojik görünümü

Luminal hücreler, histolojik olarak küboidal ya da kolumnar özellikte olup TDLÜ’de süt üretimini yapmaktadırlar. Hücrelerin çekirdekleri küçük boyutta, oval ya da yuvarlak şekilde; sitoplazmaları eozinofilik görünümündedir. İmmunohistokimyasal olarak genellikle düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinler (CK 7, 8, 18, 19) ile boyanırlar. Luminal epitel hücrelerinin bazıları ER- $\alpha$ , PR ile pozitifken bazıları negatiftir, difüz bir boyanma göstermezler. Ayrıca kazein,  $\alpha$ -laktalbumin, “gross cystic disease fluid protein-15” (GCDFP-15), mammogloblin, c-kit ile de boyanabilirler (14).

Myoepitelyal hücreler luminal hücreler ile bazal membran arasında yerleşen, matriks üretimi yapan, kontraksiyon yeteneğine sahip hücrelerdir. Histolojik olarak iğsi görünümde olup, küçük yuvarlak nükleusları vardır. Sitoplazmaları şeffaf görünümündedir. İmmunohistokimyasal olarak yüksek molekül ağırlıklı keratinler (CK5/6, CK14, CK17) ile boyanırlar. Ayrıca p63 ile nükleer, SMA (smooth muscle actin) ile sitoplazmik boyanmaları da tanıda yardımcı özellikleridir. S-100, kalponin, CD-10 ile de boyanabilirler (14).

Ayrıca her iki hücre tipine de diferansiye olabilen, her iki hücrenin boyanma özelliğini de gösterebilen, kök hücre olduğu düşünülen bir hücre tipi daha mevcuttur.

Meme başı ve areola çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Meme başında Toker hücreleri de görülebilir. Meme başına kişiden kişiye değişmekle birlikte 5-20 adet laktiferöz sinüs açılabilir. Burada düz kas liflerinden zengin bir bağ dokusu mevcuttur. Düz kas lifleri duktusların proksimalinde daha sirküler yapıdayken, meme başına doğru paralel seyir göstermektedirler (3, 12).

## **2.4.İNVAZİV MEME KARSİNOMLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETİYOLOJİSİ**

Kadınlarda görülen en sık kanser türü meme karsinomu olup WHO'nun son verilerine göre kansere bağlı ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık toplam 2,1 milyon kadın bu hastalıktan etkilenmektedir. Meme kanserinin prognozu ve hastanın yaşam süresinin belirlenmesinde erken tanının önemi büyüktür. Bu nedenle dünya çapında muayene ve görüntüleme yöntemlerini içeren çeşitli tarama programları yürütülmektedir (1).

Türkiye Kanser Daire Başkanlığı 2014 verilerine göre, kadınlarda en sık görülen kanser türü dünyadaki gibi meme kanseridir ve 2010-2014 yılları arasında 37.456 kişi meme kanseri tanısı almıştır. Bu verilere göre meme kanserinin ülkemizdeki yaşa göre standardize hızı 43,0/100.000'dir ve kanser tanısı alan her dört kadından biri meme kanseri tanısı almıştır. Yine bu verilere göre meme kanseri tanısı alan kadınların %44,5'i 50-69 yaş , %40,4'ü 25-49 yaş aralığındadır. Meme kanserinin tanı anındaki evreleri incelendiğinde invaziv vakaların %11,1'i ileri evrededir. Ülkemizde yaklaşık %85 oranı ile en sık invaziv duktal karsinom görülmektedir (15).

Meme kanserinin insidansı sosyoekonomik durum, ırk, yaş gibi parametrelerle ilişkilidir. 75 yaş öncesi kadınlarda Avustralya, Avrupa, Kuzey Amerika'da meme kanseri gelişme riski Afrika, Güney ve Doğu Asya'daki kadınlara göre 3 kat daha fazladır (16).

1990'lı yıllarda görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi, yaygınlaşması ve tedavide hormonoterapinin kullanılmasıyla önemli gelişmeler elde edilmeye başlanmıştır.

Etiyolojisinde kadın cinsiyete sahip olmak, ileri yaş, erken menarş, geç menapoza girmek, ilk doğumun 30 yaşından sonra gerçekleşmesi, "breast cancer susceptibility" (BRCA) -1 ve BRCA-2 gibi genetik mutasyonlara sahip olmak, vücuda dışarıdan hormon alımı, uzun süre oral kontraseptif kullanımı önemli yer tutmakla birlikte, obezite, alkol kullanımı, düzenli spor yapmamak da yer almaktadır (17). Ayrıca kişinin özgeçmişinde meme bölgesini de içeren radyoterapi hikayesinin varlığı, memesinde prekanseröz lezyonların olması, ailede özellikle anne tarafında ve kız kardeşlerinde meme kanseri tanısı olması da meme kanserine yakalanma riskini artırmaktadır (18-20).

## **2.5.MEME KARSİNOMLARINDA PROGNOTİK PARAMETRELER**

Meme karsinomlarının prognozları değişkenlik göstermektedir. Tanıdan sonra tedavinin belirlenebilmesi ve hastanın prognozunun nasıl ilerleyeceği hakkında fikir sahibi

olabilmek için bazı prognostik parametreler saptanmıştır. Prognoz üzerinde en çok etkisi olan faktör hastanın evresidir. Bunu saptamak için Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer - AJCC)'nin "TNM" evreleme sistemi kullanılmaktadır. Tümörün tipi, histolojik grade'i, ER, PR ve HER2 ekspresyon durumları gibi faktörler de prognozda rol almaktadır (2, 18).

### **2.5.1. İnvaziv Meme Karsinomlarında WHO Sınıflaması**

Meme karsinomlarında en çok WHO'nun önerdiği sınıflama kullanılmaktadır (Tablo 1). WHO sınıflaması ilk kez 1982 yılında, en son sınıflama da 2012 yılında yapılmıştır (18).

#### **2.5.1.1. İnvaziv Karsinom - Spesifiye Edilemeyen Tip**

İnvaziv meme kanserlerinin spesifik bir gruba konulamayan tüm tümörlerini içeren, en büyük grubunu oluşturmaktadır. Heterojen olan bu gruptaki tümörlerin tanısında "duktal" kelimesinin kullanımı yaygın olmakla birlikte duktus epitelinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı net değildir.

Mikroskopik olarak infiltratif özelliktedir. Tümör hücreleri kordonlar, kümeler, trabeküller oluşturabilir, sınırsız ya da solid paternde olabilirler.

Ortasında lümeni seçilen tübül yapıları yapan tümör hücreleri tek tek hücreler şeklinde infiltrasyon veya hedef tahtası benzeri yapılar da oluşturabilirler. Sitoplazmaları geniş ve eozinofilik özelliktedir. Nükleusları düzgün, uniform ya da nükleoller seçilebilen pleomorfik görünümde de olabilir. Mitoz görülmeyebileceği gibi yaygın da saptanabilir. Sıklıkla in situ duktal karsinom (DCIS) eşlik eder. Tümörde nekroz ve sekonder kist gelişimi izlenebilir. Stromada da sellüler fibroblastik proliferasyon, hiyalinizasyon siktir (18).

Alt gruplarında, tümörün %50'den fazla komponentini invaziv duktal karsinom-spesifiye edilemeyen tip (İDK-SET)'in oluşturduğu mikst tip karsinom yanı sıra, pleomorfik karsinom, osteoklast benzeri stromal dev hücreler içeren karsinom, koryokarsinomatöz özellikler gösteren karsinom, melanotik özellikler gösteren karsinom gibi nadir tipler de bulunmaktadır.

BRCA-1 mutasyonu gösteren ailesel meme kanserleri, sıklıkla medüller karsinom benzeri özellikler içeren İDK-SET şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Sporadik vakalara göre



daha yüksek mitoz ve daha yoğun lenfositik infiltrasyon göstermektedir. BRCA-2 ilişkili olanlar ise sporadik vakalara göre daha az tübül yapısı ve daha az mitoz göstermektedir (18).

Meme karsinomlarının büyük çoğunluğunu oluşturan bu grubun 10 yıllık sağ kalımı %35-50 civarındadır. ER, PR, HER2 ekspresyon durumu, evre gibi faktörler prognoz belirlenmesinde rol oynamaktadır. ER, PR pozitifliği %70-80 vakada görülürken, HER2 pozitifliği %15 vakada görülmektedir. ER, PR, HER2 ekspresyonuna göre yapılan moleküler gruplamada triple negatif ve HER2 eksprese eden tiplerin kötü prognozlu oldukları saptanmıştır (3, 18).



**Tablo 1:** Meme tümörlerinin sınıflaması (WHO-2012) (18)

|   |   |
|---|---|
| <p><b>EPİTELYAL TÜMÖRLER</b><br/>Mikroinvaziv karsinom<br/><b>İnvaziv Meme Karsinomları</b><br/>İnvaziv meme karsinomu, SET<br/>-Pleomofik karsinom<br/>-Osteoklast benzeri stromal dev hücreler içeren karsinom<br/>-Koryokarsinomatöz özellikler gösteren karsinom<br/>-Melanotik özellikler gösteren karsinom<br/>İnvaziv lobüler karsinom<br/>-Klasik lobüler karsinom<br/>-Solid lobüler karsinom<br/>-Alveoler lobüler karsinom<br/>-Pleomorfik lobüler karsinom<br/>-Tübülobüler lobüler karsinom<br/>-Mikst lobüler karsinom<br/>Tübüler karsinom<br/>Kribriiform karsinom<br/>Müsinöz karsinom<br/>Medüller özellikler gösteren karsinom<br/>-Medüller karsinom<br/>-Atipik medüller karsinom<br/>-Medüller özellikler gösteren invaziv karsinom, SET<br/>Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom<br/>Taşlı yüzük hücre diferansiyasyonu gösteren karsinom<br/>İnvaziv mikropapiller karsinom<br/>Metaplastik karsinom, SET<br/>-Düşük grade'li adenoskuamoz karsinom<br/>-Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom<br/>-Skvamoz hücreli karsinom<br/>-İğsi hücreli karsinom<br/>-Mezenkimal diferansiyasyon gösteren metaplastik karsinom<br/>--Kondroid diferansiyasyon<br/>--Osseöz diferansiyasyon<br/>--Diğer mezenkimal diferansiyasyon tipleri<br/>-Mikst metaplastik karsinom<br/>-Myoepitelyal karsinom<br/>Nadir Tipler:<br/>Nöroendokrin özellikler gösteren karsinom<br/>-Nöroendokrin tümör, iyi diferansiyasyon tip</p> | <p>- Nöroendokrin karsinom, az diferansiyasyon tip (Küçük hücreli karsinom)<br/>- Nöroendokrin diferansiyasyon gösteren karsinom<br/>Sekretuar karsinom<br/>İnvaziv papiller karsinom<br/>Asinik hücreli karsinom<br/>Mukoepidermoid karsinom<br/>Polimorfov karsinom<br/>Onkositik karsinom<br/>Lipidden zengin karsinom<br/>Glikojenden zengin karsinom<br/>Sebase karsinom<br/>Tükürük bezi / Deri eki tipi tümörler<br/>-Silindrom<br/>-Şeffaf hücreli hidradenom<br/><b>Epitelyal-myoepitelyal tümörler</b><br/>Pleomorfik adenom<br/>Adenomyoepitelyoma<br/>-Adenomyoepitelyoma içeren karsinom<br/>Adenoid kistik karsinom<br/><b>Prekürsör lezyonlar</b><br/>İnsitu duktal karsinom<br/>Lobüler neoplaziler<br/>-İnsitu lobüler karsinom<br/>--Klasik in situ lobüler karsinom<br/>--Pleomorfik in situ lobüler karsinom<br/>-Atipik lobüler hiperplazi<br/><b>İntraduktal proliferatif lezyonlar</b><br/>Olağan duktal hiperplazi<br/>Flat epitelyal atipi içeren kolumnar hücreli lezyonlar<br/>Atipik duktal hiperplazi<br/><b>Papiller lezyonlar</b><br/>İntraduktal papillom<br/>-Atipik hiperplazi içeren intraduktal papillom<br/>-İnsitu duktal karsinom içeren intraduktal papillom<br/>-İnsitu lobüler karsinom içeren intraduktal papillom<br/>İntraduktal papiller karsinom<br/>Enkapsüle papiller karsinom<br/>-İnvazyon içeren enkapsüle papiller karsinom<br/>Solid papiller karsinom<br/>-İnsitu<br/>-İnvaziv</p> |
|---|---|

## **2.5.1.2. İnvaziv Karsinomların Özel Alt Tipleri**

### **2.5.1.2.1. İnvaziv Lobüler Karsinom**

Kohezyon yeteneğini kaybetmiş, fibröz stroma içinde kordonlar yapan veya dağınık tek tek duran hücreler görülmektedir. Sıklıkla normal duktus yapıları çevresinde konsantrik, hedef tahtası benzeri bir görünüm oluştururlar. Tümörü oluşturan hücreler ince bir rim şeklinde sitoplazmaya ve yuvarlak ya da çentikli nükleuslara sahiptir. İntrasitoplazmik lümen, mitoz nadirdir ve sıklıkla lobüler neoplazilerle beraberdir. Prognozu İDK-SET'e benzerlik gösterir (18).

Pleomorfik lobüler karsinom belirgin atipi, yüksek mitoz ve belirgin pleomorfizmin görüldüğü, daha kötü prognozlu olan bir alt tipidir. Daha iyi prognozlu olan tübülobüler varyant ya da başka tümörlerle birlikte mikst karsinom şeklinde de görülebilir.

Sıklıkla ER, PR ile pozitif boyanırlar, Ki-67 genellikle düşüktür. Diskoheviz hücrelerden oluşan bu tümörde E-cadherin çoğunlukla negatiftir. Ancak %15 vakada E-cadherin ekspresyonu görülebilir. Ayrıca p120 ile membran yerine sitoplazmik boyanma görülür (18).

### **2.5.1.2.2. Tübüler Karsinom**

İyi diferansiye tübül yapıları tümörün %90'dan fazlasını oluşturmaktadır. Desmoplastik stroma içinde tek katlı epitel ile kaplı ve açık lümenli, köşeli tübüllerden oluşur. Yüksek mitoz, belirgin pleomorfizm, çok tabakalı hücreler görülmez. Epitel hücrelerinin düzgün, belirsiz nükleollü çekirdekleri vardır. Hücrelerin apikal yüzlerinde sitoplazmik çukurluklar görülebilir.

Hemen her zaman ER, PR ile pozitif, HER2 ile negatiftir. Ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor receptor, EGFR), P-Cadherin, p53 ve yüksek molekül ağırlıklı keratinler ile negatiftir. İyi prognozludur (18, 21).

### **2.5.1.2.3. Kribriform Karsinom**

Tübüler karsinomla birlikte de görülebilen bu tümörün %90'ından fazlasını, fibroblastik stroma içinde üreyiş gösteren kribriform patern oluşturur. DCIS'in kribriform paterni ile benzerlik gösterir ve sıklıkla DCIS ile de beraberdir. Aksiller metastazı varsa kribriform paternde görülür. İyi prognoz göstermektedirler (18).

#### **2.5.1.2.4. Medüller Özellikler Gösteren Karsinomlar**

Bu grup içinde medüller karsinom, atipik medüller karsinom ve İDK-SET'in bir alt tipi yer alır. Bu tümörlerde ekspansif sınır, yüksek grade'li veziküler nükleusların varlığı, tümörün %75'inden fazlasında görülen sinsisyal büyüme paterni ve CD3+ T lenfositlerinden zengin ve artmış CD8+ T lenfositleri içeren belirgin bir lenfoid infiltrasyonun varlığı tipiktir. Tübül yapıların izlenmeyişi, mitoz ve belirgin atipik dev hücrelerin görülmesi de diğer sık görülen özelliklerdir. Medüller özellikler gösteren karsinom ve atipik medüller karsinom bu özelliklerin tümünü göstermezler. Bu tümörler genellikle ER, PR ve HER2 negatiftir. İDK-SET'le karşılaştırıldığında uzak metastaz ve nüks daha az görülmektedir (3, 18).

#### **2.5.1.2.5. Metaplastik Karsinom**

Neoplastik epitelin skuamöz ve/veya mezenkimal görünümde bir hücreye diferansiye olduğu tümör tipleridir. Bu grup heterojen olup; düşük grade'li adenoskuamöz karsinom, fibromatozis benzeri metaplastik karsinom/tümör, skuamöz hücreli karsinom, iğsi hücreli karsinom, mezenkimal diferansiasyon (kondroid, osseöz, diğer mezenkimal yapılar) gösteren karsinom yer alır. Tanısında dikkatli ve yeterli sayıda örnekleme yapılması önemli yer tutar. İmmunhistokimyasal olarak sıklıkla ER, PR, HER2 negatiftirler. Yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler (CK5/6, 14) ve p63 değişken oranda boyanabilse de sıklıkla pozitifler. Epitelyal diferansiasyonu göstermek için en az iki belirteç kullanılmalıdır. Aynı boyut ve grade'deki İDK-SET'e göre daha az lenf nodu metastazı görülmekle birlikte alt tiplerine göre prognoz açısından değişkenlik göstermektedir. Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom/tümör ve adenoskuamöz karsinom iyi prognozludur (21).

Düşük gradeli adenoskuamöz karsinom: Yoğun fibrotik veya iğsi hücrelerden zengin stroma içinde iyi forme tübül yapıları veya solid yuvalar oluşturan bir tümördür. Tübül yapıları daha düzgün sınırlı olup daha az köşelenme içerir. Lümenleri komprese olmuş halde görülebileceği gibi keratinöz materyal içeren mikrokistik yapılar şeklinde de izlenebilir (18, 21).

Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom/tümör: Stroma içinde gömülmüş, soluk eozinofilik sitoplazmalı, ince, iğsileşen, hafif atipi de izlenebilen çekirdeklere sahip tümör hücrelerinden oluşur. Daha iyi prognozlu olan bir alt tiptir (18, 21).

Skuamöz hücreli karsinom: Primer meme kaynaklı skuamöz hücreli karsinom tanısı

konulmadan önce, deriden kaynaklanmadığından emin olunmalıdır. Genellikle ortasında kist içeren bir tümördür. Hücrelerde değişen derecelerde atipi ve pleomorfizm mevcuttur, iğsi morfolojide hücreler de içerebilir. Pür veya İDK-SET ile birlikte olabilir.

İğsi hücreli karsinom: Çeşitli paternlerin karışık olarak izlendiği bu tümör, iğsileşen, epiteloid ya da skuamöz morfoloji de gösteren pleomorfik hücrelerden oluşmaktadır. Lenfoid infiltrasyon da görülebilmektedir.

Mezenkimal diferansiyon gösteren metaplastik karsinom: Kondroid, osseöz, rabdomyoid, nöroglial diferansiyon gösterebilen mezenkimal alanlarla beraber, tübül veya solid şekilde karsinom alanları da içerebilen tümörlerdir. Sıklıkla kondroid diferansiyon ve kondroid matriks görülür (18).

#### **2.5.1.2.6. Apokrin Diferansiyon Gösteren Karsinom**

İDK-SET'te sıkça görülebilen bir diferansiyon tipidir. İki tip hücre görülebilmektedir. A tipi hücreler, büyük nükleuslu, belirgin nükleollü, dPAS (diastaza dirençli periyodik asit schiff) pozitif, granüler eozinofilik sitoplazmalıdır. B tipi hücreler ise köpüksü sitoplazmalıdır. Tipik olarak bu diferansiyonu gösteren tümörler Bcl-2 negatif, GCDFP-15 pozitifdir. Ancak ileri evre tümörlerde GCDFP-15 ekspresyonu kaybolabilmektedir. Sıklıkla ER, PR negatif, HER2 pozitifdir (18).

#### **2.5.1.2.7. Müsinöz Karsinom**

Kapiller damarlar içeren ince fibröz septalarla bölünmüş geniş müsin gölleri içinde yüzen küçük, uniform hücrelerden oluşan hücre grupları ile karakterize olan tümör grubu "klasik" veya "tip A" olarak adlandırılmaktadır. Nükleer atipi ve mitoz nadirdir. Geniş hücre grupları içeren "hiperselüler" veya "tip B" grupta ise nöroendokrin diferansiyon sıktır. Bu iki tip birarada da görülebilmektedir. ER, PR ve düşük seviyede androjen reseptörü (androjen receptor, AR) pozitifdir ve HER2 negatiftirler. İyi prognoz göstermektedirler (3, 18).

#### **2.5.1.2.8. Taşlı Yüzük Hücre Diferansiyonu Gösteren Karsinom**

Taşlı yüzük hücreleri, intrasitoplazmik müsin içerir ve sitoplazmasında içerdiği müsin nedeniyle bir kenara itilmiş çekirdeğe sahiptir. Sıklıkla invaziv lobüler karsinomda ve lobüler neoplazilerde görülür, ancak diğer karsinom tiplerinde de izlenebilir. DCIS'ta da gastrik karsinoma benzer şekilde taşlı yüzük hücreleri görülebilir. Metastazdan ayrımı

önemlidir. Bu hücreler ER, PR, GCDFP-15 ile sıklıkla pozitifdir (18).

#### **2.5.1.2.9. Nöroendokrin Özellikler Gösteren Karsinom**

Bu grup tümörler, diğer organlarda görülen nöroendokrin tümörlere benzemektedir ve nöroendokrin markerları eksprese etmektedirler. İyi diferansiye nöroendokrin tümör, küçük hücreli karsinom (az diferansiye nöroendokrin karsinom) ve nöroendokrin diferansiyasyon gösteren invaziv meme karsinomu olarak üç gruba ayrılmaktadır (18).

#### **2.5.1.2.10. İnvaziv Papiller Karsinom**

İnvaziv komponentin %90'ından fazlasını papiller morfoloji gösteren tümör hücreleri oluşturmaktadır. Fibrovasküler kor çevresinde malign epitel hücreleri izlenmektedir. Diğer organlarda görülen papiller morfolojide tümörlerin metastazlarıyla karışabileceği için metastaz olasılığı dışlanmalıdır (18, 22).

#### **2.5.1.2.11. İnvaziv Mikropapiller Karsinom**

Çevresinde boşluk bulunan, küçük, morula benzeri hücre gruplarından oluşan bu tümörde fibrovasküler kor izlenmez. Tümör hücrelerinin çevresindeki boşluk nedeniyle lenfatik invazyon ve fiksasyon artefaktı ile karışabilir. Ancak tümör hücrelerinin apikal yüzleri boşluklara çevrili olacak şekilde dizilmişlerdir ve boşluklar endotelle çevrili değildir. İmmunhistokimyasal olarak ER, PR ve HER2 eksprese edebilirler. Sıklıkla lenf nodu metastazı ve lenfovasküler invazyon gösterirler (18, 22).

#### **2.5.1.2.12. Nadir Görülen Meme Karsinomu Tipleri**

Tükrük bezi/deri eki tipi tümörler grubunda yer alan silindrom ve şeffaf hücreli hidradenom, deride görülen silindrom ve şeffaf hücreli hidroadenom ile benzer özelliklere sahiptirler. Ayrıca sekretuar karsinom, onkositik karsinom, sebace karsinom, lipidden zengin karsinom, glikojenden zengin şeffaf hücreli karsinom, asinik hücreli karsinom gibi oldukça nadir tümörler de meme dokusunda görülebilmektedir. Tükrük bezinde de görülen adenoid kistik karsinom, mukoepidermoid karsinom, polimorfoz karsinom da nadir olarak memede görülebilmektedir (3, 18).

#### **2.5.1.2.13. İnflamatuar Karsinom**

Dermal lenfatiklerdeki tümör trombüslerine bağlı olarak meme derisinde oluşan ödem, kızarıklık gibi değişiklikler nedeniyle histolojik tipten bağımsız olarak kullanılan

linik bir terminolojidir (2, 18).

#### **2.5.1.2.14. Bilateral Meme Karsinomu**

Primer tümörün tanısından itibaren 3 ay içinde karşı memede görülen odak “senkron”; 3ay sonra karşı memede tanı alan odak ise “metakron” olarak adlandırılmaktadır. Ailede meme karsinomu hikayesi, yüksek doz radyoterapi almış olmak, 30 yaş öncesinde ilk tanı alan tümörde hormonal reseptörlerin negatif olması gibi nedenler karşı memenin de tümör gelişimi açısından risk taşıdığını gösterebilir (18).

#### **2.5.2. Meme Karsinomlarında Evreleme**

Meme karsinomu tanısı alan hastaların prognozu birbirlerinden farklı olabilmektedir. Hastalığın takibi ve tedavisinin planlaması için evreleme yapılmaktadır ve tümörle ilgili parametrelere bakılmaktadır.

2017 yılında güncellenen AJCC-8. evreleme sisteminde tümör boyutu (T), lenf nodlarının durumu (N) ve uzak organ metastazının varlığı (M) kullanılmaktadır. T, N ve M parametreleri klinik muayene, radyolojik görüntülemeler ve patolojik incelemelerle değerlendirilmektedir. Bu veriler klinik bulgularla değerlendiriliyorsa “c”, patolojik kanıtı varsa “p”, hasta öncesinde neoadjuvan tedavi almışsa “yp” eklerini almakta; klinik ya da patolojik inceleme yapılmamış ve ilgili parametrenin durumu bilinmiyorsa sonuna “x” ekini alarak yazılmaktadır (2).

##### **2.5.2.1. Tümör (T)**

“T” kategorisi temel olarak invaziv tümör alanının en büyük boyutuyla ilgilidir (Tablo 2). İdeal yaklaşımda; radyolojik görüntülemelerle, makroskopide ve mikroskopide ölçülen tümör boyutlarının karşılaştırılması gerekmektedir. Tümör boyutu verilirken, tümörün bütünlüğü bozulmadan çıkarılmış olması gerekmektedir (2).

Tümörde invaziv alanın ölçüsü 1mm’den küçük ise “mikroinvaziv karsinom” olarak sınıflandırılmaktadır.

Tümörün oluşturduğu stromadaki reaksiyon genellikle tümör boyutuna eklenerek boyut verilmektedir. Ancak neoadjuvan tedavi almış vakalarda terapi etkisinden dolayı oluşan reaksiyon ile ayırd edilmesi zorluk yaratmaktadır ve tümör boyutuna stroma yanıtı eklenmemektedir (2).

“İnflamatuar karsinom” terimi klinikopatolojik bulgular sonucunda kullanılmaktadır. Meme derisinde diffüz ödem veya ödeme bağlı portakal kabuğu görünümünün (peau d’orange) varlığıyla karakterizedir. Bu bulgular lenfatiklerde bulunan tümör trombüsleri nedeniyle görülmektedir ve bu hastalar “cT4d” olarak değerlendirilmektedir. Klinik bulgular olmaksızın mikroskopta görülen tümör trombüslerinin varlığı nedeniyle “inflamatuar karsinom” terminolojisi kullanılmamaktadır. Bu hastalar karakteristik olarak; hızlı ilerleyen, ilk bulgu ile tanı arasında 6 aydan kısa süre olan hastalardır. Lokal ileri meme karsinomu olan hastalarda meme derisinde ödem bulguları olmaksızın ülser varlığı ya da dermiste tümör varlığı nedeniyle inflamatuar karsinom terimi kullanılmamalıdır. Meme başında veya deride görülebilecek çekilme gibi bulgular ise T kategorisini etkilememektedir (2).

Karşı memede de tümör varlığında her iki tümör ayrı sınıflandırılmalıdır. Tümörle ilişkisi bulunmayan satellit tümör nodülleri, tümör boyutuna eklenmemektedir. Aynı memede birden çok odak varlığında ise odakların birbiri ile birleşmediğinden emin olunmalıdır ve en büyük olan boyuttaki tümöre göre evreleme yapılmaktadır. Birbirlerine çok yakın tümörlerde radyolojik, makroskopik, mikroskopik bulgular eşliğinde karar verilmesi önerilmektedir (2).

**Tablo 2:** Patolojik ve klinik olarak T evrelemesi (2)

| <b>T kategorisi</b> | <b>Kriterler</b>   |
|---------------------|--|
| Tx                  | Primer tümör bilgisi bilinmiyor  |
| T0                  | Primer tümöre dair kanıt yok   |
| Tis (DCIS)          | DCIS   |
| Tis (Paget)         | DCIS veya invaziv karsinom olmaksızın meme başında Paget hastalığı   |
| T1                  | Tümör boyutu $\leq 20$ mm  |
| T1mi                | Tümör boyutu $\leq 1$ mm   |
| T1a                 | Tümör boyutu $> 1$ mm fakat $\leq 5$ mm  |
| T1b                 | Tümör boyutu $> 5$ mm fakat $\leq 10$ mm   |
| T1c                 | Tümör boyutu $> 10$ mm fakat $\leq 20$ mm  |
| T2                  | Tümör boyutu $> 20$ mm fakat $\leq 50$ mm  |
| T3                  | Tümör boyutu $> 50$ mm   |
| T4                  | Göğüs duvarı invazyonu, meme derisinde ülser, nodül gibi lezyonlar   |
| T4a                 | Göğüs duvarı invazyonu var ancak pektoral kas invazyonu yok  |
| T4b                 | Meme derisinde inflamatuar karsinom bulgularını karşılamayan lezyonların varlığı (ödem, ülser, nodül gibi) |
| T4c                 | T4a ve T4b kriterleri birlikte görülmektedir.  |
| T4d                 | İnflamatuar karsinom bulguları   |



Tümör boyutuna ek olarak, tümör çevresinde mikroskopik olarak kan damarı ve lenfatik invazyonu görülmesi daha fazla lenf nodu metastazı ve kötü prognozla ilişkilidir (2, 3).

#### **2.5.2.2. Bölgesel Lenf Nodları (N)**

Lenf nodu metastazı kötü prognozla ilişkilidir. Tutulan lenf nodu sayısı arttıkça, 10 yıl hastalısız sağ kalım süresi %10'a kadar düşmektedir. Klinikte fizik muayene ve radyolojik görüntülemelerde 1cm'den büyük lenf nodu saptandığında ince iğne aspirasyon veya trucut biyopsi ile metastaz varlığının teyid edilmesi gerekmektedir. Lenf nodu metastazı varlığına göre de aksilla bölgesine yapılacak operasyon değişmektedir. Genellikle 6'dan daha az sayıda sentinel lenf nodu incelemesi yapılmaktadır ve pN (sn) olarak belirtilmektedir (2).

Evrelemedeki bölgesel lenf nodları memenin esas olarak drene olduğu ipsilateral taraftaki aksiller, interpektoral ve internal mammarian lenf nodlarını ve ayrıca supraklaviküler ve intramammarian lenf nodlarını kapsar. Bunların dışındaki lenf nodlarında, karşı meme bölgesine ait lenf nodlarında görülen metastazlar uzak metastaz olarak kabul edilmektedir. İntramammarian lenf nodları aksiller lenf nodları ile aynı grupta kabul edilmektedir (2).

Aksilla lenf nodları pektoralis minör kasına göre alt aksilla (level I), orta aksilla (level II), apikal aksilla (level III) klinik olarak gruplandırılmıştır.

Klinik sınıflama level düzeyi ve lokalizasyona göre yapılırken, patolojik sınıflamada metastatik lenf nodu sayısı da belirtilmektedir (Tablo 3).

Aksiller diseksiyon materyalleri genellikle level I ve II'yi kapsamaktadır ve en az 10 lenf nodu saptanması beklenmektedir.

Lenf nodunda, tek bir kesitte 200'den daha az sayıda veya 0,2 mm'den daha küçük grup yapan tümör hücrelerinin varlığı "izole tümör hücreleri" olarak adlandırılmaktadır ve metastatik lenf nodu sayısını artırmamaktadır. Ancak N kategorisi yazılırken sonunda "(i+)" olarak belirtilmektedir (2).

Lenf nodunda 0,2 mm'den daha büyük grup yapan tümör hücrelerinin varlığı metastaz kabul edilmektedir. 0,2 mm ile 2 mm arasında ise "mikrometastaz", 2 mm'den daha büyük ise "makrometastaz" olarak isimlendirilmektedir.

Lenf nodunda birden çok tümör odağı varsa en büyük olan ölçü dikkate alınarak sınıflandırılmalıdır (2). Ayrıca tümör hücrelerinin çevresinde stromal reaksiyon varsa bu da metastaz alanının ölçüsüne eklenmelidir. Neoadjuvan tedavi almış hastalarda, tümör boyutundaki gibi, bu reaksiyon göz ardı edilmelidir.

Aksilla yağ dokusunda görülen tümör nodülleri de metastatik lenf nodu olarak kabul edilmektedir (2, 3).

**Tablo 3:** Patolojik olarak N evrelemesi (2)

| <b>pN kategorisi</b> | <b>N kriterleri</b>   |
|----------------------|---|
| pNx                  | Bölgesel lenf nodları hakkında bilgi yok  |
| pN0                  | Metastatik lenf nodu yok veya izole tümör hücreleri içeren lenf nodu (ları)   |
| pN0 (i+)             | Lenf nodunda izole tümör hücreleri  |
| pN0 (mol+)           | RT-PCR ile moleküler sonuçlarda pozitiflik (izole tümör hücreleri saptanmadı)   |
| pN1                  | Mikrometastaz / aksillada 1-3 adet lenf nodunda, en az birinde makrometastaz / klinik bulgusu olmayan ipsilateral internal mammarian sentinel lenf nodunda mikro/makro metastaz   |
| pN1mi                | Mikrometastaz   |
| pN1a                 | Aksillada lenf nodlarından en az birinde makrometastaz olan 1-3 adet lenf nodu metastazı  |
| pN1b                 | İpsilateral internal mammarian sentinel lenf nodunda mikro/makrometastaz  |
| pN1c                 | pN1a ve pN1b kriterleri birlikte görülmektedir.   |
| pN2                  | Aksillada 4-9 adet lenf nodu metastazı, lenf nodlarından en az birinde makrometastaz varlığı / Aksilla lenf nodlarında metastaz yokken radyolojik olarak internal mammarian lenf nodlarında metastaz var  |
| pN2a                 | Aksillada lenf nodlarından en az birinde makrometastaz olan 4-9 adet lenf nodu metastazı  |
| pN2b                 | Klinik olarak internal mammarian lenf nodlarında metastaz var ancak aksilla lenf nodlarında patolojik olarak metastaz yok   |
| pN3                  | Aksillada >10 lenf nodunda makrometastaz / infraklaviküler lenf nodlarında (Aksilla level-III) metastaz / Klinik olarak internal mammarian lenf nodlarında metastaz varken, aksillada da 1< adet lenf nodunda metastaz / ipsilateral internal mammarian sentinel lenf nodunda klinik olarak metastaz yokken aksillada >3 lenf nodunda mikro/makrometastaz / ipsilateral supraklaviküler lenf nodunda metastaz |
| pN3a                 | Aksillada lenf nodlarından en az birinde makrometastaz olan $\geq 10$ lenf nodunda metastaz / infraklaviküler lenf nodlarında (Aksilla level-III) metastaz  |
| pN3b                 | Klinik olarak internal mammarian lenf nodlarında metastaz varken, aksillada pN1a veya pN2a  |
| pN3c                 | İpsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz  |

### 2.5.2.3. Metastaz (M):

Metastaz varlığını saptamada fizik muayene yetersiz kaldığından radyolojik görüntülemeler mutlaka yapılmalıdır (Tablo 4). Metastaz alanına ulaşmakta zorluk yoksa biyopsi ile teyidi ve metastazsa ER, PR ve HER2 durumuna tekrar bakılması gerekmektedir. Dokuya dekalsifikasyon uygulanan vakaların ve skiröz, sert lezyonlarda ince iğne aspirasyon sonucunun yanlış negatif çıkabileceği de akılda tutulmalıdır (2).

Klinik ve radyolojik bulgular olmaksızın, tesadüfen saptanan  $\leq 2$ mm tümör hücrelerinden oluşan grup/odaklara “dissemine tümör hücreleri” adı verilmektedir ve metastaz kabul edilmemektedir. Ayrıca yine klinik ve radyolojik bulgular olmaksızın kanda saptanan tümör hücreleri de metastaz kabul edilmemektedir (2).

Kemik iliğinde, bölgesel olmayan uzak lenf nodlarında veya diğer organlarda saptanan “dissemine tümör hücreleri”, metastaz kabul edilmese de, cM0 (i+) olarak belirtilmektedir. Tanı anında kanda saptanan tümör hücreleri metastatik hastalarda hastanın sağkalımı ile güçlü ilişkilidir; ancak varlığı ya da miktarı sınıflamayı etkilememektedir (2, 3).

**Tablo 4:** Uzak metastaz evrelemesi (2)

| M kategorisi | M kriterleri   |
|--------------|--|
| M0           | Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz bulgusu yok  |
| cM0 (i+)     | Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz bulgusu yok; ancak kemik iliği, kan veya meme bölgesi dışındaki lenf nodlarında mikroskopik $<0,2$ mm tümör hücrelerinin/depozitlerinin saptanması |
| M1           | Uzak metastaz bulgusu var  |
| cM1          | Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz bulgusu var  |
| pM1          | Patolojik olarak kanıtlanmış $>0,2$ mm metastaz odağı var  |

### 2.5.3. Histolojik Grade'in Belirlenmesi

Tüm invaziv karsinomlarda histolojik grade verilmelidir. Bunun için Modifiye Bloom Richardson gradeleme sistemi (Scarff-Bloom-Richardson System-Nottingham Modification) önerilmektedir. Bu sistemde tübülüslerin oranı, nükleer özellikler ve 10 büyük büyütme alanında (BBA) saptanan mitoz sayısına skor verilmektedir (Tablo 5). Bu skorlar toplanarak da grade belirlenmektedir (Tablo 6) (23).

**Tablo 5:** Modifiye Bloom Richardson grade'leme sistemine göre skorlama (23)

| <b>İncelenen parametreler</b> | <b>Kriterleri</b>   | <b>Skor</b> |
|-------------------------------|---|-------------|
| Tübülüs yapımı                | Tümörün >%75  | 1           |
|                               | Tümörün %10-75  | 2           |
|                               | Tümörün <%10  | 3           |
| Nükleus özellikleri           | Küçük, uniform hücreler                                   | 1           |
|                               | Orta derecede pleomorfizm, nükleol varlığı                | 2           |
|                               | Belirgin pleomorfizm, sıklıkla çok sayıda nükleol varlığı | 3           |
| Mitoz sayısı (/10BBA*)        | 0-9   | 1           |
|                               | 10-19   | 2           |
|                               | >20   | 3           |

\*: Mikroskop alan çapı 0,59 mm

**Tablo 6:** Modifiye Bloom Richardson grade'leme sistemine göre grade değeri (2)

| <b>Grade</b> | <b>Toplam skor değeri</b> |
|--------------|---------------------------|
| G1           | Skor 3-5                  |
| G2           | Skor 6-7                  |
| G3           | Skor 8-9                  |

#### 2.5.4. ER ve PR Ekspresyonu

Meme karsinomlarında %0-100 arasında değişen oranlarda ER ve/veya PR ekspresyonu saptanmaktadır. İmmunhistokimyasal boyamada ER ve PR için tümör hücrelerinde %1'den fazla görülen boyanma pozitif kabul edilmektedir. ER ve/veya PR pozitif olan hastalarda tamoksifen tedavisi uygulanmaktadır (3).

#### 2.5.5. HER2 Ekspresyonu

Kromozom 17q21'de yer alan onkogen, epidermal growth faktör ailesine aittir. Meme karsinomlarının %15'inde aşırı ekspresyonu saptanmaktadır ve bu grup kötü prognozludur.

İmmunhistokimyasal olarak değerlendirilen HER2; 0, 1, 2, 3 olarak skorlanmaktadır (Tablo 7). Skor 0 ve 1 negatif, skor 3 pozitif kabul edilmektedir. Skor 2 olan şüpheli vakalarda in situ hibridizasyon (in situ hybridization - ISH) tekniği ile de HER2 bakılması önerilmektedir. ISH, HER2 ve kromozom 17'de gen kopya sayısına göre ve bunların

oranına göre yorumlanmaktadır (Tablo 8-9). Şüpheli ISH sonuçlarında alternatif bir ISH tekniği ile testin tekrarlanması önerilmektedir (2, 24).

**Tablo 7:** İmmunhistokimya ile HER2'nin değerlendirilmesi (24)

| <b>İHK sonucu</b> | <b>Değerlendirme kriterleri</b>   |
|-------------------|---|
| Negatif (Skor 0)  | Boyanma yok / < %10 zayıf inkomplet membran boyanması   |
| Negatif (Skor 1+) | < %10 zayıf inkomplet membran boyanması   |
| Şüpheli (Skor 2+) | > %10'dan fazlasında inkomplet ve/veya zayıf-orta şiddette komplet membran boyanması veya <%10 komplet kuvvetli membran boyanması |
| Pozitif (Skor 3+) | > %10'dan fazlasında komplet kuvvetli membran boyanması   |

**Tablo 8:** Dual prob ISH ile yapılmış HER2 sonuçlarının yorumlanması (2)

| <b>Sonuç</b> | <b>Değerlendirme kriterleri</b>                           |
|--------------|---|
| Negatif      | HER2/Kr17 oranı <2 ve HER2 kopya sayısı <4                |
| Şüpheli      | HER2/Kr17 oranı <2 ve HER2 kopya sayısı $\geq 4$ fakat <6 |
| Pozitif      | HER2/Kr17 oranı $\geq 2$<br>HER2 kopya sayısı $\geq 6$    |

**Tablo 9:** Single prob ISH ile yapılmış HER2 sonuçlarının yorumlanması (2)

| <b>Sonuç</b> | <b>Değerlendirme kriterleri</b>     |
|--------------|-------------------------------------|
| Negatif      | HER2 kopya sayısı <4                |
| Şüpheli      | HER2 kopya sayısı $\geq 4$ fakat <6 |
| Pozitif      | HER2 kopya sayısı $\geq 6$          |

HER2 gen amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu olan vakalarda trastuzumab, pertuzumab tedavisi uygulanmaktadır ve hastaların prognozunda iyi sonuçlar alınmaktadır (3).

### 2.5.6. Ki-67 Proliferasyon İndeksi

Nükleer bir immünohistokimyasal belirteç olan Ki-67, tümör hücrelerinin proliferasyon hızı hakkında bilgi vermektedir. Yüksek proliferasyon indeksine sahip tümörler kemoterapiye daha iyi yanıt vermektedir (3).

### 2.5.7. Meme Karsinomlarında Gen Ekspresyon Profili

Meme karsinomlarında benzer histomorfolojik bulgulara rağmen farklı tedavi yanıtları alınabilmektedir. Bu nedenle pek çok DNA (deoksiribonükleik asit) mikroarray çalışmaları yapılmış, “messenger” ribonükleik asit (mRNA) düzeylerinde ve ekspresyon profillerinde farklılıklar saptanmıştır. Buna göre esas olarak “luminal A”, “luminal B”, “HER2 eksprese eden tip” ve “bazal” alt tipleri belirlenmiştir (3). Ayrıca “normal meme benzeri tip”, “claudin düşük tip” ve “moleküler apokrin tip” de tanımlanmıştır (25-27).

**Luminal A:** Meme karsinomlarının çoğunluğu bu grupta yer alır. Yüksek ER (+/-PR) ekspresyonuna ve luminal epitel sitokeratinlerine (CK8/18 vb.) sahiptirler. HER2 aşırı ekspresyonları yoktur ve düşük proliferasyon indeksine sahiptirler.

**Luminal B:** Luminal A'ya göre daha az ER (+/-PR) ekspresyonuna sahiptirler. HER2 eksprese etmezler. Proliferasyon indeksleri daha yüksektir ve daha agresif gidişe sahiptirler.

**HER2 alt tipi:** Yüksek oranda HER2 ekspresyonları ve proliferasyon indeksleri vardır. ER ve PR eksprese etmezler.

**Bazal alt tip:** Gen ekspresyon profilleri memenin bazal hücrelerine benzer, CK5/6 ve CK17 gibi bazal sitokeratinleri sentezlerler. HER1 eksprese edebilirler. HER2 aşırı ekspresyonu ve ER, PR ekspresyonu görülmez, genellikle triple negatif tümörlerdir. AR eksprese eden triple negatif tümörler bazal tip içinde yer almazlar. Kötü klinik gidişe sahiptirler.

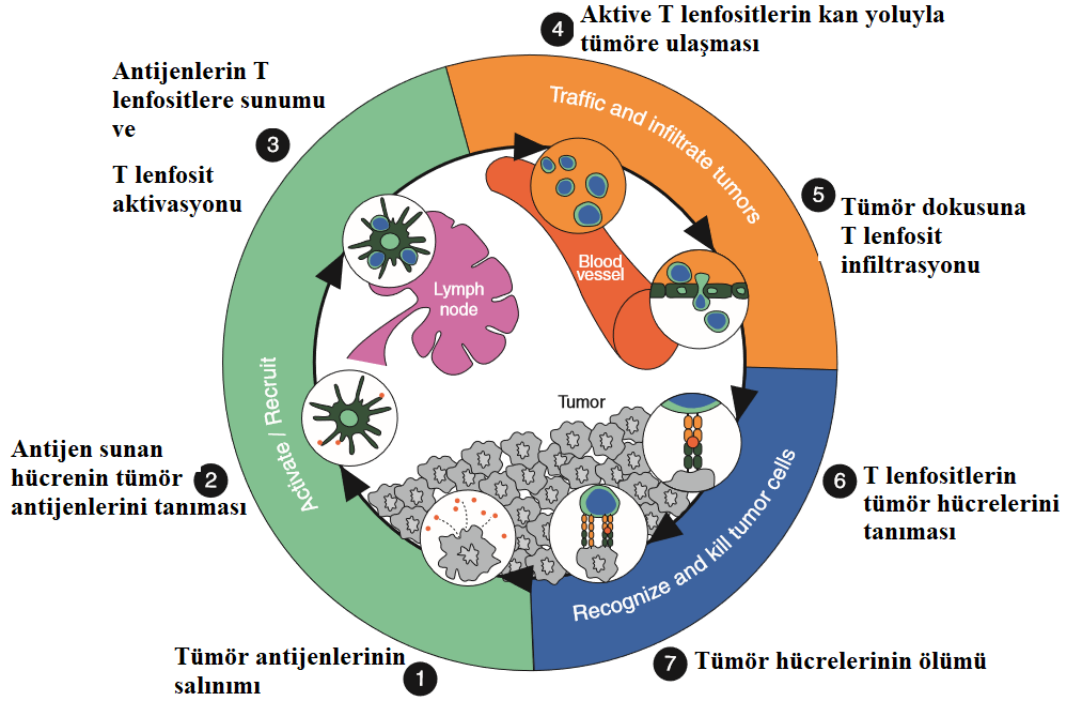
**Normal meme benzeri tip:** Genellikle triple negatiftirler. Bazal tiplerden farklı olarak HER1 ve CK5/6 eksprese etmezler. Luminal ile bazal tipler arasında bir klinik gidişleri vardır.

**Claudin düşük tip:** ER (+/- PR) ekspresyonları yoktur, düşük oranda HER2 sentezleyebilirler. Hücreler arası bağlantıda rol alan E-cadherin, claudin gibi moleküllerin sentezi düşüktür ve kötü prognoza sahiptirler.

**Moleküler apokrin tip:** HER2 grubu ile örtüşmekle birlikte AR ekspresyonları da artmıştır.

## 2.6.TÜMÖR VE İMMÜNİTE

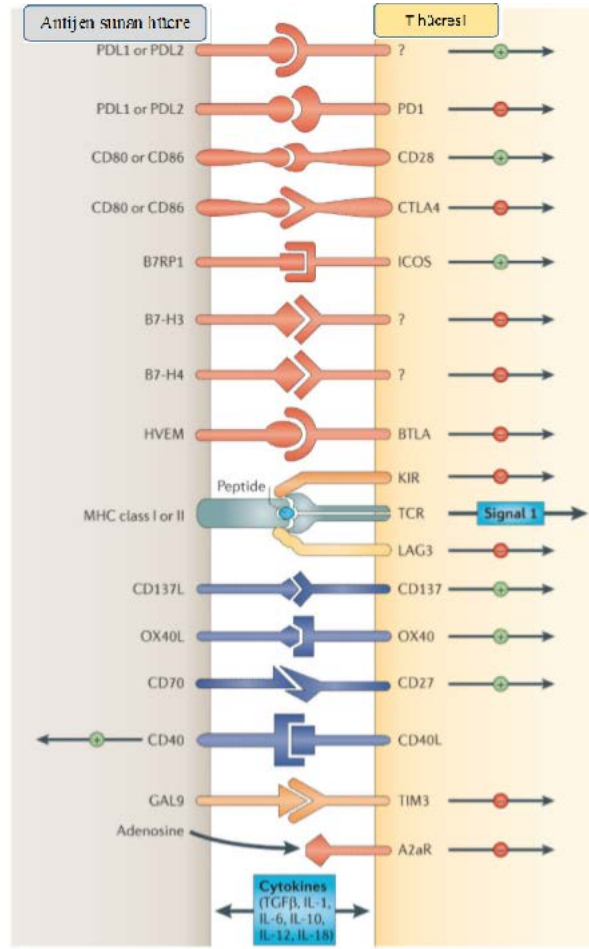
Tümör, insan vücudundaki bir hücreden kaynaklanıyor olsa da, farklı antijenler ürettiği için immün yanıtı neden olmaktadır. Tüm çekirdekli hücrelerde olduğu gibi “major histocompatibility complex” (MHC) -I moleküllerini de sentezlerler. Bu reseptörü tanıyan CD8+ sitotoksik T lenfositler (STL), anti-tümöral yanıtta ana rolü üstlenmektedir (28, 29).



Şekil 1: İmmün sistemin tümör antijenlerine yanıtı (30)

Tümörün immün sistem tarafından tanınması pek çok adımdan oluşmaktadır (Şekil 1). Tümöre ait antijenler önce dendritik hücre, makrofaj gibi antijen sunan hücreler (ASH) tarafından tanınır, işlenir ve ASH lenf noduna gider. ASH, hem MHC-I hem MHC-II ile naif CD8+ T hücrelerine ve CD4+ yardımcı T (Thelper - Th) hücrelerine sunulur. ASH'deki MHC ile T lenfosit yüzeyindeki T hücre reseptörünün (T cell receptor - TCR) birleşimi ilk sinyaldir; ancak antijenin tanınmasında yeterli olmamaktadır, ikinci bir sinyal daha ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da B7-CD28 birleşimi sayesinde olmaktadır. TCR ve ikinci sinyal yolu ile T lenfositler aktive olur (Şekil 2). Eğer immünolojik bir yanıt verilecekse, interlökin (interleukin - IL) -2 etkisiyle çoğalmaya başlar. Çoğalan aktive lenfositler hedeflenen antijeni tanır ve esas rolü alan CD8+ STL'ler direkt perforin, granzim gibi enzimleriyle sitolitik etki yapmaktadır. CD4+ T lenfositleri de sitokinler aracılığıyla CD8+

STL'lerin aktivasyonunu kuvvetlendirmektedir (29, 31).



**Şekil 2:** Antijen sunan hücre ve T lenfosit yüzeyinde immün yanıtın aktivasyonu ya da inhibisyonunun belirlenmesinde rol alan reseptörler (6)

Sadece CD8+ STL yanıtı anti-tümöral etkide yeterli olmamaktadır. Ayrıca doğal öldürücü hücreler (natural killer, NK), normal hücrelerin ekspres etmediği molekülleri tanıyarak ya da MHC-I molekülünün yok olması durumunda devreye girer ve anti-tümöral etki gösterir (29).

CD4+ T lenfositler iki türlü etkide bulunmaktadır. Regulator T (Regulatory T, Treg) ve Th2 lenfositler immün yanıtın baskılanmasında rol alırken, Th1 lenfositler ise anti-tümöral yanıtı güçlendirerek katkıda bulunmaktadır. Th17 lenfositlerinin etkileri henüz anlaşılamamıştır, tümör tipi ve organa göre yanıtının değişkenlik gösterdiği görülmüştür. T-foliküler helper (Tfh) lenfositlerin varlığı da iyi klinik gidişle ilişkili saptanmıştır (32).

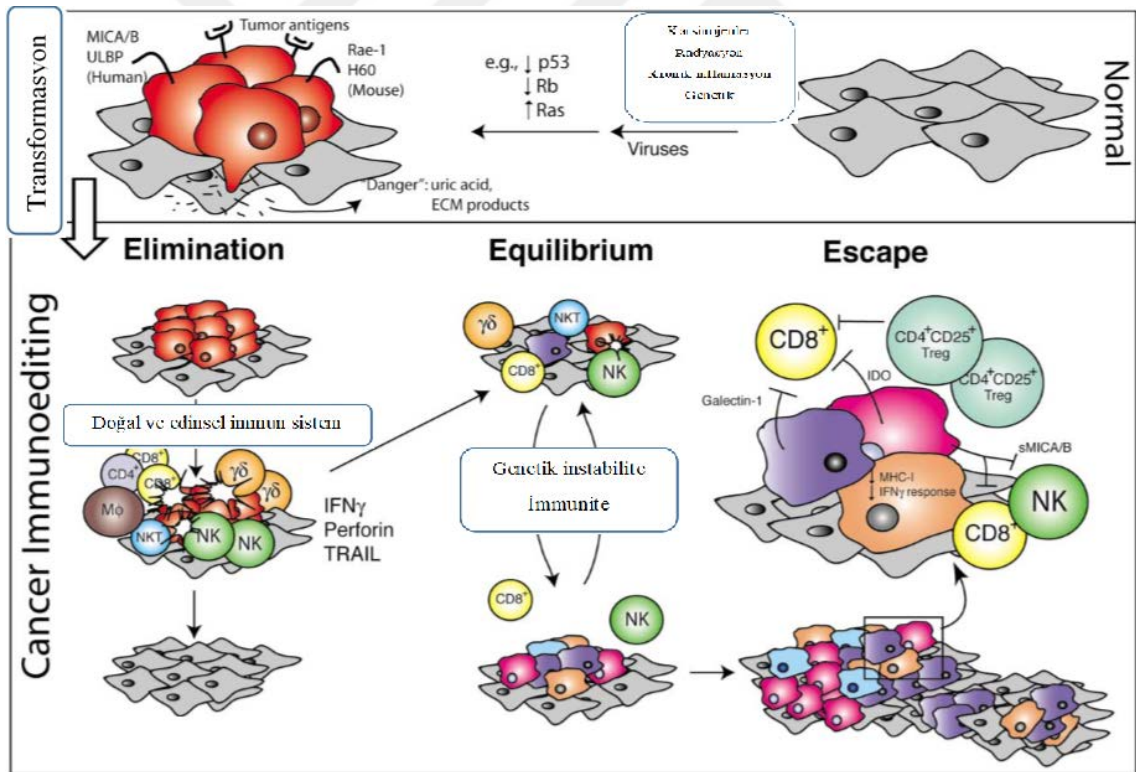
B lenfositler de antikor aracılığıyla kompleman yolu veya antikor bağımlı



mekanizmalarla sitotoksiteyi uyarır. Myeloid kökenli süpresör hücreler (Myeloid derived suppressor cells- MDSC), T lenfosit fonksiyonlarını azaltmaktadır. T lenfosit ve NK hücrelerini inhibe ederken, immun yanıtı baskılatan Treg lenfositlerin etkisini artırmaktadır (33).

### 2.6.1. Tümör ve İmmün Düzenlenme

Tümör-immunite arasındaki “immunoediting / immun düzenlenme” yarış süreci kimi zaman immunite lehine kimi zaman tümör lehine sonuçlanmaktadır. Bu süreç tümörün gelişip gelişmeyeceğini belirlemektedir (34). İmmun hücreler bir süre tümörü baskı altında tutabilmekte hatta yok edebilmektedir, bu ilk etap “elimination / yok etme” şeklinde adlandırılmaktadır. Tümör ve immun sistem hücreleri arasındaki yarıştaki ikinci etapta, tümör hücreleri varyantlar oluşturarak yarışa denge getirir ve bu “equilibrium / denge dönemi” olarak isimlendirilmektedir. Sonrasında tümör hücrelerinin galip geldiği etap ise “escape / immuniteden kaçış dönemi” olarak tanımlanmaktadır (Şekil 3) (35, 36).



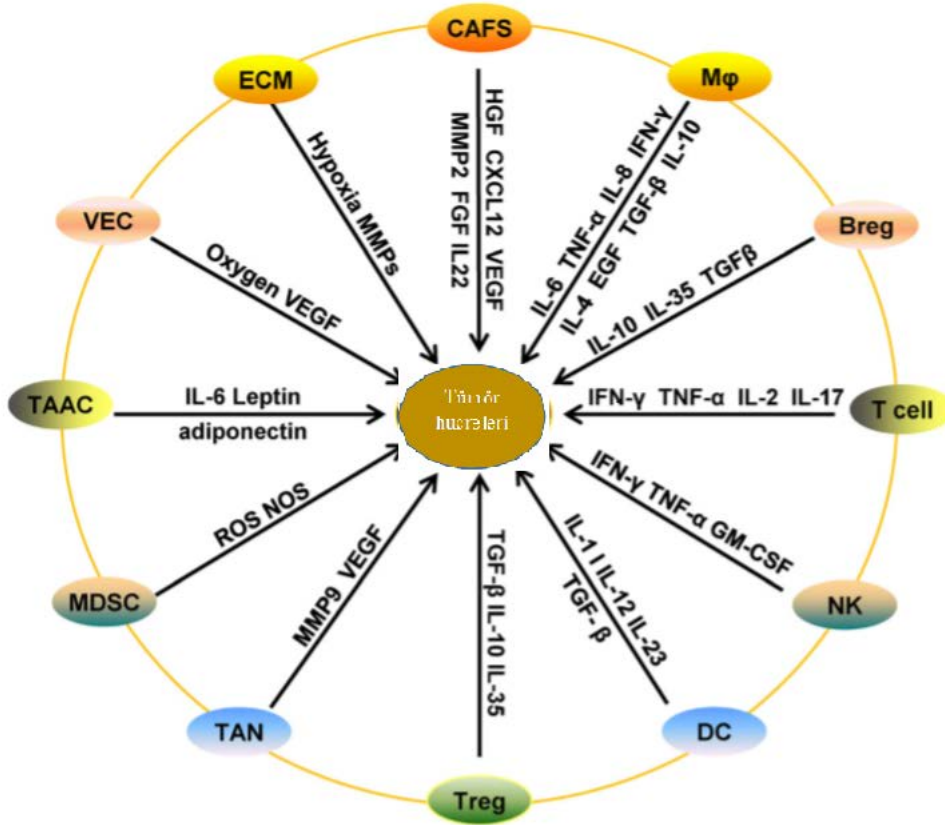
Şekil 3: İmmün düzenlenme süreci (36)

### 2.6.2. Tümör ve Mikroçevresi

Tümör çevresindeki immun yanıtta CD8+ STL, CD4+ Th lenfositler, NK hücreleri ve

antijen sunan dendritik hücreler aktif rol almaktadır. Tümör ve çevresindeki immün yanıtta yoğun bir sinyal ağı mevcuttur (37). Bu ağda büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, “non-coding RNA” taşıyan ekzomlar rol alır (Şekil 4).

İmmün hücrelerin aktivasyonunu ve etkilerini sınırlandıran, Treg, regülatuar B lenfositler (regulatory B - Breg), MDSC, M2 makrofajlar da tümör mikroçevresinde yer alırlar. Ayrıca immün uyarıyı azaltmak için PD-1/PD-L1, CTLA-4, galectin-9 / TIM-3 (T cell immunoglobulin mucin-3), IDO1 (indoleamine 2,3 dioxygenase), LAG-3 (lymphocyte activation gene-3) gibi moleküller aktivasyon sinyallerinin inhibisyonunda rol alırlar. Ekstraselüler matriks de, bazal membran ile tümörün invazyonuna mekanik bir bariyer sağlamanın yanında tümör hücrelerinden sentezlenen pek çok büyüme faktörleri, matriksmetalloproteinaz (matrixmetalloproteinases-MMP) enzimleri, sitokinleri içerir (37, 38).



Şekil 4: Tümör hücreleri ve mikroçevresi arasındaki sinyal ağı (37)

Tümör mikroçevresindeki stromal hücreler, lipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri de ürettikleri moleküllerle yer alırlar. Mezenkimal hücreler vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor- VEGF), MMP-2, CXCL12 gibi büyüme

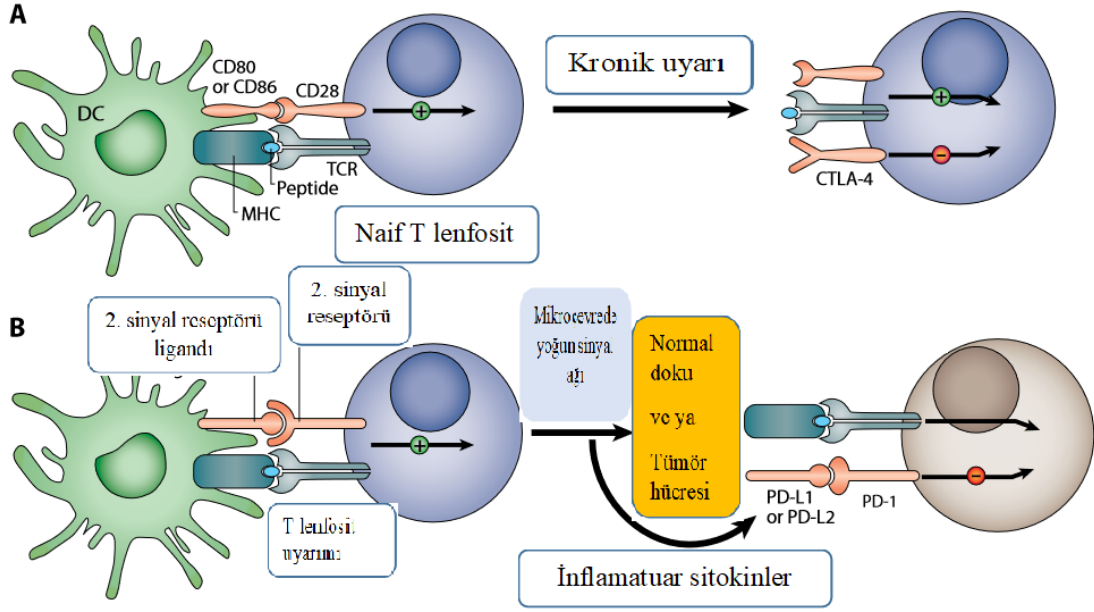
faktörleri salgılar ve bu sayede tümörün proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu artar. Lipositler, tümörün çevresindeki hipoksik ve inflamatuvar süreçte IL-6, leptin, adiponectin gibi moleküller üreterek tümörün büyümesine yardım ederler (39). Esas aktif immun yanıtta rol alan CD4+ Th ve CD8+ STL'ler interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-17, IL-2 üretirken, immünsüpresif etki yapan Treg ve Breg hücreleri de IL-10, IL-35 ve "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) üretirler. NK hücreleri sitotoksik etki yaparlar, ayrıca IFN- $\gamma$ , "tumor necrosis factor" (TNF) - $\alpha$  ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte-macrophage colony stimulating factor - GM-SFC) ile immun yanıtta katkıda bulunurlar. Dendritik hücreler, IL-1, IL-12, IL-23 aracılığı ile Th ve sitotoksik CD8+ STL yanıtını desteklerler. MDSC nitrikoksit sentaz ürünleri ve reaktif oksijen radikalleri ile CD8+ STL aktivasyonunu önleyerek, immun süpresif yanıtta yardımcı olurlar. Nötrofiller esas olarak kanda olsalar da, MMP-9, VEGF üretimine destek olurlar ve tümörün migrasyonuna katkıda bulunurlar. Tümör çevresindeki makrofajlar, fonksiyonları bakımından 2'ye ayrılmaktadır: M1-tip makrofajlar IL-6, IL-8, IL1b, IFN- $\gamma$ , TNF - $\alpha$  proinflamatuvar sitokinlerle anti-tümöral etki gösterirken, M2-tip makrofajlar IL-10, IL-4, epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor - EGF), TGF- $\beta$ , IL-19 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerle tümör gelişimini desteklerler (37).

### 2.6.3. İmmun Kontrol Noktaları

Uzun süren immun yanıtta, immünolojik yanıtı sınırlayan mekanizmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. İmmünsüpresör etki gösteren hücrelerin etkilerinin görülebilmesi için hücre içinde sinyal iletimininin de bloke edilmesi gerekmektedir. Bu noktada rol alan ve en çok üzerinde durulan moleküller CTLA-4 ve PD-1 yolaklarıdır (Şekil 5). Bunlar ikinci sinyal iletimi yolunda rol alan immunglobulin süper ailesine ait immun yanıtı baskılayan, inhibitör etkideki moleküllerdir. PD-1, CTLA-4'e göre vücutta daha yaygın üretilmektedir (6).

Tümör hücreleri, CTLA-4 ve PD-L1 dışında immuniteden kaçış mekanizmaları da geliştirmişlerdir. Tümör ile immun hücrelerin ilk tanışma basamağını durdurmak için; immuniteyi uyarıcı antijenlerin veya MHC-I moleküllerinin ekspresyonunu durdurabilirler. TGF- $\beta$ , IL-10 gibi immun yanıtı baskılayan sitokinleri veya CD8+ STL aktivasyonunu ve matürasyonunu engelleyen sitokinleri üretebilirler. İmmuniteyi baskılayan Treg lenfositleri uyarabilirler. Apoptozda rol alan Fas-Fas ligand etkileşimini

engelleyebilirler (40).



Şekil 5: CTLA-4 ve PD-L1 etki mekanizmaları (6)

### 2.6.3.1. CTLA-4 Yolağı

İmmuniteyi uyarıcı ilk basamak olan ASH-T lenfosit arasındaki antijen-reseptör etkileşimi yeterli değildir. İmmun yanıtın aktivasyonu için ihtiyaç duyulan ikinci sinyal iletimi, B7-CD28 moleküllerinin etkileşimi ile sağlanmaktadır. B7 yerine, CTLA-4 molekülü CD28 ile etkileşime geçtiğinde ikinci sinyal iletimi inhibe olmaktadır. CD28 reseptörüne CTLA-4'ün afinitesi B7 molekülüne göre daha yüksektir. ASH'ler normal hücrelere ait antijenleri T lenfositlerine sunarken B7 molekülü düzeyi azalmaktadır. Enfeksiyon gibi yabancı antijenin olduğu durumda B7 molekülü düzeyi artmaktadır (28).

CTLA-4 molekülünün ASH-T lenfosit etkileşimini engellemenin yanısıra T lenfositlerine baskılayıcı sinyaller de iletebileceği ve immunitiyi baskılayan Treg lenfosit oluşumunu artırabileceği saptanmıştır.

CTLA-4 gen polimorfizmleri bazı otoimmün hastalıklara neden olmaktadır. Normal immün yanıtta B7 molekülü yüksek düzeyde olursa "otoimmünite" geliştiği deneysel olarak gösterilmiştir (28).

Anti-CTLA-4 ilaçlarla T lenfosit aktivasyonu sağlanır ve immün yanıt güçlenir. Ancak güçlenen immün aktivasyon sonucu, bu ilaçların ciddi otoimmün yan etkileri olduğu görülmüştür.

### 2.6.3.2. PD-1 Üretimi ve Düzenlenimi

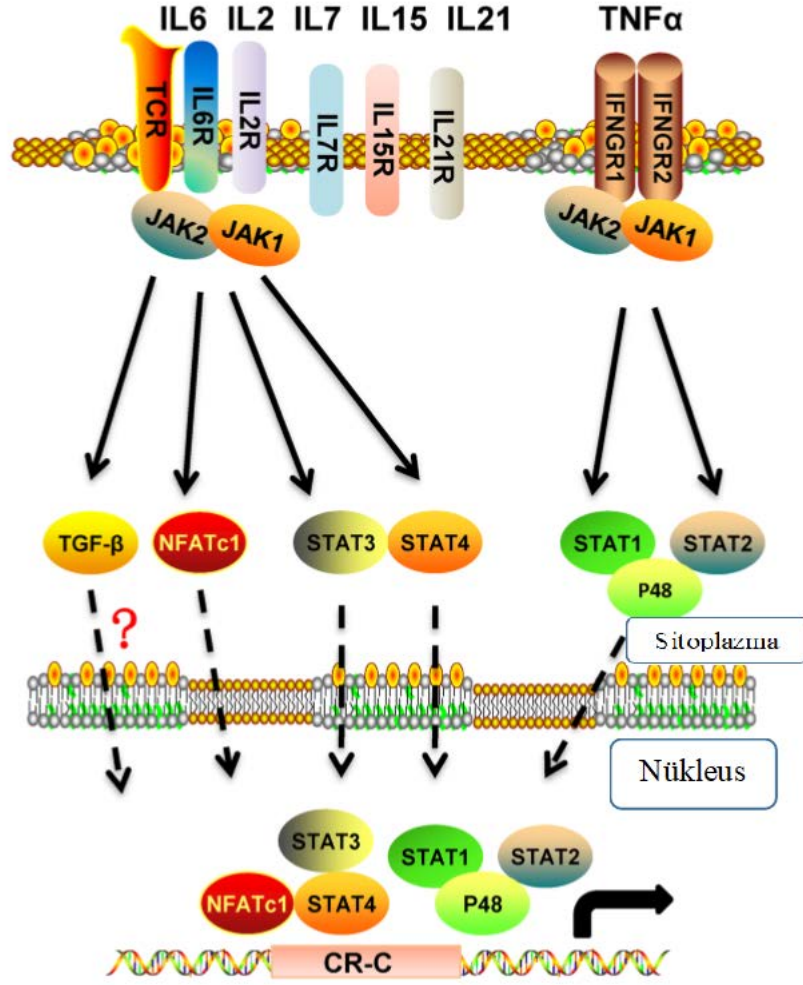
PD-1 (CD279) molekülü 1992'de Kyoto Üniversitesi'nde Honjo Laboratuvarında bulunmuştur (41). Kromozom 2q37'de yer alan, beş ekzon içeren, PDCD1 geni tarafından kodlanan bir transmembran proteindir. PD-1, immunglobulin süper ailesine ait, ikinci sinyal iletimini inhibe eden moleküllerdendir. Hücre dışında, transmembran alanda ve hücre içinde yer alan üç bölgeden oluşmaktadır. Hücrenin dış kısmında Immunglobulin (Ig) V tipi ekstraselüler parçası bulunmaktadır. Hücre içindeki ucunda iki adet fosforile edici alan; ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif - immünoresptör tirozin bazlı inhibisyon motifi) ve ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif - immünoresptör tirozin bazlı anahtarı motifi) bulunur. PD-1'e ligand bağlandığında hücre içindeki motiflerde yer alan Src homolog fosfataz-I (SHP-I) ve Src homolog fosfataz-II (SHP-II) ile fosforilenme sonucu, ZAP70 molekülü inaktive olur ve bunun sonucunda TCR sinyal yolağı inhibe olur (42).

PD-1 antijen spesifik T-B lenfositleri, dendritik hücreler ve NK hücrelerinin yüzeyinde yer almaktadır. Kronik antijen stimülasyonunda tükenen T lenfositlerinde de görülmektedir. T ve B hücrelerinin, timus ve kemik iliğindeki çeşitli gelişim aşamalarında zayıf PD-1 ürettikleri de görülmüştür (41).

PD-1, CTLA-4'ten farklı olarak antijenin ilk tanındığı ASH ile T lenfosit etkileşiminden daha sonraki basamaklarda inhibisyon yapmaktadır (43). T hücrelerinin yanısıra, NK hücreleri, B lenfositlerini de etkileyen PD-1 yolağı ile immun yanıtta daha güçlü bir baskılanma sağlanır (44).

T lenfositlerinin aktivasyonunu inhibe eden PD-1, naif T lenfositlerinde saptanamayacak kadar az bulunurken, TCR aktivasyonu sonucu hızla PD-1 üretimi başlamaktadır. Burada en önemli rolü TGF- $\beta$  oynamaktadır ve CD4+ T lenfositler, CD8+ STL, NK hücreleri hücre membranlarında PD-1'i artmaktadır. TCR aktivasyonu ile hücreye giren Ca<sup>+2</sup> ile NFATc1 aktive olmakta, PD-1 geninin translasyonunu artırmaktadır. IL-12, IL-6 da "signal transducer and activator of transcription" (STAT) 3/STAT4 aktivasyonu, FOXO1 ve "nuclear factor-  $\kappa$ B" (NF- $\kappa$ B) transkripsiyon faktörleri ile PD-1 transkripsiyonunu artırmaktadır. IL-7, IL-15 ve IL-21 de T lenfositlerde PD-1 sentezini artırmaktadır. Makrofajlarda IFN- $\alpha$  da JAK/STAT sinyal yolundaki P48/STAT1/STAT2 kompleksi aracılığıyla PD-1 transkripsiyonunu artırmaktadır. Ayrıca IFN- $\gamma$ 'nın "interferon regulatory factor"(IRF) -9 stimülasyonu sonucu PD-1 ekspresyonu artar. Farelerde yapılan

bir çalışmada IFN-  $\alpha$  ve TCR'nin sinerjistik etkiyle PD-1 ekspresyonunu artırdığı görülmüştür (Şekil 6) (37).



Şekil 6: PD-1 ekspresyonunda rol alan sinyal yolları (37)

T lenfosit yüzeyindeki PD-1'e bağlanan iki ligand tanımlanmıştır ve bunlar B7 ailesinde yer almaktadır. Bu ligandlardan PD-L1 (B7H1 / CD274) vücutta daha yaygın olarak saptanmıştır. İmmun sistem hücreleri yanısıra endotel, retiküler fibroblastlar, parankim dışı karaciğer hücreleri, mezenkimal kök hücreler, pankreas adacık hücreleri, nöronal hücreler, astrositler, trofoblastik ve epitelyal hücrelerde de varlığı gösterilmiştir. PD-L2 (B7-DC / CD273) ise farklı bir mekanizma ile PD-1'e bağlanmaktadır. Vücutta daha düşük oranda saptanan bu molekül ASH'lerde saptanmıştır. İmmun yanıtı sınırlamadaki etkisi ve bunun mekanizması net değildir (45).

### 2.6.3.3. PD-L1 Üretimi ve Düzenlenimi

PD-L1 molekülü kromozom 9p24'te yer alan, yedi ekzon içeren, CD274 geni tarafından eksprese edilen bir transmembran proteindir. Ig V ve Ig C ekstraselüler parçalarını oluşturur. IL-4, IFN- $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle STAT-1 ve IRF-1 yolağı hücre içinde aktive olur. B7 ailesindeki ikinci sinyal iletimini aktive eden moleküllerin çoğu gibi kan dolaşımında “çözünabilir / soluble” formu da vardır. Bu form esas olarak, makrofaj, monosit gibi hücrelerce üretilmektedir. Ayrıca MMP etkisiyle hücre yüzeyinden de ayrılabilirdikleri düşünülmektedir. Bu nedenle kanda yüksek düzeydeki “soluble” PD-L1 varlığında metastaz şüphesi ve kötü klinik gidişle ilişkili olabileceğini belirten çalışmalar da mevcuttur (46).

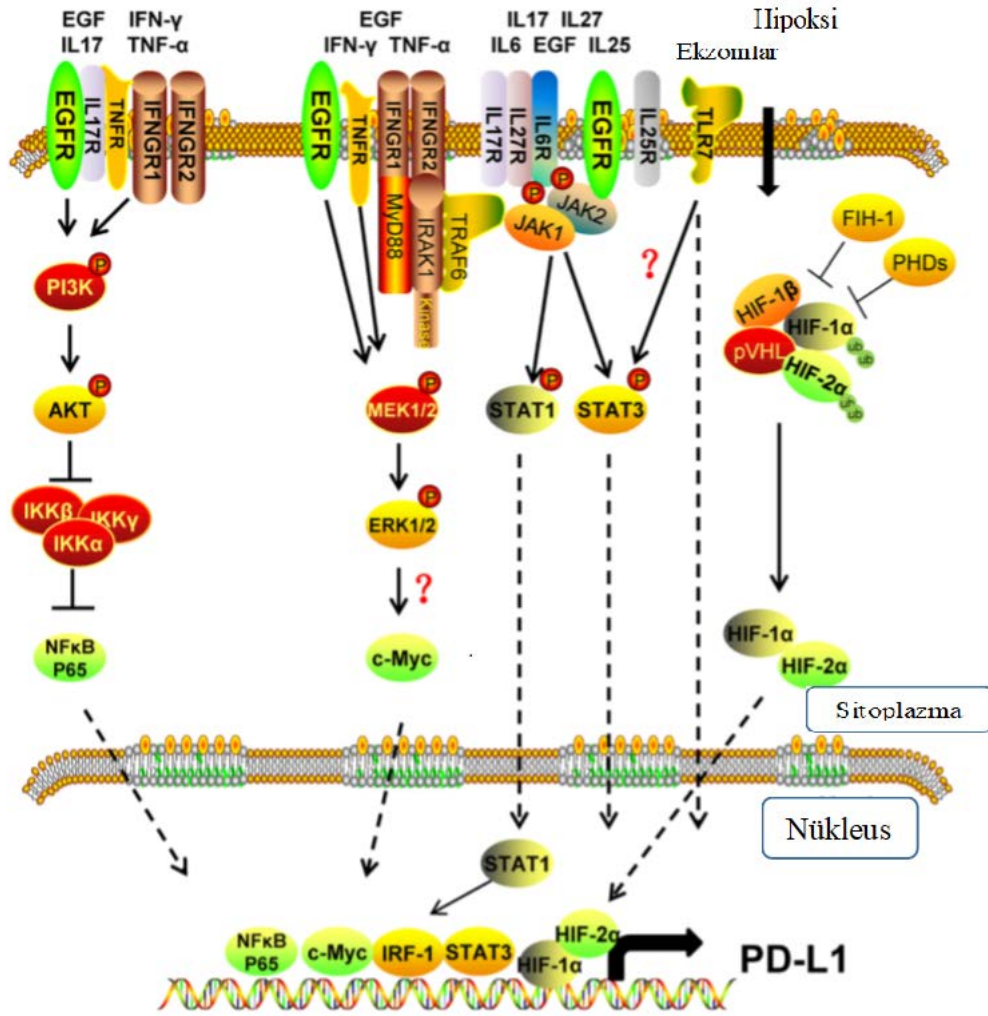
T ve B lenfositleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve tümör hücrelerinde saptanan bu molekülün üretiminde pek çok sitokin, ekzom ve büyüme faktörleri rol almaktadır. T hücre aktivasyonu ile salgılanmaya başlayan çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle PD-L1 üretimi artar. Antijenik uyarı ortadan kalktığı anda, ortamdaki sitokinlerin azalmasına bağlı olarak üretimi azalır. Üretiminde en çok rol alan sitokin T lenfositlerinden salınan IFN- $\gamma$  'dır (6).

PD-1 ile PD-L1 etkileşimi sonucu, TCR aktive edici sinyal yollarını inhibe olmaktadır. T hücre aktivasyonu, proliferasyonu, inflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe etmekte, apoptozis ve Treg lenfosit diferansiasyonu artmaktadır (47).

Tümörle ilişkili immün hücrelerin yüzeyinde artan PD-1 reseptörü ile etkileşime giren ligand tümör hücreleri yüzeyinde yer almaktadır. Tümör hücrelerinde PD-L1 üretiminin; hücre içindeki artan transkripsiyon faktörleri – “hipoksi inducible factor” (HIF-1), fosforile aktif STAT-3, NF- $\kappa$ B - aracılığıyla “mitogen activated protein kinase” (MAPK) ve “phosphoinositide-3-kinase” (PI3K) /AKT yollarını üzerinden sağlandığı saptanmıştır (42, 48, 49).

Son yıllarda PD-L1 molekülünün sentezinin, birkaç farklı mekanizmayla hatta bazı tümörlerde farklı mekanizmalarla artırıldığı saptanmıştır. Mide kanserinde STAT1/IFR1, akciğer kanserinde JAK/STAT3 ve PI3K/AKT, multipl myelomda MEK/ERK, JAK/STAT sinyal yollarının rol aldığı görülmüştür (50-52). Ayrıca dermal fibroblastlarda MAPK ve PI3K fosforilasyonu sonucu NF- $\kappa$ B salınımıyla PD-L1 üretiminin arttığı saptanmıştır (53).





Şekil 7: PD-L1 ekspresyonunda rol alan sinyal yolları (37)

TNF- $\alpha$ , inflamatuvar bir sitokindir. Makrofajlar tarafından üretilen bu molekül hücre büyümesini, diferansiasyonunu ve apoptozu da etkilemektedir. Trimer yapıdaki reseptörü aracılığıyla kaspaz aktivasyonu yapmakta, JNK ve NF- $\kappa$ B transkripsiyon yollarını aktive etmektedir. Farelerde yapılan çalışmada IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  birlikte monositten makrofaja diferansiasyon aşamasında etkili olsa da, TNF- $\alpha$ 'nın IFN- $\gamma$ 'dan bağımsız olarak, monosit yüzeyinde zayıf PD-L1 sentezlenmesine sebep olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca HIV'li hastalarda Tat proteini aracılığıyla PD-L1 sentezini artırmaktadır. Dendritik hücrelerde NF- $\kappa$ B ve ERK1/2 sinyal yolları ile mRNA ve PD-L1 protein düzeyini artırmaktadır (37).

Bir çok interlökin PD-L1 üretimine etki etmektedir. IL-27, STAT1 aracılığıyla T hücrelerinde PD-L1 üretimini artırmaktadır. IL-6 ise farklı mekanizmalar içinde rol almaktadır. EGFR, IL6/JAK/STAT3 yolağı üzerinden PD-L1'i ve hücre proliferasyonunu



artırmaktadır. Radyoterapiye duyarlı küçük hücre dışı akciğer karsinomlarında IL-6/MEK/ERK sinyal yolunun aktive olduğu ve PD-L1 ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmıştır. IL-10 ekspresyonu azaldığında PD-L1 ekspresyonunun da azaldığı saptanmıştır. IL-17 de NF- $\kappa$ B ve ERK1/2 sinyal yollarının sinerjistik etkisi ile PD-L1 ekspresyonunu artırmaktadır. Th17 yanıtını inhibe eden IL-25, STAT3/PD-L1 yolunu aktive ederek PD-L1 artışı sağlamaktadır (Şekil 7). IL-12 T lenfosit ve NK hücrelerinin aktivasyonunda rol almaktadır. Ayrıca NF- $\kappa$ B sinyal yolağını aktive edip IFN- $\gamma$ 'yı artırarak PD-L1 ekspresyonunu artırdığı da düşünülmektedir (37).

Büyüme faktörlerinden EGF, TGF- $\beta$  ve GM-SCF'nin de PD-L1 ekspresyonu üzerinde etkisi bulunmaktadır. EGF, vücutta yaygın olarak bulunan hücre büyümesini sağlayan peptid yapısında bir moleküldür. Reseptörü olan EGFR'de mutasyon varlığında, EGF'den bağımsız olarak aktive olduğu ve mutant EGFR'nin tümörlerde invazyon, migrasyona yol açtığı saptanmıştır. Bu yol, pek çok kanserde farklı mekanizmalarla PD-L1 üzerine etki etmektedir. EGFR sinyali, baş-boyun kanserlerinde JAK/STAT1, akciğer kanserlerinde PI3K/AKT, MEK/ERK yolları üzerinden PD-L1 ekspresyonunu artırmaktadırlar. Ayrıca EGFR yolu aktive olunca, MYC ekspresyonunu azaltarak, PD-L1 ekspresyonunu da negatif etkilemektedir. EGFR-RAS yolu klasik en çok bilinen yol olup, MEK üzerinden PD-L1 mRNA stabilizasyonunu sağlayarak PD-L1 ekspresyonunu artırmaktadır (37, 54, 55).

Tümörlerde PTEN azaldıkça, EGFR artmakta ve PTEN azalınca PI3K/AKT yolu aktive olmaktadır (56). PI3K/AKT yolu aktive olunca mTOR/S6K1 aracılığıyla PD-L1 proteini stabilize olmakta ve tümörün immuniteden kaçışı sağlanmaktadır.

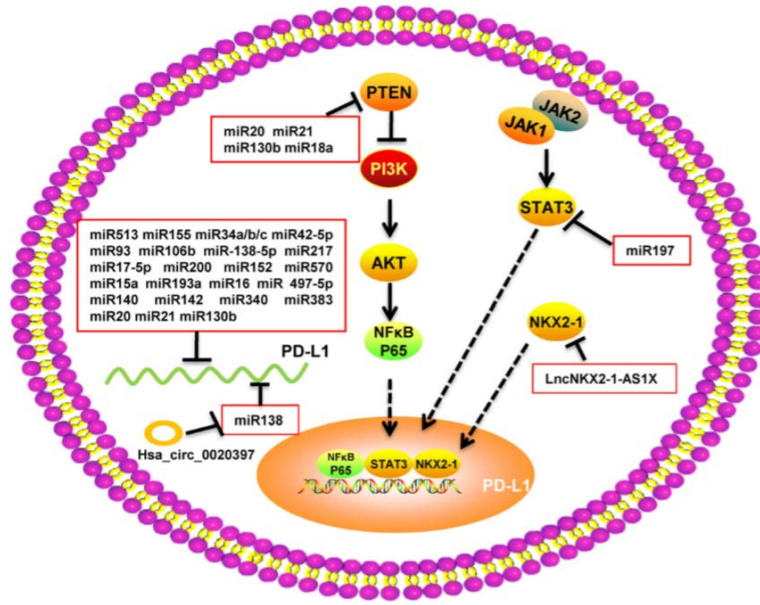
EGFR sinyal yolu inhibe olduğunda hücre büyümesi ve immun sistemden kaçışı da durdurulmuş olmaktadır (57).

TGF- $\beta$ 'nın akciğer ve karaciğer kanserlerinde dendritik hücrelerde STAT3 üzerinden PD-L1 ekspresyonunun artmasına neden olduğu saptanmıştır. Klasik olan TGF- $\beta$ /Smad sinyal yolu veya diğer sinyal yolu TGF- $\beta$ /EGFR üzerinden etki eden bu molekülün mekanizması kesin olarak anlaşılamamıştır.

Tümör metabolizması sonucu ortaya çıkan asidik artıklar tümörde epitelyal-mezenkimal değişime ve tümör mikroçevresinde oksijen oranının düşmesine neden olur. Ayrıca tümör hızlı büyürken, anjiyogenezin geride kalmasına bağlı da hipoksik bir çevre

oluşmaktadır. Hipoksik çevrede kalan tümörün metabolizması değişmekte, hücre içine daha çok glukoz almak için “glucose transporter” (GLUT) -1, GLUT-3, PK-M2 (pyruvate kinase isozymes-M2 – piruvat kinaz izozimi-M2), LDHA gibi moleküller tümör hücrelerinde sentezlemektedir. Ayrıca tümör mikroçevresinde üretilen HIF-1’in, hipoksi halinde ubiquitin ligazlarla inhibisyonu engellenmekte ve mikroçevredeki immun hücrelerde PD-L1 üretimi artmaktadır (58).

Tüm hücrelerden ekstraselüler ortama salınan ekzomlar, iki tabakalı lipidle çevrili DNA ve RNA proteinleri içeren veziküllerdir. “Non-coding” RNA’ların hücreler arasında “gap junction” veya ekzomlar aracılığıyla transfer edilebildiği, tümör büyümesi, migrasyonu, anjiyogenezinde rol aldıkları saptanmıştır (59). Monosit aktivasyonu esas olarak non-coding small RNA Yh4 ekzomu aracılığıyla TLR7 sinyal yolağı üzerinden olmaktadır. Tümörden salınan ekzomlarla, STAT3 fosforilasyonu ile monositin M2 tip anti-tümöral makrofajların gelişimi sağlanmaktadır. Ayrıca hücre içindiyken, long non-coding RNA NKX2-1-AS1’in, NKX2- proteini ile PD-L1 promoter bölgesine bağlanarak PD-L1 üretimini azalttığı saptanmıştır. Mikro RNA (miRNA)’lar da hedef gen bölgesinde translasyonu direkt inhibe ederek veya hedef mRNA’ya bağlanıp degradasyonunu sağlayarak protein ekspresyonunda rol alırlar. IFN- $\gamma$  aracılığıyla miRNA-513; IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  ile de miRNA155, PD-L1 ‘in translasyonunu azaltır. Ayrıca PTEN’i inhibe eden miRNA’lar nedeniyle de PD-L1 ekspresyonu azaltılmaktadır. Servikal karsinomlarda miRNA18a’nın PTEN, WNK2, SOX6 aracılığıyla PI3K/AKT, MEK/ERK ve Wnt/B-katenin yolunu inhibe ederek; non-skumöz akciğer karsinomlarında miRNA-197’nin CKS1B/STAT3 sinyal yolunu inhibe ederek PD-L1 üretimini azalttığı saptanmıştır. Circulating RNA’lar çok sayıda miRNA bağlanma bölgesi içerir ve miRNA etkisini azaltan moleküllerdir. Kolorektal karsinomlarda gösterilen bir circulating RNA olan “Hsa\_circ\_0020397” ile, PD-L1 üretimini azaltan miRNA-138’nin engellendiği ve PD-L1 üretiminin arttığı saptanmıştır (37, 60) (Şekil 8).

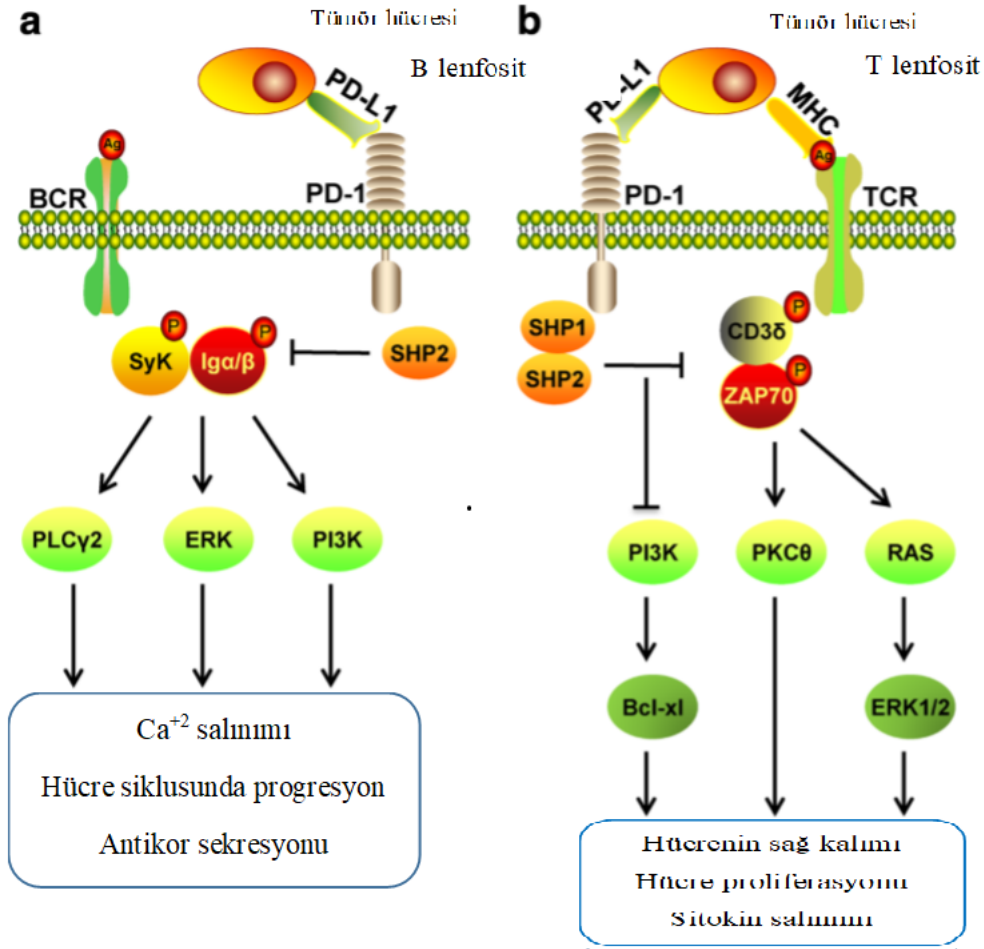


Şekil 8: Ekzomlardaki moleküllerin PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkileri (37)

#### 2.6.4. T ve B Lenfositlerinde PD-1/PD-L1 Mekanizması

T hücrelerinin immun yanıtta rol alabilmeleri için uyarılması gerekmektedir ve üzerindeki TCR'nin aktivasyonunda ASH'ler ve ikinci sinyal yolağı rol almaktadır. PD-1'e ligand bağlanınca, hücre içindeki tirozin fosforilasyonu sonucu T lenfosit aktive olur, ITSM'deki SHP-I ve SHP-II fosforilasyonu ile ZAP70 ve CD3  $\zeta$  defosforile olur (41). Buna bağlı olarak da PI3K/AKT sinyal yolu inhibe olur, Bcl-xl azalır ve T lenfosit apoptoza yönelir. PD-1 molekülü, RAS-ERK1/2 sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ederek T lenfositlerden PKC-  $\delta$  aktivasyonunu önler ve IL-2 üretimini engellemiş olur. IL-2 azalınca T lenfosit proliferasyonunu da inhibe olmaktadır. T hücrelerinde PTEN, TCR aracılı PI3K/AKT aktivasyonunu inhibe ederek PD-1'i azaltmaktadır (37).

B lenfositlerin üzerinde bulunan PD-1 molekülü, B hücre reseptörü (B cell receptor - BCR) aracılı hücre büyümesini inhibe eder, intrasellüler  $Ca^{+2}$  transport mekanizması inhibe olur ve bazı efektör moleküllerin tirozin fosforilasyonu azalır. PD-1, B lenfositte etki gösterirken, TCR'dekine benzer şekilde, BCR İTSM'deki SHP-I ve SHP-II fosforilasyonu yapar, buna bağlı olarak da SyK, Ig-  $\alpha/\beta$  defosforile olur. Sonrasında PI3K, PLC-  $\gamma$  2 ve ERK yolakları inhibe olur. Sonrasında da hücrede  $Ca^{+2}$  mekanizması bozulur, uzun süre boyunca hücrede büyüme durdurulur (Şekil 9). Ayrıca PD-1'e bağlı bazı antikorların sekresyonunun azaldığı da saptanmıştır (37).



Şekil 9: T ve B lenfositlerde PD-1/PD-L1 mekanizmasının inhibe ettiği sinyaller (37)

Pek çok tümörde gösterilen PD-L1, immunoterapinin hedeflerinden biri haline gelmiştir. Bu yolağı inhibe eden ajanlarla skuamöz hücre dışı akciğer karsinomları, mesane karsinomları, böbrek hücreli böbrek karsinomları ve malign melanomda yüz güldürücü sonuçlar alınmıştır. Meme karsinomlarında da özellikle kötü gidişli triple negatif ve HER2 eksprese eden tipinde pek çok çalışma yapılmış, PD-L1 varlığının kötü prognozla ilişkili olduğu görülmüştür.

## 2.7.PD-L1'İN SAPTANMASI VE PD-L1 ANTİKORUNUN ÖZELLİKLERİ

PD-L1 ekspresyonu pek çok tümörde saptanmış, kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. PD-1/ PD-L1 yolağını inhibe eden ilaçlarla malign melanom, mesane karsinomları, böbrek hücreli böbrek karsinomları gibi tümörlerde prognoz üzerine olumlu sonuçlar edilmiştir. PD-L1, kanda flowsitometri ve ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ile; dokuda immunohistokimyasal antikor ile boyama veya ISH gibi tekniklerle saptanabilmektedir.

Ayrıca PD-L1'in PET (positron emission tomography – pozitron emisyon tomografisi) ile de saptanabildiği gösterilmiştir (61, 62). Ancak uygulanabilirliğinin kolaylığı ve maliyet açısından immunhistokimyasal boyama ile bakılması şu anda daha ön plandadır.

Doku örneği hasta vücudundan çıkarıldığı andan itibaren etki eden sıcaklık, hava ile temas, fiksasyona giriş süresi, fiksasyon tipi, fiksasyonda bekleme süresi, dekalsifikasyon yapılıp yapılmadığı gibi pek çok etken dokuya etki etmektedir. Takip işlemi sonucunda parafine gömülen dokudan elde edilen kesitlerin kalınlığı, parafin blok şeklinde uzun depolama süresi, yüksek sıcaklıkta bekletilmesi, uzun süre hava teması, güneşe maruziyet de değerlendirmeyi etkileyebilmektedir. Kesit alınan doku örneğine immunhistokimyasal boyama yapılırken de çeşitli teknik işlemler uygulanır. Epitop duyarlılığına solventin polaritesi, pH ve sıcaklık da etki edebilir. Tüm bu etkenler ve işlemler sonucu epitopun immünreaktivitesi değişebilir ya da tamamen yok olabilir ve yanlış-negatif sonuçlara yol açabilir (40).

Laboratuvar ortamında bu molekülü gösteren antikör ve bu yolağı inhibe edecek ilaç ile birlikte üretilmiştir. Üretilen her antikör farklı bir epitopu göstermektedir. Piyasada yaygın olarak kullanılan, standardizasyonu ve validizasyonu yapılmış 5 farklı PD-L1 antikör klonu mevcuttur. Bu antikörlerden SP142 (rabbit) klonu, PD-L1'in sitoplazmik alanına yöneliktir. 28-8 (rabbit), 22C3 (mouse), SP263 (rabbit) klonları ise PD-L1 molekülünün ekstraselüler alanına yöneliktir. 73-10 klonunun henüz PD-L1 molekülünde gösterdiği yer saptanamamıştır. Bu klonlar ve beraberinde üretilen ilaçlar ile boyama sonuçlarını değerlendirme kriterleri aşağıdaki Tablo 10'da verilmiştir.

**Tablo 10:** PD-L1 immunhistokimya boyaları ve ilaçları (40)

| İlaç                               | PD-L1 Klonu    | PD-L1'deki hedef yeri | Platform            | Pozitiflik kriteri  |
|------------------------------------|----------------|-----------------------|---------------------|---|
| Nivolumab (Bristol-Myers Squibb)   | 28-8 (rabbit)  | Hücre dışı            | Link 48 Autostainer | $\geq 1\%$ tümör hücreleri                                  |
| Pembrolizumab (Merck)              | 22C3 (rabbit)  | Hücre dışı            | Link 48 Autostainer | $\geq 50\%$ tümör hücreleri                                 |
| Atezolizumab (Genentech/Roche)     | SP142 (rabbit) | Sitoplazmik           | BenchMark ULTRA     | Tümör hücreleri ve/veya tümörü infiltr eden tümör hücreleri |
| Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune) | SP263 (rabbit) | Hücre dışı            | BenchMark           | $\geq 25\%$ tümör hücreleri                                 |
| Avelumab (Pfizer/Merck Serono)     | 73-10          | Bilinmiyor            | Dako assay          | $\geq 1\%$ tümör hücreleri                                  |

Çeşitli firmalarca üretilen başka klonlar da mevcuttur. Bunlara ait liste Tablo 11'dedir.

**Tablo 11:** Diğer PD-L1 antikollarının firmalara göre listesi

| Firma                     | Klon adı     |        |
|---------------------------|--------------|--------|
| Abcam                     | Pab ab58810  | Rabbit |
| Cell singal               | 9A11         | Mouse  |
| Biologend                 | 29E2A3       | Mouse  |
| eBioscience               | MIH1         | Mouse  |
| MBL international         | 27A2         | Mouse  |
| Gene tex                  | Pab GTX89590 | Goat   |
| Cell sinyaling technology | E1L3N        | Rabbit |
| Sino Biological           | 015          | Rabbit |
| Lieping chan              | 5H1          | Mouse  |

PD-L1 antikollarının klonları arasındaki farkları saptamak, bu antikolları standardize ve harmonize edebilmek amacıyla akciğer karsinomlarında “Blueprint” çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın ilk etabında 28-8, 22C3, SP263, SP142 antikolları, aynı doku örneği üzerinden karşılaştırılmıştır. Her bir antikör kendisine uygun platformda boyanmış, kendi pozitiflik kriterine göre ve firmaların kendi patologlarınca değerlendirilmiştir. 38 vaka üzerinden yapılan değerlendirmelerde SP142'nin diğerlerine göre daha az sayıda

tümör hücrelerini ve daha zayıf şekilde tümör hücrelerini boyadığı görülmüştür. Tümör hücrelerinin boyanması açısından 22C3, 28-8 ve SP263 klonları arasında daha yüksek uyum saptanmıştır. İmmun hücrelerde ise değişkenlikler yüksek düzeyde saptanmıştır. 38 vakanın sonuçları farklı eşik değerlere göre değerlendirildiğinde ise 14 vakanın pozitiflik ve negatiflik yönünden farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç, hastaların gereksiz tedavi edilmesine ya da eksik tedavi edilmesine neden olabileceğini göstermektedir (63). Blueprint-2 çalışmasında ise ilk dört antikora ek olarak 73-10 antikoru da çalışmaya alınmıştır. Bu çalışmada, sitolojik materyalden elde edilen hücre blokları ve küçük biyopsi örnekleri de dahil edilerek 81 vaka değerlendirilmiştir. Bu çalışmada ikinci etabında 73-10 klonunun daha güçlü şekilde boyanma gösterdiği ve daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu görülmüştür. SP142'nin tümör hücrelerini daha zayıf boyadığı, sensitivitesinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Tümör hücrelerinde değerlendirilen 22C3, SP263 ve 28-8'in SP142'ye göre daha yüksek uyum gösterdiği, bu üç klon içinde de SP263 ile gözlemciler arası daha yüksek uyum olduğu görülmüştür. İmmun hücrelerde değerlendirme sadece SP142 için önerilirken Blueprint-2 çalışmasında diğer klonlarla da immün hücreler değerlendirilmiş ve değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Küçük biyopsilerde ve sitolojik materyallerdeki sonuçların değişkenlik gösterdiği görülmüştür (40, 64).

## **2.8. MEME KARSİNOMLARINDA TEDAVİ**

Meme karsinomu tedavisinde cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri kullanılır. Tümörün tipi, tümör boyutu, tümörün evresi, tümörde hormon reseptörleri ve HER2 ekspresyon durumu, hastanın yaşı, in situ karsinomun varlığı, lenf nodu metastazı varlığı, uzak metastaz varlığına göre tedavi şekilleri ve kombinasyonları değişmektedir.

Hedefe yönelik tedavide östrojen-progesteron hormon reseptörlerinin ve HER2 ekspresyon durumunun belirlenmesi büyük öneme sahiptir. ER ve/veya PR pozitif saptanan hastalarda tamoksifen gibi hormonal tedaviler ön plandadır. HER2 ekspresyonu artmış olgularda da trastuzumab ve lapatinib gibi tedavilerle prognoz üzerine olumlu sonuçlar alınmaktadır.

Tümör hücrelerinin immuniteden kaçış noktaları immunoterapi için hedef olmuştur. Mevcut kanser tedavileri yan etki olarak normal hücrelerde ciddi toksisite oluşturduğu için

immunoterapi ilaçları umut vericidir. Ancak bu tedavi yöntemi yeterli olmamaktadır. Bunun nedeni olarak da tümör mikroçevresinde yer alan hücrelerin plastisite yetenekleri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu ilaçların normal immun sistemi de etkilemelerinden dolayı ciddi immünolojik yan etkileri de mevcuttur.

Tümörlere yönelik başka immünolojik tedaviler de denenmektedir. Tümör çevresinden CD8+ STL'lerin izolasyonu ve çoğaltılıp hastaya geri verilmesi, dendritik hücrelerin in vitro ortamda tümörle tanıştırılıp hastaya verilmesi, hastaya ait immun yanıtı artırmak için IL-2 verilmesi gibi çalışmalar mevcuttur.

Meme karsinomlarında yapılan araştırmalarda da, triple negatif ve HER2 eksprese eden alt tiplerde PD-L1 ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur. Kötü gidişli olarak bilinen triple negatif ve HER2 eksprese eden tip meme karsinomu grupları immunoterapiye aday hasta gruplarıdır. Henüz meme kanseri tedavisinde rutin kullanılan FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir PD-L1 ilacı bulunmamaktadır (65, 66).



### **3. MATERYAL VE METOD**

Çalışma planı oluşturulduktan sonra, çalışma içeriğini anlatan form ile İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na başvuruldu; 83045809-604.01.02- sayılı yazıyla Etik Kurul Onayı alındı.

#### **3.1.OLGULARIN SEÇİMİ VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ**

2000-2012 yılları arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'ne başvurmuş, mastektomi ya da meme koruyucu cerrahi uygulanmış ve invaziv meme karsinomu tanısı almış hastalar çalışmamıza alındı. Bu materyallerin ilk fiksasyonundan tanı aşamasına kadar tüm aşamalarının bölümümüzde gerçekleşmiş olması, başka bir merkezde incelenmiş hazır blok olmaması, tümör boyutlarının 0,4cm'den büyük ve tümöre ait en az 2 adet parafin bloğun olması, cerrahi öncesi neoadjuvan kemoterapi veya radyoterapi almamış olmalarına dikkat edildi. Patoloji Anabilim Dalı arşivinden bu hastalara ait yaklaşık 1614 rapora ve bu raporlardaki bilgilere ulaşıldı.

Patoloji raporlarından hastanın tanı esnasındaki yaşı, tanı yılı, rezeksiyon tipi (Parsiyel rezeksiyon / Mastektomi / Modifiye radikal mastektomi), tümör çapı, tümörün histolojik tipi ve grade'i, Modifiye Bloom Richardson Sistemi'ne göre verilmiş skorlama puanları, stromal reaksiyonun ve iltihabi hücre infiltrasyonu yoğunluğu, perinöral/lenfatik invazyon ve eşlik eden in situ karsinomun olup olmadığı, sentinel lenf nodu sonucu, aksiler lenf nodlarının durumu ile total lenf nodu sayısı ve total metastatik lenf nodu sayısı, tümörün ER, PR ve HER2 durumu ve var olan Ki-67 sonuçları kaydedildi.

Sonrasında Onkoloji Bilim Dalı arşivinde hastalara ait dosyalar tarandı ve 755 hastaya ait dosya incelendi. En az 5 yıl takipli olan 520 hasta çalışmaya alındı. Dosyalardan hastaların en son takibe geldikleri tarih, nüks veya metastaz zamanı öğrenildi. Takip bilgilerine ulaşılan, çalışmamıza uygun vakalara ait lam ve bloklar Anabilim Dalı'mız arşivinden çıkarıldı. Arşivden hem lam hem de bloklarına ulaşılan 391 vakanın H&E lamaları ışık mikroskopunda tekrar değerlendirildi. Genellikle tümörün periferinde

lenfositlerle yakın ilişkide olduğu, nekroz içermeyen invaziv tümör alanları lam üzerinde asetat kalemi ile işaretlendi.

### 3.2.OLGULARDAN ÖRNEK ALINMASI, DOKU DİZİNİ OLUŞUMU VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Mikroskopta incelenmiş ve işaretlenmiş lama ait 397 adet parafin bloktan, işaretli kısım 0,4cm'lik deri punch biyopsi aleti ile kesit yüzeyinden derine doğru inerek silindirik şekilde çıkarıldı. Yapılacak olan haritada vakaların sırasının kontrolünü sağlamak için plasenta ve dalak dokularından da aynı yöntemle örnekler çıkarıldı. Diğer bir taraftan parafin eritilerek boş parafin blokları oluşturuldu. Oluşturulan blokların kesit yüzünde, birbirine yaklaşık 0,2cm mesafede, benzer şekilde, 0,4cm'lik deri punch biyopsi aleti ile kesit yüzeyinden derine doğru inerek silindirik şekilde parafin çıkarılarak her blokta 3 sırada 5'er tane olacak şekilde toplam 15 adet yuva oluşturuldu. Her blokta kasetin baş tarafında üstte ilk yuvaya - pek çok çalışmada PD-L1 için kontrol dokusu da olan- plasenta örneği konuldu. Diğer yuvalara tümöre ait çıkarılan örnekler haritalandırılarak yerleştirildi. Bu şekilde 391 adet vakaya ait 397 doku örneği içeren 30 adet parafin blok oluşturuldu (Resim 2).



**Resim 2:** Parafin blok doku dizini oluşumu

Elde edilen 30 bloktan immunhistokimyasal boyama için pozitif şarjlı lamlara ve morfolojinin görülmesi için de normal lama H&E boyanması için 4 µ kalınlıkta birer kesit alındı. İHK boyama için hazırlanan lamlara, PD-L1 için önerilen kontrol dokusu olan tonsil dokusundan da birer kesit eklendi.

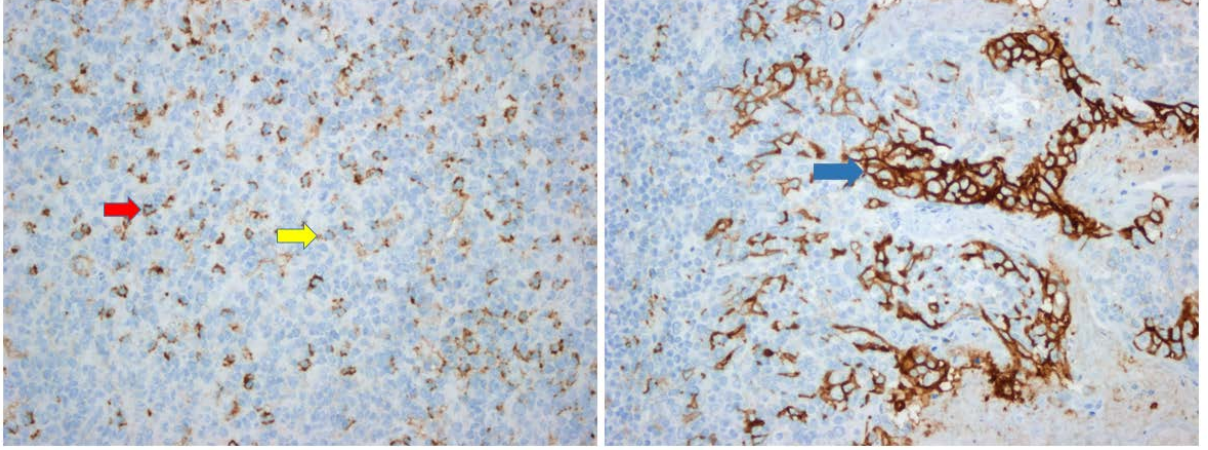
İmmunhistokimyasal boyama otomatik boyama cihazında (Ventana Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) gerçekleştirildi. Optiview DAB IHC detection kit kullanıldı. Kullanıma hazır olarak üretilmiş PD-L1 sp263 klonu ile otomatik olarak cihazda boyama gerçekleştirildi. Cihazda hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile tamamlanmış olan lamlar, manuel olarak dehidratasyon ve ksilen aşamalarından sonra lamelle kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi.

### **3.3.İmmunohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi**

İmmunhistokimyasal boyama sırasında 34 adet doku örneğinde dökülme oldu. Tamamen dökülen olgular değerlendirmeye alınmadı. Boyanma yüzdesinin daha iyi anlaşılması için kalan dokularda tümör hücrelerinin ve immun hücrelerin sayısına bakıldı ve değerlendirmeye alınan vakalarda dökülme sonrasında dahi en az 200 tümör hücresi içerdiği görüldü.

Tümörle ilişkili immun hücrelerde ise, tümör hücreleri ile yakın ilişkideki lenfositler, makrofajlar gibi immun hücreler değerlendirmeye alındı.

Tonsil dokusunda en yoğun boyanma alanı olan skuamoz epitel – lenfoid doku komşuluğunda epiteldeki membranöz boyanma şiddeti “3” , lenfoid foliküllerdeki lenfositlerin ve makrofajların membranöz boyanmaları ise şiddetine göre daha zayıf olanlar “1” ve zayıfa göre daha kuvvetli olanlar “2” olarak kabul edildi. Boyanma görülmeyen yerler “0” olarak değerlendirmeye alındı.



**Resim 3:** PD-L1 antikorü (SP263) ile tonsil dokusundaki farklı boyama şiddetleri görölmekte. Sarı ok; lenfoid dokuda zayıf boyanma, kırmızı ok; lenfoid dokuda orta şiddette boyanma, mavi ok; yüzeydeki skuamoz epitelin lenfoid dokuyla temas eden alt kısımlarında şiddetli boyanma (İHKx400).

Boyama kriterlerine göre de her vakaya ait örnekte, tümör hücrelerindeki membranöz boyanma ve tümörle ilişkili immün hücrelerdeki boyanma şiddetlerine göre değerlendirildi. Görülen tümör hücre sayısına göre tümör hücrelerindeki boyanma yüzdeleri şiddetlerine göre ayrı ayrı, görülen immün hücrelerin sayısına göre de immün hücrelerdeki boyanma yüzdeleri şiddetlerine göre ayrı ayrı not edildi. İmmün hücrelerde ve tümör hücrelerinde, zayıf ve %1'in altında kalan boyanmalar negatif kabul edildi.

Tümör hücrelerinde görülen membranöz boyanma paternleri de ayrıca incelendi. Tüm hücreyi çepeçevre saran boyanmalar "komplet", hücrenin bir kısmını saran boyanma paterni "inkomplet" olarak değerlendirildi ve boyanan hücrelere göre yüzdeleri belirlendi.

Artefakt olan nükleer boyanmalar, nekroz alanları, lümendeki sekrette görülen tutulumlar, endotel hücrelerindeki boyanmalar, örnek alanına giren in situ karsinom alanları, doku üzerine çöken pigmentler değerlendirmeye alınmadı.

### 3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiklerinde sürekli değişkenler için ortalama değer, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler; kesikli değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri hesaplandı.

Başlangıç analizleri olarak normal dağılımın değerlendirilmesinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. İki grup arası karşılaştırmalarda nonparametrik verilerde Mann Whitney U ve Ki kare testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan verilerin analizinde binary logistic regresyon testi uygulandı.

Sağ kalım analizleri için Kaplan- Meier sağ kalım analizi, gruplar arası sağ kalım eğrilerini karşılaştırmak için Log rank analizi (Mantel Cox) kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan verilerin analizinde Cox regresyon testi uygulandı.

Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilerek  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık olarak tanımlandı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. GENEL BULGULAR

Çalışmaya alınan 391 olguya ait tümör dokularından ayrı ayrı birer adet olmak üzere toplam 397 adet örnek alındı. Olgulardan 4'ü eş zamanlı olarak hem sağ hem solda meme karsinomu tanısı almıştı. 1 hasta da 4 sene arayla karşı memede de karsinom tanısı alarak, hem sağ hem sol meme karsinomu tanısı almıştı. 1 vakada da tek taraf memeye ait iki tümör odağından ayrı ayrı örnek alınmış ancak teknik işlemler sonucu döküldüğü için biri değerlendirme dışında kalmıştır. Sonuç olarak 358 vakaya ait 363 doku örneği çalışmamızda incelenmiştir.

Çalışmaya alınan 358 vakanın 4'ü (%1,1) erkek, 354'ü (%98,9) kadın, ortalama tanı yaşı 51,4 (min-max 28-87, medyan 50) idi. Kadınlarda ortalama tanı yaşı 51,2 (min-max: 28-87 yaş, medyan 50) , erkeklerde ortalama tanı yaşı 43,5 saptandı (min-max 33-55 yaş, medyan 43).

Olguların 169'una (%46,6) modifiye radikal mastektomi, 146'sına (%40,2) parsiyel mastektomi ve 48'ine (%13,2) sadece mastektomi uygulanmıştı.

Tümör yerleşim yeri olguların %51'inde sağ meme (n=185), %49'unda sol meme (n=178) idi. Odak sayısı %80,99 (n=294) olguda 1 iken, %19,01 (n=69) olguda 1'den fazlaydı. Ortalama tümör çapı  $2,66 \pm 1,57$  cm (min-max 0,5-14 cm, medyan 2,5 cm) bulundu.

Tümöre eşlik eden insitu karsinom vakaların %84,8'inde (n=308) saptanırken, %15,2'sinde (n=55) görülmemiştir.

Tümörlerin tiplerine bakıldığında; %76'sını (n=276) İDK-SET, %3,9'unu (n=14) invaziv lobüler karsinom, %17,6'sını ise (n=64) mikst tipteki karsinomlar oluşturmaktadır. Bunların dışında ise 3 müsinöz karsinom (%0,8), 2 invaziv apokrin karsinom (%0,6), 1 invaziv mikropapiller karsinom (%0,3), 2 metaplastik karsinom (%0,6) ve 1 tübüler karsinom (%0,3) mevcuttu (Tablo 12).

**Tablo 12:** Çalışmaya alınan vakaların histolojik tümör tipleri

| Tümör tipi                     | Sayı | Yüzde |
|--------------------------------|------|-------|
| İDK-SET                        | 276  | %76,0 |
| İLK                            | 14   | %3,9  |
| Tübüler karsinom               | 1    | %0,3  |
| Müsinöz karsinom               | 3    | %0,8  |
| İnvaziv apokrin karsinom       | 2    | %0,6  |
| İnvaziv mikropapiller karsinom | 1    | %0,3  |
| Metaplastik karsinom           | 2    | %0,6  |
| Mikst karsinom                 | 64   | %17,6 |

Tümörler Modifiye Bloom-Richardson Sistemine göre belirlenmiş histolojik grade'lerine göre gruplandırıldığında %40,2'si (n=146) grade III, %56,5'si (n=205) grade II, %3,3'si (n=12) ise grade I'dir (Tablo 13). Bu sisteme göre bakılan parametreler de ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tübülüs yapımı az olanlar (skor 3) vakaların %78,8'ini (n=286), orta derecede (skor 2) olanlar %19,8'ini (n=72), tübülüs yapımı yaygın olan (skor 1) %1,4'ini (n=5) oluşturmaktadır. Pleomorfizm açısından bakıldığında belirgin pleomorfizm içerenler vakaların %55,1'ini (n=200), orta derecede olanlar %44,4'ünü (n=161), uniform hücrelerden oluşanlar ise %2'sini (n=0,6) oluşturmaktadır. Mitoz sayılarına göre dağılıma baktığımızda ise %41,9'unda (n=152) 1-9/10BBA, %42,1'inde (n=153) 10-19/10BBA, %16'sında (n=58) >20/10BBA mitoz saptandı.

**Tablo 13:** Histolojik grade açısından vakaların dağılımı

|                  | Sayı | Yüzde |
|------------------|------|-------|
| Histolojik grade |      |       |
| I                | 12   | %3,3  |
| II               | 205  | %56,5 |
| III              | 146  | %40,2 |

Tümörün oluşturduğu desmoplazi açısından bakıldığında, stromada görülen yanıt vakaların %21,8'inde belirgin (n=79), %67,8'sinde (n=246) orta derecede, %10,5'inde ise (n=38) hafif derecede idi (Tablo 14).

Tümöre karşı gelişen immün yanıtın yoğunluğuna bakıldığında vakaların %3,6 'sında (n=13) yoğun, %20,9'unda (n=76) orta derecede, %75,5'inde (n=274) ise hafif derecede olduğu görüldü (Tablo 14).

**Tablo 14:** Tümörde stromal ve iltihabi yanıt dereceleri

|                        | Sayı | Yüzde |
|------------------------|------|-------|
| Stromal yanıt derecesi |      |       |
| hafif                  | 38   | %10,5 |
| orta                   | 246  | %67,8 |
| yoğun                  | 79   | %21,8 |
| İtihabi yanıt derecesi |      |       |
| hafif                  | 274  | %75,5 |
| orta                   | 76   | %20,9 |
| yoğun                  | 13   | %3,6  |

Perinöral invazyon (PNİ) tümörlerin %29,5'inde (n=107) görülürken, %70,5'inde (n=256) saptanmadı (Tablo 15).

Vakaların %50,4'ünde (n=183) lenfovasküler invazyon (LVİ) görülürken, %49,5'inde (n=180) görülmedi (Tablo 15).

**Tablo 15:** Olgularda perinöral ve lenfatik invazyon görülme oranları

|     |        | Sayı | Yüzde |
|-----|--------|------|-------|
| PNİ | mevcut | 107  | %29,5 |
|     | yok    | 256  | %70,5 |
| LVİ | mevcut | 183  | %50,4 |
|     | yok    | 180  | %49,5 |

Aksiller lenf nodu metastazı %58,1 tümörde (n=211) mevcut iken, %41,9'inde (n=152) metastaz saptanmadı. Sentinel lenf nodu eksizyonu 184 vakada yapılmış olup bunların %50'sinde metastaz (n=92) varken, %50'sinde metastaz (n=92) yoktu.

Prognostik parametlerden olan ER, PR ekspresyon durumu tüm tümörlerde incelenmiş olup; ER(-) tümör oranı %20,9 (n=76), PR(-) tümör oranı ise %28,9'dur (n=105). ER(+) tümör oranı %79,1 (n=287), tümörde görülen ortalama boyanma yüzdesi %57,8 (medyan %70) olarak bulundu. ER(+) tümörlerin %11'i (n=40) hafif, %25,9'u (n=94) orta, %42,1'i (n=153) kuvvetli boyanma göstermiştir. PR(+) tümörlerin oranı %71,1 (n=258)'dir, tümörde görülen ortalama boyanma yüzdesi %41,02 (medyan %40)'dir. PR(+) tümörlerin ise %8'i (n=29) zayıf, %19,3'ü (n=70) orta, %43,8'i (n=159) kuvvetli boyanma göstermektedir (Tablo 17). ER(+) ve PR(+) tümörler vakaların %68,3'ünü (n=248) oluştururken; ER(+) veya PR(+) tümörlerin oranı ise %89'dur (n=323).



**Tablo 16:** HER2 immunhistokimya sonuçları

|                       |             | Sayı | Yüzde |
|-----------------------|-------------|------|-------|
| HER2<br>İHK sonuçları | 0 (Negatif) | 116  | %36,1 |
|                       | 1 (Negatif) | 67   | %20,9 |
|                       | 2 (Şüpheli) | 78   | %24,3 |
|                       | 3 (Pozitif) | 60   | %18,7 |

HER2 immunhistokimyasal olarak 321 olguda değerlendirilmiştir. Bunların 116'sı (%36,1) skor 0, 67'si (%20,9) skor 1, 78'i (%24,3) skor 2, 60'ı (%18,7) skor 3'dür (Tablo 16). Skor 2 olan vakalara uygulanmış SİSH sonuçlarına göre HER2 69'unda negatif (%88,5), 9'unda pozitif (%11,5) bulunmuştur.

HER2 açısından İHK ve SİSH sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; 321 vakada HER2 ekspresyon durumu belirlenmiş olup bunların %78,5'i (n=252) negatif, %21,5'i (n=69) pozitifdir (Tablo 17).

**Tablo 17:** Vakaların ER, PR ve HER2 ekspresyonlarına göre dağılımı

|       | Boyama şiddeti | Sayı | Yüzde |
|-------|----------------|------|-------|
| ER    | Negatif        | 76   | %20,9 |
|       | Zayıf          | 40   | %11,0 |
|       | Orta           | 94   | %25,9 |
|       | Kuvvetli       | 153  | %42,1 |
| PR    | Negatif        | 105  | %28,9 |
|       | Zayıf          | 29   | %8,0  |
|       | Orta           | 70   | %19,3 |
|       | Kuvvetli       | 159  | %43,8 |
| HER2* | Negatif        | 252  | %78,5 |
|       | Pozitif        | 69   | %21,5 |

\*İHK ve SİSH sonuçlarına göre 321 vaka üzerinden değerlendirilmiştir.

Ki-67, tümörlerin 95'inde değerlendirilmiş olup ortalama Ki-67 indeksi %31,15'tir (%0-92, medyan %24).

Bilateral meme karsinomu olan vakalardan her iki tarafa ait örneklerle ulaşılan 5 hastadan 2'si metakron olup 3'ü senkron olarak saptanmıştır. Bu hastalardan biri BRCA-2 pozitif saptanmıştır. 5 hastanın 3'ünde, ilk tanıya göre 2-4 yıl sonrasında meme karsinomu

nüksü görülmüştür. Nükseden hastalardan biri her iki taraf memede İLK, diğerleri İDK-SET ve mikst karsinom (İDK + İLK) tanıları almıştır. Nüksü olmayan vakalar mikst karsinom (İDK + İLK) (ER ve PR pozitif, HER2 negatif); İDK (ER ve PR pozitif, HER2 negatif) ve İLK (ER ve PR pozitif, HER2 negatif); her iki tarafta da İDK-SET (ER, PR negatif, HER2 pozitif) tanıları almıştır.

Toplamda iki hastanın BRCA durumu öğrenilmiştir. BRCA-2 pozitif olan hasta, ilk önce mikst karsinom (invaziv duktal karsinom + invaziv lobüler karsinom) tanısı almış, tedavi görmüş. 4 sene sonra karşı memede invaziv lobüler karsinom tanısı konulmuştur. İlk tümörde ER ve HER2 pozitifken, ikinci tümörde HER2 negatif bulunmuştur. Diğer hasta BRCA-1 pozitif olup, triple negatif İDK-SET tanısı almış ve 3 sene sonra over karsinomu nedeni ile opere olmuştur. Her iki hasta da halen yaşamakta olup, bilateral meme karsinomu olan vakada meme karsinomu ilk tanıdan 6 sene sonra nüksetmiştir.

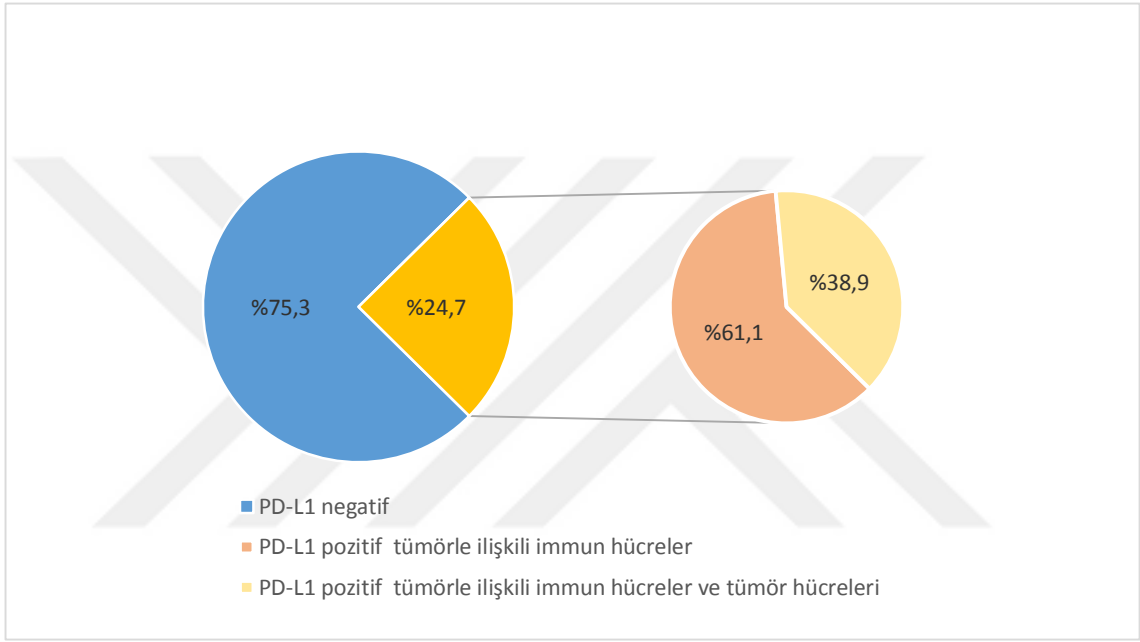
Tümör örnekleri, tanı yıllarına göre gruplandırıldığında %16'sı (n=58) 2012, %16'sı (n=58) 2011, %18,7'si (n=68) 2010, %14'ü (n=51) 2009, %10,2'si (n=37) 2008, %7,4'ü (n=27) 2007, %4,4'ü (n=16) 2006, %5,5'i (n=20) 2005, %2,8'i (n=10) 2004, %1,7'si (n=6) 2003, %0,8'i (n=3) 2002, %1,4'ü (n=5) 2001, %1,1'i (n=4) 2000 yılına aittir. Yıllara göre gruplandırıldığında vakaların %50,7'si (n=184) 2010, 2011, 2012 yıllarına ait iken %49,3'ü (n=179) daha önceki yıllara aittir (Tablo 18).

**Tablo 18:** Tanı yıllarına göre vaka sayısı

| Tanı yılı | Vaka sayısı |
|-----------|-------------|
| 2000      | 4           |
| 2001      | 5           |
| 2002      | 3           |
| 2003      | 6           |
| 2004      | 10          |
| 2005      | 20          |
| 2006      | 16          |
| 2007      | 27          |
| 2008      | 37          |
| 2009      | 51          |
| 2010      | 68          |
| 2011      | 58          |
| 2012      | 58          |
| Total     | 363         |

#### 4.2.PD-L1 İMMUNHİSTOKİMYA BULGULARI

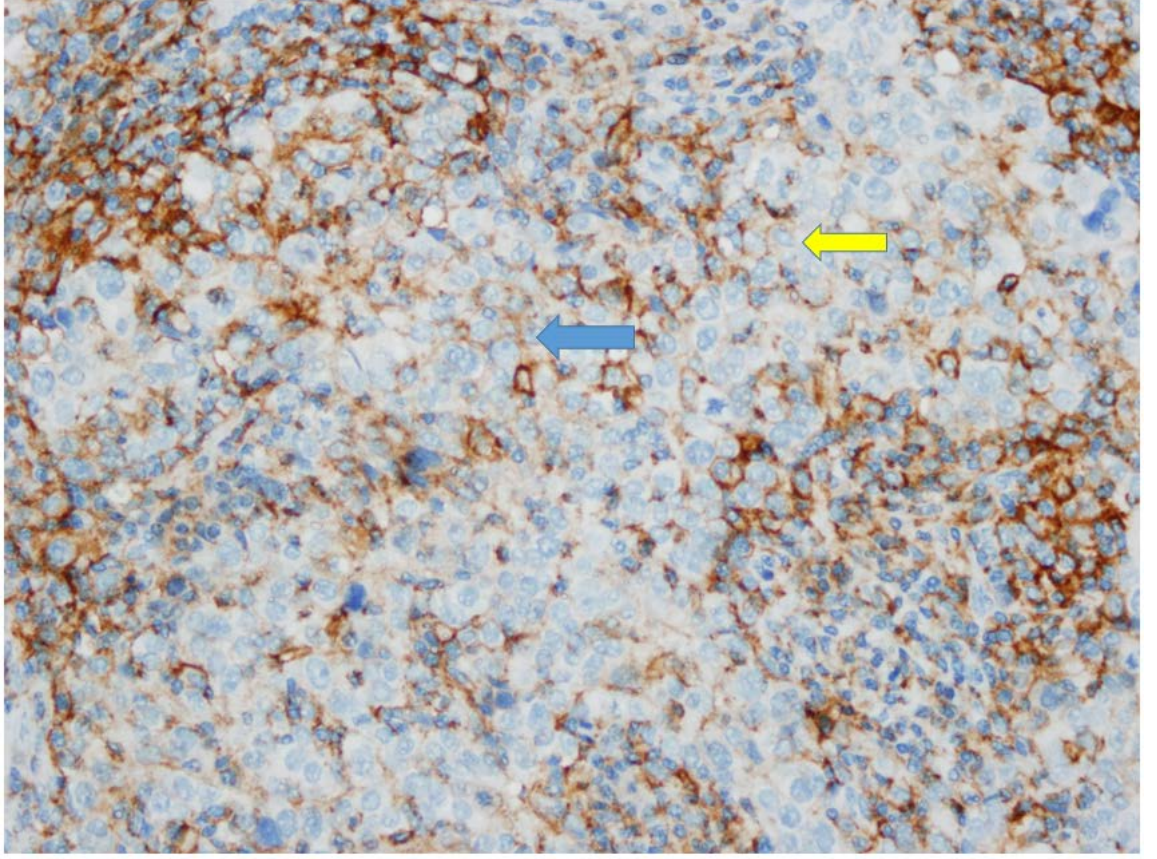
PD-L1 immunhistokimyasal boyama tümör hücrelerinde ve tümör ilişkili immün hücrelerde ayrı ayrı değerlendirildi. Tümör örneklerinin 90'ında tümörde veya lenfositte pozitif boyanma saptandı. Bu tümörlerin tamamında immün hücrelerin boyandığı görülürken 35'inde (%38,9) tümör hücrelerinde boyanma mevcuttu. 55 vakada sadece immün hücreler boyandı.



**Grafik 1:**PD-L1 sonuçlarına göre vakaların dağılımı

Tümör hücreleri açısından incelendiğinde, PD-L1 antikoru ile 328 tümör örneğinde (%90,4) boyanma görülmedi. 35 vakada (%9,6) boyanma mevcuttu. Boyanma paternine bakıldığında 14 tümörde (%40) sitoplazmik membranda komplet, 21 tümörde (%60) inkomplet boyanma görüldü.

Sitoplazmik memebbrandaki komplet ve inkomplet boyanma paternleri açısından tümörlerin çoğunlukla heterojenite gösterdiği saptandı. Pozitif boyanan tümör hücrelerindeki komplet boyanma oranı %1-60, inkomplet boyanma oranı ise %40-100 arasında değişkenlik göstermekte idi. 32 vakada tamamen inkomplet boyanma saptandı.

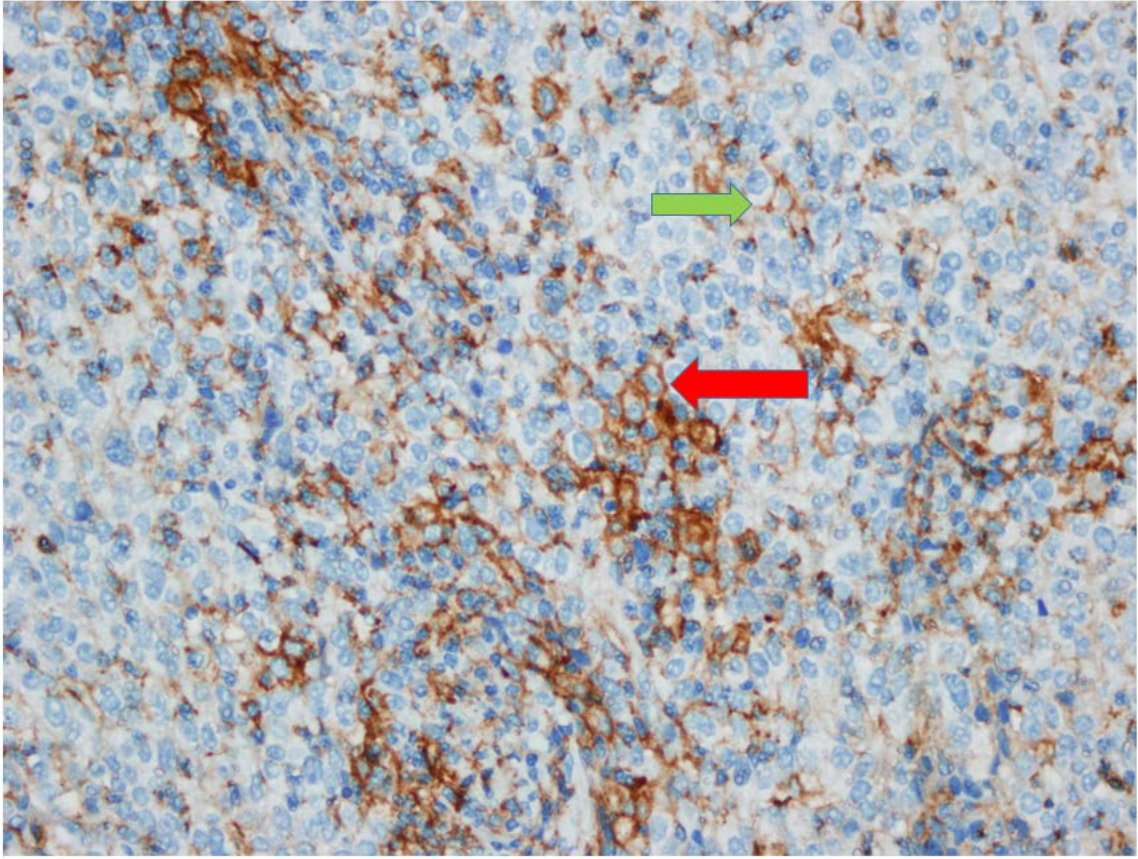


**Resim 4:** PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör hücrelerinde sitoplazmik membranda komplet ve inkomplet pozitif boyanma. Sarı ok: İnkomplet zayıf boyanan tümör hücresi, mavi ok: Komplet zayıf boyanan tümör hücresi (İHKx400).

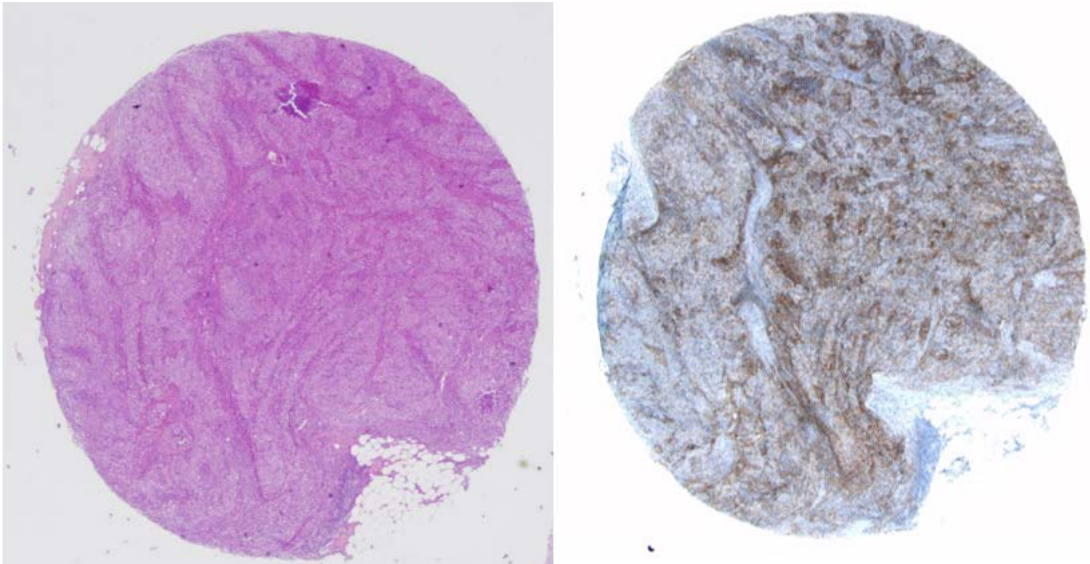
Tümör hücrelerinin boyanma şiddetine göre gruplandırıldığında tüm örneklerde heterojenite olduğu görüldü (Tablo 20). Tamamen zayıf, tamamen orta kuvvette, tamamen kuvvetli boyanan vaka saptanmadı. 35 pozitif vakanın tümör hücrelerinde %0 ile %30 arasında değişen yüzdelerde zayıf, %0 ile %30 arasında değişen derecelerde orta, %0 ile %35 arasında değişen derecelerde kuvvetli boyanma gösterdikleri saptandı (Resim 4-6).

Tümör hücrelerinin tamamen negatif olduğu 316 (%87,1) vaka mevcuttur. 12 vakada (%3,4) ise pozitif boyanan tümör hücre sayısı %1'in altında olduğu için negatif grupta yer almaktadır.





**Resim 5:** PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör hücrelerinde orta şiddette ve kuvvetli boyanma. Yeşil ok: Tümör hücresinde orta şiddette boyanma, kırmızı ok: Tümör hücresinde kuvvetli komplet boyanma (İHKx400).



**Resim 6:** Tümör dokusunda PD-L1 antikoru (SP263) ile heterojen boyanma paterni (H&E ve İHKx20).

Tümörle ilişkili immün hücelere bakıldığında tümör örneklerinin 90'ında tümörle ilişkili immün hücelerde pozitiflik görülmüştür (Resim 7-8). 273 vakada (%75,2) ise hem tümör hücelerinin hem immün hücelerin boyanmadığı saptanmıştır (Tablo 19). Sadece immün hücelerde pozitiflik görülen 55 vaka (%61,1) mevcuttur.

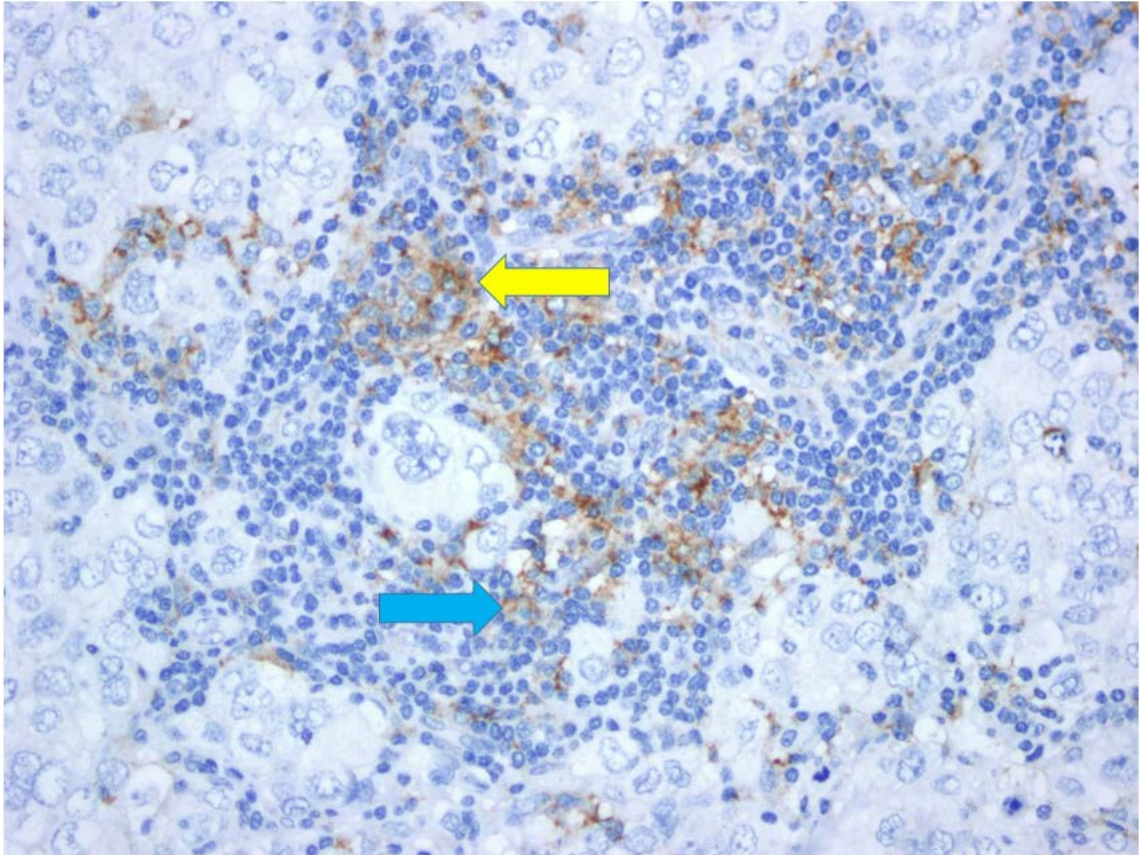
**Tablo 19:**Tümör hüceleri ve tümörle ilişkili immün hücelerde PD-L1 sonuçları

|                                 | <b>PD-L1 negatif</b> | <b>PD-L1 pozitif</b> |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| Tümör hücresi                   | 328 (%90,4)          | 35 (%9,6)            |
| Tümörle ilişkili immün hücelere | 273 (%75,2)          | 90 (%24,8)           |

**Tablo 20:** PD-L1 boyanma şiddetlerinin heterojen dağılımı

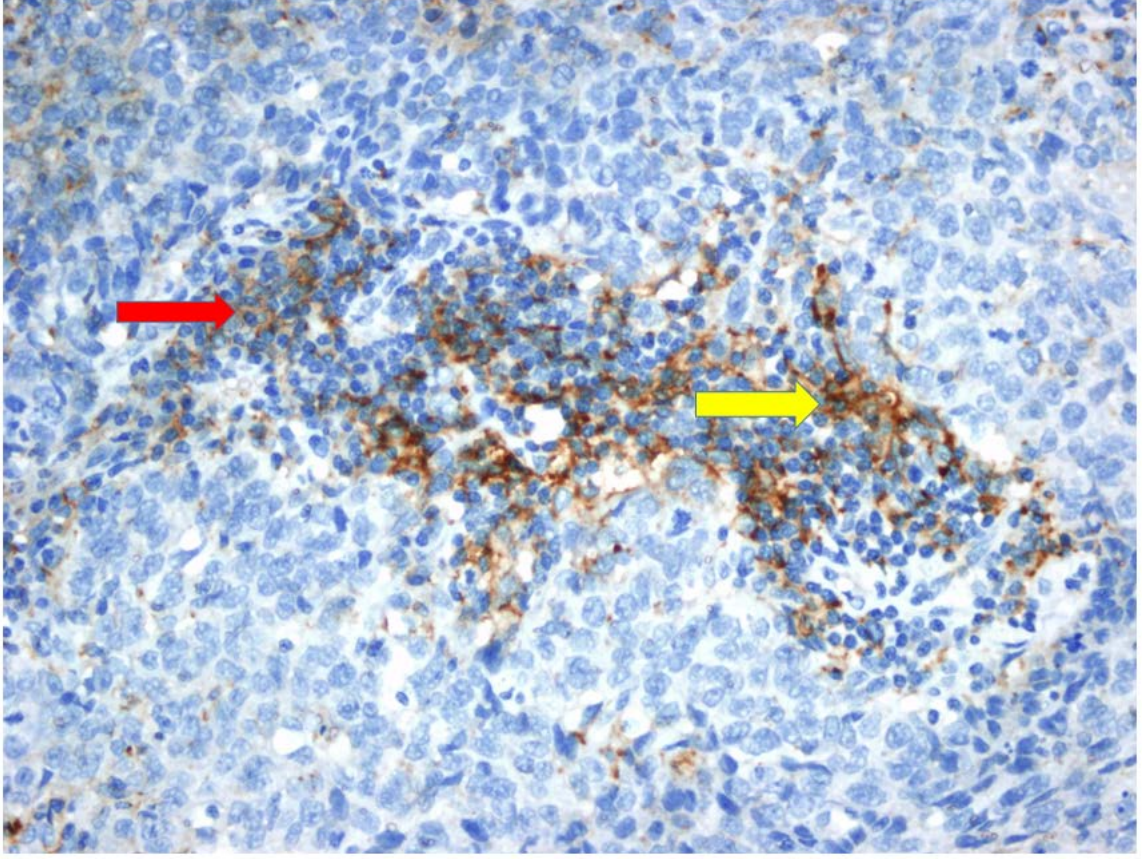
|                                 | <b>Negatif</b> | <b>Zayıf (1)</b> | <b>Orta (2)</b> | <b>Kuvvetli (3)</b> |
|---------------------------------|----------------|------------------|-----------------|---------------------|
| Tümör hücresi                   | 316 (%87)      | 45 (%12,4)*      | 11(%3)          | 4 (%1,2)            |
| Tümörle ilişkili immün hücelere | 273 (%75,2)    | 88 (%24,2)       | 12 (%6,1)       | 9 (%2,5)            |

\* 12 vaka, <%1 boyanma göstermektedir.



**Resim 7:** PD-L1 antikorunu (SP263) ile tümör ilişkili immün hücelerde orta ve zayıf şiddette boyanma. Mavi ok: Zayıf boyanan immün hücelere, Sarı ok: Orta kuvvette boyanan immün hücelere (İHKx400).





**Resim 8:** PD-L1 antikoru (SP263) ile tümör ilişkili immün hücrelerde orta şiddette ve kuvvetli boyanma. Kırmızı ok: Orta şiddette boyanan immün hücreler, sarı ok: Kuvvetli boyanan immün hücreler (IHK, x400).

#### **4.3.PD-L1 BULGULARI İLE HASTALARA AİT PARAMETRELERİN İLİŞKİSİ**

Hastalara ait prognostik parametrelerle, PD-L1'in pozitif veya negatif olması arasındaki korelasyon incelenmiştir.

PD-L1 pozitifliğiyle cinsiyet ve tanı yaşı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,984$ ,  $p=0,089$ ).

PD-L1 pozitifliği ile tümör çapı, tümör tipi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $p=0,122$ ,  $p=0,082$ ).

PD-L1 pozitifliğiyle histolojik grade arasındaki korelasyon incelendiğinde, grade III olan vakaların PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). Histolojik grade belirlenirken bakılan parametreler ayrı ayrı değerlendirildiğinde pleomorfizm varlığı ve mitoz oranının artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 21). Pleomorfizm ve mitoz açısından 3 puan alan vakalarda PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu

gözükmektedir ( $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ). Ancak tubulus yapımı ile PD-L1 pozitifliği arasındaki korelasyon incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $p=0,076$ ).

**Tablo 21:** Histolojik grade ve parametrelerin skoruna göre PD-L1 ekspresyonunun dağılımı

|                       |     | PD-L1 negatif | PD-L1 pozitif      |
|-----------------------|-----|---------------|--------------------|
| Histolojik grade      | I   | 12 (%100)     | -                  |
|                       | II  | 174 (%84,90)  | 31 (%15,10)        |
|                       | III | 87 (%59,60)   | <b>59 (%40,40)</b> |
| Tübülüs yapımı (skor) | 1   | 5 (%100)      | -                  |
|                       | 2   | 60 (%83,30)   | 12 (%16,70)        |
|                       | 3   | 208 (%72,70)  | 78 (%27,30)        |
| Pleomorfizm (skor)    | 1   | 2 (%100)      | -                  |
|                       | 2   | 138 (%85,70)  | 23 (%14,30)        |
|                       | 3   | 133 (%66,50)  | <b>67 (%33,50)</b> |
| Mitoz (skor)          | 1   | 130 (%85,50)  | 22 (%14,50)        |
|                       | 2   | 120 (%78,40)  | 33 (%21,60)        |
|                       | 3   | 23 (%39,70)   | <b>35 (%60,30)</b> |

PD-L1 durumu ile tümörün stromal yanıtı ve iltihabi hücre yanıtı arasındaki korelasyon incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmış olup, stromal yanıtı hafif olan tümörlerin PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu; iltihabi hücre yanıtı yoğun olanların ise PD-L1 negatifliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir ( $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo 22).

**Tablo 22:** Stromal ve iltihabi hücre yanıtı ile PD-L1'in ilişkisi

|                |       | PD-L1 Negatif |       | PD-L1 Pozitif |              | p      |
|----------------|-------|---------------|-------|---------------|--------------|--------|
|                |       | Sayı          | yüzde | Sayı          | yüzde        |        |
| Stromal yanıt  | hafif | 20            | 52,60 | <b>18</b>     | <b>47,40</b> | <0,001 |
|                | orta  | 183           | 74,40 | 63            | 25,60        |        |
|                | yoğun | 70            | 88,60 | 9             | 11,40        |        |
| İltihabi yanıt | hafif | 234           | 85,40 | 40            | 14,60        | <0,001 |
|                | orta  | 36            | 47,40 | 40            | 52,60        |        |
|                | yoğun | 3             | 23,10 | <b>10</b>     | <b>76,90</b> |        |



PD-L1 pozitifliği ile perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmış olup, invazyon saptanmayan vakalarda PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu görüldü ( $p=0,045$ ). Lenfovasküler invazyon açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0,806$ ) (Tablo 23).

PD-L1 ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmış olup, lenf nodu negatif olanların PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu görüldü ( $p=0,041$ ) (Tablo 23).

**Tablo 23:**PD-L1 ekspresyonu ile perinöral, lenfatik invazyon ve bölgesel lenf nodu metastazının ilişkisi

|                              |           | PD-L1 Negatif |       | PD-L1 Pozitif |              | p değeri |
|------------------------------|-----------|---------------|-------|---------------|--------------|----------|
|                              |           | Sayı          | Yüzde | Sayı          | Yüzde        |          |
| Perinöral invazyon           | Görülmedi | 185           | 72,30 | 71            | <b>27,70</b> | 0,045    |
|                              | Mevcut    | 88            | 82,20 | 19            | 17,80        |          |
| Lenfatik invazyon            | Görülmedi | 136           | 76,00 | 44            | 24,50        | 0,806    |
|                              | Mevcut    | 137           | 74,90 | 46            | 25,10        |          |
| Bölgesel lenf nodu metastazı | yok       | 106           | 69,70 | 46            | 30,30        | 0,041    |
|                              | var       | 167           | 79,10 | 44            | 20,90        |          |

PD-L1 pozitifliği ile tümörün ER ve PR ekspresyonları arasındaki ilişki ayrı ayrı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmış olup, ER ve PR negatif olanların PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu görüldü ( $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ). PD-L1 pozitifliğiyle HER2 arasındaki korelasyon incelendiğinde HER2 pozitif vakaların PD-L1 pozitifliğinin daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0,001$ ).

PD-L1 pozitifliğiyle ER, PR ve Ki-67 değerleriyle ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (sırasıyla  $p<0,001$ ;  $<0,001$ ;  $0,001$ ) (Tablo 24). PD-L1 pozitif vakalarda Ki-67 değeri daha yüksekken ER ve PR değerinin daha düşük olduğu gözlenmektedir.

**Tablo 24:** PD-L1 ekspresyonu ile ER, PR ve HER2 durumunun ilişkisi

|        |         | PD-L1 negatif |       | PD-L1 pozitif |              | p      |
|--------|---------|---------------|-------|---------------|--------------|--------|
|        |         | Sayı          | yüzde | Sayı          | yüzde        |        |
| ER     | Negatif | 33            | 43,40 | <b>43</b>     | <b>56,60</b> | <0,001 |
|        | Pozitif | 240           | 83,60 | 47            | 16,40        |        |
| PR     | Negatif | 59            | 56,20 | <b>46</b>     | <b>43,80</b> | <0,001 |
|        | Pozitif | 214           | 82,90 | 44            | 17,10        |        |
| HER2 * | Negatif | 205           | 81,30 | 47            | 18,70        | <0,001 |
|        | Pozitif | 34            | 49,30 | <b>35</b>     | <b>50,70</b> |        |

\*HER2 durumu bilinen 321 vaka üzerinden değerlendirilmiştir

ER, PR, HER2 ekspresyon profillerine göre luminal ve non-luminal olarak gruplandırıldığında, PD-L1 ile boyanma triple negatif ve HER2 eksprese eden gruplarda, luminal gruplara göre daha yüksek oranda bulundu ( $p<0,001$ ) (Tablo 25).

**Tablo 25:** ER, PR, HER2 ekspresyon durumuna göre gruplanan vakaların PD-L1 ile boyanma oranları

| ER | PR     | HER-2 | PD-L1 negatif | PD-L1 pozitif     |
|----|--------|-------|---------------|-------------------|
| +  | +      | -     | 160 (%89,4)   | 19 (%10,6)        |
| +  | veya + | -     | 245 (%83,6)   | 48 (%16,4)        |
| -  | -      | -     | 15 (%39,5)    | <b>23 (%60,5)</b> |
| -  | -      | +     | 9 (%37,5)     | <b>15 (%62,5)</b> |

Tanı yılı ile PD-L1 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı ( $p=0,127$ ). Tanı yıllarına göre 4 grup halinde sonuçlar incelendiğinde PD-L1 pozitifliği, olgu sayısı azalsa da, daha eski vakalarda pozitiflik oranının düştüğü görüldü (Tablo 26-27).

**Tablo 26:** Tanı yıllarına göre PD-L1 ekspresyonunun dağılımı

|           |      | PD-L1 Negatif |       | PD-L1 Pozitif |       | p     |
|-----------|------|---------------|-------|---------------|-------|-------|
|           |      | Sayı          | Yüzde | Sayı          | Yüzde |       |
| Tanı yılı | 2000 | 2             | 50,00 | 2             | 50,00 | 0,127 |
|           | 2001 | 4             | 80,00 | 1             | 20,00 |       |
|           | 2002 | 2             | 66,70 | 1             | 33,30 |       |
|           | 2003 | 4             | 66,70 | 2             | 33,30 |       |
|           | 2004 | 9             | 90,00 | 1             | 10,00 |       |
|           | 2005 | 18            | 90,00 | 2             | 10,00 |       |
|           | 2006 | 8             | 50,00 | 8             | 50,00 |       |
|           | 2007 | 22            | 81,50 | 5             | 18,50 |       |
|           | 2008 | 32            | 86,50 | 5             | 13,50 |       |
|           | 2009 | 38            | 74,50 | 13            | 25,50 |       |
|           | 2010 | 46            | 67,60 | 22            | 32,40 |       |
|           | 2011 | 41            | 70,70 | 17            | 29,30 |       |
| 2012      | 47   | 81,00         | 11    | 19,00         |       |       |
| Total     |      | 273           | 75,20 | 90            | 24,80 |       |

**Tablo 27:** Gruplanmış tanı yıllarına göre PD-L1 pozitif vakaların dağılımı

| Tanı yılı           | Sayı | Yüzde |
|---------------------|------|-------|
| 2010-2011-2012      | 184  | 50,7  |
| 2007-2008-2009      | 115  | 31,7  |
| 2004-2005-2006      | 46   | 12,7  |
| 2000-2001-2002-2003 | 18   | 5     |
| Total               | 363  | 100   |

PD-L1 pozitifliği ile nüks ve sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla  $p=0,187$ ,  $p=0,952$ ).

PD-L1 pozitifliğinin diğer parametrelerle ilişkisi lojistik regresyon analizinde incelendiğinde, PD-L1 pozitifliği ile stromal yanıt derecesi, iltihabi yanıt derecesi ve HER2 ekspresyon durumu arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptandı (Tablo 28).

**Tablo 28:** PD-L1 pozitifliği ile diğer parametrelerin ilişkisi

|                              | B       | S.E.      | Wald   | Sig.   | OR     | 95% güven aralığı |           |
|------------------------------|---------|-----------|--------|--------|--------|-------------------|-----------|
|                              |         |           |        |        |        | Alt sınır         | Üst sınır |
| Perinöral invazyon           |         |           |        |        |        |                   |           |
| yok                          |         |           |        |        |        |                   |           |
| var                          | -0,203  | 0,381     | 0,284  | 0,594  | 0,816  | 0,387             | 1,721     |
| Bölgesel lenf nodu metastazı |         |           |        |        |        |                   |           |
| yok                          |         |           |        |        |        |                   |           |
| var                          | -0,293  | 0,377     | 0,602  | 0,438  | 0,746  | 0,356             | 1,563     |
| ER durumu                    |         |           |        |        |        |                   |           |
| negatif                      |         |           |        |        |        |                   |           |
| pozitif                      | -0,753  | 0,513     | 2,158  | 0,142  | 0,471  | 0,172             | 1,286     |
| PR durumu                    |         |           |        |        |        |                   |           |
| negatif                      |         |           |        |        |        |                   |           |
| pozitif                      | -0,424  | 0,44      | 0,927  | 0,336  | 0,654  | 0,276             | 1,551     |
| HER2 durumu                  |         |           |        |        |        |                   |           |
| negatif                      |         |           |        |        |        |                   |           |
| pozitif                      | 1,446   | 0,366     | 15,601 | <0,001 | 4,246  | 2,072             | 8,701     |
| Stromal yanıt                |         |           |        |        |        |                   |           |
| hafif (ref)                  |         |           |        |        |        |                   |           |
| orta                         | -0,977  | 0,49      | 3,978  | 0,046  | 0,376  | 0,144             | 0,983     |
| yoğun                        | -2,074  | 0,631     | 10,787 | 0,001  | 0,126  | 0,036             | 0,433     |
| İltihabi yanıt               |         |           |        |        |        |                   |           |
| hafif (ref)                  |         |           |        |        |        |                   |           |
| orta                         | 1,598   | 0,372     | 18,4   | <0,001 | 4,942  | 2,381             | 10,255    |
| yoğun                        | 3,184   | 0,966     | 10,859 | 0,001  | 24,132 | 3,633             | 160,306   |
| Histolojik grade             |         |           |        |        |        |                   |           |
| 1 (ref)                      |         |           |        |        |        |                   |           |
| 2                            | -20,698 | 11401,192 | 0      | 0,999  | 0      | 0                 | .         |
| 3                            | 0,164   | 0,403     | 0,166  | 0,684  | 0,849  | 0,385             | 1,869     |
| Sabit                        | 0,063   | 0,702     | 0,008  | 0,928  | 0,939  |                   |           |

R<sup>2</sup>=0,31(Cox&Snell) 0,46(Nagelkere)  $\chi^2=118,846$ , p<0,001 \*p<0,05

#### 4.4.HASTALARIN YAŞAMLARIYLA İLGİLİ PARAMETRELERİN ANALİZİ

Vakalardan 2'sinin sağ kalım bilgisine ulaşılamadı. Diğer vakaların ise %18,5'u eks olduğu (n=66), %81,4'ünün (n=290) sağ olduğu saptandı. Vakaların %24,6'sında hastalığın nüksü varken (n=88), %75,4'ünde (n=270) nüks veya metastaz görülmedi. Sağ kalımla ilgili analizler 356 hasta; nüks ile ilgili analizler 358 hasta üzerinden yapıldı (Tablo 29).

**Tablo 29:** Olgulara ait nüks ve sağkalım bilgileri

|                      |         | <b>Sayı</b> | <b>Yüzde</b> |
|----------------------|---------|-------------|--------------|
| Nüks*                | Var     | 270         | %75,4        |
|                      | Yok     | 88          | %24,6        |
| Sağ kalım bilgisi ** | Ölen    | 66          | %18,5        |
|                      | Yaşayan | 290         | %81,4        |

\* 358 hasta üzerinden değerlendirilmiştir.

\*\*356 hasta üzerinden değerlendirilmiştir.

Takip süresi açısından bakıldığında 358 hastanın ortalama 101,8 aylık (21-255 ay, medyan 94,5 ay) takip bilgilerine ulaşıldı. Nüks açısından bakıldığında 88 hastada nüks görülmüş olup, bu hastalarda nüks görülme zamanı ortalama 60,9 aydır (0-167 ay, medyan 60).

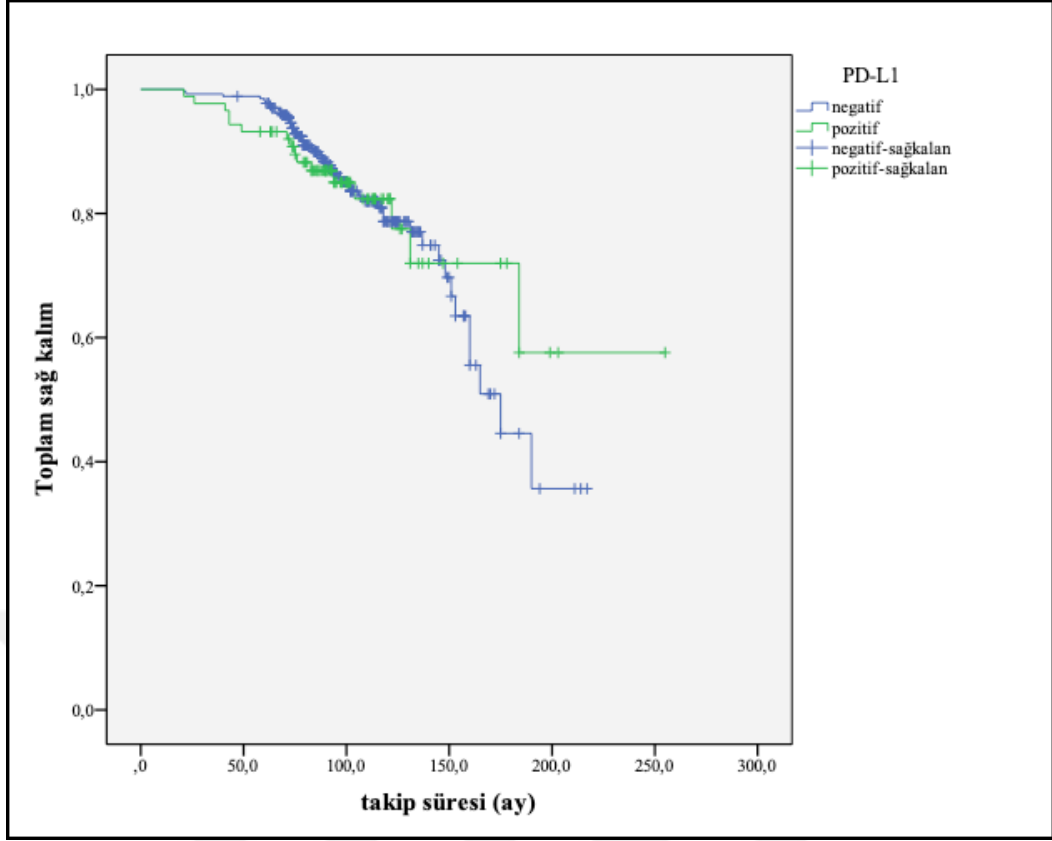
#### 4.4.1. Toplam Sağ Kalım İle İlgili Sonuçlar

Sağ kalım ile nüks arasındaki korelasyona bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon mevcut olup, eks olmuş vakalarda nüks daha yüksek saptanmıştır. ( $p<0,001$ )

PD-L1 ile eks/sağ kalım korelasyonuna bakıldığında anlamlı bir korelasyon görülmemiştir ( $p=0,157$ ) (Tablo 30).

**Tablo 30:** PD-L1 ekspresyonuna göre sağ kalım durumu

|               | <b>Ölen</b> | <b>Yaşayan</b> | <b>Yüzde</b> | <b>p</b> |
|---------------|-------------|----------------|--------------|----------|
| PD-L1 negatif | 62          | 261            | %80,80       | 0,157    |
| PD-L1 pozitif | 4           | 29             | %87,90       |          |



**Grafik 2:** PD-L1 ekspresyon durumuna göre toplam sağ kalım

Cox regresyon analizi sonucunda sağ kalım ile rezeksiyon tipi, tümör çapı, perinöral invazyon ve bölgesel lenf nodu metsstazı arasında anlamlı ilişki bulundu (Tablo 31).

**Tablo 31:** Cox regresyon analizi

|                              |                |       |       |       |       |       | %95 güven aralığı |           |
|------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-----------|
|                              |                | B     | SE    | Wald  | p     | OR    | Alt sınır         | Üst sınır |
| Rezeksiyon tipi              | Parsiyel (ref) |       |       |       |       |       |                   |           |
|                              | Mastektomi     | 0,399 | 0,448 | 0,794 | 0,373 | 1,491 | 0,619             | 3,59      |
|                              | MRM            | 0,565 | 0,331 | 2,917 | 0,088 | 1,76  | 0,92              | 3,366     |
| Tümör çapı                   |                | 0,072 | 0,071 | 1,023 | 0,312 | 1,075 | 0,935             | 1,236     |
| Perinöral invazyon           | yok            |       |       |       |       |       |                   |           |
|                              | var            | 0,359 | 0,265 | 1,833 | 0,176 | 1,432 | 0,851             | 2,41      |
| Bölgesel lenf nodu metastazı | yok            |       |       |       |       |       |                   |           |
|                              | var            | 0,487 | 0,307 | 2,514 | 0,113 | 1,627 | 0,891             | 2,969     |

$\chi^2 = 642,632, p < 0,001$

Hastaların sağ kalımı ile lenf nodu metastazı varlığı arasında korelasyon saptandı (p=0,012).

Tümörün histolojik grade'i, eşlik eden insitu karsinom varlığı, stromal yanıt ve iltihabi hücre infiltrasyonunun derecesi ile sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla p=0,371, p=0,458, p=0,150, p=0,583). Histolojik grade saptanırken bakılan tübülüs yapımı, pleomorfizm ve mitoz sayısı ile de sağ kalım arasında ilişki görülmedi (p=0,378, p=0,671, p=0,821)

**Tablo 32:** Tümör boyutu ile sağ kalım korelasyonu

|            |       | <b>Ölen (n)</b> | <b>Yaşayan n (%)</b> | <b>p</b>     |
|------------|-------|-----------------|----------------------|--------------|
| Tümör çapı | <2cm  | 15              | 110 (88,0)           | <b>0,026</b> |
|            | 2-5cm | 40              | 164 (80,4)           |              |
|            | ≥5cm  | 11              | 16 (59,3)            |              |

Tümör boyutu arttıkça sağ kalım oranının azaldığı görüldü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001) (Tablo 32).

Tümörde lenfatik invazyon varlığı ile sağ kalım arasında anlamlı korelasyon bulunmazken (p=0,118), perinöral invazyon ile sağ kalım arasında anlamlı korelasyon görüldü (p=0,027) (Tablo 33).

**Tablo 33:** Sağ kalım ile perinöral, lenfatik invazyon korelasyonu

|                    |           | <b>Ölen (n)</b> | <b>Yaşayan (n)</b> | <b>Yaşayan (%)</b> | <b>p</b>     |
|--------------------|-----------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Perinöral invazyon | Görülmedi | 42              | 209                | %83,30             | <b>0,027</b> |
|                    | Mevcut    | 24              | 81                 | %77,10             |              |
| Lenfatik invazyon  | Görülmedi | 25              | 151                | %85,80             | 0,118        |
|                    | Mevcut    | 41              | 139                | %77,20             |              |

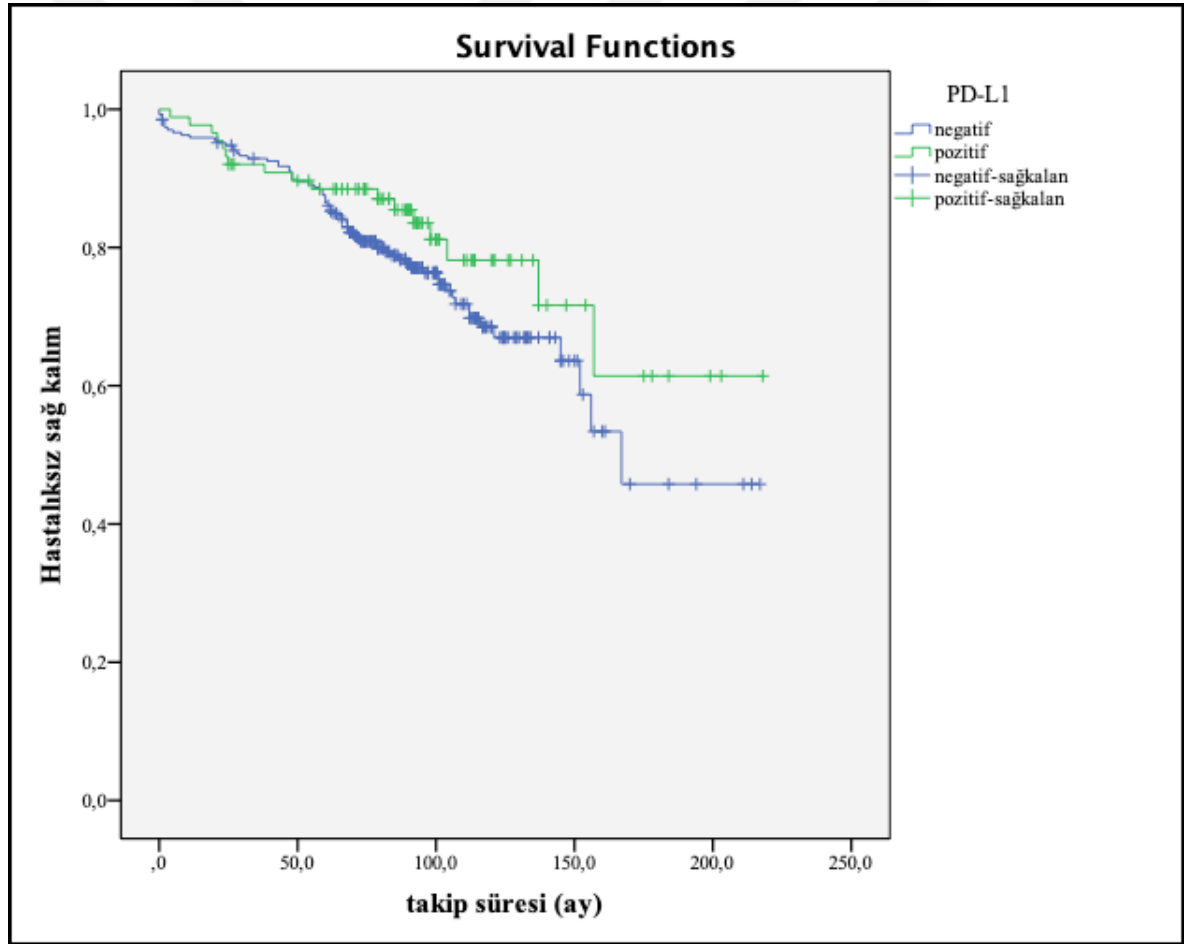
Hastaların sağ kalımı ile ER, PR ve HER2 ekspresyon durumları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (p=0,726, p=0,106, p=0,376).

#### 4.4.2. Hastaliksız Sağ Kalım İle İlgili Sonuçlar

PD-L1 ekspresyonu ile nüks arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0,160$ ) (Tablo 34).

**Tablo 34:** Nüks ve PD-L1 ekspresyon durumuna göre vakaların dağılımı

|               | Nüks var | Nüks yok | Yüzde  | p     |
|---------------|----------|----------|--------|-------|
| PD-L1 negatif | 71       | 199      | %73,70 | 0,160 |
| PD-L1 pozitif | 17       | 71       | %80,70 |       |
| Toplam        | 88       | 270      | %75,40 |       |



**Grafik 3:** PD-L1 durumuna göre hastaliksız sağ kalım grafiği

Hastaliksız sağ kalım ile rezeksiyon tipi, lenf nodu metastazı varlığı arasında korelasyon saptanmadı ( $p<0,001$ ,  $p=0,002$ ).



Tümör çapı 2 cm'nin altında olan vakalarda hastaliksız sağ kalımın daha yüksek olduğu görüldü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ) (Tablo 35).

**Tablo 35:** Tümör boyutu ile hastaliksız sağ kalım ilişkisi

|              |       | Nüks var | Nüks yok | Hastaliksız sağ kalım yüzdesi | p                |
|--------------|-------|----------|----------|-------------------------------|------------------|
| Tümör boyutu | <2cm  | 16       | 110      | %87,30                        | <b>&lt;0,001</b> |
|              | 2-5cm | 57       | 148      | %72,20                        |                  |
|              | ≥5cm  | 15       | 12       | %44,40                        |                  |

Tümörün histolojik grade'i, eşlik eden insitu karsinom varlığı, stromal yanıt ve iltihabi hücre infiltrasyonunun derecesi ile hastaliksız sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla  $p=0,304$ ,  $p=0,634$ ,  $p=0,979$ ,  $p=0,973$ ). Histolojik grade saptanırken değerlendirilen tübülüs yapımı, pleomorfizm ile de hastaliksız sağ kalım arasında korelasyon görülmedi ( $p=0,536$ ,  $p=0,712$ ). Mitoz sayısı arttıkça hastaliksız sağ kalımın azaldığı görüldü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,041$ ) (Tablo 36).

**Tablo 36:** Hastaliksız sağ kalım durumuna göre vakaların histolojik grade ve pleomorfizm-mitoz skorlarının dağılımı

|                    |     | Nüks var | Nüks yok | Hastaliksız sağ kalım yüzdesi | p            |
|--------------------|-----|----------|----------|-------------------------------|--------------|
| Histolojik grade   | I   | 1        | 11       | %91,70                        | 0,304        |
|                    | II  | 48       | 154      | %76,20                        |              |
|                    | III | 39       | 105      | %72,90                        |              |
| Pleomorfizm (skor) | 1   | 0        | 2        | %100,00                       | 0,712        |
|                    | 2   | 42       | 119      | %73,90                        |              |
|                    | 3   | 46       | 149      | %76,40                        |              |
| Mitoz (skor)       | 1   | 28       | 121      | %81,20                        | <b>0,041</b> |
|                    | 2   | 47       | 105      | %69,10                        |              |
|                    | 3   | 13       | 44       | %77,20                        |              |

Tümörde saptanan lenfatik veya perinöral invazyon ile hastaliksız sağ kalım arasında anlamlı ilişki görüldü ( $p=0,031$ ,  $p=0,015$ ) (Tablo 37).

**Tablo 37:** Hastaliksız sağ kalım ile perinöral ve lenfatik invazyon ilişkisi

|                    |           | Nüks var | Nüks yok | Hastaliksız sağ kalım yüzdesi | p            |
|--------------------|-----------|----------|----------|-------------------------------|--------------|
| Perinöral invazyon | Görülmedi | 55       | 198      | %78,30                        | <b>0,015</b> |
|                    | Mevcut    | 33       | 72       | %68,60                        |              |
| Lenfatik invazyon  | Görülmedi | 34       | 144      | %80,90                        | <b>0,031</b> |
|                    | Mevcut    | 54       | 126      | %70,00                        |              |

Tümörün ER, PR ve HER2 ekspresyon durumuyla hastaliksız sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı (sırasıyla p=0,431, p=0,309, p=0,852).

**Tablo 38:** Cox regresyon analizi

|                              |                 | B     | SE    | Wald   | p            | OR    | %95 güven aralığı |           |
|------------------------------|-----------------|-------|-------|--------|--------------|-------|-------------------|-----------|
|                              |                 |       |       |        |              |       | Alt sınır         | Üst sınır |
| Rezeksiyon tipi              | Parsiyel (ref)  |       |       |        |              |       |                   |           |
|                              | Mastektomi      | 0,647 | 0,394 | 2,694  | 0,101        | 1,91  | 0,882             | 4,134     |
|                              | MRM             | 0,559 | 0,29  | 3,722  | 0,054        | 1,748 | 0,991             | 3,084     |
| Perinöral invazyon           | Görülmedi (ref) |       |       |        |              |       |                   |           |
|                              | Mevcut          | 0,419 | 0,229 | 3,331  | 0,068        | 1,52  | 0,97              | 2,383     |
| Bölgesel lenf nodu metastazı | Görülmedi(ref)  |       |       |        |              |       |                   |           |
|                              | Mevcut          | 0,417 | 0,29  | 2,069  | 0,150        | 1,517 | 0,86              | 2,676     |
| Lenfatik invazyon            | Görülmedi (ref) |       |       |        |              |       |                   |           |
|                              | Mevcut          | 0,021 | 0,249 | 0,007  | 0,932        | 1,022 | 0,627             | 1,665     |
| Tümör çapı                   |                 | 0,176 | 0,055 | 10,347 | <b>0,001</b> | 1,192 | 1,071             | 1,327     |
| Mitoz                        | 0 (ref)         |       |       |        |              |       |                   |           |
|                              | 1               | 0,387 | 0,251 | 2,387  | 0,122        | 1,473 | 0,901             | 2,408     |
|                              | 2               | 0,267 | 0,353 | 0,573  | 0,449        | 1,306 | 0,654             | 2,606     |

$\chi^2=906,571$ , p<0,001

Cox regresyon analizinde, hastaliksız sağ kalım ile tümör çapı arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Tablo 38).

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve hormonoterapi yanı sıra trastuzumab gibi hedefe yönelik tedavi yer almaktadır. Tümörün evresi, hormon reseptörlerinin durumu ve HER2 durumuna göre çeşitli kombinasyonlarla tedavi şekilleri değişmektedir.

Kanser hücreleri ile immun sistem arasındaki oldukça kompleks ve dinamik ilişkilerin daha iyi anlaşılması ile immun sistemi kontrol eden noktalar, tümör içi lenfoid hücreler ve dolayısı ile de immunoterapi tüm dünyada ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca, mevcut kanser tedavilerinin yan etki olarak normal hücrelerde de ciddi toksisite oluşturması nedeniyle, günümüzde immunoterapi ilaçları umut verici olmuştur.

T hücre aktivasyonunu önleyen ve tümör hücrelerinin immün yanıtı kaçımasını sağlayan CTLA-4 ve PD-1 gibi immun kontrol noktalarının tanımlanmasından sonra bu noktaları bloke eden ajanlar geliştirilmiş ve immun sistemin tümöre olan yanıtını artırmak hedeflenmiştir. İpilimumab, CTLA-4'e karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. Nivolumab ve pembrolizumab ise PD-1'i, atezolizumab ise PD-1'in ligandı olan PD-L1'i hedef almaktadır. Malign melanom, küçük hücre dışı akciğer kanserleri, böbrek hücreli böbrek kanseri, Merkel hücreli karsinom ve mesane kanserleri gibi tümörlerde immunoterapi klinik kullanıma girmiş ve daha iyi sağ kalım sonuçları elde edilmiştir (67-70). Ancak, her iki yolun inhibisyonu ile ciddi otoimmün yan etkiler oluşabilmektedir. Meme karsinomlarında da PD-L1 eksprese eden bazı tümörlerde immunoterapiye yanıt kemoterapiye göre daha iyi olduğuna dair kanıtlar bulunmakla birlikte, PD-L1'in saptanmasında hangi antikorun kullanılacağı ve eşik değerin ne olduğu konusunda henüz standart yaklaşımlar bulunmamaktadır (71). Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında, yüksek PD-L1 ekspresyonunun daha kısa hayat süresi ile ilişkili kötü bir prognostik belirteç olduğu saptanmıştır (72). Meme karsinomlarında PD-L1'in prognostik önemini değerlendiren çalışmalarda ise birbirine ters düşen sonuçlar mevcuttur. Bu çalışmaların bazılarında, meme kanserlerinde PD-L1'in kötü bir prognostik parametre olduğu ve PD-L1 ekspresyonu arttıkça yaşam süresinin azaldığı gösterilmiştir (73, 74). Ayrıca, meme

karsinomlarında PD-L1 ekspresyonunun büyük tümör boyutu, yüksek histolojik grade, ER ve PR negatifliği, HER2 pozitifliği gibi kötü prognostik parametreler ile birliktelik gösterdiği de saptanmıştır (75-77). Ancak, Sabatier ve arkadaşlarının (78) 5.454 meme kanserinde yaptıkları çalışmada, tüm histolojik tipteki meme karsinomları değerlendirildiğinde, PD-L1 pozitifliğinin prognostik öneminin olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, moleküler alt tiplere göre değerlendirdiklerinde, bazal tip meme kanserlerinde, diğer tüm klinikopatolojik parametrelerden bağımsız olarak, PD-L1 pozitifliğinin prognostik öneminin olduğu ve PD-L1 ekspresyonu arttıkça yaşam süresinin de arttığı saptanmıştır (78).

Meme karsinomlu hastalarda, PD-L1 ile immunoterapi pilot uygulamalarda ve faz I-II çalışmalarında, PD-1/PDL-1 aksını bloke eden tek ajan şeklinde veya diğer kemoterapi ilaçları ile birarada adjuvan ya da neoadjuvan olarak uygulanmıştır (79-85). Kısıtlı sayıdaki vaka ile yapılan bu çalışmalarda komplet remisyondan hastalığın bir süre stabil kalmasını sağlamaya kadar değişen yanıtlar alınmıştır. Ancak bu çalışmalarda, çalışmaya alınan hastaların özellikleri, PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunu saptamada kullanılan antikolar, değerlendirme kriterleri ve pozitiflik için kabul edilen eşik değerler açısından farklılıklar vardır. Schmid ve arkadaşlarının 2018 yılı son aylarında yayınladığı faz III çalışmada, triple negatif metastatik meme karsinomlarında PD-L1 ekspresyonunun belirlenmesinde SP142 antikoru kullanılmış ve değerlendirme tümörü infiltre eden immun hücreler üzerinden yapılmıştır. Bu çalışmada, PD-L1 pozitif grupta, 1 yıllık progresyonsuz yaşam oranı kemoterapi+atezoluzimab hastalarda %29.1 iken, kemoterapi+plasebo alanlarda bu oranın %16.4'e düştüğü görülmüştür. Toplam sağkalım açısından değerlendirildiğinde ise, kemoterapi+atezoluzimab alan hastalardaki medyan yaşam süresi 25 ay bulunurken, kemoterapi+plasebo alan grupta bu oranın 15.5 aya düştüğü görülmüştür (84).

Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde yapılmış Blueprint-1 çalışmasında, farklı antikolar (28.8, 22C3, SP142, SP263) aynı örnekler üzerinden karşılaştırıldığında, 38 vakanın 24'ünde pozitiflik ve negatiflik yönünden antikoların uyumlu olduğu, ancak 14 örnekte farklı sonuçların elde edildiği görülmüştür (63). Bunun yanı sıra ilaca göre değişen eşik değerlere göre de hastalar pozitif veya negatif olarak değerlendirilebilmektedir. Uluslararası akciğer kanseri çalışma grubu (International association for the study of lung cancer - IASLC), akciğer karsinomlarında SP263 klonu için durvalumab ile tedavide tümör hücrelerindeki %25 ve üzeri boyanmayı anlamlı kabul ederken, nivolumab ile tedavide

<%1, %1-5, %5-10, >%10 gibi aralıklara göre rapor edilmesini önermektedir. PD-L1 ile ilgili pek çok çalışmada boyanmanın heterojen olduğu da bildirilmektedir. IASLC'nin akciğer karsinomları için oluşturduğu klavuzda, tümör hücrelerindeki PD-L1 pozitifliğinin değerlendirilmesinde herhangi bir yoğunluktaki komplet ya da parsiyel membranöz boyanmanın pozitif olarak kabul edilmesi önerilmektedir (40). Literatürde mide karsinomlarında yapılan bazı çalışmalarda sitoplazmik boyanmanın da pozitif kabul edildiği görülmektedir. Meme karsinomlarında Karnik ve arkadaşlarının (86) 3 farklı antikora yaptığı çalışmada 136 vakanın 20'sinde uyumsuzluk saptanmış ve standardizasyon çalışmalarına ihtiyaç olduğu görülmüştür. Ayrıca akciğer karsinomlarında yapılan Blueprint-2 çalışmasında sitolojik materyal ve küçük biyopsilerde de değerlendirme sonuçlarında uyum sağlanamadığı gösterilmiştir (64). Meme karsinomlarında ise, farklı ilaçlara ya da farklı antikor klonlarına göre belirlenmiş PD-L1 eşik değerleri bulunmamaktadır (86).

Çalışmamızda tümör dokularından 0,4 cm çapında örnekler alınmıştır. Bu kısıtlı örneklemin tümörün tamamını temsil etmiyor olabileceği ve PD-L1'in heterojen boyanmasından dolayı örneklenen kısımda pozitif hücre saptanmamış olabileceği düşünülmüştür. Eşik değerleriyle ilgili de standardizasyon olmadığı için çalışmamızdaki tüm boyanma yüzdeleri not edilmiş ve akciğer karsinomlarında hastanın tedavi alıp almayacağını belirleyen en düşük değer olan “%1” eşik değerine göre pozitif veya negatif olarak yorumlanmıştır. Mevcut alınan tümör örneğine göre, boyanma oranı %1'in altında kalan 12 vaka negatif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamıza sitolojik materyal veya küçük biyopsiler alınmamış, tümör dokusu tamamen çıkmış vakalar dahil edilmiştir.

Pratik uygulamada, akciğer kanserlerinde yapılacak immunoterapide tümördeki PD-L1 ekspresyonunun %1'in üzerinde olması gerekmektedir. Literatürde, tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun tümörle ilişkil lenfositler (TİL)'deki ile paralellik gösterdiğini ortaya koyan yayınlar da mevcuttur. Zhou ve arkadaşlarının (87) meme karsinomlarında yaptığı çalışmada, PD-L1 pozitif tümör hücre oranının tümör mikroçevresindeki immun hücrelerde saptanan PD-1 pozitifliği oranı ile benzer olduğu saptanmıştır.

PD-1/PD-L1 aksı normal immunitenin bir parçasıdır. Uzun süren iltihaplarda daha belirgin olmak üzere, T lenfosit aktivasyonu ile üretilen bu sinyal yolu immun sistem yanıtını dengede tutmaktadır. Bu nedenle PD-L1 değerlendirmesinin yapıldığı

alanda eski biyopsi alanı, kronik bir iltihabi süreç bulgularının olmamasına dikkat edilmelidir.

PD-L1 ekspresyonunun İHK ile değerlendirilmesi en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. İHK boyama sonuçlarının fiksasyon solüsyonuna ve fiksasyon süresine göre değişiklik gösterebileceğini bildiren yayınlar mevcuttur (88). Doğru sonuçların elde edilebilmesi için soğuk iskemik zamanının (fiksasyona giriş süresi) 30 dk'nın altında olması, bu sürenin 1 saati geçmemesi gerekmektedir. En ideal fiksatif %10'luk tamponlu formalin olup fiksasyon süresi kor iğne biopsilerde 6-48 saat, eksizyon materyallerinde ise 24-48 saat olarak önerilmektedir.

Tümör hücrelerinde PD-L1'in immunhistokimyasal olarak değerlendirilmesinde sitoplazmik membrandaki membranöz boyanma dikkate alınmaktadır. Çalışmamızda üç vakada nükleer pozitif boyanma gösteren tümör hücreleri görülmüş ancak değerlendirmeye alınmamıştır. PD-L1 ile nükleer boyanma özofagus karsinomlarında da görülmüş ve bu çalışmada nükleer pozitifliğin invazyon derinliği ile ilişkili olduğu saptanmıştır (89). Polioudaki ve arkadaşları uzun fiksasyon veya Triton X ile kısa fiksasyon sonucunda PD-L1'in membranöz boyanmasının bozulabildiği, ER-golgi zonunda boyanma olabileceği gösterilmiştir. Doxorubisin tedavisi alan hastalarda immun floresan yöntem ile PD-L1'in membran yerine nükleer boyandığı görülmüş, ancak bu durumun doxorubisin ile direkt ilişkisinin olmadığı düşünülmüştür. Kai ve arkadaşlarının yaptığı 32 vakalık çalışmada 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 1 hafta süren fiksasyon sonucunda PD-L1 ve HER2 boyanmasında anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Üç aydan daha uzun fiksasyon sonucunda ise, 1 vakada PD-L1'in negatifleştiği, 3 vakada HER2'nin zayıf boyandığı ya da boyanmanın tamamen kaybolduğu gösterilmiştir (88). Fiksasyonla ilgili farklılıkları en aza indirebilmek için, başka bir merkezde incelenmiş ve bölümümüze revizyon için gelmiş vakalara ait hazır parafin bloklar çalışmamıza dahil edilmemiştir.

PDL-1 ekspresyonunun belirlenmesinde parafin blokların yaşının da önemli olduğu bildirilmektedir. Mide adenokarsinomlarında yapılan bir çalışmada 42 günden daha eski materyallerde PD-L1 pozitifliği oranında düşme saptanmıştır. 42 günden daha yeni olan arşiv materyallerindeki PD-L1 pozitifliği %73.3 iken, 900 günden daha eski materyallerde bu oranın %39.1'e düştüğü görülmüştür (90). Bizim çalışmamızda da, tanı yıllarına göre değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, eski yıllara ait dokularda

PD-L1 pozitiflik oranında düşme olduğu saptanmıştır.

PD-L1 sadece tümör hücreleri ve TİL’de görülmemektedir. Tümör mikroçevresinde ve çevredeki normal dokularda yer alan makrofaj, endotel, fibroblastlar ve sinir hücrelerinde de eksprese edilebilmektedir. Parra ve arkadaşlarının farklı tümör tiplerinde yaptığı çalışmada, bazı vakalarda tümör alanı içinde ve normal çevre dokuda yer alan tümör olmayan hücrelerde PD-L1 ile boyanma olduğu görülmüştür. Bu boyanma, bazı tümörlerde nükleer, bazılarında sitoplazmik, bazılarında da membranöz karakterde saptanmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen duktal meme karsinomu örneklerinde tümör, makrofaj ve TİL dışındaki hücrelerde boyanma görülmemiştir. Bizim vakalarımızdan birinde endotelde boyanma saptanmıştır. İnternal pozitif kontrol olarak da kullanılabilen bu hücrelerdeki boyanma değişikliklerinin sebebi kesin olarak bilinmemektedir (91).

Tümörde ve TİL’de pozitiflik saptanan tüm vakalarımızda boyanmanın heterojen olduğu görüldü. Dill ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer şekilde heterojenite saptanmış olup %50 eşik değerinin üstü diffüz kabul edildiğinden 30 vakanın 6’sı diffüz boyanma olarak kabul edilmiştir (92).

Meme karsinomları alt tiplerinde yapılan çalışmalarda medüller özellikler gösteren İDK ile apokrin ve metaplastik özellikler tümörlerde PD-L1’in eksprese olduğu görülmüştür (92). Bizim çalışmamızda ise tümörün histolojik tipi ile PD-L1 ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda tümörün histolojik grade’i arttıkça PD-L1 ekspresyonunun da arttığı görüldü. Grade III tümörlerdeki PD-L1 pozitifliğinin grade I ve II’ye göre daha yüksek olduğu saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). Literatürde pek çok çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (8, 78, 86, 87, 92-96) Çalışmamızda ayrıca histolojik grade belirlenirken değerlendirilen parametreler de ayrı ayrı incelenmiş olup, pleomorfizm ve mitoz sayısı arttıkça PD-L1 pozitifliğinin de arttığı saptandı. Ki-67 sonucu bilinen vakalarda da, medyan değer üzerindeki proliferasyon indeksine sahip olanlarda PD-L1 pozitifliğinin arttığı görüldü. Literatürde de Ki-67 oranları arttıkça PD-L1 pozitifliğinin arttığını bildiren yayınlar mevcuttur (86, 87, 94, 97).

Tümör mikroçevresinde yer alan TİL’lerdeki PD-L1 ekspresyonunun da anlamlı olduğunu gösteren pek çok yayın mevcuttur (31, 98). Ayrıca neoadjuvan tedavi için prediktif, adjuvan için de prognostik öneminin olduğu gösterilmiştir (98). “TİL Çalışma

Grubu” TİL oranının belirlenmesine yardımcı olacak kriterler önermiştir. Bu kriterlere göre tümörün stromasında saptanan immun hücrelerin yüzdesi belirlenmekte ve sayıma stromadaki tüm mononükleer immun hücreler dahil edilmektedir. Değerlendirme alanında nekroz ve granülasyon dokusu gibi sonucu etkileyebilecek alanların olmaması önerilmektedir (31).

TİL’ler yerleşim yerlerine göre tümör hücrelerinin arasında, direkt tümör hücreleri ile kontakt haldeyse “intratümöral TİL”, tümör adaları arasındaki stromadaysa “stromal TİL” olarak gruplandırılmaktadır. Tümörün invazyon sınırlarındaki ise “peritümöral” olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca, peri-tümöral stromaya yakın bölgedeki meme dokusunda “tersiyer lenfoid yapı (tertiary lenfoid structure, TLS) olarak adlandırılan lenfosit agregatları da mevcuttur. Buisseret ve arkadaşlarının (99) çalışmasında, TLS varlığının daha yüksek oranda TİL varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunun daha yüksek TİL ve TLS ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca yüksek TİL oranı, TLS varlığı ve PD-L1 ekspresyonunun daha agresif tümörlerde görüldüğü ortaya konulmuştur (31, 99, 100). Lenfositlerle ilgili Wang ve arkadaşlarının (101) yaptığı çalışmada, tümörle yakın ilişkideki stromada CD4 ve CD8 lenfositlerin daha fazla olduğu, CD4/CD8 oranının hastaliksız ve toplam sağ kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Lenfositlerin yerleşim yerleri açısından bakıldığında, yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar mevcuttur. Wang ve arkadaşları (101) triple negatif meme tümörlerinde, tümör hücreleri ile çevre meme dokusu arasındaki interface alanda yer alan lenfositlerdeki CD4/CD8 oranının sağ kalım ile ilişkili olduğunu göstermiş, ancak intratümöral stromadakilerle sağ kalım arasında anlamlı ilişki bulamamışlardır. Cataccio ve arkadaşlarının (102) çalışmasında ise CD8+ lenfositlerin hastaliksız sağ kalımla korelasyonu saptanamamıştır. Ancak intratümöral yerleşimli CD8+ lenfositlerin varlığı daha kısa hastaliksız sağ kalım ve PD-1 ile PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Stromal CD8+ lenfositlerin ise sadece PD-1 ile korelasyona sahip olduğu görülmüştür. Brockhoff ve arkadaşlarının (103) triple negatif meme kansinomlarında yaptığı çalışmada, PD-1+ immun hücrelerin varlığının hastaliksız ve toplam sağ kalım üzerine etkisinin olduğu saptanmıştır.

Tümör ilişkili lenfoid hücrelerin yerleşim yeri kadar yoğunluğunun da hastaların yaşam süresinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. TİL’ler yoğunluklarına göre de düşük, orta ve yoğun olarak da gruplandırılmaktadır (100). Stromadaki lenfositlerin



oranını %30 eşik değerine göre gruplandıran bir çalışmada, düşük (<%30) lenfosit oranının daha kısa sürede nüks ile ilişkili olduğu, ancak toplam sağ kalımda etkisinin olmadığı saptanmıştır. PD-L1 boyanma oranlarına bakıldığında da daha çok PD-L1+ lenfosit içeren vakaların daha kötü prognoza sahip oldukları gösterilmiştir (104). Çalışmamızda ise iltihabi hücre yoğunlukları hafif, orta, yoğun olarak gruplandırılmış ancak sağ kalım analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç alınamamıştır (p=0,583).

TİL oranının yoğunluğu ile triple negatif ve HER2 eksprese eden alt tiplerde tedavi yanıtları değişmektedir. <%10, %10-50 ve >%50 eşik değerlerine göre düşük-orta-yoğun olarak gruplandırıldığında, yüksek oranda TİL varlığında triple negatif meme karsinomlarında adjuvan tedavi ile prognoz daha iyi olduğu gösterilmiş, ancak HER2 eksprese eden grupta bu ilişki saptanamamıştır. HER2 pozitif grupta neoadjuvan tedavi sonrası TİL varlığı komplet remisyon ile ilişkili ve olumlu bir prognostik bulgu olsa da aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (105). Noske ve arkadaşlarının (106) 1318 meme karsinomunda, sp263 PD-L1 antikoruyla yaptıkları çalışmada, PD-1 ve PDL-1 ekspresyonunun, TİL yoğunluğu ile ilişkili olduğu, triple negatif ve HER2 eksprese eden alt tiplerde daha yüksek oranda TİL görüldüğü saptanmıştır. Neoadjuvan almış 180 hastada yapılan başka bir çalışmada PD-1/PD-L1 ekspresyonu ile yüksek TİL varlığı ile patolojik komplet regresyon arasında ilişki olduğu ve alt tiplerden en çok triple negatif grupta PD-L1 ekspresyonu saptanmış (107).

Meme kanserlerinde, TİL oranı ve PD-L1 ekspresyonu ile bazal hücre markerları, kanser kök hücre markerları ve vimentin ekspresyonu arasında ilişki saptanmıştır. Vimentin eksprese eden invaziv meme karsinomlarında stromal TİL'in arttığı, PD-L1 ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (108).

Çalışmamızda, ER ve PR negatif vakalarda PD-L1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ER- $\alpha$  ile PD-L1 ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, ER- $\alpha$  pozitif meme karsinomlarında PDL-1 mRNA düzeyinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Triple negatif meme karsinomlarında, hücre kültürlerinde yapılan bu çalışmada ektopik ER- $\alpha$  ekspresyonu varlığında PD-L1 mRNA düzeyinin düştüğü görülmüştür (109). ER ve PR durumu ile PD-L1'in korelasyonunu gösteren çok sayıda yayın mevcut olup benzer sonuçlar elde edilmiştir (8, 78, 87, 92, 94, 106).

Triple negatif meme karsinomlarında yapılan çalışmalarda, bu tümörlerin en yüksek immunojenite gösteren meme kanseri tipi olduğu ve TİL ile prognoz arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca daha yüksek PD-L1 ekspresyonu göstermeleri nedeniyle triple negatif meme karsinomları immunoterapiye en güçlü aday tümörlerdir (7, 9). Buna karşın, Mori ve arkadaşlarının (110) çalışmasında, triple negatif tümörlerin % 46.7'sinde yüksek TİL oranı saptanmış, ancak bunun prognostik önemi gösterilememiştir.

Meme karsinomlarını moleküler alt tiplere ayıran çalışmalarda HER2 eksprese eden grupta yüksek oranda TİL varlığı saptanmıştır. Bu vakalardaki yüksek TİL varlığının PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (71, 94, 111, 112) Yüksek TİL varlığı, triple negatif tümörlerde iyi prognozla ilişkiliyken, Loi ve arkadaşlarının (112) çalışmasında HER2 eksprese eden grupta TİL'in prognostik önemi gösterilememiştir. Moleküler alt tiplerde yapılan başka bir çalışmada ise, TİL varlığı ve yoğunluğunun, HER2 pozitif ve triple negatif tümörlerde prognostik öneminin olduğu, luminal grupta ise prognostik değerinin olmadığı saptanmıştır (113). ER+ meme karsinomlarında yapılan KEYNOTE 028 çalışmasında da; ER+HER2- vakaların %19'unda PD-L1 pozitifliği görülmüş, ER pozitifliği arttıkça PD-L1 ekspresyonunun azaldığı, luminal B grupta ise daha fazla PD-L1 eksprese edildiği saptanmıştır(114). Daha kötü prognozlu olduğu bilinen HER2 pozitif ve triple negatif meme karsinomlarında daha yüksek PD-L1 ekspresyonunun olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Zawlik ve arkadaşlarının (95) yaptığı çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiş olup, bu bulguya ek olarak yüksek grade'li meme karsinomlarında PD-L1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Çalışmamızda, stromada yoğun iltihabi hücre içeren tümörlerde PD-L1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu görüldü. ER/PR negatifliği ve HER2 pozitifliği ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptandı. Bu sonuçlara göre gruplandırıldığında triple negatif ve sadece HER2 eksprese eden tiplerde, luminal gruba göre PD-L1 ekspresyonunun daha fazla olduğu saptandı.

Lenf nodu metastazı ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında, Hou ve arkadaşlarının (8) HER2 eksprese eden meme karsinomlarında yaptığı çalışmada PD-L1 ekspresyonunun lenf nodu metastazının yokluğu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bae ve arkadaşlarının (94) 465 meme karsinomunda yaptığı çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da lenf nodu metastazı olmayan vakalarda PD-L1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulundu ( $p=0.004$ ). Buna karşın Soliman ve arkadaşlarının (115) yaptığı çalışmada, lenf nodu metastazı olan vakalarda PD-L1 ekspresyonu daha yüksek saptanmıştır.

Yapılan bir metaanalizde hasta yaşı ile PD-L1 ekspresyonunun ilişkisi bulunmamıştır (93). Benzer şekilde çalışmamızda da yaş ile anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Cinsiyet açısından bakıldığında, çalışmamızda PD-L1 ekspresyonunun kadın ve erkekler arasında anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı. Erkek meme kanserleri oldukça nadir olup, tüm meme kanseri vakalarının %1'den daha azını oluşturmaktadır. Çalışmamıza alınan vakaların sadece 4'ü erkek olup, sayının az olması sonuçların istatistiksel olarak anlamsız çıkmasına neden olmuş olabilir. 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada, 165 erkek ve 246 kadın meme kanserinde PD-1, PD-L1 ekspresyonları karşılaştırılmış ve iki grup arasında anlamlı fark bulunmamış, ancak erkek meme kanserlerinde daha az PD-1 ekspresyonunun olduğu saptanmıştır (96).

Çalışmamızda PD-L1 ekspresyonu ile hastaların hastaliksız ve toplam sağ kalım sürelerine bakıldığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Li ve arkadaşlarının (116) yaptığı çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiştir. Ancak bunun tam tersini saptayan, PD-L1 varlığının daha iyi sağ kalım veya aksine kötü prognozla ilişkili olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Baptista ve arkadaşlarının çalışmasında (117) PD-L1 ekspresyonu arttıkça toplam sağ kalım süresinin de uzadığı gösterilmiştir. Triple negatif meme karsinomlarında yapılan başka bir çalışmada ise PD-1+ immun hücrelerin varlığının hastaliksız ve toplam sağ kalım üzerine daha fazla etkisinin olduğu saptanmıştır (103). Triple negatif meme karsinomlarında yapılan bir diğer çalışmada da PD-L1 varlığında hastaliksız sağ kalım ve toplam sağ kalımın daha iyi olduğu bulunmuştur (97). Gebelik döneminde meme karsinomu gelişen 21 vaka ile yapılan çalışmada, PD-L1 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu ve hatta tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun toplam ve hastaliksız sağ kalım açısından bağımsız bir faktör olduğu görülmüştür (118). Okabe ve arkadaşlarının (119) çalışmasında toplam sağ kalım süresinin CD8+ TIL yoğunluğu ve CD8+/PD-L1+ ekspresyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda perinöral invazyon olmayan vakalardaki toplam sağkalımın perinöral invazyon gösterenlere göre daha fazla olduğu görüldü. Hem lenfatik hem de perinöral invazyon ile hastaliksız sağ kalım arasında korelasyon saptandı. Li ve arkadaşlarının (116)

136 vakada yaptığı çalışmada lenfatik invazyonun daha kısa hastaliksız ve toplam sağ kalımla ilişkili olduğu bulunmuştur. Karnik ve arkadaşlarının (86) yaptığı çalışmada PD-L1 ekspresyonu ile lenfatik invazyon arasında korelasyon saptanırken, çalışmamızda lenfatik invazyon durumunun PD-L1 ile korelasyonu gösterilemedi.

Yapılan çalışmalarda toplam ve hastaliksız sağ kalım süresinin tümör evresi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (116). Çalışmamızda da benzer sonuç elde edilmiş olup tümör evresi arttıkça hastaliksız sağ kalım ve toplam sağ kalım süresinin azaldığı görüldü. Tümördeki PD-L1 pozitifliği ile tümör çapı arasında istatistiksel anlamlı ilişkinin bulunmadığı çalışmalar da mevcuttur (86, 87, 94).

Çalışmamızda aynı seansta bilateral meme opereasyonu yapılan üç vaka bulunmaktadır. Bunların ikisinde her iki tarafa ait örneklerde hem tümör hem de TİL'de PD-L1 negatif bulundu. Bir vakada ise boyutu büyük olan tümörde (4.5cm, grade III) tümör hücrelerinde ve TİL'de %1 oranında zayıf pozitif boyanma varken; diğer taraftaki daha küçük boyutlu (0,8cm, grade II) tümörde sadece TİL'de %10 oranında pozitif boyanma saptandı. Bu durum örnekleme kısıtlılığından kaynaklı olabileceği gibi tümör çap ve grade'ine göre PD-L1 ekspresyonundaki değişikliğe de bağlı olabilir. Çalışmamızdaki tüm vakaların sonuçları değerlendirildiğinde ise tümör çapı ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

İki sene arayla her iki memesinden de İDK-SET (HER2+, ER-, PR-) nedeniyle opere olan bir vakamızda ise ilk çıkarılan tümörde (4cm, grade II) tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu bulunmazken TİL'de %10 oranında zayıf pozitif boyanma görüldü. Sonra çıkarılan memede ise (1,7cm, grade III) tümör hücrelerinde %2 zayıf, TİL'de %20 zayıf boyanma saptandı. Bu sonuç tedaviye bağlı gelişmiş olabilir. Trastuzumab ile tedavi edilen hastalarda PD-L1 düzeyinin arttığı saptansa da Kanser Genom Atlasında HER2 ile PDL-1 arasında direkt ilişki yer almamaktadır (120).

BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonu olan hastalarımızın ikisinde de ne tümörde ne de TİL'de pozitif boyanma saptanmadı. BRCA-2 mutasyonu olan hasta dört sene arayla her iki memesinden de opere olmuştur. İlk opere edilen tümörde ER ve PR pozitifken, HER2 negatif, diğer memedeki tümör ise triple negatif bulundu. Bu sonuç tedaviye bağlı gelişmiş olabilir. BRCA-1 mutasyonu olan diğer hasta ise triple negatifti. Yapılan çalışmalarda BRCA-1 mutasyonu gösteren vakalarda PD-L1 ekspresyonunun ve TİL oranının daha fazla

olduğu saptanmıştır (92, 121). Solinas ve arkadaşlarının (122) alışmasında ise, triple negatif meme karsinomlarında BRCA mutasyonu ile yüksek TİL oranı ve PD-1/PD-L1 ekspresyonunun korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızın sonuçları, meme karsinomlarındaki PD-L1 ekspresyonunun belli moleküler alt tiplerde daha fazla olduğunu, literatürle uyumlu olarak HER2 eksprese eden tip ve triple negatif meme karsinomlarının immünoterapiye en güçlü aday olduklarını desteklemiştir. ER, PR negatifliği ve HER2 ekspresyonu ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon bulunmaktadır. Ki-67 değeri ve mitoz sayısı gibi proliferasyonla ilgili parametrelerin ve histolojik grade'in PD-L1 ile korelasyon gösterdiği saptandı. Ancak cinsiyet, yaş, tümör tipi ve tümör çapı ile PD-L1 ekspresyonunun ilişkisi gösterilemedi. Tümöre eşlik eden immün hücrelerin yoğunluğu arttıa PD-L1 ekspresyonun da arttığı görüldü. Negatif lenf nodu ile PD-L1 ekspresyonunu arasında korelasyon olduğu saptandı.

Çalışmamızda PD-L1 ekspresyonunun toplam ve hastalıksız sağ kalım üzerine etkisi gösterilemedi. Hastalara ait çok sayıdaki değişken parametre buna neden olmuş olabilir.

Tanı yıllarına göre PD-L1 pozitifliği oranının düşmesi, inceleme yapılacak materyalin daha güncel ve taze olması gerekliliğini akla getirmektedir. Antikorlar arası farklılıklar, değerlendirme farklılıkları nedeniyle hastalar yanlış negatif sonuçlarla eksik tedavi, yanlış pozitif sonuçlarla da fazla tedavi alabilir. PD-L1 değerlendirmesinin standardizasyonu ve eşik değerlerinin netleşmesi gerekmektedir.

İmmünoterapi kanser hastalarının sağ kalım süresinde uzama sağlasa da, sistemik değil de, sadece tümörü hedefleyebildiğinde ideal bir tedavi olacaktır. Bunun için daha fazla çalışma yapılmasına ve başka hedef noktalarının da bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

1. WHO. Breast cancer. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
2. AJCC Cancer Staging Manuel. 8th ed. 2017, Switzerland: Springer. 588-628.
3. Hicks, G.D. and L.C. Susan, Diagnostic Pathology Breast. 2nd ed. 2016, Philadelphia: Elsevier.
4. Wang, X., et al., PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*, 2016. 9:5023-39.
5. Sukari, A., et al., Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res*, 2016. 36(11):5593-06.
6. Pardoll, D.M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4):252-64.
7. Gregorio, A.C., et al., Therapeutic Implications of the Molecular and Immune Landscape of Triple-Negative Breast Cancer. *Pathol Oncol Res*, 2018. 24(4):701-16.
8. Hou, Y., et al., PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer. *Breast J*, 2018. 24(6):911-19.
9. Kwa, M.J. and S. Adams, Checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer (TNBC): Where to go from here. *Cancer*, 2018. 124(10):2086-03.
10. Tsang, J.Y., et al., PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2017. 162(1):19-30.
11. Javed, A. and A. Lteif, Development of the human breast. *Semin Plast Surg*, 2013. 27(1):5-12.
12. Collins, L.C. and S.J. Schnitt, Breast. In: *Histology for Pathologists*, S.E. Mills, Editor. 2012, Lipincott Williams & Wilkins - Wolters Kluwer Health.
13. Moore, K., *Clinically Oriented Anatomy*. 4th ed. 1999: Lipincott Williams & Wilkins - Wolters Kluwer Health. 71-79.
14. Going, J., Normal Breast. In: *Breast Pathology: A Volume in the Foundations in Diagnostic Pathology Series*, J. Golblum, Editor. 2012, Elsevier Saunders.
15. 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. 2014; Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html>.

16. Anderson, W.F., et al., Age-related crossover in breast cancer incidence rates between black and white ethnic groups. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(24):1804-14.
17. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br J Cancer*, 2000. 83(10):1301-8.
18. WHO Classification of Tumors of the Breast. 4th ed. 2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
19. Rosai, J., Breast. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, J. Rosai, Editor. 2011, Elsevier: China.1659-70.
20. Kumar, V., et al., Robbins Temel Patoloji 9th ed. 2013, İstanbul: Nobel tıp kitabevi.
21. Schnitt, S.J. and L.C. Collins, Biopsy interpretation series Biopsy Interpretation of Breast. 2th ed. 2014, İstanbul: Lipincott Williams & Wilkins - Wolters Kluwer.
22. Dabbs, D.J., Breast Pathology. 2012, Philadelphia: Elsevier Saunders.
23. 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*, 2002. 41(3a):154-61.
24. 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):3997-13.
25. Dias, K., et al., Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS One*, 2017. 12(1):e0168669.
26. Lehmann-Che, J., et al., Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Research*, 2013. 15(3):R37.
27. Tang, P. and G.M. Tse, Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Arch Pathol Lab Med*, 2016. 140(8):806-14.
28. Abbas, A.K., et al., Temel İmmunoloji İmmun Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları. 4th ed. 2015, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
29. Janeway, C.A., et al., Immunobiology The İmmun system in Health and Disease. 6th ed. 2005, USA: Garland Science.
30. Nathan, M.R. and P. Schmid, The emerging world of breast cancer immunotherapy. *Breast*, 2018. 37:200-06.
31. 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):259-71.
32. Shi, W., et al., Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8(+) T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. *Exp Cell Res*, 2018. 372(1):35-42.

33. Nam, S., et al., Analysis of the Expression and Regulation of PD-1 Protein on the Surface of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs). *Biomol Ther (Seoul)*, 2019. 27(1):63-70.
34. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007. 121(1):1-14.
35. Mittal, D., et al., New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*, 2014. 27:16-25.
36. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004. 21(2):137-48.
37. Jiang, X., et al., Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*, 2019. 18(1):10.
38. Kim, J.M. and D.S. Chen, Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann Oncol*, 2016. 27(8):1492-04.
39. Zhang, Q., et al., Influence of adipocytokines in periprostatic adipose tissue on prostate cancer aggressiveness. *Cytokine*, 2016. 85:148-56.
40. Sound, M., et al., IASLC Atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. 2017, North Fort Myers, FL: Editorial Rx Press.
41. Kamimura, N., A.M. Wolf, and Y. Iwai, Development of Cancer Immunotherapy Targeting the PD-1 Pathway. *J Nippon Med Sch*, 2019. 86(1):10-14.
42. Chen, J., et al., Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*, 2016. 27(3):409-16.
43. O'Byrne, K., Stimulating immune responses to fight cancer: Basic biology and mechanisms. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2015. 11 Suppl 1:9-15.
44. Yu, L.-Y., et al., New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*, 2017. 14(1):68.
45. Ghiotto, M., et al., PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol*, 2010. 22(8):651-60.
46. Ni, Y.G., et al., Development and Fit-for-Purpose Validation of a Soluble Human Programmed Death-1 Protein Assay. *AAPS J*, 2015. 17(4):976-87.
47. He, J., et al., Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep*, 2015. 5:13110.
48. Onishi, H., et al., Hedgehog signaling regulates PDL-1 expression in cancer cells to induce anti-tumor activity by activated lymphocytes. *Cell Immunol*, 2016. 310:199-04.
49. Liu, S., et al., PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget*, 2017. 8(59):99901-12.
50. Moon, J.W., et al., IFN $\gamma$  induces PD-L1 overexpression by JAK2/STAT1/IRF-1 signaling in EBV-positive gastric carcinoma. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 17810.



51. Zhang, X., et al., PD-L1 induced by IFN-gamma from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. *Int J Clin Oncol*, 2017. 22(6):1026-33.
52. Liu, J., et al., Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*, 2007. 110(1):296-04.
53. Lee, S.K., et al., IFN-gamma regulates the expression of B7-H1 in dermal fibroblast cells. *J Dermatol Sci*, 2005. 40(2):95-103.
54. Azuma, K., et al., Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2014. 25(10):1935-40.
55. Akbay, E.A., et al., Activation of the PD-1 Pathway Contributes to Immune Escape in EGFR-Driven Lung Tumors. *Cancer Discovery*, 2013. 3(12):1355-63.
56. Parsa, A.T., et al., Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*, 2007. 13(1):84-8.
57. Chen, N., et al., Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation. *J Thorac Oncol*, 2015. 10(6):910-23.
58. Maxwell, P.H., et al., The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 1999. 399(6733):271-5.
59. Patel, J.S., et al., Non-coding RNA as mediators in microenvironment-breast cancer cell communication. *Cancer Lett*, 2016. 380(1):289-95.
60. Zhang, X.L., L.L. Xu, and F. Wang, Hsa\_circ\_0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1. *Cell Biol Int*, 2017. 41(9):1056-64.
61. Truillet, C., et al., Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET. 2018. 29(1):96-103.
62. Chatterjee, S., et al., A humanized antibody for imaging immune checkpoint ligand PD-L1 expression in tumors. *Oncotarget*, 2016. 7(9):10215-27.
63. Hirsch, F.R., et al., PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol*, 2017. 12(2):208-22.
64. Tsao, M.S., et al., PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol*, 2018. 13(9):1302-11.
65. Wu, X., et al., Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019. 17:661-74.
66. Dawood, S. and H.S. Rugo, Targeting the host immune system: PD-1 and PD-L1 antibodies and breast cancer. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2016. 10(4):336-42.
67. Hamid, O., et al., Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med*, 2013. 369(2):134-44.

68. 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):2455-65.
69. Bellmunt, J., et al., Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 2017. 376(11):1015-26.
70. Nghiem, P.T., et al., PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2016. 374(26):2542-52.
71. Wein, L., et al., Checkpoint blockade in the treatment of breast cancer: current status and future directions. *Br J Cancer*, 2018. 119(1):4-11.
72. Brody, R., et al., PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*, 2017. 112:200-15.
73. 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):15-24.
74. Schalper, K.A., et al., In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(10):2773-82.
75. Zhang, M., et al., Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2017. 8(19):31347-54.
76. Katz, H. and M. Alsharedi, Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*, 2017. 35(1):13.
77. Schütz, F., et al., PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncol Res Treat*, 2017. 40(5):294-97.
78. Sabatier, R., et al., Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(7):5449-64.
79. Adams, S., et al., Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 2019. 30(3):405-11.
80. Solinas, C., et al., Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. *ESMO Open*, 2017. 2(5):e000255.
81. Adams, S., et al., Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 2019. 30(3):397-04.
82. Lyons, T.G., M.N. Dickler, and E.E. Comen, Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Curr Oncol Rep*, 2018. 20(7): 51.
83. Weiss, G.J., et al., A phase Ib study of pembrolizumab plus chemotherapy in patients with advanced cancer (PembroPlus). *Br J Cancer*, 2017. 117(1):33-40.
84. Schmid, P., et al., Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2018. 379(22):2108-21.
85. Polk, A., et al., Checkpoint inhibitors in breast cancer - Current status. *Cancer Treat Rev*, 2018. 63:122-34.

86. Karnik, T., et al., PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. *Hum Pathol*, 2018. 72:28-34.
87. Zhou, T., et al., Expression of programmed death ligand-1 and programmed death-1 in samples of invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with prognosis. *Anticancer Drugs*, 2018. 29(9):904-10.
88. Kai, K., et al., Formalin fixation on HER-2 and PD-L1 expression in gastric cancer: A pilot analysis using the same surgical specimens with different fixation times. *World J Clin Cases*, 2019. 7(4):419-30.
89. Chen, L., et al., B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7(9):6015-23.
90. Fashoyin-Aje, L., et al., FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Recurrent Locally Advanced or Metastatic Gastric or Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma Expressing PD-L1. *Oncologist*, 2019. 24(1):103-09.
91. Parra, E.R., P. Villalobos, and J. Rodriguez-Canales, The Multiple Faces of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Malignant and Nonmalignant Cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2019. 27(4):287-94.
92. Dill, E.A., et al., PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. *Am J Surg Pathol*, 2017. 41(3):334-42.
93. Wang, C., et al., Prognostic Value of PD-L1 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Breast J*, 2017. 23(4):436-43.
94. Bae, S.B., et al., Expression of Programmed Death Receptor Ligand 1 with High Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with Better Prognosis in Breast Cancer. *J Breast Cancer*, 2016. 19(3):242-51.
95. Zawlik, I., et al., Immune checkpoints in aggressive breast cancer subtypes. *Neoplasma*, 2016. 63(5):768-73.
96. Manson, Q.F., et al., PD-1 and PD-L1 Expression in Male Breast Cancer in Comparison with Female Breast Cancer. *Target Oncol*, 2018. 13(6):769-77.
97. 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).
98. Denkert, C., et al., Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Mod Pathol*, 2016. 29(10):1155-64.
99. Buisseret, L., et al., Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology*, 2017. 6(1):e1257452.
100. Kurozumi, S., et al., Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer. *Med Mol Morphol*, 2017. 50(4):185-94.

101. Wang, K., et al., The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*, 2017. 69:110-17.
102. Catacchio, I., et al., Intratumoral, rather than stromal, CD8+ T cells could be a potential negative prognostic marker in invasive breast cancer patients. *Transl Oncol*, 2019. 12(3):585-95.
103. 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):6201-12.
104. Tomioka, N., et al., The therapeutic candidate for immune checkpoint inhibitors elucidated by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC). *Breast Cancer*, 2018. 25(1):34-42.
105. Voutsadakis, I.A., Immune Blockade Inhibition in Breast Cancer. *Anticancer Res*, 2016. 36(11):5607-22.
106. Noske, A., et al., Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur J Cancer*, 2019. 114:76-88.
107. Kitano, A., et al., Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open*, 2017. 2(2):e000150.
108. Polonia, A., et al., Prognostic value of stromal tumour infiltrating lymphocytes and programmed cell death-ligand 1 expression in breast cancer. *J Clin Pathol*, 2017. 70(10):860-67.
109. Liu, L., et al., ERalpha is a negative regulator of PD-L1 gene transcription in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. 505(1):157-61.
110. Mori, H., et al., The combination of PD-L1 expression and decreased tumor-infiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 2017. 8(9):15584-92.
111. Burugu, S., K. Asleh-Aburaya, and T.O. Nielsen, Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer*, 2017. 24(1):3-15.
112. Loi, S., Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *OncoImmunology*, 2013. 2(7): p. e24720.
113. Swoboda, A. and R. Nanda, Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. *Cancer Treat Res*, 2018. 173:155-65.
114. Rugo, H., et al., Abstract S5-07: Preliminary efficacy and safety of pembrolizumab (MK-3475) in patients with PD-L1-positive, estrogen receptor-positive (ER+)/HER2-negative advanced breast cancer enrolled in KEYNOTE-028. *Cancer Research*, 2016. 76(4 Supplement):S5-07-S5-07.
115. Soliman, H., F. Khalil, and S. Antonia, PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One*, 2014. 9(2):e88557.

116. Li, X., et al., Stromal PD-L1 Expression Is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Clin Pathol*, 2016. 146(4):496-02.
117. Baptista, M.Z., et al., Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol*, 2016. 47(1):78-84.
118. Acs, B., et al., PD-1, PD-L1 and CTLA-4 in pregnancy-related - and in early-onset breast cancer: A comparative study. *Breast*, 2017. 35:69-77.
119. Okabe, M., et al., Predictive factors of the tumor immunological microenvironment for long-term follow-up in early stage breast cancer. *Cancer Sci*, 2017. 108(1):81-90.
120. Chaganty, B.K.R., et al., Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN $\gamma$  secretion. *Cancer Lett*, 2018. 430:47-56.
121. Wen, W.X. and C.O. Leong, Association of BRCA1- and BRCA2-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/PD-1, immune infiltrates, and T cell-inflamed signature in breast cancer. *PLoS One*, 2019. 14(4):e0215381.
122. Solinas, C., et al., BRCA gene mutations do not shape the extent and organization of tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer. *Cancer Lett*, 2019. 450:88-97.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**AD SOYAD:** Reha Akpınar

**DOĞUM TARİHİ:** 1989

**E-MAİL:** drrehaakpınar@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

| Derece               | Bölüm/Program | Okul / Üniversite                            | Yıl  |
|----------------------|---------------|--|------|
| İlkokul              | -             | Oruçoğlu İlköğretim Okulu                    | 2000 |
| Ortaokul             | -             | Mareşal Fevzi Çakmak Milli Laboratuvar Okulu | 2003 |
| Lise                 | Sayısal       | Afyonkarahisar Süleyman Demirel Fen Lisesi   | 2006 |
| Lisans-Yüksek Lisans | Tıp Fakültesi | Ege Üniversitesi                             | 2013 |

### ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1- Tekin B, Simsek IB, Akpınar R, Demirkesen C ; Adult orbital xanthogranulomatous disease: A case report and brief discussion of the terminology ; Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2016 Sep-Oct;82(5):547-50.
- 2- Hakkı Caner İnan, Haydar Murat Yener, Türkan Bakhshaliyeva, Reha Akpınar; Submental bölgede yerleşimli dev epidermal kist ; ENTcase 2018; 4(4):121-125.
3. 27<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Belgrad / Sırbistan  
“Ovarian seromucinous carcinoma: A rare case report” poster sunumu
2. 25 . Ulusal Patoloji ve 6 . Sitopatoloji Kongresi, Bursa / Türkiye  
“Serviks adenokarsinomlarında morfolojik yayılım patern analizinin prognostik önemi ” poster sunumu
3. XXXI International Congress of the IAP and 28<sup>th</sup> Congress of the ESP, Köln / Almanya  
“CD34 and MAP2 expression of focal cortical dysplasia associated with tumors/Experience of Cerrahpasa Medical Faculty” poster sunumu
4. 30<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Bilbao / İspanya  
“Diagnosis Abetalipoproteinemia, Before Neurological Disorders Occur” poster sunumu
5. 28 . Ulusal Patoloji Kongresi, Ankara / Türkiye  
“33 Olguluk Granüler Hücreli Tümör Serisi” poster başı sözlü sunum