T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERLERİNDE MİKROÇEVRENİN KLİNİKOPATOLOJİK ÖNEMİ

Dr. Özge YAPRAK
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Melek ERGİN

ADANA-2023

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERLERİNDE MİKROÇEVRENİN KLİNİKOPATOLOJİK ÖNEMİ

Dr. Özge YAPRAK
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Melek ERGİN

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonunun TTU-2022-14568 nolu Projesiile desteklenmiştir.

ADANA-2023

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında geçirdiğim uzmanlık eğitimim süresince, tezimin her aşamasında bilgi, beceri ve deneyimleriyle beni aydınlatan, her konuda fikirlerine güvendiğim ve akıl danıştığım değerli tez danışmanım Prof. Dr. Melek ERGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim boyunca sadece patoloji bilgilerini değil hayata dair tecrübelerini de bana aktaran, her birinden ayrı ayrı değerli bilgiler öğrendiğim hocalarım Prof. Dr. Suzan ZORLUDEMİR, Prof. Dr. Figen DORAN, Prof. Dr. Gülfiliz GÖNLÜŞEN, Prof. Dr. Derya GÜMÜRDÜLÜ, Prof. Dr. Aysun Hatice UĞUZ, Prof. Dr. Şeyda ERDOĞAN, Prof. Dr. Arbil AÇIKALIN, Doç. Dr. Emine KILIÇ BAĞIR ve Doç. Dr. Kıvılcım EREN ERDOĞAN'a minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Tuğba TOYRAN, asistan arkadaşım Dr. Evin KUŞSEVER, Kürşat MUTLU, Öznur AKIN, Sinan ÖZBULAT, Şakir UÇAR, Zübeyde YALÇINKAYA, Çağla SARITÜRK'e teşekkür ederim.

Asistanlığa başladığım ilk günden bu zamana hep yanında olan başta Uzm. Dr Aslı AYDOĞDU YEŞİLOĞLU ve arkamda kocaman bir ekip olduğunu hiç unutturmayan asistan arkadaşlarım; Dr. Büşra Nur ATEŞ, Dr. Merve AKSIN, Dr. Hande YANAR, Dr. Evin KUŞSEVER, Dr. Ayşe DAŞ ÇERÇİ, Dr. Arzu DEMİR, Dr. Melis Ladin YAMAÇ, Dr. Ayşe Büşra ÇETİNKAYA, Dr. Merve AVLUKLU ve Dr. Hayriye TEZCAN'a, artık uzman olan Dr. Savalan KARİM ve Dr. Merve İNCEMAN'a, ayrıca patoloji bölümünde bizlere destek olan patoloji teknikerleri, sekreterler ve diğer tüm patoloji ailesi çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeklerini asla unutamayacağım anneme, babama ve kardeşime hep yanımda oldukları için teşekkür ediyorum.

Tıp fakültesine başladığım günden bugüne en zor sınavlarımda hep yanımda olan, bu zorlu tez sürecinde de desteklerini hiç esirgemeyen, hep bir çıkış yolu gösteren, her durumda yüzümü güldüren eşim Kutalmış YAPRAK'a, hayat enerjim oğlum Azur Rua'ya teşekkür ederim.

Dr. Özge YAPRAK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....I
İÇİNDEKİLER II
TABLOLAR LİSTESİ..... V
ŞEKİLLER LİSTESİ VI
KISALTMALAR LİSTESİ VII
ÖZET VIII
ABSTRACT..... X
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Embriyoloji 3
2.2. Anatomi 4
2.3. Histoloji 5
2.4. Meme Kanseri..... 6
2.4.1. Epidemiyoji..... 7
2.4.2. Etiyoloji, Risk Faktörleri ve Genetik Predispozisyon 11
2.4.3. Klinik ve Radyolojik Özellikleri..... 12
2.4.4. Makroskopik Görünüm..... 12
2.4.5. Patogenez 13
2.4.6. Memenin Epitelyal Tümörleri Sınıflaması (WHO Sınıflaması)..... 14
2.4.7. Mikroskopik Tipler..... 15
2.4.7.1. İnsitu Karsinomlar 15
2.4.7.2. İnvaziv Karsinomlar 16
2.4.8. Meme Tümörlerinin Histolojik Derecelendirilmesi 21
2.4.9. İmmünohistokimya ve Hormon Reseptörleri: 23

2.4.10. Meme Tümörlerinde Evreleme 26
2.4.11. Gen Ekpresyon Profiline Göre Alt Grupları 27
2.5. Üçlü Negatif Meme Karsinomları 30
2.6. Tümör İmmünitesi 33
2.6.1. Tümör Mikroçevresi 33
2.6.2. Tümör İnfiltre Eden Lenfositler (TIL) 36
2.6.3. PD-L1 38
2.6.4. T lenfositler 40
2.6.5. Regulatuar T Lenfositer 40
2.6.5.1. CD8(+) T Lenfositler 42
2.6.6. CD163 (M2 Makrofajlar) 43
3. GEREÇ ve YÖNTEM 44
3.1. Olguların Seçimi 44
3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem ve Cihazdaki Aşamaları 44
3.3. TIL Değerlendirilmesi 45
3.4. İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi 46
3.5. Histopatolojik Değerlendirme 46
3.6. İstatistiksel Değerlendirme 47
4. BULGULAR 48
4.1. Demografik Veriler ve Histopatolojik Bulgular 48
4.2. Klinik Bilgiler ile Prognostik Verilerin Değerlendirilmesi 50
4.2.1. Yaş ile Prognostik Verilerin Karşılaştırılması 50
4.2.2. Histolojik tip, derece ile prognostik verilerin karşılaştırılması 51
4.2.3. Mikroçevre 51
4.2.4. PD-L1 54
4.2.5. Tümör Mikroçevresinde Tümör İlişkili İmmün Hücreler ve Dağılımı 58

4.2.5.1. CD8 58
4.2.5.2. FOXP3 61
4.2.5.3. CD163 64
5. TARTIŞMA 74
6. SONUÇLAR 87
7. KAYNAKLAR 90

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 1. Memenin epitelyal tümörleri sınıflaması 15
Tablo 2. Meme tümörlerinde evreleme Tümör boyutu (T) 26
Tablo 3. Meme tümörlerinde evreleme Lenf Nodu (N) 26
Tablo 4. TNM evrelemesi 27
Tablo 5. Meme kanserleri moleküler ve hormon reseptörlerine göre alt tipleri 29
Tablo 6. PD-L1 Hem TH hem de İH için skorlama PD-L1 TH skorlama kuralı PD-L1 IH skorlama kuralı 47
Tablo 7. Demografik ve histopatolojik bulgular 50
Tablo 8. TIL değerlerinin tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve sağkalım ilişkisi 55
Tablo 9. TIL düzeylerine göre klinik evrelerin karşılaştırılması 55
Tablo 10. PD-L1 bulgularının incelenmesi 58
Tablo 11. PD-L1 ekspresyonun TIL seviyelerine göre dağılımı 59
Tablo 12. İmmün hücrelerde PD-L1 ekspresyon durumu ve TIL seviyelerine göre karşılaştırması 59
Tablo 13. İmmün hücrelerin birbirleri ile ilişkisi 68
Tablo 14. Verilerin genel dağılımı 68
Tablo 15. Lenfovasküler invazyon ve TM boyutları ile ilgili parametreler arasındaki farklılıklar 68
Tablo 16. Verilerin genel dağılımı ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi 69
Tablo 17. Lenf nodu metastazına varlığına göre karşılaştırmalar 69
Tablo 18. Lenf nodu metastazı ve mortalite bulguları ile ilgili parametreler arasındaki farklılıklar 70
Tablo 19. Mortaliteye göre immün hücrelerin ekspresyon durumları 71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 1. Meme gelişiminin emriyolojik evreleri 3
Şekil 2. Memenin yandan görünümü 4
Şekil 3. Meme kanserlerinin yaşa göre ülkelerde görülme sıklığı 7
Şekil 4. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları 9
Şekil 5. 2020 yılında Türkiye'de en sık görülen ilk 5 kanser türü 9
Şekil 6. Kadınlarda yeni tanı almış kanser türleri 10
Şekil 7. 2020 yılı en sık görülen ilk 10 kanser 10
Şekil 8. Meme kanseri gelişiminde rol alan yolaklar 14
Şekil 9. Nottingham histolojik derece için kullanılan skorlama sistemi 23
Şekil 10. ÜNMK alt tipleri ve patogenezlerinde ilişkili olan yolaklar 32
Şekil 11. Moleküler değişiklikler, gen ekspresyon profili oluşturma, klasik histopatolojik ve genomik değişiklikler 33
Şekil 12. Tümöre karşı immün yanıttaki üç basamakta görev alan hücreler ve sitokinler 37
Şekil 13. Antijen sunan hücrelerin CD4 ve CD8 + T lenfositler ile ilişkisi ve CD8 T lenfositlerin bellek hücrelerine dönüşümü 39
Şekil 14. PD-1 veya PD-L1 inhibitörlerinin ana mekanizması 41
Şekil 15. CD4 (+) T lenfosit alt tipleri 42
Şekil 16. Makrofaj tipleri ve fonksiyonları 43
Şekil 17. Olguların yaş dağılımı 49
Şekil 18. Düşük TIL (Hematoksilen& eozin x100 büyütme) 53
Şekil 19. Orta seviye TIL (Hematoksilen&eozin x200 büyütme) 54
Şekil 20. Yüksek TIL seviyesi (Hematoksilen & eozin x200 büyütme) 54
Şekil 21. İmmün hücrelerde PD-L1 pozitifliği (x200 büyütme) 56
Şekil 22. İmmün hücrelerde PD-L1 negatif sonuç (x100 büyütme) 56
Şekil 23. PD-L1 ile tümör hücrelerinde boyanma izlenmemiştir. (x100 büyütme) 57
Şekil 24. PD-L1 ile tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma. (x200 büyütme) 57
Şekil 25. Stromal CD8 +TIL (x200 büyütme) 60
Şekil 26. Stromal CD8+ TIL (x100 büyütme) 61
Şekil 27. İntratümoral CD8 + TIL (x100 büyütme) 61
Şekil 28. İntratümöral CD8 + TIL (x100 büyütme) 62
Şekil 29. Stromal FOXP3 + TIL (x100 büyütme) 63
Şekil 30. Stromal FOXP3 + TIL (x200 büyütme) 63
Şekil 31. İntratümöral FOXP3+ TIL 64
Şekil 32. İntratümöral FOXP3 +TIL (x100 büyütme) 64
Şekil 33. Tümör hücreleinde FOXP3 pozitifliği (x100 büyütme) 64
Şekil 34. Stromal CD163+ TİM (x200 büyütme) 65
Şekil 35. Stromal CD163 +TİM (x100 büyütme) 65
Şekil 36. intratümöral CD163+ TİM (x200 büyütme) 66
Şekil 37. İntratümöral CD163+ TİM (x100 büyütme) 66
Şekil 38. Ortalama yaşam sürelerinin incelenmesi 71
Şekil 39. Lenfovasküler varlığı ile ortalama sağkalım arasındaki ilişki 71
Şekil 40. PD-L1 IH varlığı ile ortalama sağkalım arasındaki ilişki (kırmızı çizgi (1) PD-L1 pozitif olgular, mavi çizgi (0) PD-L1 negatif olgular) 72
Şekil 41. TIL sevilyeleri ile ortalama sağkalım arasındaki ilişki 73

KISALTMALAR LİSTESİ

AJCC : American Joint Committee on Cancer
AMPK : AMP Aktive Protein Kinaz
DKIS : Duktal Karsinoma İn Situ
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
ERα : Nükleer Östrojen α
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IARC : Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IHS : İmmün Hücre Skoru
ILK : İnvaziv Lobüler Karsinom
IM : İmmünmodülatuar
ISH : in Situ Hibridizasyon
İMK : İnvaziv Meme Karsinomu
İMPK : İnvaziv Mikropapiller Karsinom
KK : Kribriform Karsinom
LAR : Luminal Androjen Reseptör
M : Metastaz Varlığı
MHC : Majör Histokompatibilite Kompleks
MK : Müsinöz Karsinom
MSL : Mezenkimal Kök Hücre Benzeri
N : Lenf Nodu Durumu
PR : Progesteron
T : Tümör Boyutu
TDLÜ : Terminal Duktal Lobüler Üniteler
TIL : Tümör İnfiltre Eden Lenfositler
TİM : Tümör İlişkili Makrofajlar
TK : Tübüler Karsinom
ÜNMK : Üçlü Negatif Meme Kanseri
VNPİ : Van Nuys Prognostik İndeksi

ÖZET

Üçlü Negatif Meme Kanserlerinde Mikroçevrenin Klinikopatolojik Önemi

Amaç: Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık sebebidir. Tedavisinde cerrahi tedavinin yanı sıra kemoterapi, radyoterapi, hormonoterapi (östrojen ve progesteron reseptörüne karşı) ve *"Human epidermal growth factor receptor 2"* (HER2) durumuna göre hedefe yönelik ajanlar kullanılmaktadır. Ancak üçlü negatif meme karsinomları için tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Prognozu diğer gruplardan daha kötü olduğu bilinen bu grup için tedavi seçeneklerini artırmaya yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı tümör mikroçevresi ve tümöre karşı gelişen immün yanıtı araştırmaya yöneliktir. Tümörün savunma mekanizmalarından olan PD-L1 reseptör ekspresyonunda artışa karşı kullanılan ajanlar sağkalım üzerindeki etkileri nedeniyle umut vadetmektedir.

Tümör mikroçevresinde yer alan lenfositler (Treg ve CD8+ T lenfositler) ve makrofajların (M1 ve M2 makrofajlar) prognoz üzerinde etkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda tümör mikroçevresini oluşturan immün hücrelerin yoğunluğu ve lokalizasyonunun ve PD-L1 ekspresyon durumunun konvansiyonel prognostik parametreler ile ve birbirleriyle karşılaştırılması; immünitenin klinikopatolojik faktörler üzerine etkisini araştırmak ve immünoterapide uygun hasta seçimine ışık tutmak amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Patoloji Bölümü'nde Ocak 2017- Aralık 2021 tarihleri arasında Üçlü negatif meme karsinomu tanısı almış ve sistemik tedavi almamış 52 olgunun materyali çalışmaya dahil edilmiştir. Her olguya immünhistokimyasal olarak CD8, FOXP3, CD163 ve PD-L1 uygulanmıştır. CD8, FOXP3, CD163 ekspresyonları stromal ve intratümöral alanlarda ayrı ayrı değerlendirilmiştir. PD-L1 ekspresyonu da immün hücrelerde ve tümör hücrelerinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Bulgular: Olgularımızın tanı anındaki ortalama yaşı 48 ve takip süreleri ortalama 33 ay idi. Çalışmamızda yüksek TIL seviyeleri olguların %30'unda görüldü ve yüksek PD-L1 pozitifliği ile ilişkili bulundu. TIL seviyeleri ile konvansiyonel prognostik parametreler için anlamlı farklılık saptanmadı. PD-L1 pozitifliği saptanan olgularda daha az LVİ görüldü ancak tümör boyutu, lenf nodu metastazı, sağkalım ve mortalite ile anlamlı ilişki bulunmadı. İmmün hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun intratümöral ve stromal FOXP3 ve CD8 ile ve de intratümöral CD163 ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı. intratümöral ve stromal CD8(+) seviyeleri yaşayan olgularda daha yüksek medyan değere sahipti, yaşayan ve eksitus olan olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu. Mikroçevrede; CD8 ekspresyonu artığında stromal FOXP3 ekspresyonu CD8 ve CD163 ekspresyonunda pozitif korelasyon izlendi.

Sonuç: Tümör mikroçevresi ÜNMK'lerin tedavisini yönlendirmede önem kazanmıştır. İmmün hücrelerin kompozisyonu, yoğunluğu ve lokalizasyonun ile kontrol noktası moleküllerinden PD-L1'in ÜNMK'lerinde önemli prognostik parametreler olduğunu düşünmekteyiz. Sonuçlarımız ÜNMK'lerinde TIL'lerin araştırılmasının faydalı prognostik ve terapötik bilgiler sağlayacağını desteklemektedir. Bununla birlikte immün hücre belirteçlerinin durumu ve buna yönelik tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi için daha geniş olgu serilerinde çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Üçlü negatif meme karsinomu, tümör mikroçevresi, programlı hücre ölümü ligandı 1, tümör infiltre eden lenfositler, CD8, FOXP3, CD163, M2 makrofaj, regülatuar T lenfositler, sitotoksik T lenfositler.

ABSTRACT

Clinicopathological Importance of Microenvironment in Triple Negative Breast Cancers

Aim: Breast cancer is the most common cancer type among women and the leading cause of cancer death. İn its treatment, addition to surgical treatment, hormonal therapy (against estrogen and progesterone receptors) and targeted agents according to "Human epidermal growth factor receptor 2" (HER2) are used. However, treatment options for triple negative breast carcinomas are limited. This group known to be has worse prognosis than other groups and studies to developt treatment moptions for this group is gaining importance. Most of these studies are aimed at investigating the tumor microenvironment and the immune response against the tumor. Agents used against the increase in PD-L1 receptor expression, which is one of the defense mechanisms of the tumor, are promising due to their effects on survival. Agents used against the PD-L1 receptor expression on tumor cells, which is one of the defense mechanisms of the tumor, are promising due to their effects on survival.

There are many studies showing that lymphocytes (Treg and CD8+ T lymphocytes) and macrophages (M1 and M2 macrophages) in the tumor microenvironment are effective on prognosis. In our study, the density and localization of immune cells forming the tumor microenvironment and the expression status of PD-L1 were compared with conventional prognostic parameters and with each other; It is aimed to investigate the effect of immunity on clinicopathological factors and to shed light on the appropriate patient selection in immunotherapy.

Material and Methods: Materials of 52 patients who were diagnosed with triple negative breast carcinoma and did not receive systemic treatment between January 2017 and December 2021 in Çukurova University Balcalı Hospital Pathology Department were included in the study. CD8, FOXP3, CD163 and PD-L1 were applied for all cases by immunohistochemically. CD8,FOXP3 and CD163 expressions were separately evaluated in intratumoral and stromal areas. PD-L1 expression was also evaluated separately in immune cells and tumor cells.

Findings: The mean age of our cases at the time of diagnosis was 48, and the mean follow-up period was 33 months. In our study, high TIL levels were seen in 30% of the cases and were associated with high PD-L1 positivity. There was no significant difference between TIL levels and conventional prognostic parameters. PD-L1 positivity was found to be statistically significantly higher in cases without LVI, but no significant correlation was found with tumor size, lymph node metastasis, survival and mortality. PD-L1 expression in immune cells was positively correlated with intratumoral and stromal FOXP3 and CD8 and intratumoral CD163 expression. Intratumoral and stromal CD8(+) levels between surviving and deceased cases were statistically significantly different and had a higher median value in surviving cases. In the microenvironment; When CD8 expression increased, stromal FOXP3 expression

also increased significantly, again FOXP3 expression was positively correlated with stromal and intratumoral CD163 expression.

Conclusion: Tumor microenvironment has gained importance in guiding the treatment of triple negative breast cancers. We think that the composition, density and localization of immune cells and checkpoint molecules such as PD-L1 are important prognostic parameters in triple negative breast carcinomas. Our results support that investigation of TILs in triple negative breast carcinomas will provide useful prognostic and therapeutic information. However, we believe that further studies in larger case series are necessary to evaluate immune cell marker expression and treatment outcomes.

Keywords: triple negative breast cancer, tumor microenvironment, programmed cell death ligand 1 tumor infiltrating lymphocytes, CD8, FOXP3, CD163, M2 macrophages, regulatory T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve tüm kadın kanserlerinin %24'ünü oluşturur. Kadınlardaki kanser ölümlerinin en önde gelen nedenidir.[1-3]

2018 yılında 2,1 milyon hasta yeni meme kanseri tanısı alırken, tüm dünyada meme kanserine bağlı 627 000 ölüm gerçekleşmiştir.[1] Meme kanserlerinde östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) ekspresyonu olmayan meme kanserleri üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) olarak bilinmektedir ve tüm meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır.[4,5] Meme kanserlerinin tedavisinde cerrahi tedavinin yanı sıra kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, HER2 durumuna göre ise hedefe yönelik tedavi uygulanmaktadır. Ancak üçlü negatif meme karsinomları için tedavi seçenekleri kısıtlıdır.[6] Prognozu diğer gruplardan daha kötü olduğu bilinen bu grup için tedavi seçeneklerini artırmaya yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır.[7]

Meme karsinomlarında ayrıca hasta yaşı, tümör tip, histolojik derece, evre ve proliferasyon oranı da prognostik faktörler arasında yer almaktadır. Son yıllarda ise tümör mikroçevresinin de prognostik olarak önemli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.[8] İmmün yanıtın düzenlenmesinde rol alan ajanlar umut vadeden tedavi seçenekleri arasındadır.[9] Tümör mikroçevresini oluşturan en önemli inflamatuar hücre grubu tümör infiltre eden lenfositlerdir (TIL). T lenfositler özellikle sitotoksik T lenfositler ise en büyük grubu oluştururlar. TİL'ler aktivatör ve inhibitör faktörler ile düzenlenirler. Aktivatörler tümöre karşı immün mekanizmaları aktive ederek anti-tümör etki oluştururlar. Aktivatör faktörler arasında diğer immün hücrelerden salgılanan antitümör etkili sitokinler, tümör antijenleri ve lenfositlerden sitotoksik T lenfositler yer alır. İnhibe edici faktörler ise immünsupresyon oluşturarak tümör progresyonuna yol açarlar. İnhibitör faktörler de tümörün savunma mekanizmasında rol oynayan PD-L1, yine immün hücrelerden protümörojenik etkiye sahip ve FOXP3 ekspresyonu gösteren regülatuar T lenfositler ve CD163 ekspresyonu yapan M2 makrofajlar yer almaktadır.[10-12]

PD-1/PD-L1 yolağı lenfositlerin antitümör fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır. T ve B lenfositlerin yüzeyinde yer alan PD1; reseptörü ile bağlandığında

tümöre karşı sitotoksik yanıtın inhibe olmasına neden olur. Birçok tümör tipinde olduğu gibi ÜNMK'lerinde de artmış PD-L1 ekspresyonuna rastlanmaktadır.[13,14] Lenfositler üzerinde yer alan PD-1 reseptörü tümör yüzeyindeki PD-L1 ligandı ile bağlandığında sitotoksik T lenfosit yanıtı inhibe edilir ve sitotoksik T lenfositler tümör hücrelerini öldürme özelliklerini kullanamazlar ve tümör immün sisteme karşı yaşamını sürdürmeye devam eder. PD-1/ PD-L1 bağlantısını önlemek için geliştirilen immünoterapi ajanları PD-1 yada PD-L1'e bağlanarak sitotoksik T lenfositlerin aktive olmalarının önündeki engeli kaldırırlar.[15,16] Meme kanserleri daha az immunojenik tümörler olarak bilinse de yapılan çalışmalar immun sistem ve meme kanseri arasındaki ilişkinin günden güne arttığını göstermektedir. Birçok çalışma göstermiştir ki meme tümörlerinde PD-1 pozitif TIL varlığı negatif prognostik faktör olup kötü klinikopatolojik özelliklerle ilişkilendirilmiştir.[17]

Tümöre karşı immün yanıtta rol oynayan bir diğer önemli hücre grubu makrofajlardır. Tümör ilişkili makrofajlardan (TİM) M1 makrofajlar aktive edici makrofajlar olup antitümör etkiye sahiptirler. CD163 eksprese eden M2 makrofajlar ise inhibe edici özellik gösterirler.[18] Tümör mikroçevresinde M2 makrofajların fazla olması; tümör invazyonu, migrasyonu ve anjiogenezi artırarak protümörojenik etkiye yol açmaktadır. ÜNMK'lerinde artmış CD163 varlığının kötü prognostik faktör olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.[19,20] Bunun aksine artmış M1 makrofaj varlığında ise sağkalımın uzadığı bildirilmektedir.[11]

ÜNMK'lerinin diğer meme kanseri gruplarına göre daha kötü prognozlu ve tedavi seçenekleri daha kısıtlı olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle ÜNMK'lerinde yeni tedavi seçenekleri araştırılmaya devam etmektedir.[21] ÜNMK'nin immünolojik mikroçevresinin tedaviye yön verebilmesi ve prognoz üzerindeki etkisi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda ÜNMK'nin immünolojik temellerini daha iyi anlamak, klasik prognostik parametrelerle immünolojik mikroçevrenin ilişkisini araştırmak amacıyla sitotoksik T lenfositler için CD8, regülatuar T lenfositler için FOXP3 ve M2 makrofajlar için CD163 ve PD-L1 biyobelirteçlerinin ekspresyonunun incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışma sonucunda tümörün immünolojik mikroçevresi hakkında elde ettiğimiz verilerin prognoza etkisinin ortaya konması bu olgularda tedaviye ve prognoza katkı sağlayacaktır.

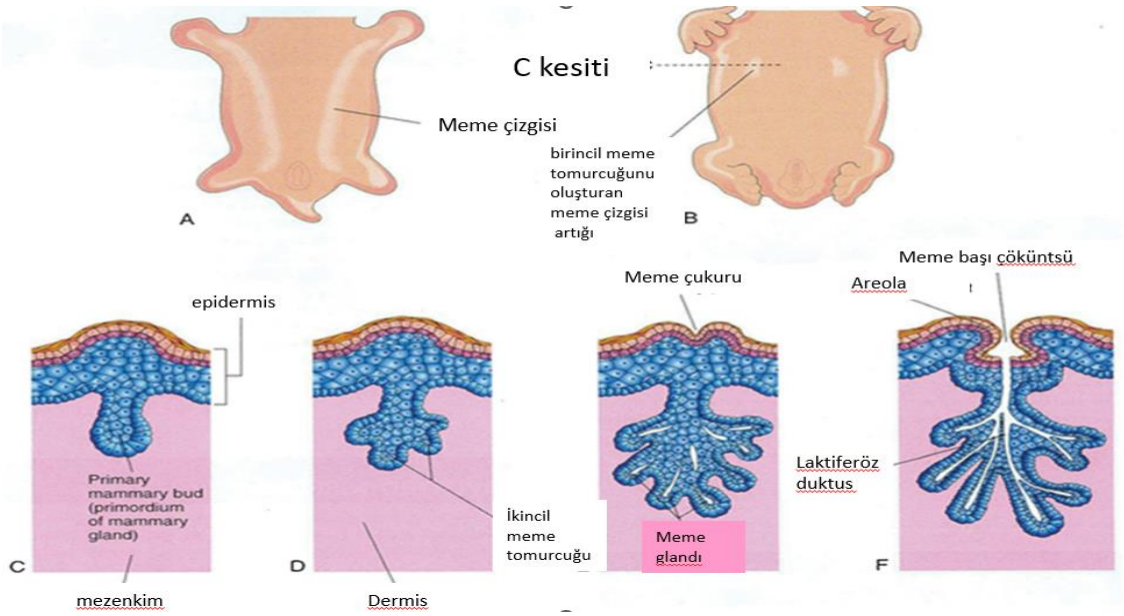
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyoloji

Meme bezleri embriyogenez ile gelişimine başlayıp laktasyona kadar gelişimine devam eden özelleşmiş epidermal uzantılardır. Meme bezlerinin oluşumda rol alan gelişimsel basamaklar ve hücre sinyal yolakları meme kanserlerinin gelişiminde rol oynayan faktörlerle paralellik göstermektedir.[22]

Gestasyonun 4 - 6. Haftasında meme dokusuna spesifik öncül hücreler görülmeye başlar. Bu hücreler epidermiste prolifere olurken aksilladan inguinal bölgeye uzanan süt çizgisi olarak adlandırılan bir hat üzerinde bilateral olarak bulunurlar.[23] Dördüncü interkostal aralık dışında bulunan meme tomurcukları geriler ve atrofiye uğrarlar. Birinci trimesterda meme tomurcuğu çevre mezenkimal hücrelerin etkisiyle stromaya doğru büyür. Epitelyal sütunlar, meme tomurcuğunda toplanan mezenkim hücreleri içinde gelişirler; loblar ve segmentler oluşur.[23]

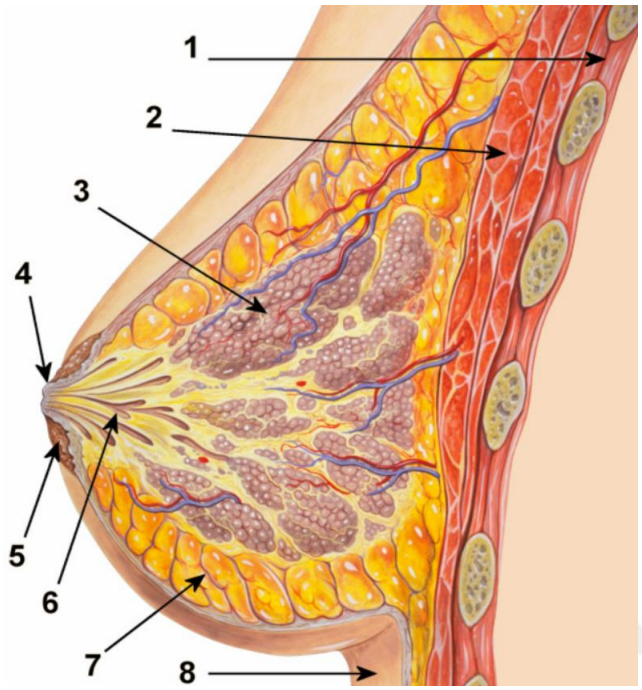
32. haftadan sonra duktal-lobüler üniteler şekillenmeye başlar. Puberteye kadar meme dokusu laktiferöz duktuslardan oluşur. Pubertede östrojen etkisiyle duktuslar gelişirken, progesteron etkisiyle bağ dokusu artar.[24]



Şekil 1. Meme gelişiminin emriyolojik evreleri (A) Gestasyonun 28. Günündeki embriyoda meme çizgilerini önden görünüşü (B) Gestasyonun 6. Haftasında meme çizgilerinin kalıntılarının görüldüğü benzer görüntü (C) Meme glandlarının geliştiği meme çizgisinin transvers kesiti (D-F)[23]

2.2. Anatomi

Meme dokusu kadınlarda 50 gramdan 400 grama kadar değişen ağırlıkta olmakla birlikte, laktasyonda olmayan meme dokusu yaklaşık 150-250 gram ağırlıktadır. Laktasyon sırasında bu ağırlık 400 grama kadar çıkabilir.[25]



Şekil 2. Memenin yandan görünümü; 1-Göğüs duvarı 2- Pektoral kaslar 3- Lobüller 4-Meme başı 5- Areola 6-Laktiferöz duktuslar 7- Adipöz doku 8- Cilt[26]

Kostaların ön yüzünde yer alan pektoralis majör kasının üzerinde, süperfisyal ve derin fasyalar arasında yer alır. Vertikal olarak 2. – 6. kostaların, horizontal olarak sternum kenarıyla midaksiller çizginin arasında yer almaktadır. Kaslar da ise lateralinde serratus anterior, inferiorunda eksternal oblik kası ve rektus kılıfının üst kısmı yer almaktadır. Cooper ligamanlarıyla ilişkili olan meme dokusu içindeki fibröz bağ dokusu meme yapısını destekler.[26,27]

Memenin innervasyonunu 2-6. İnterkostal sinirler'in anterior kutaneal dalları ve lateral kutaneal dalları ve n. Supraklavikularis'ten gelen dallar sağlarlar.[24,28]

Meme; arteria rami (a rr.) Mammarii laterales (2-4 Posterior interkostal ve lateral torasik arter), a rr. Mammarii mediales (internal torasik arterin 2-4. dallarından) ve torakoakromiyal arter (aksiller arter) ile beslenir.[24,28]

Memenin venöz dönüşünde yüzeyel ve derin venler yer alır. Bu venlerde kapak yoktur ve kendi aralarında birçok anastomoz yaparlar. Yüzeyel venler genellikle

memenin merkez kısmını drene eder. Bu venler diğer memedeki venler ile de bağlantılı olabilir. Medialde memeyi drene eden venöz yüzeyel damarlar Haller'in venöz halkası adı da verilen dairesel bir venöz ağ ile birleşir. Bu venöz ağın medial kısmı internal torasik venlere, lateral kısmı ise lateral torasik venlere drene olur. Süperfisyal venöz akımın küçük bir kısmı ise boynun yüzeyel venlerine doğrudur. Derin venöz drenaj büyük ölçüde internal torasik venin perfore eden dalları tarafından sağlanır. Aksiller venin dalları da ek olarak bu drenaja yardımcı olur. İnterkostal venler ise bu venöz akım için başka bir rotadır ve bu venler aracılığı ile meme venleri vertebral venler ve vertebral pleksus ile bağlantı sağlar.[4]

Memenin lenfatik drenajı meme kanserinin yayılımı açısından önemli olmasının yanı sıra memenin süt üretimi için de önemlidir. Ana drenaj aksiller lenf nodlarına ve internal torasik arter çevresindeki parasternal nodlara olur.[29] Memenin lenfatikleri dört ayrı yol izler, bunlar; kutanöz, aksiller, internal torasik ve posterior interkostal lenfatiklerdir. Kutanöz lenfatik drenaj, memeyi çevreleyen dermiste yer alan süperfisyel bir pleksus ve subareolar alandaki meme duktuslarıyla ilişkili derin bir lenfatik ağı içerir. Kutanöz kanalların çoğu, ipsilateral aksillaya drene olur. Memenin inferiorundaki kutanöz lenfatikler epigastrik pleksusa, karaciğer lenfatiklerine ve intraabdominal lenf nodlarına dökülürler.[30] Lenfatik drenajın %75 i aksiller lenf nodlarına olurken , kalan kısmı internal torasik lenf nodlarına olur.[13]

Aksiller lenf nodları basitçe üç bölüme ayırır;

- Level I: pektoralis minörün inferiorundaki lenf nodları
- Level II: pektoralis minörün arkasındaki lenf nodları
- Level III: pektoralis minörün üzerindeki lenf nodları[31]

2.3. Histoloji

Meme dokusu luminal-myoepitelyal hücreler ve interlobuler-intralobuler stroma içeren duktus ve lobüllerden oluşmaktadır.[32] Meme dokusunun en önemli kısmı dallanan bir duktus sistemi ve bunların sonlarındaki terminal duktal lobüler ünitelerdir (TDLÜ). Memenin duktal lobüler sistemi segmentler ve loblar halinde düzenlenmiştir. Kişiler arasındaki varyasyonlardan dolayı bu sistem kesin olarak tanımlanamamıştır. Her lobda >40 lobül, her lobülde ise 10-100 asini bulunur Bir TDLÜ; lobülden ve terminal duktustan oluşur. TDLÜ'lerideki lobuller; asinüslerden (terminal duktuli)

oluşur ve terminal duktuslara drene olurken terminal duktuslar laktiferöz (segmental) duktus sistemine drene olur. Laktiferöz duktuslar genişleyerek laktiferöz sinüsleri oluşturur ve toplayıcı duktus haline gelerek meme başına açılır.[33]

Meme dokusundaki glandüler ve duktal yapılar, meme başına yakın 1-2 mm'lik mesafe dışında büyük ölçüde iki sıralı hücre tabakası ile döşelidir. Bu iki kat hücre tabakasının lümene bakan kısmını oluşturan luminal epitelyal hücreler daha çok sekresyondan sorumlu iken lüminal epitelyal hücrelerin etrafını saran myoepitelyal hücrelerin kasılma işlevi vardır. lüminal hücreler küboidal veya kolumnar şekilli olup, soluk, eozinofilik sitoplazmalara ve uniform, oval nükleuslara sahiptirler.[34] Bu hücreler sitokeratin 7, 8, 18, 19 gibi çeşitli düşük ağırlıklı sitokeratinler ve E-Kaderin ekspresyon gösterirler. Ayrıca bu hücrelerin az bir kısmında tek tek dağılmış halde nükleer Östrojen α (ERα) ve progesteron (PR) boyanması görülür. Bu boyanma lobüllerde duktuslardan daha yüksek orandadır. Östrojen ekspresyonu gebelikte ve Ki-67 proliferasyonu gösteren hücrelerde azalır, yaşla birlikte ise artar.[35] Bazalde bulunan myoepitelyal hücreler ışık mikroskobunda zor seçilir.[34] Myoepitelyal hücreler, yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler ve S100, aktin, kalponin, p63 ve CD10 gibi immünohistokimyasal belirteçlerle gösterilebilirler.[17]

Lobüller içindeki stroma lobüller arasındaki stromadan farklıdır. İntralobüler stroma daha gevşektir ve mast hücresi, makrofaj, plazma hücresi ve lenfosit içerebilir.bazen bu stroma da tümörle karışabilecek dev hücreler bulunabilir.[34]

Meme başı-areola kompleksi ve toplayıcı duktusların son 1-2 mm'lik kısmı pigmentasyonun artmış olduğu sirküler bir alandır ve çok sayıda sinir ucu içerir ve keratinize çok katlı yassı epitel ile döşelidir.[36]

2.4. Meme Kanseri

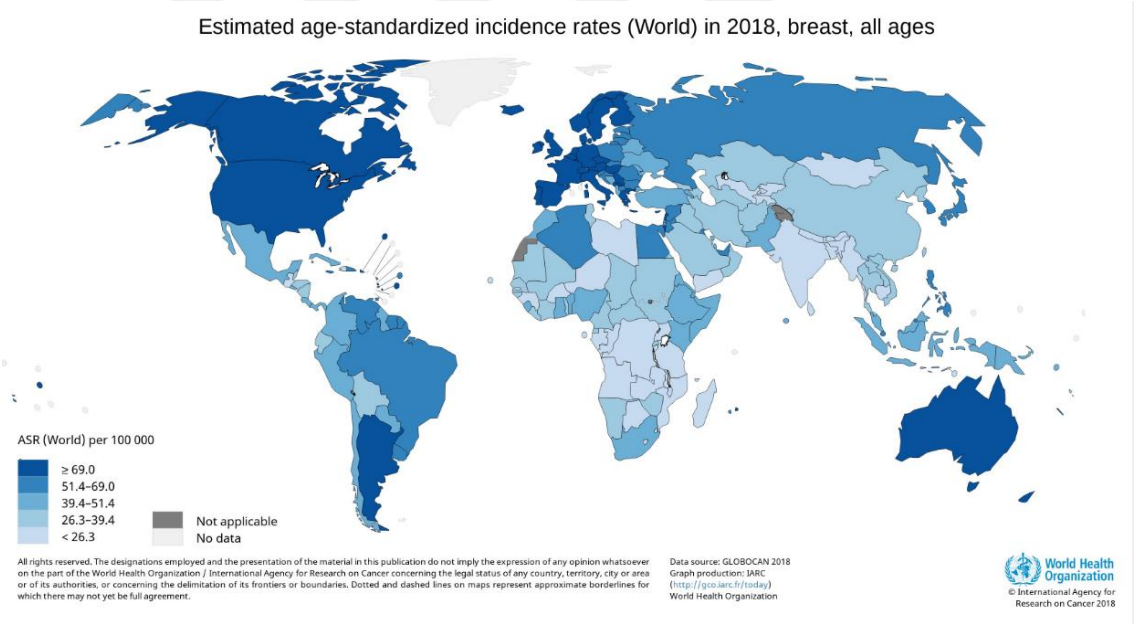
Meme tümörleri ilk milattan önce 3000'li yıllarda Mısırlılar tarafından tariflenmiştir.[37] 20. yüzyılın sonlarında meme patolojisinin karmaşıklığı, tedavi kararında mikroskobik ayırıcı tanının gereksinimimi arttırmıştır.[38]

2.4.1. Epidemiyoji

Meme kanseri her iki cinsiyette görülebilirken kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir ve (tüm kadın kanserlerinin %24'ünü oluşturur) kadınlardaki kanser ölümlerinin en önde gelen nedenidir. Erkeklerde ise bu oran %1'den azdır.[1-3]

Son yıllarda invaziv meme karsinomu (İMK)'nun insidansı, düşük gelirliülkelerde daha fazla artarken orta gelirli ülkelerde artış saptanmıştır; ABD, Kanada Birleşik Krallık, Fransa ve Avustralya gibi yüksek gelirli ülkelerde azaldığı dikkati çekmektedir.[39-41]

Ancak yaşlanan popülasyonlarda, küresel yük genel olarak artmıştır. 2018 yılında 2,1 milyon yeni meme kanseri tanısı alan hasta yanı sıra tüm dünyada meme kanserine bağlı ölüm 627.000'dir.[1] 2018 yılında yeni tespit edilen meme kanseri vakalarının kıtalara göre dağılımı[42,43] (Şekil 3).



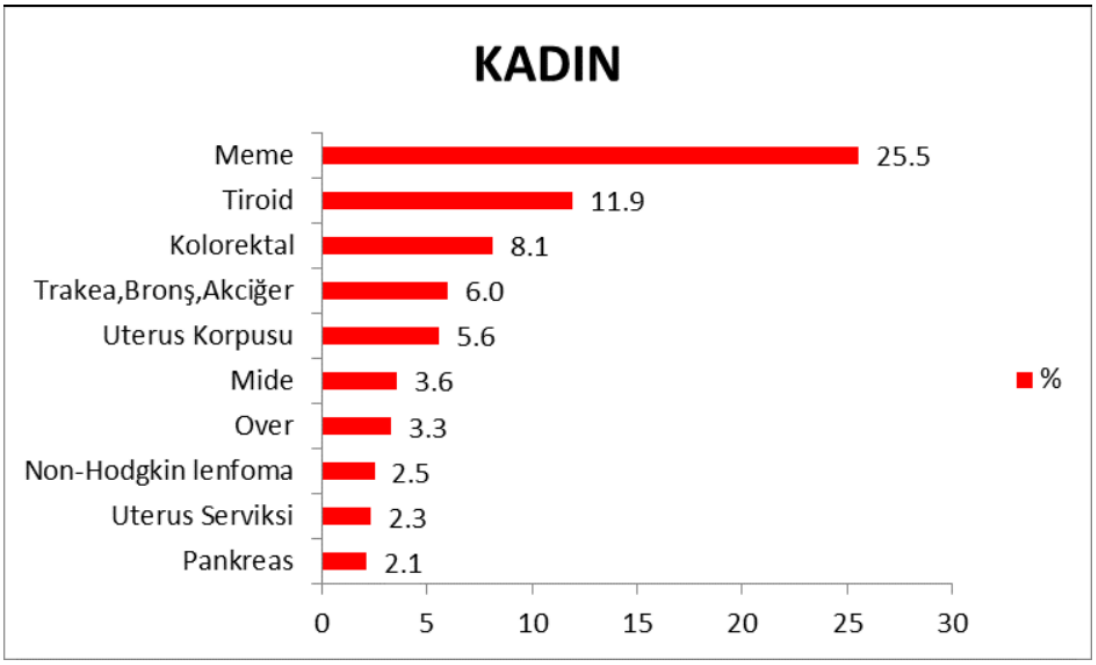
Şekil 3. Meme kanserlerinin yaşa göre ülkelerde görülme sıklığı[43]

Düşük riskli bölgelerden yüksek riskli bölgelere göç eden nüfusların bir ya da iki nesil sonra göç ettikleri nüfusun risk düzeyine yaklaştığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu da kanserin etyolojisinde çevresel faktörlerin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. ABD'de meme kanseri alt tiplerindeki varyasyonlar üzerine yapılan araştırmalar, meme kanseri alt tiplerinin sıklıklarının popülasyon özelliklerine göre değiştiğini göstermiştir. Rutin meme kanseri taraması yapılan popülasyonlarda hormon

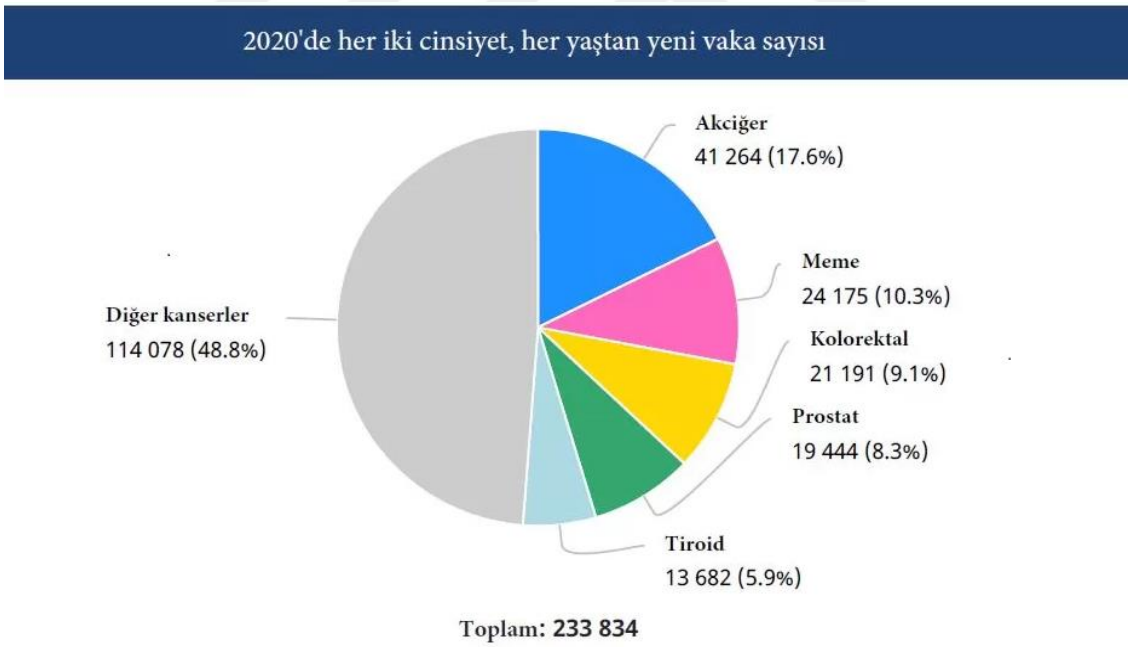
reseptörü pozitif kanserler en yaygın alt tiptir, HER 2 pozitif kanserler %10-15'i oluşturur ve ER- negatif/HER 2 negatif kanserler %13-17'yi oluştururken, meme kanseri açısından rutin taranma yapılmamış popülasyonlarda sıklık farklıdır, ER-negatif/ HER- negatif kanserler (%20-40) ve HER 2 Pozitif kanserler (%15- 25) daha yüksek oranlardadır.[44,45]

Türkiye Cumhuriyeti Halk Sağlığı Kurumunun Türkiye kanser istatistikleri 2015 rehberine göre meme kanseri tüm yaş gruplarında %24,7 oranla kadınlarda en çok görülen kanserdir. Bu tanıyı alan kadınlardan 50-69 yaş arasında olanların oranı %44,5; 25-49 yaş arasında olanların oranın ise %40,6 olduğu belirtilmiştir. Meme kanseri tanısı alma ortanca yaşının ise 53 olduğu görülmüştür. Meme kanseri evrelerinin 2015 yılı içinde dağılımına bakıldığında olguların %45,5'inin lokalize evrede olduğu, olguların %43'ünün bölgesel evrede olduğu yani aksiller lenf nodu metastazı yapmasına rağmen uzak metastaz yapmadığı, %11,5'inin ise uzak metastaz yaptığı görülmüştür. Kadınlarda meme kanserinin histolojik tiplere göre dağılımı incelendiğinde ise "İnvaziv Karsinom, özel tip olmayan" (NST) histolojik tipi %83 oranla en çok izlenen histolojik tip olurken bunu %6,2 oranla lobüler karsinom izlemiştir.[46,47]

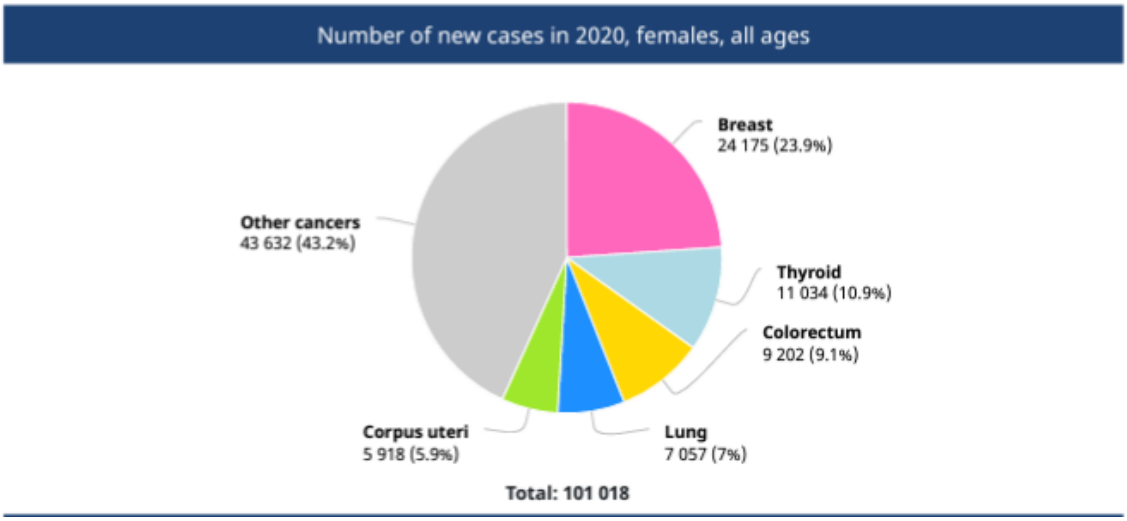
Globocan 2020 verilerine göre Türkiye de kadınlarda yeni tanı alan tüm kanser olgularından %23,9'ü (24,175) meme kanseri tanısı almıştır. Bu oran diğer kanser tipleri arasında birinci sıradadır. Kansere bağlı ölümlere bakıldığında birinci sırada akciğer kanseri %29,3, ikinci sırada meme kanseri 7,161 ölüm sayısı ile (%5.7) yer almaktadır. Tüm yaşlara ve cinsiyetlere göre uyarlanmış en sık görülen kanserlerde meme kanseri kadınlarda 100,000 de 46.6 ile birinci sıradadır (Şekil 4-6).[48] En çok yaşam kaybına neden olan ilk 10 kanserin cinsiyete göre dağılımı Şekil 7'de gösterilmektedir.[47,48]



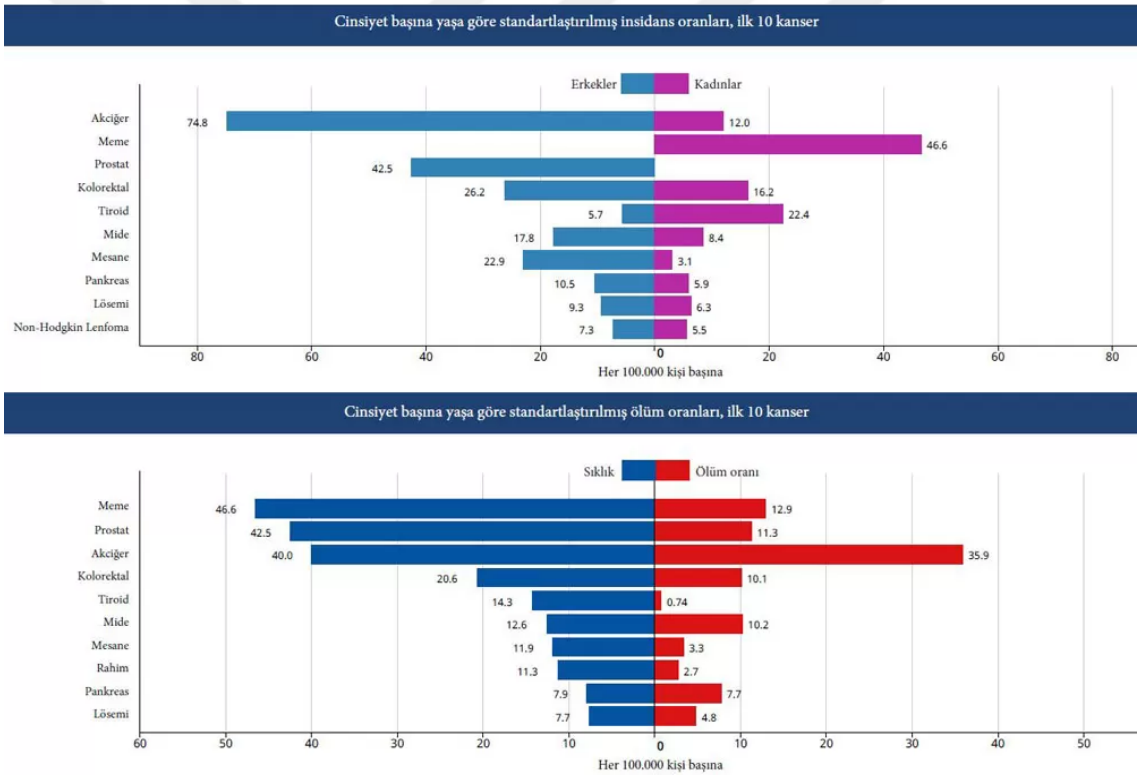
Şekil 4. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017)[46]



Şekil 5. 2020 yılında Türkiye'de en sık görülen ilk 5 kanser türü, akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal (kalın bağırsak) kanser, prostat kanseri ve tiroid kanseri idi. Bu 5 kanser türü, tüm kanserlerin %50'den fazlasını oluşturdu.[47,48]



Şekil 6. Kadınlarda yeni tanı almış kanser türleri[42,48]



Şekil 7. 2020 yılı ilk grafikte, erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanser görülebilir (her 100 bin kişi başına yıllık yeni kanser vaka sayısı)[47,48]

İkinci grafikte, en çok yaşam kaybına neden olan ilk 10 kanserin cinsiyete göre dağılımı görülmektedir (her 100 bin kişi başına yıllık kansere bağlı yaşam kaybı sayısı).[47,48]

2.4.2. Etiyoloji, Risk Faktörleri ve Genetik Predispozisyon

Kadınlar arasında majör risk faktörleri; herediter faktörler, ömür boyu östrojen maruziyeti ve daha az oranda çevresel faktörler ve yaşam tarzı gibi faktörlerdir.[32]

Kadın cinsiyette olmak en büyük risk faktörüdür ve 25 yaş üstünde görülme sıklığı artmaktadır. Erken menarj (12 yaş altı), geç menopoz (50 yaş üzeri), hiç doğum yapmamış olmak, az sayıda çocuk sahibi olmak meme kanseri riskini arttırır.[49] Meme kanseri vakalarının yaklaşık %15-20'sinin birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü vardır, ancak kendileri meme kanserine özel bir gen mutasyonu taşımamaktadır.[32] Epidemiyolojik bilgiler meme kanserinin hayvansal yağ ve proteinden zengin diyet ve fiziksel egzersizden fakir bir hayat sürenlerde daha fazla ortaya çıktığını göstermiştir.[50] Vücut kitle indeksi ve meme kanser riski arasında güçlü pozitif bir ilişki gösterilmiştir.[51] Alkol kullanımı meme kanseri riskini hafif arttırdığı ve bu riskin ER pozitif meme kanserlerinde daha fazla olduğu dikkat çekmektedir.[52,53] Sigara kullanımı ile meme kanseri arasında net ilişki kurulamasa da geniş bir meta analizde ilk çocuktan önce sigara kullanımının meme kanserinin başlatıcısı olabileceğini düşündürmektedir.[54,55] Fizik aktivite ve meme kanseri riski arasında ki bağlantı Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından değerlendirilmiş olup yüksek aktivite seviyelerinin meme kanseri riskini düşürdüğü sonucuna varılmıştır.[56]

Meme kanserinin gelişiminde ekzojen seks steroidleri (östrojen ve progesteron)'nin çok önemli rol oynadığı epidemiyolojik çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır.[57] Meme kanseri görülme hızı menopoz öncesi (yaklaşık yılda %8) ve sonrası (yaklaşık % 2) değişmektedir.[58]

İnsanlarda görülen diğer kanser tiplerine göre meme kanseri daha fazla ailesel yatkınlık gösterir. Meme kanseri gelişim riskini oldukça arttıran iki yüksek penetrasyonlu gen; Meme Kanser Geni 1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2) tanımlanmıştır. Ek olarak daha düşük riske neden olan düşük ve orta penetrasyonlu genlerde ek polimorfizmler saptanmıştır.[43] Herediter meme kanseri görülen kadınların üçte birinde BRCA1 (17q21.3 kromozom lokusunda) veya BRCA2 (13q12-13 kromozom bandında) geninde mutasyonlar bulunur.[32] Germline *BRCA1* mutasyonları üçlü negatif meme kanseri (ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif) ile ilişkili iken germline *BRCA2* mutasyonları hormon reseptörü pozitif meme kanserleri ile ilişkilidir.[59,60]

2.4.3. Klinik ve Radyolojik Özellikleri

İMK, memenin glandüler elemanlarının malign epitelyal tümörüdür.[43]

Meme kanserlerinin %90'ı tek odaklıdır ve memenin her kadranında çıkabilir. Bright ve arkadaşlarının çalışmasında daha sık olarak üst-dış kadranda görülmüştür.[61] Hastaların %2 sinde senkron bir kontralateral tümör bulunur. Meme kanserlerinin yaklaşık %0,1'i net meme primeri olmayan bir aksiller metastaz olarak ortaya çıkar.[61]

Rutin meme tarama yapılmayan popülasyonlarda; cilt ve meme başı çekintisi, meme başı akıntısı şeklinde bulgu verebilir. Nadir durumlarda ciltte ülserasyon görülebilir. İnflamatuar meme karsinomlarında meme derisinin yarısından fazlasını tutan yaygın eritem ve ödem görülür.[43] Meme karsinomunda görülen tüm bu semptomlar benign meme lezyonlarında da görülebilir ve kesin tanı için radyolojik ve histopatolojik doğrulama gerekir.[43] Rutin taramada ultrasonografi <40 yaş kadınlarda tercih edilen bir yöntemdir. Mamografi ve ultrasonografinin beraber kullanılması ile yanlış negatiflik oldukça düşüktür (%0-3).[62,63] MRG, meme kanserini saptamak için en duyarlı ancak spesifik olmayan bir yöntemdir. Kullanımı yüksek risk altındaki kadınlarda tarama ve evreleme için kullanılmaktadır.[43]

Fizik muayene, görüntüleme ve histopatolojik inceleme sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ile kanseri gözden kaçırma riski son derece düşüktür. Bununla birlikte, bu modalitelerden herhangi biri birbirleri ile uyumlu olmadığında veya değerlendirilemediğinde, tekrar biyopsi veya cerrahi eksizyon gerekmektedir.[43]

2.4.4. Makroskopik Görünüm

Çoğu İMK; düzensiz, yıldız şeklinde veya nodüler yapıda bir kitle olarak görüntülenebilir veya palpe edilebilir. Tümör sert kıvamlı olup sınırları genellikle düzensizdir. Bazı İMK'ları makroskobik olarak ayırt edilemeyebilir ve bu durumda radyolojik görüntüleme ile korelasyon gerekebilir. Ayrıca radyolojik görüntüleme ve makroskopik değerlendirme; lezyon sayısı, lezyon boyutu, klipsler/işaretleyiciler ve bunların konumu hakkında bilgi verebilir.[43]

Birbiri ile ilişkili lezyonlar arasında örnekleme yapmak önemlidir, böylece patolog, evreleme amacıyla bunların gerçekten çoklu mu yoksa büyük bir kanser mi olduğunu belgeleyebilir. Kitlenin kendisi veya boyutu makroskopik olarak belirgin

olmadığında yada neoadjuvan tedavi sonrasında bu tip lezyonların haritalanarak örneklenmesi gerekebilir.[64-66]

Deri ülserasyonu, meme başı değişiklikleri ve varsa ayrı cilt nodüllerinin makroskopik değerlendirmesi de evreleme için önemlidir. Tümörlerin rezeksiyon sınırlarına olan uzaklıkları kaydedilmeli ve mikroskobik analiz için yakın sınırlardan örneklenme yapılmalıdır.

Son olarak, materyalin cerrah tarafından çıkarıldığı, fiksatife yerleştirildiği ve fiksasyonda kaldığı süre gibi parametreler soğuk iskemi süresinin belirlenebilmesi için kaydedilmelidir. Bu parametreler reseptör (ER/PR ve HER2) testini, tümör derecelendirmesini ve lenfovasküler invazyon değerlendirmesini etkileyebilir.[67]

2.4.5. Patogenez

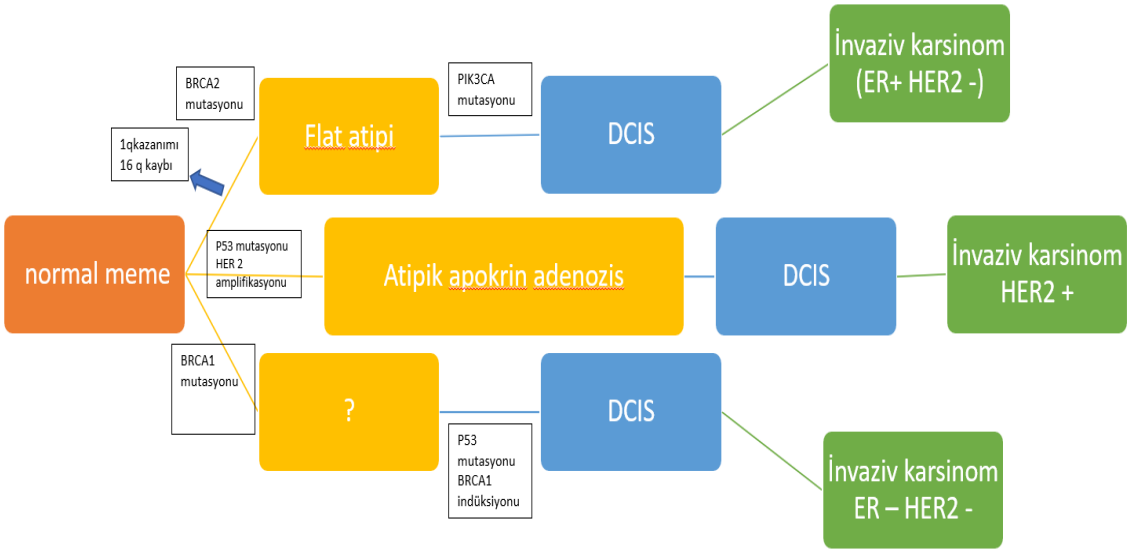
Meme kanserinin patogenezinde birkaç yolak rol oynamaktadır. Meme karsinogenezisinde tümörün köken aldığı hücre seviyesine göre iki farklı model tanımlanmıştır: *sporadik klonal gelişim modeli* ve *kanser kök hücre modeli*. Moleküler düzeyde, meme kanserinin esas olarak hormon reseptörleri ile ilgili iki farklı moleküler yolak boyunca geliştiğini gösteren güçlü kanıtlar vardır. Moleküler veriler ayrıca ER-pozitif ve ER-negatif meme kanserlerinin temelde farklı hastalıklar olduğunu da göstermiştir.[68,69]

Birinci model; ER pozitif invaziv karsinomları içermektedir ve düz epitelyal atipi, atipik duktal hiperplazi ve ER-pozitif duktal karsinoma in situ (DKIS) bu tümörlerin öncü lezyonları olarak kabul edilirler.[70] Ayrıca bu tümörler 1q kazanımı, 16q kaybı ve genellikle 17q12'nin ampifikasyon yokluğu ile karakterizedir. Bu lezyonlar hormon pozitiftirler ancak HER 2 overekspresyon ve bazal hücre belirteçleri içermezler.[43] Bu grup genel olarak düşük ya da orta dereceli lezyonlardan oluşur, sadece küçük bir grup (yaklaşık %9) yüksek derecelidir.[43]

İkinci model; ER negatif invaziv karsinomları içerir ve ER-negatif DKIS ve mikroglandüler adenozis bu tümörlerin öncülleri olarak bilinirler.[70] En sık ve karakteristik genetik mutasyonları 13q kaybı olup 11q13 kromozom bölgesinde kazanım ve 17q12 amplifikasyonudur. Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsünde rol alan genetik mutasyonlar görülür. Bu yol morfolojik olarak orta- yüksek dereceli tümörleri içerir.[68]

PIK3CA mutasyonları genellikle her iki yolakda da görülürken, TP53 mutasyonları daha çok ER negatif yolakta izlenir.[71]

ER-negatif meme kanserleri, hem HER2-pozitif hem de HER2-negatif grupları içerir ER-negatif-HER2-pozitif grupta, *PIK3CA*17q12 amplifikasyonuna ek olarak farklı mutasyonlar da sıkça görülür. ER-negatif-HER2-negatif meme kanseri biyolojisinde yer alan önemli unsurlar; yüksek proliferatif aktivite, artmış immün hücre infiltrasyonu, bazal benzeri ve mezenkimal fenotip ve homolog rekombinasyon eksikliğidir.[43] Genel olarak meme karsinomu gelişiminde muhtemel yolaklar Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Meme kanseri gelişiminde rol alan yolaklar[72]

2.4.6. Memenin Epitelyal Tümörleri Sınıflaması (WHO Sınıflaması)

Meme tümörleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tümör sınıflama kitabına göre; epitelyal tümörler, fibroepitelyal tümörler, hamartomlar, areolanın tümörleri, memenin mezenkimal tümörleri, memenin hematolenfoid tümörleri, erkek meme tümörleri ve genetik sendromlar başlıkları altında sınıflandırılmıştır.[43]

Tablo 1. Memenin epitelyal tümörleri sınıflaması[43]

Benign epitelyal proliferasyonlar ve öncül lezyonlar:	**Non-invaziv lobüler neoplazi:**
Olağan duktal hiperplazi	Atipik lobüler hiperplazi
Düz epitelyal atipi içeren kolumnar hücre lezyonları	Lobüler karsinoma insitu
Atipik duktal hiperplazi	**Duktal karsinoma insitu**
Adenosis ve benign sklerozan lezyonlar:	**İnvaziv meme karsinomu:**
Sklerozan adenozis	Özel bir tip olmayan invaziv meme karsinomu
Apokrin adenozis ve adenom	Mikroinvaziv karsinom
Mikroglandüler adenozis	İnvaziv lobüler karsinom
Radyal skar / kompleks sklerozan lezyon	Tübüler karsinom
Adenomlar:	Kribriform karsinom
Tübüler adenom	Müsinöz karsinom
Laktasyon adenomu	Müsinöz kistadenokarsinom
Duktal adenom	İnvaziv mikropapiller karsinom
Epitelyal-miyoepitelyal tümörler:	Apokrin farklılaşma gösteren karsinom
Pleomorfik adenom	Metaplastik karsinom
Adenomyoepitelyoma	**Nadir ve tükürük bezi tipi tümörler:**
Malign adenomyoepitelyoma	Asinik hücreli karsinom
Papiller neoplazmalar:	Adenoid kistik karsinom
İntraduktal papillom	Sekretuar karsinom
Papiller duktal karsinoma insitu	Mukoepidermoid karsinom
Enkapsüle papiller karsinom	Polimorföz adenokarsinom
Solid papiller karsinom (insitu ve invaziv)	Ters polariteli uzun hücreli karsinom
İnvaziv papiller karsinom	**Nöroendokrin neoplazmalar**:
	Nöroendokrin tümör
	Nöroendokrin karsinom

2.4.7. Mikroskopik Tipler

Meme kanserlerinin %95'ten fazlası öncelikle duktal ya da lobüler sistemde karsinoma in situ olarak başlar, ancak tespit edildikleri anda %70'i bazal membranı aşmış ve stromayı invaze etmiştir.[72]

2.4.7.1. İnsitu Karsinomlar

Duktal karsinoma insitu

Neoplastik epitelyal hücrelerin TDLÜ'e sınırlı monoklonal çoğalmasıdır. Bu çoğalma tipik olarak bazal membranı aşmaz ve segmental dağılım gösterir.[73] Papiller, solid, kribriform ve mikropapiller gibi yapısal varyantları ve nükleer değişkenliğe göre düşük ya da yüksek dereceli tipleri bulunmaktadır.[74] Duktal karsinoma in situ (DKİS) tedavi yönetiminde kılavuz olarak Van Nuys Prognostik İndeksi (VNPİ) kullanılmakta olup kriterler; tümör çapı, nükleer derece, cerrahi sınırlar ve hasta yaşıdır.[75] Hastalar skor 4-6; skor 7-9; skor 10-12 olarak üç ayrı kategoriye ayrılır. En düşük skor en iyi klinik gidiş ile ilişkilidir. Hastanın tedavi protokolüne VNPİ skoruna göre karar verilir.[28,76]

Lobuler karsinoma in situ

TDLÜ'den köken alan küçük ve diskoheziv hücrelerin invaziv olmayan neoplastik proliferasyonudur. Tümör hücreleri TDLÜ'deki asinilerin yarısından fazlasını doldurmuş ve genişletmiştir. Atipik lobüler hiperplazide ise lezyon asinusun bir kısmını tutar ve asinuslarda genişleme minimaldir yada yoktur.[28,43]

2.4.7.2. İnvaziv Karsinomlar

a. İnvaziv karsinom, özel tip olmayan (NST)

İMK, NST morfolojik olarak herhangi bir özel tipe sınıflandırılmayan oldukça geniş ve heterojen bir grubu oluşturur.[43]

Mikroskopik olarak çoğunlukla infiltratif özellikte olup; kordonlar, kümeler ve trabeküller oluştururken, bazen solid ya da sinsityal paternde olabilirler.

Tümör hücreleri genellikle ortasında lümeni seçilebilen tübül yapılar ve tek tek hücreler şeklinde infiltrasyon oluşturur. Sitoplazmaları geniş ve eozinofilik özelliktedir. Nükleusları düzgün, uniform şekilden nükleolleri seçilebilen pleomorfik görünüme kadar değişebilir. Mitoz sıklığı tümörden tümöre farklılık göstermektedir.

Olguların %80'ine in situ duktal karsinom eşlik eder. Stromal komponent değişkendir.[43]

Bazı İMK'ları, NST ile birlikte özel tip meme karsinomu da içerir, eğer özel tip %10-%90 arasında bir oranda ise mikst İMK NST ve spesifik alt tip karsinom olarak raporlanır. Her iki komponentin yüzdesinin raporda belirtilemesi önerilir. Eğer tümör >%90'dan fazla özel bir alt tipi içeriyorsa o alt tip olarak adlandırılır fakat bu özel alt tip %10'dan az ise lezyon sadece İMK, NST olarak isimlendirilir.[43]

İMK NST, onkositik, lipitten zengin, glikojenden zengin, şeffaf hücreli ve sebaseöz karsinom gibi spesifik morfolojik paternler içerebilir. Bunlar özel bir alt tip olmaktan çok özel morfolojik patern olarak tanımlanmaktadır. Benzer olarak Medüller karsinom, invaziv karsinom nöroendokrin diferansiyasyon gösteren, pleomorfik, koryokarsinomatöz ve melanositik özellikli tümörler İMK, NST'nin özel morfolojik paternleridir. Bu tümörler paternin yaygınlığına bakılmaksızın İMK, NST'nin morfolojik paternleri olarak kabul edilirler ve spesifik alt tipler için uygulanılan %90 kuralı bu parternleri içeren tümörlere uygulanmaz.[43]

Meduller patern; daha önceleri ‘medüller karsinom’, ‘atipik medüller karsinom’ veya ‘karsinom, medüller özellik gösteren’ olarak tanımlanmıştır. Bu tümörlerin histolojik derecesi yüksek olup, itici tarzda tümör sınırı, glandüler yapılar içermeyen sinsityal arşitektür ve bölgesel nekroz ve yoğun TIL varlığı ile karakterizedirler. Bu tümörler çoğunlukla hormon reseptörleri (ER ve PR) ve HER2 (üçlü negatif) için negatiftir.[43]

b. İnvaziv lobüler karsinom (ILK):

İnvaziv lobüler karsinom; tek sıra halinde veya tek tek hücreler şeklinde bulunan kohezyon yeteneğini kaybetmiş hücrelerden oluşur.[77] 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 ve sıklıkla in situ lobüler neoplazilerle beraberdir.[78] Mitoz nadirdir. Prognozu İMK, NST’ye benzerlik gösterir.[79-82]

Pleomorfik lobüler karsinom ise belirgin atipi, yüksek mitoz ve belirgin pleomorfizmin görüldüğü daha kötü prognozlu bir alt tiptir.[83]

E-kadherin fonksiyon kaybının, lobüler karsinom hücrelerinin karakteristik eksikliğine ve invazivlik modeline neden olduğu gösterilmiştir.[84,85] İLK’larda; ER-pozitif, HER2-negatif İMK NST’den daha düşük düzeyde TIL bulunduğunu dikkati çekmiştir.[43,86]

c. Tübüler karsinom (TK): İyi diferansiye tübül yapıları tümörün %90’dan fazlasını oluşturmaktadır. Desmoplastik stroma içinde tek katlı epitel ile kaplı ve açık lümenli, köşeli tübüllerden oluşur. Sık mitoz, belirgin pleomorfizm ya da çok tabakalı hücre sıralanması görülmez. Epitel hücreleri düzgün sınırlı ve belirsiz nükleollü çekirdeklere sahiptir. Hücrelerin apikal yüzlerinde sitoplazmik çıkıntılar görülebilir.[43]

TK, invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %1.6’sını oluşturur.[87] Herzaman ER, PR ile pozitif ve HER 2 ile negatif olduğu için gen ekspresyonuna göre luminal A moleküler tiptedir.[88]

d. Kribriform karsinom (KK): Kribriform karsinom nadir olup tüm invaziv karsinomların %0,4’ünü oluşturmaktadır.[89-91] Genellikle yaşlı hastalarda görülür. Kribriform karsinom kribriform tip DKİS’dakine benzer, pencere şeklinde boşluklar içeren iyi sınırlı tümör adalarından oluşur. Adalar ovoid veya angüler şekilde olup etrafında dezmoplastik bir stroma bulunur. Adaları; küçük-orta boyutlu, çok tabakalı

kolumnar ya da küboidal hücrelerin glandüler yapıları oluşturur. Mitoz düşüktür ve çoğunlukla derece 1 tümörlerdir.[92] Olguların %80'inde kribriform yapıda karsinoma in situ odakları da bulunur.[90] Tipik olarak ER, PR pozitif, HER2 negatif tümörlerdir. Hastaların prognozları iyidir, on yıllık sağkalım %90'ın üzerindedir.[4,43]

e. Müsinöz karsinom (MK): Ekstrasellüler müsin gölcükleri içinde yüzen tümör topluluklarından oluşan invaziv meme karsinomu tipidir. Bu tümör kolloid karsinom, müsinöz karsinom veya mukoid karsinom olarak da adlandırılabilir.[43] Meme karsinomlarının %2'sini oluşturur. Sıklıkla yaşlı hastalarda görülür.[93,94] MK'lar luminal A moleküler alt tipte yer alır.[88] Transkriptomik özelliklerine göre Tip A ve Tip B olarak iki tipi mevcut olmakla birlikte İMK,NOS dan farklı olarak nöroendokrin karsinomlara benzer özellikler gösterir.[95] Pür Müsinöz karsinom tanısı için müsinöz komponent oranının %90 veya daha fazla olması gerekmektedir. Müsin gölcükleri damar içeren, ince septalarla bölünebilir. Bazen mikropapiller yapılar da görülebilir.[96-99]

f. Müsinöz kistadenokarsinom: Memenin müsinöz kistadenokarsinomu, pankreatobiliyer veya overin müsinöz kistadenokarsinomunu andıran, bol intrasitoplazmik müsin içeren uzun kolumnar hücrelerle kaplı kistik yapılarla karakterize invaziv bir meme karsinomudur. Oldukça nadirdir ve görülme yaşı ortalama 61'dir.[43] Müsinöz kistadenokarsinom, tabakalaşma, kümelenme ve papiller oluşumlara sahip uzun kolumnar hücrelerle döşeli kistik boşluklarla karakterizedir. Neoplastik hücreler, bazal yerleşimli çekirdeklere sahiptir ve bol miktarda intrasitoplazmik müsin içerir. Müsin ayrıca kistik boşluklarda da bulunur. Aynı tümör içinde bile sitolojik atipinin derecesi değişkendir. Kistik yapılar yuvarlak bir kontura sahiptir ancak kistin periferinde miyoepitelyal hücreler yoktur. Bu tümöre DKIS eşlik edebilir. Memenin çoğu müsinöz kistadenokarsinomları ER, PR ve ERBB2 (HER2) için negatiftir(100). Memede primer müsinöz kistadenokarsinom CK7 pozitiftir ancak CK20 ve CDX2 için negatiftir; bu bulgular, özellikle CK7 pozitif olabilen ancak genellikle CK20 ve CDX2'yi eksprese eden metastatik pankreatobiliyer müsinöz kistadenokarsinomdan ayırt edilmesine yardımcı olabilir.[43]

g. İnvaziv mikropapiller karsinom (İMPK): Memenin invaziv mikropapiller karsinomu, içten dışa büyüme paterni olan açık boşluklarla çevrili küçük, içi boş veya morul benzeri malign hücre kümelerinden oluşan invaziv bir meme kanseridir. Aksiller lenf nodu metastazı sıktır.[43] Spesifik patogenetik mekanizmalar veya tekrarlayan moleküler değişiklikler tanımlanmamıştır.[101-103] Pür invaziv mikropapiller karsinom

tanısı için tümörün > %90'ı içi boş ya da morül benzeri küboidal hücrelerden oluşmalıdır.[43] Çoğu tümör ER ve PR pozitif[104] olmakla birlikte, bazı çalışmalar vakaların %15-20'sinde üçlü negatif bir fenotip bildirmektedir.[105]

h. Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom: Apokrin ter bezlerini andıran, abondan, eozinofilik, granüler sitoplazmalı, büyük nükleuslu ve belirgin nükleollü hücrelerden oluşan invaziv meme karsinomu tipidir. Çoğu invaziv karsinom apokrin diferansiasyon odakları içerir ancak pür apokrin karsinom %1 oranında görülür.[106] Tümörler histolojik olarak derece 2 ya da 3'tür. Hücreler keskin sitoplazmik sınır içeren geniş granüler eozinofilik sitoplazmaya sahiptir. İri oval yuvarlak belirgin nükleollü ve orta derece atipiye sahip çekirdek içerirler.[107-109] Genellikle apokrin özellikler gösteren in situ karsinom da invaziv karsinoma eşlik eder. Tipik olarak bu diferansiyasyonu gösteren tümörler GCDFP-15 pozitiftir. Ancak ileri evre tümörlerde GCDFP-15 ekspresyonu kaybolabilmektedir. Sıklıkla Androjen Reseptörü (AR) pozitif, ER ve PR negatif, HER2 pozitiftirler.[109-113]

ı. Metaplastik karsinom: Neoplastik epitelin skuamöz ve/veya mezenkimal görünümde bir hücreye diferansiye olduğu tümör tipleridir. Bu grup heterojen olup; düşük dereceli adenoskuamöz karsinom, fibromatozis benzeri metaplastik karsinom, skuamöz hücreli karsinom, iğsi hücreli karsinom, mezenkimal diferansiasyon (kondroid, osseöz, diğer mezenkimal yapılar) gösteren karsinom yer alır. Tanı için dikkatli ve yeterli sayıda örnekleme yapılmalıdır.[114]

Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom: iğsi hücrelerden oluşmuş bir zemin üzerinde igelişmiş glandüler-tübüler yapılar yanısıra skuamöz hücrelerin oluşturduğu solid adalar içerir. Yüksek dereceli adenoskuamöz karsinoma göre prognozu daha iyi olduğu için ayrımı önemlidir.[43]

Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom: Tümörün neredeyse %95'i stroma içinde gömülmüş, soluk eozinofilik sitoplazmalı, ince, iğsileşen, hafif atipi de izlenebilen çekirdeklere sahip tümör hücrelerinden oluşur. Bu tümörler değişken oranda P63 ekspresyonu gösterirken keratin her zaman pozitiftir. Ayrıcı tanıda memenin sakin görünümlü iğsi hücreli proliferasyonları mutlaka yer almalıdır. Daha iyi prognozlu olduğu için sık görülen yüksek dereceli iğsi hücreli metaplastik karsinomdan ayrılması gerekmektedir.[43]

Skuamöz hücreli karsinom: Primer meme kaynaklı skuamöz hücreli karsinom tanısı konulmadan önce, deriden kaynaklanmadığından emin olunmalıdır. Hücrelerde

değişen derecelerde atipi ve pleomorfizm mevcuttur, iğsi morfolojide hücreler de içerebilir. Pür veya İMK, NST ile birlikte olabilir. Pür metaplastik skuamöz hücreli karsinomlar genellikle kistik bir lezyon olarak ortaya çıkar ve kist atipik ve pleomorfik nükleuslu hücreler döşeyici epitelini oluşturur.[43]

İğsi hücreli karsinom: Çeşitli paternlerin karışık olarak izlendiği bu tümör, iğsileşen, epiteloid ya da skuamöz morfoloji de gösteren pleomorfik hücrelerden oluşmaktadır. İğsi morfoloji dışında kümeler oluşturmuş daha epiteloid görünümlü neoplastik hücreler görüldüğünde spektrumun bir ucunda iğsi skuamöz hücreli karsinom diğer ucunda malign myoepitelyoma /myoepitelyal karsinom düşünülmekle birlikte bu iki lezyonun ayrımı için net kriterler ve klinik gidişleri ile ilgili yeterli veriler yoktur.[43]

Mezenkimal diferansiasyon gösteren metaplastik karsinom: Kondroid, osseöz, rabdomyoid, nöroglial diferansiasyon gösterebilen mezenkimal alanlarla beraber, tübül veya solid şekilde karsinom alanları da içeren tümörlerdir. Sıklıkla kondroid diferansiasyon ve kondroid matriks görülür. Kemik ya da yumuş doku sarkomlarından ayırt etmek için çok örnekleme yapılmalı ve karsinomatöz alanlar gösterilmeldir. Epitelyal belirteçlerden yüksek molekül ağırlıklı keratinler kullanılır.[43]

Metaplastik karsinomların büyük çoğunluğunda (> %90) ER, PR ve ERBB2 (HER2) ekspresyonu görülmez.[115,116] Çoğunluk, yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinleri (CK5/6 ve CK14), p63 ve EGFR (HER1) ekspresyonu mevcuttur.[117] Metaplastik meme karsinomlarında epitel farklılaşmasının tanımlanması için bir immünohistokimyasal belirteç panelinin kullanılması gereklidir. Olağan belirteçler özellikle AE1/AE3 ve MNF116 (vakaların %75-85'inde pozitif); 34βE12, CK5/6 ve CK14 (%70-75'te) gibi yüksek molekül ağırlıklı keratinler ve p63'tür (%77'de). SMA, CD10 ve maspin dahil olmak üzere miyoepitelyal belirteçler de sıklıkla pozitiftir.[43,116]

i. Nadir tümörler ve tükürük bezi benzeri tümörler;

- Asinik hücreli karsinom: Sıklığı geniş serileriden oluşan çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle net değildir. İntrasitoplazmik zimojen granüller içeren şeffaf (hipernefroid) ya da granüler epitelyal hücrelerden oluşur. ER, PR negatiftir ve ERBB2 (HER2) amplifikasyonu görülmez. Vaka sayısının kısıtlı olması nedeniyle prognozu ile ilgili bilgiler kısıtlıdır.

- Adenoid kistik karsinom: Adenoid kistik karsinom meme karsinomların yaklaşık %0.1'ini oluşturur, düşük derecelidir ve yavaş seyir gösterir.[118] Tükürük bezi

tümörlerine benzerdir. İki hücre komponentinden (epitelyal ve myoepitelyal hücreler) oluşur. Bu hücreler tübüler, kribriform ve solid patern oluşturur ve bu yapıların çevresinde bazofilik matriks ve basement membran benzeri materyal bulunur.[119] Bu tümörler ER, PR negatiftir ve ERBB2 (HER2) amplifikasyonu göstermezler. 10 yıllık sağkalım oranları >%90'dır ve nadir uzak metastaz yaparlar.[120]

- **Sekretuar karsinom**: Sekretuar karsinom, oldukça nadirdir ve meme karsinomlarının <%1'ini oluşturur.[121] ortalama görülme yaşı 25 olmakla birilikte ve çocukluk çağında ve adöleasanlarda sık görülür ve sıklıkla "juvenil karsinom" olarak adlandırılır. Sistemik metastazı oldukça nadirdir.[122] Çoğu sekretuar karsinom 3 paternden oluşur: mikrokistik, solid ve tübüler patern. Hücre içi ve hücreler arası sektretuar materyal PAS ve alcian blue ile pozitif boyanır.[123] Sekretuar karsinomda t(12;15) ETV6-NTRK3 gen füzyonundan oluşan dengeli traslokasyon gösterilmiştir ve tedavisi cerrahidir.[124]

- **Mukoepidermoid karsinom:** solid ve kistik paternde görülen müsinöz, intermediyer ve skuamoid hücrelerden oluşan invaziv karsinomdur. Hücre tiplerini belirlemek için yüksek molekül ağırlıklı keratinler (CK14) , P63 ve müsinöz komponent için düşük molekül ağırlıklı keratinler (CK7) kullanılabilir. Düşük ve yüksek dereceli tipleri mevcuttur.[125,126]

- **Polimorföz adenokarsinom (PmA):** Tükürük bezlerinin PmA'sına benzer histolojik özelliklere sahip, monoton neoplastik hücre proliferasyonun çeşitli paternler oluşturduğu infiltratif malign epitelyal bir neoplazmdır. ER, PR negatiftir ve HER2/ERBB2 amplifikasyonu göstermez.[43]

- **Uzun hücreli ters polariteli karsinom:** Tümör hücreleri, bol eozinofilik sitoplazmalı uzun görünümde olup en belirgin özelliği nükleusların bazalde değil apikalde yerleşmiş olmasıdır. ER, PR ve HER 2 negatiftir.[43]

2.4.8. Meme Tümörlerinin Histolojik Derecelendirilmesi

a. Histolojik derece

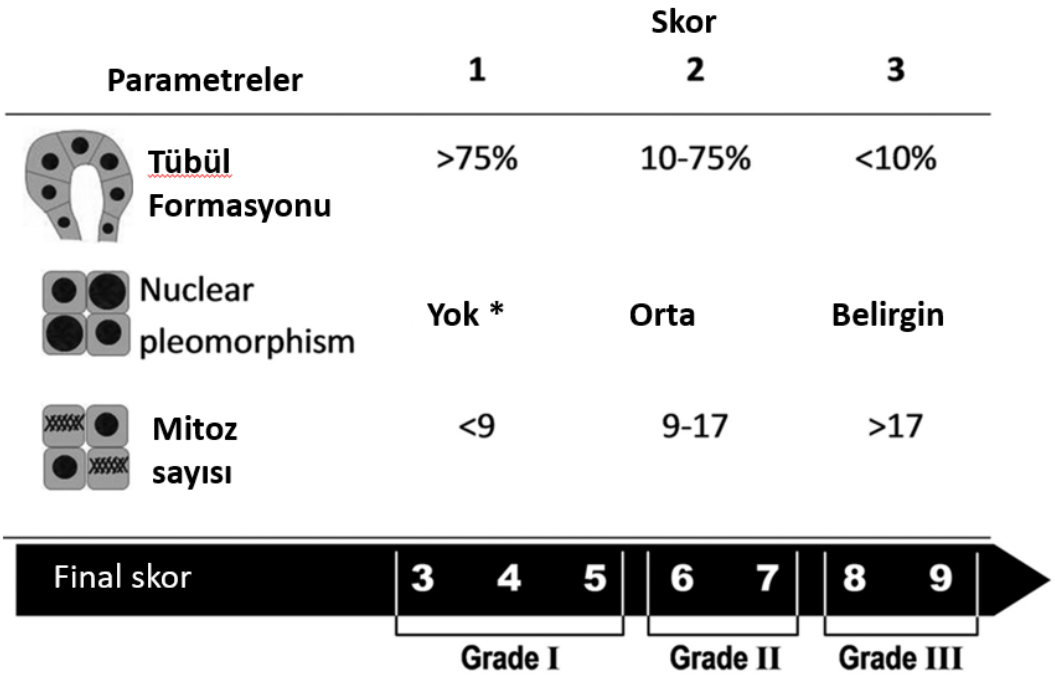
Meme kanserlerinde morfolojik değerlendirmeler prognostik açıdan önemlidir. Bu değerlendirmenin tekrarlanabilir olması için kriterler Nottingham/ Tenovus Primer Meme Kanseri Çalışmasında Bloom&Richardson tarafından tanımlanmış ve zaman

içinde daha objektif hale gelmesi için değişiklikler yapılmıştır. Son olarak Notthingam Elston & Ellis kriterleri ile histolojik belirlenmektedir.[8]

Histolojik derece için üç özellik değerlendirilir: glandüler farklılaşmayı gösteren tübül oluşumu, nükleer pleomorfizm ve mitoz.[8,92] Her faktörün bağımsız olarak değerlendirilmesini sağlamak için 1'den 3'e kadar sayısal bir skorlama sistemi kullanılır (Şekil 9).[8,43,127] Tübüler veya glandüler/asiner formasyon tümörün tamamında küçük büyütmede değerlendirilir. Şeffaf lümen etrafında yerleşmiş neoplastik hücrelerden oluşan yapılar değerlendirmeye alınır. Glandüler/tübüler skoru belirlemek için kullanılan aralıklar <%10 , %10- %75, >%75'dür.[43]

Nükleer skorlama için tercih edilen büyütme 40x objektiftir. Nükleer pleomorfizm, pleomorfizmin en yüksek olduğu alanda, çevre meme dokusundaki normal epitelin nükleusu ile boyut ve şekil olarak karşılaştırılarak yapılır.[43] Pleomorfizm skorlamasında nükleer kontür düzensizliğinde artma, nükleollerin sayısı ve boyutunda artış önemlidir. Nükleer skor 1 (minimal pleomorfizm); çevre dokudaki normal epitel hücrelerinin çekirdeklerine yakın boyutta olup (normal epitel nükleusunun yaklaşık 1.5 katı) eşit dağılımlı kromatin paterni ve belirsiz nükleolle karakterizedir. Nükleer skor 2 (orta derecede pleomorfizm) çevre dokudaki normal epitel hücre çekirdeklerinin boyutunun 1.5-2 katı olup, küçük ve göze çarpmayan nükleollere sahiptir. Nükleer skor 3, nükleus veziküler kromatine sahiptir ve daha büyük boyuttadır (çevre dokudaki normal epitel hücre çekirdeklerinin boyutunun > 2 katı). Boyut ve şekil olarak belirgin farklılıklar gösterir ve sıklıkla belirgin nükleoller görülür.[43]

Mitotik figürlerin değerlendirilmesi; optimal doku fiksasyonu ve kaliteli kesit hazırlanmasını gerektirir. Gözlemciler yalnızca belirli mitotik figürleri saymalıdır; hiperkromatik ve piknotik çekirdekler, mitozdaki hücrelerden ziyade apoptozu temsil etme olasılıkları daha yüksek olduğundan göz ardı edilmelidir. Görme alanı mikroskoplar arasında değişiklik gösterdiği için, mitotik sayımlar sabit bir görme alanı standardizasyonu gerektirir. 10 büyük büyütme alanı başına toplam mitoz sayısı kaydedilir. Skorlama için sınırlar büyütme alanı boyutuna bağlıdır ve kullanılan mikroskop, büyük büyütme alanının (40 × objektif) çapı ölçülerek kalibre edilmelidir. Büyütme alanının çapına göre mitoz sayısı değişkenlik göstermektedir.[43]



Şekil 9. Nottingham histolojik derecelendirme için kullanılan skorlama sistemi[127]

Bu üç değer toplandığına 3-9 arasında bir skor çıkar ve 3-5 skor: derece 1 (iyi diferansiye), 6-7 skor: derece 2 (orta diferansiye) ve 8-9 skor: derece 3 (kötü diferansiye) olarak sınıflandırılır.[43,127]

b. Modifiye black nükleer derece:

Tümör derecelendirmesinde kullanılan bir diğer yöntem, nükleusların yapısal özelliklerine göre sınıflandırıldığı Black, Speer ve Cutler ve ark. tarafından tanımlanan nükleer derecelendirme sistemidir. Bu sistem 1-3 arası skor kullanır ve bunlar iyi diferansiye, orta diferansiye ve kötü diferansiye histolojik derecedir. Düşük derecede, nükleuslar küçüktür ve nükleoller belirgin değilken derece yükseldikçe nükleusların şekli daha pleomorfik olup belirgin nükleoller izlenir.[128,129]

2.4.9. İmmünohistokimya ve Hormon Reseptörleri

IMK hücreleri genellikle düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinler (CK7, CK8/18, CK19), Gata 3, GCDFP-15, mamoglobulin, EMA, E-cadherin, BCL2, laktalbümin ve CEA ile pozitiftir boyanırlar. Meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda, yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinler (CK5/6, CK14, CK17) ve EGFR (HER1) dahil olmak

üzere bir veya daha fazla bazal belirteç ekspresyonu vardır ve bu belirteçler ER-negatif tümörlerde daha sıklıkla görülür. S100, meme kanserlerinin bir kısmında ve aynı zamanda miyoepitelyal hücrelerde de eksprese edilir. Meme kanserleri tipik olarak CK20 ve p63 negatiftir ancak metaplastik ve tükürük bezi benzeri karsinomlarda p63 ekspresyonu saptanabilir. Çoğu meme kanseri CDX2, PAX8, WT1, TTF1, HMB45, Melan-A, CD20 ve CD3 gibi diğer dokuya özgü belirteçler negatiftir, ancak CD138 pozitif olabilir.[43]

a. Hormon reseptörleri (ER/PR):

ER ekspresyonu; endokrin tedaviden klinik yararı öngörmedeki faydası ve çeşitli klinik tedavi algoritmalarında kullanımı nedeniyle İMK'de değerlendirilmelidir.[130] 2010 Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO)/Amerikan Patologlar Koleji (CAP) kılavuzunda meme kanserinde ER ve PR immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi için; %1 oranda zayıf boyanmanın görüldüğü durumlarda bile endokrin tedaviden fayda gördüğüne dair kanıtlar olması nedeniyle pozitif olarak değerlendirilmesi tavsiye edilmiştir. Bu kılavuzun 2019'da yayınlanan güncellemesinde bu eşik değer korunmuştur.[131,132] Ancak invaziv kanserlerde, ER boyanmalarında özellikle %1-10 arasındaki pozitiflik düşük ER pozitifliği olarak ek yorumla belirtilmelidir, çünkü endokrin tedaviden sağladıkları fayda ile ilgili bilgiler kısıtlı olmakla birlikte bu grup hastalar endokrin tedavi için uygun olabilirler.[43] Hormon reseptörü ekspresyonu tümör içerisinde heterojenite gösterebilir. İnvaziv kanser örneğinin tamamındaki pozitif hücrelerin yüzdesi hesaplanmalı ve boyanma yoğunluğu 0, 1+, 2+ ve 3+ şeklinde derecelendirilmelidir. Genel skoru belirlemek için boyanma yoğunluğu ve yüzdesini içeren farklı skorlama sistemleri kullanılmaktadır (örneğin, H-skoru veya Allred skoru).[43,133]

b. HER2

HER2, normal hücre proliferasyonunu, gelişimini ve hayatta kalmasını düzenleyen EGFR (HER1), ERBB3 (HER3) ve ERBB4 (HER4) de dahil olmak üzere büyüme faktörü reseptörü ailesinin bir üyesidir. HER2 normal meme epitelinde hücre yüzeyinde düşük seviyelerde bulunurken İMK'ların %10-20'si *ERBB2* (*HER2*) gen amplifikasyonu içerir ve bu da hücre yüzeyindeki HER2 proteininin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır. Bu proteinin aşırı ekspresyonu daha sonra kanser proliferasyonu, hücre

motilitesi ve anjiyogenezdeki artışlar nedeniyle daha agresif kanser biyolojisine yol açar. Yeni tanı alan her İMK'una HER2 testi uygulanmalıdır. Günümüzde, ilk ve standart olan anti-HER2 tedavisi [trastuzumab (Herceptin)] ile kombine halde kullanılan birçok HER2 hedefli tedavi mevcuttur.[134] HER2 hedefli ajanlar sağkalımda önemli artış sağlar. HER2 protein aşırı ekspresyonu, immünohistokimya kullanılarak, *ERBB2* amplifikasyonu ise in situ hibridizasyon yöntemi ile gösterilir.[135] İmmünohistokimya daha düşük bir maliyetle kolayca ulaşılabildiği için birçok laboratuvar ilk test olarak kullanılır; şüpheli bir sonuç varsa (2+ boyama) vaka otomatik olarak in situ hibridizasyona yönlendirilir. ASCO/CAP HER2 test kılavuzlarının 2018 güncellemesinde, alışılmadık in situ hibridizasyon sonuçları (grup 2, 3 ve 4 gibi) ve bunların yorumlanmasına rehberlik etmek için iHK kullanımını da kılavuza dahil etmiştir. İHK olarak membranöz boyanma; 2 ve 5 x'lik büyütmede rahatça görülüyorsa kuvvetli pozitif (3+), 10-20 x'lik büyütmede seçilebiliyorsa orta şiddette pozitif (2+) ve 40x'lik büyütmede görülebiliyorsa zayıf boyanma (1+) , hiç boyanma yoksa negatif (0) kabul edilir.[43,136]

c. Ki 67

Ki 67 antijeni; G0 fazı dışındaki hücre döngüsü basamaklarında sentezlenir ve İHK kullanılarak nükleer ekspresyonu tespit edilir. Erken evre meme kanserlerinde prognostik bir belirteçtir.[137] Uluslararası Ki67 Meme Kanseri Çalışma Grubu tarafından yapılan çalışmada Kİ67 düzeyinin preanalitik işlemler ve gözlemci farklılığı ile değişkenlik gösterebileceğini belirtmiştir. Metaplastik meme karsinomlarında sitoplazmik ve membranöz boyanma yanıltıcı sonuçlara neden olabilir. Prognostik değerlendirme için; Ki 67'nin tümörde nükleer boyanması değerlendirilmelidir. Tek başına Ki 67 değeri'nin prognostik değeri net değilse de ER, PR ve HER 2 ile birlikte değerlendirilmesi prognostik ve kemoterapiye yanıtın değerlendirilmesinde daha faydalıdır. ER pozitif ve negatif tümörlerde luminal A ve daha agresif luminal B alt tipleri arasında korelasyon sağlaması açısından %14 veya %15 gibi bir eşik değer kullanımı önerilmiştir.[43,137]

2.4.10. Meme Tümörlerinde Evreleme

Meme tümörlerinin evrelemesinde, American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından kullanılan, tümör boyutu (T), lenf nodu durumu (N) ve metastaz varlığı (M) (TNM) olmak üzere üç parametre dikkate alınmaktadır (Tablo 2).[138]

Tablo 2. Meme tümörlerinde evreleme Tümör boyutu (T)[138]

Primer Tümör (T)
Tx Primer tümör belirlenemiyot
T0 Primer tümör kanıtı yok
Tis In situ karsinom (DKİS veya meme başının Paget hastalığı)
T1 Tümörün en büyük çapı ≤ 20mm
T1mi 1mm veya daha küçük mikroinvazyon odağı varlığı
T1a Tümör > 1mm fakat ≤ 5 mm
T1b Tümör > 5mm fakat ≤ 10mm
T1c Tümör > 10 mm fakat ≤ 20mm
T2 Tümör > 20mm fakat ≤ 50mm
T3 Tümör > 50mm
Boyuttan bağımsız olarak tümörün göğüs duvarına ve/veya deriye direkt yayılımı (ülserasyon veya deri nodülleri) inflamatuar karsinom*
T4a Göğüs duvarına yayılım var. (Tek başına pektoral kas invazyonu bulunması hariç)
Deride ülserasyon, ipsilateral meme derisinde satellit nodül veya ödem (peau d'orange dahil)
T4cT4a ve T4b'nin birlikteliği
T4d İnflamatuvar karsinom

* Dermis invazyonu pT4 olarak değerlendirilmez.

** İnflamatuar karsinom tanısı için eritem ve ödem meme derisinin en az üçte birinde olmalıdır.

Tablo 3. Meme tümörlerinde evreleme Lenf Nodu (N) [138]

Patolojik Lenf Nodu Durumu (pN)	
pNx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
pN0	Histolojik olarak saptanmış bölgesel lenf nodu metastazı yok
pN0(i+)	Bölgesel lenf nodlarında en büyük çapı 0,2mm'i geçmeyen kümelenmiş izole tümör hücreleri
pN0(mol+)	İzole tümör hücresi tespit edilmeyen RT-PCR ile pozitif moleküler bulgular
pN1	Mikrometastaz ya da 1-3 ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz ve/veya sentinal lenf nodu biyopsisi (SLNB) ile saptanmış internal mammarian lenf nodu metastazı
pN1mi	Mikrometastazlar (0,2 mm'den büyükve/veya 200 hücreden fazla ancak 2 mm'den küçük)
pN1a	En az bir metastazın >2 mm olduğu 1-3 aksiller lenf nodu metastazı
pN1b	İnternal mammarian lenf nodlarında klinik olarak saptanamayan fakat SLNB ile saptanan makro ya da mikro metastaz varlığı
pN1c	Aksiller lenf nodlarında 1-3 metastaz ve klinik olarak saptanamayan fakat SLNB ile makro ya da mikro metastazlı internal mammarian lenf nodu metastaz varlığı
pN2	4-9 aksiller lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodunda metastaz olmadan klinik olarak saptanmış internal mammarian lenf nodu metastazları
pN2a	4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (en az biri >2 mm)
pN2b	Aksiller lenf nodu metastazının yokluğunda klinik olarak saptanmış internal mammarian lenf nodu metastazı
pN3	>10 lenf nodu metastazı;
pN3a	10 ya da daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (en az biri >2 mm) ya da infraklaviküler lenf nodlarında metastaz

Tablo 3'ün devamı

pN3b	Bir ya da daha fazla pozitif aksiller lenf nodunun varlığında klinik olarak saptanmış ipsilateral internal mammarian lenf nodu metastazı; ya da 3 ten fazla aksiller lenf nodu ve klinik olarak saptanmamış fakat SLNB ile makro ya da mikro metastaz saptanmış internal mammarian lenf nodu metastazları
	N2b ve N1a yada N2a birlikte ; N2a ve N1b birlikte
pN3c	İpsilateral supraklaviküler lenf nodlarına metastaz
M0 Uzak metastaz yok.	**M1** Uzak metastaz var

Not: İnternal mammaryan, infraklaviküler veya supraklaviküler lenf nodları için AJCC Evreleme Kılavuzuna bakılması önerilmektedir.[138]

***** İzole tümör hücreleri (İTH): 0,2 mm'den büyük olmayan küçük tümör hücre kümeleri veya tek tek tümör hücreleri ya da tek histolojik kesitte 200'den az tümör hücresinin bir araya gelmesi şeklindedir. İTH içeren lenf nodları, toplam pozitif lenf nodu sayısına dahil edilmemelidir.

Tablo 4. TNM evrelemesi

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

2.4.11. Gen Ekpresyon Profiline Göre Alt Grupları

a. Meme kanserinin moleküler sınıflaması; Meme kanseri klinik davranışta farklılıklara yol açan çeşitli gen ekspresyonlarına sahip moleküler düzeyde oldukça heterojen tümörlerdir.[71] Son yıllarda meme kanserlerini sınıflandırmak (özellikle moleküler seviyede) daha efektif tedavi planlaması için önemli hale gelmiştir. Zaman ve maliyet nedeniyle meme kanseri moleküler sınıflaması çoğunlukla immünhistokimyasal yöntemlerle uygulanan (ER, HER2 ve Kİ 67) biyobelirteçlere göre yapılmaktadır.[43] Bununla birlikte küresel gen ekspresyon paternlerinin incelenmesi moleküler alt tiplerin belirlenmesinde ve tedaviye yanıtın tahmininde değerlidir.[43]

a1. İntrinsik alt tip sınıflaması: Meme karsinomlarında benzer histomorfolojik bulgulara sahip tümörlerde farklı tedavi yanıtları alınabilmektedir. Bu nedenle çok sayıda deoksiribonükleik asit (DNA)mikroarray çalışmaları yapılmış, "messenger" ribonükleik asit (mRNA) düzeylerinde ve gen ekspresyon profillerinde farklılıklar saptanmıştır. Buna göre 'normal meme benzeri' grubun yanı sıra dört ana meme kanseri

alt tipi tanımlanmıştır: luminal A, luminal B, HER 2 zengin ve bazal benzeri tip.[139] Ayrıca "claudin düşük tip" ve "moleküler apokrin tip" de tanımlanmıştır.

Luminal A tipi: Meme karsinomlarının çoğunluğu bu grupta yer alır. Yüksek ER (+/-PR) ekspresyonuna ve luminal epitel sitokeratinlerine (CK8/18 vb.) sahiptirler. HER2 aşırı ekspresyonu yoktur ve Ki67 ile proliferasyon indeksi düşüktür.

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

HER2 zengin tip: Yüksek HER2 ekspresyonu ve proliferasyon indeksine sahiptir. ER ve PR eksprese etmezler.

Bazal alt tipi: Gen ekspresyon profilleri memenin bazal hücrelerine benzer ve CK5/6 ve CK 17 gibi bazal sitokeratinleri sentezlerler. HER1 eksprese edebilir. HER2 aşırı ekspresyonu ve ER, PR ekspresyonu görülmez, genellikle üçlü negatif tümörlerdir. Kötü klinik gidişe sahiptirler. Androjen reseptörü (AR) eksprese eden triple negatif tümörler bazal tip içinde yer almazlar.

Normal meme benzeri tip: Genellikle üçlü negatiftirler. Bazal tiplerden farklı olarak EGFR (HER1) ve CK 5/6 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. Bu sınıflamanın standart ve tekrarlanabilir olması için RT-PCR ile 50 genden (PAM50 gen imzası) oluşan test paneli önerilmiştir.[140] Bu genomik analizin maliyeti yüksek olduğu için immünhistokimyasal belirteçleri baz alan tümör sınıflaması beş ana grup olarak güncellenmiştir (Tablo 5).[141]

Tablo 5. Meme kanserleri moleküler ve hormon reseptörlerine göre alt tipleri[140]

İntrinsik alttip	ER	PR	HER 2	Ki 67
Luminal A benzeri	pozitif	Pozitif	negatif	düşük
Luminal B benzeri (HER2 negatif)	pozitif	Pozitif / düşük	negatif	yüksek
Luminal B benzeri (HER2 pozitif)	pozitif	Pozitif/ negatif	Yüksek ekspresyon/ amplifiye	değişken
Her 2 zengin	negatif	negatif	Yüksek ekspresyon/ amplifiye	yüksek
Üçlü negatif (bazal benzeri)	negatif	negatif	Negatif	yüksek

a.2. Bütünleştirici küme sınıflaması: Bu sınıflamada meme kanseri genomik ve transkriptomik verilerine göre 10 alt gruba ayrılır. Bu gruplar kendi aralarında farklı kopya sayılarına sahip olmakla birlikte farklı klinik gidiş ve tedaviye yanıta sahiptirler. Bu gruplardan altısı (intclusters 1, 2, 3, 6, 7 ve 8) ER pozitif tümörleri ve PAM50 alt tiplerinden luminal A ve B gruplarına benzer değişiklikler içerirler. İntCluster 10 çoğunlukla ER negatif tümörlerden oluşur ve yüksek genomik değişken içerir ve kötü prognozludur. İntCluster 4 genellikle yaygın intratumoral lenfositik infiltrasyon içeren tümörleri içerir.[139]

b. İntrinsik alt gruplara göre tümörlerin histolojisi

i. Hormon reseptörü pozitif kanserlerin histolojisi (Luminal A ve Luminal B): Hormon reseptörü pozitif meme kanserleri, çeşitli morfoloji ve derecelere sahiptir. Bunlar, iyi diferansiye kanserlerden, kötü diferansiye kanserlere kadar değişkenlik gösterirler. Bununla birlikte güçlü ER pozitif ve HER2 negatif olan meme kanserlerinin çoğu düşük ila orta derecelidir. (43) Ancak düşük yüzdelerde ER pozitifliği (ve HER2 negatifliği) olan kanserler sıklıkla yüksek dereceli üçlü negatif kanserlerinkine benzer histolojik özelliklere sahiptirler.[43,142] Bu grup tümörler germline BRCA2 mutasyonları ile ilişkilidirler.[43]

ii. HER2-pozitif kanserlerin histolojisi: Bu tip meme kanserleri yüksek derecelidir ve tümöre yüksek dereceli komedo DCİS sıklıkla eşlik eder. Tümör hücreleri genellikle pleomorfik nükleuslu, geniş eozinofilik sitoplazmalı ve bazen apokrin görünümlüdür. Proliferasyon indeksleri yüksek ancak ÜNMK'ler kadar değildir (%20-60). Tipik büyüme paternleri infiltratif ve solid adalar şeklindedir.[43]

iii. Üçlü negatif kanserlerin (ÜNMK) histolojisi: Üçlü negatif meme kanserleri adenoid kistik karsinom ve metaplastik karsinom gibi özel tipleri de içermekle birlikte morfolojik tipleri farklılık gösterebilir. ÜNMK'larının çoğu yüksek dereceli, nükleus/sitoplazma oranları yüksek, solid büyüme parternine sahip sıklıkla çevre dokuyu iterek büyüyen, coğrafik nekrozlar içeren tümörlerdir.[43] Mitotik indeksleri tipik olarak yüksektir (ortalama ≥%80). Bu lezyonlar merkezde skar ve/veya geniş asellüler alan içerirler. Bazı ÜNMK'ler yoğun lenfositik infiltrasyona sahiptir, bu da tedaviye daha iyi

yanıt ile ilişkilidir.[43] DCİS görülme sıklığı ÜNMK'lerde hormon pozitif tümörlere göre daha azdır.[143] Bu morfolojideki tümörlerde BRCA1 germline mutasyonları sıktır.[144]

c. İMK'nun mutasyon profilleri

Meme kanseri alt tipleri, tedaviye yanıtı ve prognozu etkileyen farklı mutasyon paternlerine sahiptirler ve en sık TP53, PIK3CA, GATA 3, MAP3K1 ve CDH1 genlerinde mutasyon görülmektedir.[145]

Luminal A tümörler yüksek *PIK3CA* mutasyon prevalansına sahipken (%49), bazal benzeri tümörler ise çoğunlukla *TP53* mutasyonuna sahiptir (%84). Erken evre hastalıkta *PIK3CA* mutasyonlarının genel prevalansı %32'dir ve bu mutasyon ileri yaş, iyi diferansiye ve küçük tümör boyutu, ER-pozitifliği ve HER2-negatifliği ile birliktedir.[146]

ÜNKM'lerinden bazal benzeri alt tip genomik olarak en dengesiz gruptur ve yüksek oranda TP53 mutasyonu (%92) gösterir. Ayrıca DNA tamiri ile ilgili genlerde (BRCA2, MDM2, PTEN, RB1 ve TP53) delesyonlar içerir. Luminal AR grup ise PIK3CA (%55), AKT1 (%13) ve CDH1 (%13) mutasyonlarını ilgilendiren yüksek mutasyon yüküne sahiptir.[43]

Meme kanserinde *BRCA1* veya *BRCA2'de* kalıtsal mutasyonları (meme tümörlerinin ~%1-5'inde bulunur) homolog rekombinasyon eksikliği şeklinde olur ve tam genom dizilimi kullanılarak tanımlanabilir.[147,148]

Yeni nesil sekanslamanın kullanılması ile immünoterapötik yanıt ile ilişkili tümör mutasyon yükünü ölçmek mümkün olmaktadır. Genel olarak meme kanserleri, melanomdaki kadar total mutasyon yüküne sahip değilken ÜNMK'ler luminal tümörlere göre daha yüksek tümör mutasyon yüküne sahip olma eğilimindedir. Bu gruptan Luminal AR grup ise mezenkimal kök hücre benzeri alttipten daha fazla mutasyon yükü içerir, bu sebeple immünoterapi ÜNMK'lerde kullanılabilmektedir.[43,149]

2.5. Üçlü Negatif Meme Karsinomları

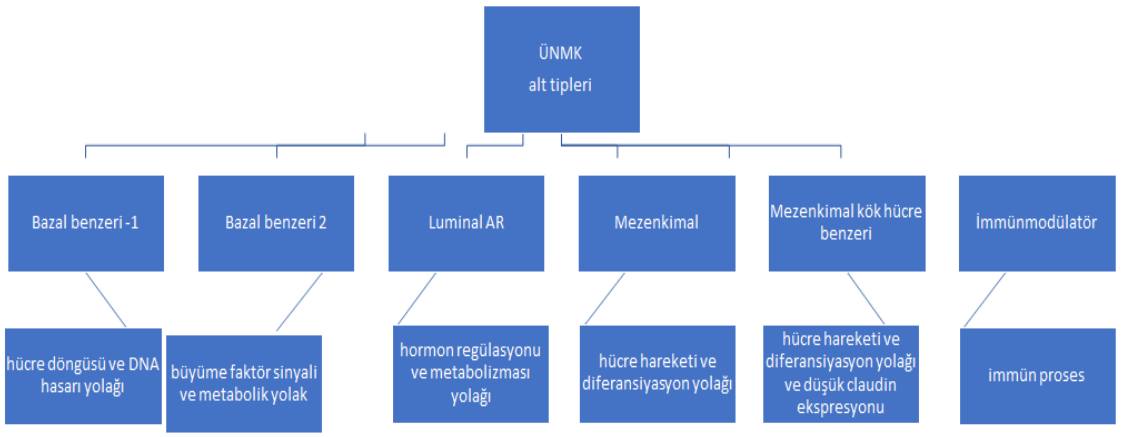
ÜNMK'ler ER, PR ve HER2 ekspresyonun izlenmediği, diğer meme tümörlerine göre daha agresif davranış gösteren, farklı tedavi seçenekleri olan bir tümör grubunu temsil eder.[150] Bu grup tümörler diğer meme karsinomlarına göre daha genç yaşta,

erken menarş, erken yaşta doğum, emzirme süresinin kısalığı, vücut kitle indeksinin artması gibi risk faktörleri ile yakından ilişkilidir.[151] ÜNMK'ler daha çok Afrikan-Amerikan kökende ve BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında görülür.[44,152]

ÜNMK'ler bazı yayınlarda 'bazal benzeri grup' olarak isimlendirilmekle birlikte 'bazal benzeri' terminolojisi aslında cDNA mikrodizileri kullanılarak tanımlanmış moleküler bir gruptur ve bazal sitokeratin (CK 5/6) ekspresyonları mevcuttur. Her ne kadar ÜNMK'ler içerisinde bazal benzeri grup büyük oranda yer alsa da bu iki terminoloji sinonim olarak kabul edilmemektedir.[153]

ÜNMK'ler farklı moleküler yolakların etkili olduğu ve farklı prognozları olan heterojen bir gruptur. ÜNMK'ler 6 alt tipten oluşur: Bunlar;

1. İmmünmodülatuar (IM)
2. Luminal androjen reseptör (LAR)
3. Bazal benzeri 1
4. Bazal benzeri 2
5. Mezenkimal (M)
6. Mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) olup şekilde gösterilmiştir (Şekil 10)[5]



Şekil 10. ÜNMK alt tipleri ve patogenezlerinde ilişkili olan yolaklar[5]

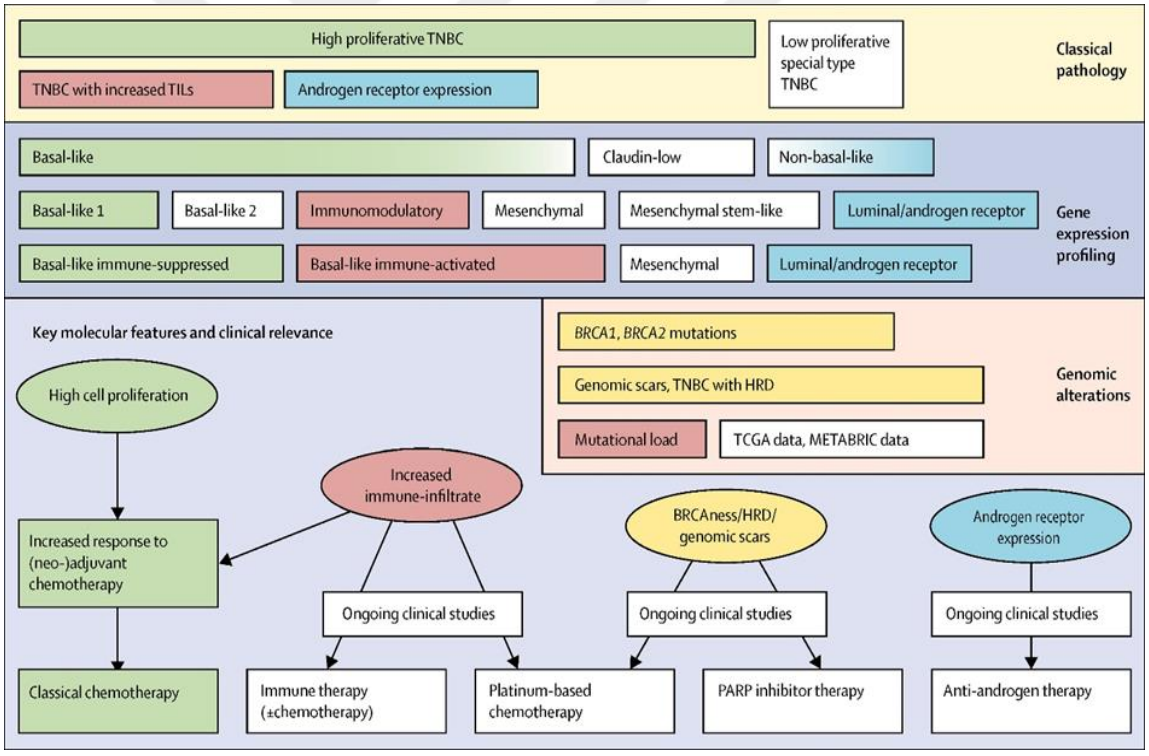
Bu tümörlerden BL-1 ve BL-2 alt tiplerinde etkili genler hücre bölünmesi ile ilgili olup, gen ekspresyonları açısından benzerlik gösterirler. BL-1 alt tipte daha çok DNA tamiri ve replikasyonda görev alan genler, BL-2 alt tipte ise büyüme sinyal yolağındaki genler rol oynar.[5]

İmmünmodülatör alt tipte immün hücrelerin çalışmasıyla ilgili gen ekpresyonları görülür, daha çok doğal öldürücüler yolağında olup, TH1/TH2 yolağı, sitokin sinyalizasyonu, B hücre reseptör antijenlerini ilgilendiren genler bu gruptadır.[5]

Mezenkimal kök hücre benzeri ve mezenkimal alt tiplerde ekstrasellüler reseptör ilişkisini, hücre motilitesini ve diferansiyasyon yolaklarını etkileyen genlerde ekspresyon saptanmıştır. Ancak MSL tipinde ML gruba göre claudin[3,4,7] genlerinde düşük ekspresyon izlenmiştir.[5] Herschkowitz ve ark. MSL grubunu 'claudin düşük tip' olarak sınıflandırmıştır.[154]

Luminal androjen reseptör alt tip, hormonal regülasyon yolağında rol alan, AR ve onun ko-aktivatörleri ile ilişkili genlerin ekspresyonunda artış izlenir.[5]

ÜNMK'lerin sınıflandırılmasındaki faydalardan biride alt tipe özgü tedavi seçeneklerinin değişiklik göstermesi.[5,155]



Şekil 11. Moleküler değişiklikler, gen ekspresyon profili oluşturma, klasik histopatolojik ve genomik değişiklikler

Şekil 11'de Moleküler değişiklikler, gen ekspresyon profili oluşturma, klasik histopatolojik ve genomik değişiklikler dahil olmak üzere farklı metodolojik yaklaşımlar verilmiştir. Farklı yaklaşımlara göre farklı sınıflandırma sistemleri olmasına rağmen, benzer özellikler ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında artan immünolojik

infiltrat (kırmızı), yüksek proliferasyon indeksi (yeşil), androjen reseptörlerinin ekspresyonu (mavi) ve homolog rekombinasyon eksikliği (sarı) bulunur. Renk kodlaması, bu temaların farklı sınıflandırma yaklaşımlarında paralel olarak izlendiğini gösterir. Bu moleküler sonuçlara dayanarak, şu anda klinik çalışmalarda test edilmekte olan TNMK için en az dört önemli tedavi stratejisi ortaya çıkmaktadır.[149]

ÜNMK'lerin bir kısmı H&E boyalı preperatlarda kolaylıkla tanınabilirken (adenoid kistik karsinom gibi) çoğunluğu oluşturan bazal benzeri grubu tanımak için yüksek molekül ağırlıklı keratinler, Laminin ve EGFR gibi bazal belirteçler kullanılmaktadır.[149] Bu grup tümörlerden sekretuar karsinom ve adenoid kistik karsinom daha az agresif seyrederken diğerleri hızlı progresyon göstermeleriyle bilinirler.[156]

ÜNMK'de genel kabul edilmiş hedef tedaviler olmamakla birlikte, belirli alt tipler ve genetik mutasyonlarına göre tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Bu tedavi seçenekleri; AR antagonistleri, PI3KCA ve m-TOR inhibitörleri, AMPK (AMP aktive protein kinaz) agonistleri ve immünoterapidir.[118] Standart tedavi seçeneği olmaması nedeniyle bu tümörlerin yönetimleri zordur ve ilk tanı sonrasında 1-3 yıl içinde rekkürrens görülebilmektedir. Tedavi sonrası ilk 5 yıl içinde ise mortalitenin daha fazla olduğu gösterilmiştir.[157]

2.6. Tümör İmmünitesi

2.6.1. Tümör Mikroçevresi

Meme kanserinde tümör mikroçevresi hücresel elemanlardan, mediatörlerden ve fiziksel bileşenlerden oluşan dinamik bir ortamdır. Hücresel elemanlar intratümöral, bölgesel ve metastatik kompartman olarak bölümlere ayrılabilir. İntratümöral alan içerisinde tümör hücreleri ile birlikte tümörü infiltre eden inflamatuar hücreler; lenfositler, plazma hücreleri, dentritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller yer alır. Bölgesel kompartman tümöre komşu stromadaki stromal fibroblastları, miyoepitelyal hücreleri, adipositleri ve endotelyal hücreleri içerir. Metastatik alan ise tümör için yeni bir mikroçevredir ve lenf nodu ya da uzak organlardaki yerel hücrelerden oluşur.[9]

Tümörü infiltre eden immün hücreler "TIL" olarak isimlendirilir. TIL'ler tümör ve tümör stromasını infiltre eden mononükleer lenfoid hücrelerdir ve tümöre karşı konak immün yanıtın göstergesidir. TIL'lerin yaygınlığı İMK'larında prognostik faktör

olarak gittikçe önem kazanmaktadır. Yüksek TIL'ler daha iyi klinik gidiş ve ÜNMK'lerde ve HER 2 pozitif meme kanserlerinde neoadjuvan tedaviye daha iyi yanıt ile birliktedir.[158-160]

TIL'leri ölçmek için kullanılan uluslararası konsensüs skorlaması kor biyopsilerde veya cerrahi numunelerde tümörü en iyi temsil eden blokta ve 20-40x büyütmede yapılmalıdır. TIL'ler, intratümöral stromada skorlanmalı ve tüm mononükleer hücreler (lenfositler ve plazma hücreleri) değerlendirmeye alınmalıdır. Stromal TIL'ler, sadece stromal alanların yüzdesi olarak skorlanmalı, karsinom hücreleri bu orana dahil edilmemelidir. Germinal merkezlere sahip peritümöral foliküler agregatlar ve tersiyer lenfoid yapılar aktif bir immün yanıtın göstergesidir, ancak bunlar stromal TIL değerlendirmesine dahil edilmemelidir.[161]

TIL değerlendirilmesi kantitasyonu yüzde olarak belirtilmelidir. Eğer TIL'ler heterojen dağılım gösteriyorsa hot-spot alanlar göz ardı edilerek ortalama bir oran şeklinde hesaplanmalıdır.[43]

Kanser hücrelerine karşı gelişen immün yanıt konağın tümör gelişimine karşı kendini savunması için gereklidir ve her ne kadar kanser hücreleri konağın kendi hücrelerinden gelişiyor ve tek bir hücreden köken alıyor olsalar da farklı antijenler ürettiği için konak immün yanıtına yol açmaktadırlar. Nükleusu olan tüm hücreler gibi tümör hücreleri de tanınmalarını sağlayan "majör histokompatibilite kompleks " (MHC) -1 moleküllerini sentezlerler ve bu da CD8 (+) sitotoksik T lenfositler tarafından tanınmasına ve anti tümör immün yanıta neden olur.[162,163] Konak immün sistemi tümöre karşı savunma yaparken, tümör hücreleri de immün yanıttan kaçmaya çalışırlar.[164] Tümör hücreleri somatik mutasyonlarla immünojenik antijenlerini değiştirerek sitotoksik T lenfositleri uyarmadan yaşamlarına devam ederler.[165]

Tümörde ve çevresindeki immün yanıt üç fazda değerlendirilir. Eliminasyon, kronik denge ve kaçış.[166]

1. Eliminasyon fazı: Bu faz kanser immün denetiminin ana basamağıdır. Bu aşamada tümör ortadan kaldırılırsa diğer basamaklara ilerlemeden immün sistem görevini yapmış olur.

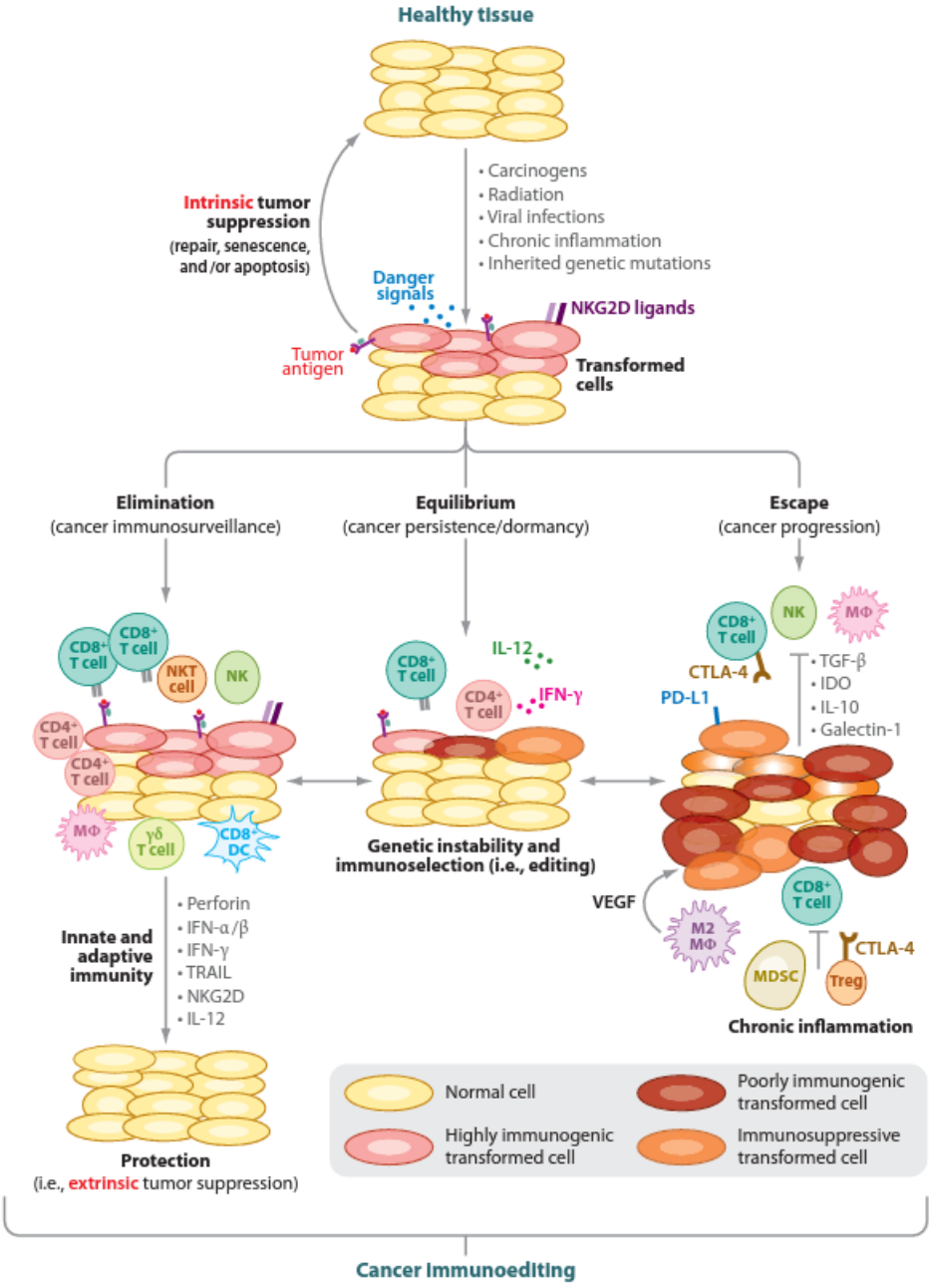
Tümör hücreleri büyürken çevre dokuda anjiogenez ve stromal yanıta neden olurlar. Meydana gelen doku hasarına karşı konak immün sistemi uyarılır. Yeni oluşan bir tümöre karşı hem doğal hem de adaptif immün sistemin birlikte çalışması gerekir. Ortaya çıkan tümör antijenlerine karşı doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar,

dentritik hücreler ve T hücreleri immün cevapta birlikte görev alır. Proinflamatuar sitokinler ve kemokinlerde immün sistemin aktive olmasında önemli rol oynarlar.[167]

Doğal immün sistemin başlattığı anti-tümör mekanizmalar ile tümör antijenleri ortama salınır ve tümöre özgü adaptif bağışıklık reaksiyonlarının gelişmesine yol açarlar. Tümör bölgesine toplanan olgunlaşmamış dendritik hücreler (DH) aktive olurlar. Aktive edilmiş, antijen taşıyan olgun DH'ler daha sonra, naif tümöre özgü Th1 CD4(+) T hücrelerinin aktive edildiği lenf düğümüne göç ederler. Th1 hücreleri, DH MHC sınıf I molekülleri üzerinde antijenik tümör peptitlerinin çaprazlaşması yoluyla uyarılan tümöre özgü CD8(+) T lenfositlerin gelişimini kolaylaştırırlar.[168] Son olarak tümöre özgü adaptif immünite büyümeye devam eden tümörü tamamen ortadan kaldırmak için kapasitesini artırır. CD4(+) T lenfositler tarafından salgılanan IL-2 ve konak hücreleri tarafından salgılanan IL-15 CD8(+) T hücrelerin fonksiyonunu artırmak ve ömrünü uzatarak bu etkiyi sağlarlar. Eliminasyon fazı yeni antijenik özellik taşıyan her tümör hücresi için yeniden başlayan ve devamlılığı olan bir süreçtir. Bu nedenle yaş ilerledikçe kanser prevelansının artması immünitenin zayıflaması ile açıklanabilir.[168]

2. Kronik denge faz: Bu aşamada tümör ile immün sistem arasında bir denge vardır. Tümör hücreleri eliminasyon fazında tamamen ortadan kaldırılamamıştır. Tümör hücrelerinden bazıları immün yanıta rağmen hayatta kalmaya devam edebilir ve bu faz oldukça uzun sürebilir. Tümör hücreleri latent hale gelir; immün sistem hücreleri de tümör çevresindeki varlığını sürdürür. Proinflamatuar ve anti inflamatuar hücreler ve sitokinler arasında da denge söz konusudur.[168,169] Son olarak tümör immün sistemden kaçarak büyümeye devam eder.

3. Kaçış fazı: Denge fazından seçilen tümör hücreleri sağlam bir immünolojik mikroçevrede hayatta kalır ve büyümeye devam edebilirler. tümör hücrelerinin immun sistemden kaçarak direnç kazanmalarının nedeni genetik ve epigenetik değişikliklere maruz kalmalarıdır. Ayrıca immün sistemden: MHC sınıf 1 yapımın azaltılması ve PD-1/PD-L1 aksını aktive etmesi ile, antiapoptotik moleküllerden bcl-2 ekspresyonunu artırması da kaçışda etkilidir. İmmün baskılanmış mikroçevrede CD4 ve FOXP3 pozitif regülatuar T lenfositler ve Tip 2 makrofajlar baskın hale gelirler ve sonuçta CD8 pozitif sitotoksik T lenfositleri inhibe ederler. Sonuç olarak tümör otonom büyüme ve metastaz özelliği kazanır ve kanser görüntülenebilir hale gelir.[166-168,170]



Şekil 12. Tümöre karşı immün yanıttaki üç basamakta görev alan hücreler ve sitokinler[170]

2.6.2. Tümör İnfiltre Eden Lenfositler (TIL)

TİL'ler patolojide ÜNMK'ler için önemli bir parametredir ve yoğun lenfositik infiltrat nispeten iyi prognoz göstergesidir. ÜNMK'lerin alt gruplarında tümör tarafından aktive edilmiş bir immünolojik mikroçevrenin nasıl sürdürülebileceğine dair mekanizmalar üzerine çalışmalar devam etmektedir.[149]

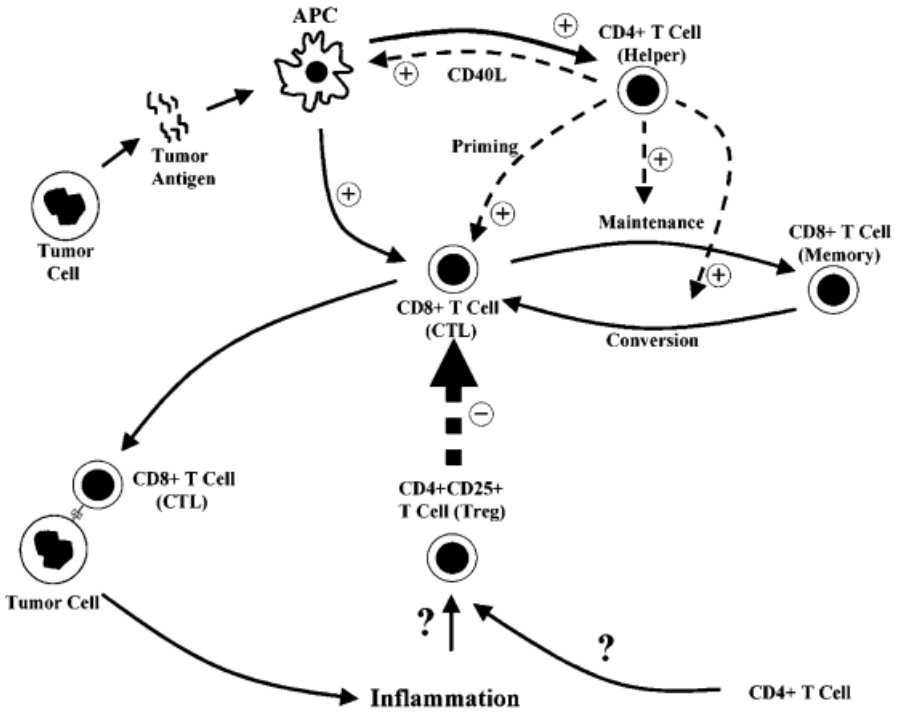
Son zamanlarda bazı kanser türlerinde tedavi amaçlı bir dizi bağışıklık kontrol noktası inhibitörü kullanılmaktadır. Bunlar, sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4'e (CTLA-4) (ipilimumab ve tremelimumab) ve programlanmış ölüm-1 (PD-1) T hücresi ko-reseptörüne (pembrolizumab ve nivolumab) ve onun ligandı PD-L1'e karşı antikorları (atezolizumab, avelumab ve durvalumab) içerir. Pembrolizumab ve atezolizumab bugüne kadar meme kanserinde en kapsamlı şekilde çalışılan kontrol noktası inhibitörleridir.[171]

Tümör mikroçevresi; proinflamatuar ve immün supresör etkisi olan hücreleri birlikte barındırır. Tip 1 T yardımcı hücreler, sitotoksik CD8 T hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK), dendritik hücreler ve M1 makrofajlar etkili bir bağışıklık cevabı temsil ederken; M2 makrofajlar, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler ve regülatuar T hücreleri baskılayıcı bir işleve sahiptir.[171]

Meme kanserinde, üçlü negatif (TNBC) ve HER2 pozitif (HER2+) tümörlerde ER+/HER2- tümörlere kıyasla daha yüksek TIL seviyeleri görülür.[160]

Artmış TIL'lerin iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiş olsa da; T lenfostiler arasında antitümöral efektör T lenfositler ve regülatuar T lenfositlerin dengesi tümöre immün yanıtı belirlemektedir. Bu nedenle tümör mikroçevresindeki TIL'lerin yoğunluğunun her zaman iyi prognoz anlamına gelmediği düşünülmektedir. Bundan dolayı tümör mikroçevresindeki lenfositlerin alt tiplerini de bilmek önemlidir.[172] CD4 ve CD8 T lenfositlerin immün gözetimdeki etkilerini anlamak oldukça güçtür. CD8 pozitif T lenfositler immün cevapta çok önemli bir yere sahiptir ve gelişmesi için CD4 T lenfositlere ihtiyacı vardır. CD4 T hücreleri, birçok solid tümörde MHC sınıf II proteinlerinin olmaması nedeniyle kanser hücrelerini bu mekanizma ile öldüremez ama tümör hücrelerinin bulunduğu mikroçevreye göç ederek CD8 T lenfositlerin çalışmasını engelleyerek protümörojenik etkide bulunur.[172,173]

Ancak CD8(+) T hücrelerine yardım ederek veya bazı tümör hücre yüzeyinde sunulan endojen olarak işlenmiş antijenleri doğrudan tanıyarak tümör hücrelerini öldürebilir ve antitümör özellik sergileyebilir.[172,174] CD4 T lenfositler, tümör hücrelerine karşı sitotoksik T lenfosit ve bellek T lenfosit dönüşümüne yardımcı olur.[175]



Şekil 13. Antijen sunan hücrelerin CD4 ve CD8 (+) T lenfositler ile ilişkisi ve CD8 T lenfositlerin bellek hücrelerine dönüşümü[172]

2.6.3. PD-L1

PD-1/PD-L1 sinyal yolağı antitümör immünitesini destekleyen en önemli yolaklardan biridir. Meme kanserleri daha az immunojenik tümörler olarak bilinse de yapılan çalışmalarla immün sistem ve meme kanseri arasındaki ilişkinin günden güne arttığı dikkati çekmektedir. Birçok çalışma göstermiştir ki meme tümörlerinde PD-1 pozitif TIL varlığı negatif prognostik faktör olup kötü klinikopatolojik özelliklerle ilişkilendirilmiştir.[17]

Tümör hücreleri immün sistemden pek çok farklı mekanizmayla kaçabilir. Tümör hücreleri; immün sistem için yabancı antijenlerini azaltması, antiinflamatuar sitokin üretimi ile immünsupresif bir mikroçevre oluşturması ve immün sistemin negatif regülasyonunu sağlaması sayesinde tümörle savaşan immün sistem hücrelerini susturur ve sonuçta hiç tanınmadan yaşamını sürdürmeye devam eder.

Kanser ve immün sistem arasında anahtar ilişkilerden biri PD-1 ve PD-L1'in bağlanma sinyalidir.[176] PD-1; 2. kromozom üzerindeki PDCD-1 geni tarafından kodlanan, 288 aminoasitten oluşan bir transmembran proteinidir. CD4 pozitif T lenfositler, CD8 pozitif T lenfositler, B lenfositler, NK hücreleri, aktive monositler,

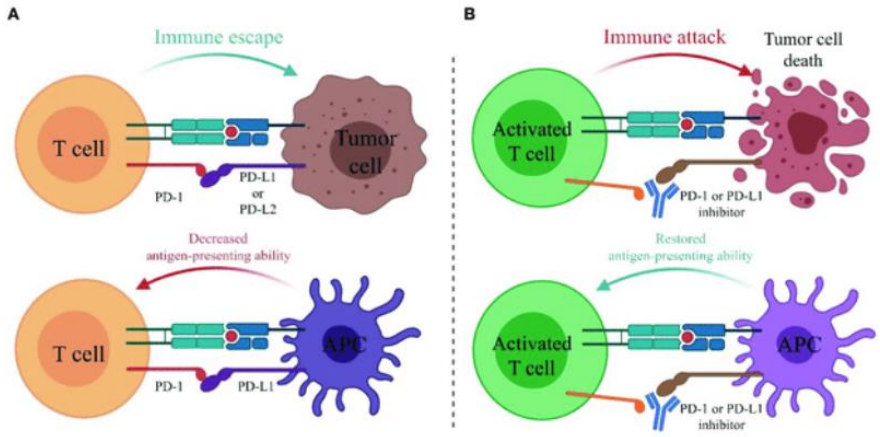
dendritik hücreler ve makrofajlar PD-1 eksprese edilebilirler.[16] PD-1 proteini hücre zarında iç, transmembran ve dış kompartmanda bulunur ve dış kısımda immünglobülün (Ig) parçası, iç kısmında fosforile edici parçası yer alır.

PD-L1, 9. kromozom üzerinde bulunan CD274 geni tarafından kodlanan, 290 aminoasitten oluşan bir transmembran proteindir. PD-L1; T lenfositler, B lenfositler, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi inflamatuar hücrelerden eksprese edilir.[177]

Fizyolojik olarak plasental trofoblastlarda yaygın ve kuvvetli PD-L1 pozitifliği saptanmıştır ve dolayısıyla PD-L1'in fetal implanta karşı immün yanıt oluşumunu engellediği düşünülmektedir.[178] Fizyolojik şartlarda, PD1/PD-L1 mekanizması, periferal immünolojik tolerans dahilinde "anerji"nin sağlanmasında görev alır. PD 1 aktivasyonu otoimmün hastalıklar ile ilişkili iken, inaktivasyonu neoplastik progresyon ile ilişkili bulunmuştur. PD1 aktivasyonu ile oluşacak sitotoksik yanıt nedeniyle hücrelerde öz-yıkım meydana gelir; olası öz-yıkımı önleyecek immünolojik toleransın oluşması için PD-L1 molekülünün PD1'e bağlanması gereklidir.[72]

PD-1 ile PD-L1 etkileşimi sonucu, TCR aktive edici sinyal yolakları inhibe olmakta ve bunun sonucunda T hücre aktivasyonu, proliferasyonu, inflamatuar sitokinlerin salınımı inhibe olurken, T hücrelerin apoptozisi ve T *reg* lenfosit differansiyasyonu artmaktadır.[13] PD-L1 salınımı, inflamatuar sitokinler ile arttığı gibi onkojen yolakların aktive olması ile de artabilir. IFN-γ/JAK2/IFN, ALK/STAT3/PI3K ve MEK/ERK/STAT-1 gibi onkojenik sinyal yolakları PD-L1 salınımını aktive edebilir.[179,180]

PD-1/PD-L1 eşleşmesi CD8(+) sitotoksik T lenfositlerin efektif çalışmasını ve prolifere olmasını inhibe eder ve TIL'lerin apopitozise gitmesini teşvik eder.[15] Yüksek PD-1 ekspresyonu; hem diğer inhibitör reseptörlerin aktive olmasında hem de TIL'lerin tümörü yok etmeye yönelik fonksiyonunun inhibe edilmesinde ve tümörün mikroçevresindeki antitümöral lenfositlerin azaltılmasında rol oynar.[16] Sonuç olarak PD-1/PD-L1 yolağı aktive olduğunda protümörojenik bir mikroçevre yaratılır, PD-1/PD-L1 yolağının bloke edilmesi regulatuar T lenfositleri azaltırken sitotoksik T lenfositlerin üzerindeki baskıyı kaldırır ve bu da anti-tümöral sitokin salınımını artmasına yol açar sonuçta tümöre karşı immün sistemin aktive olması sağlanır (Şekil 14).[16,181]



Şekil 14. PD-1 veya PD-L1 inhibitörlerinin ana mekanizması. (A) PD-1, T hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir. Ligandları, tümör hücrelerinin yüzeyinde PD-L1 veya PD-L2 ve antijen sunan hücrelerin (APC'ler) yüzeyinde PD-L1'dir. PD-1 ve ligandının kombinasyonu, T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ederek tümör hücrelerinin immün kaçışına yol açar. (B) PD-1 veya PD-L1 inhibitörleri, PD-1'in ligandlarına bağlanmasını bloke eder ve tümör hücrelerinin bağışıklıkla öldürülmesini eski haline getirir.[182]

2.6.4. T lenfositler

ÜNMK olgularında, tümörde immünolojik mikroçevreyi oluşturan en önemli hücre grubu lenfositlerdir. İmmünolojik mikroçevrede izlenen TIL miktarı ve içerdiği hücre tipi prognozda oldukça önemlidir.[161,187] T lenfositler timüsda farklılaşırlar, hücresel immünitenin efektör hücreleridir ve protein antijenlere karşı B lenfositlerin antikor üretimine yardımcı olurlar.[188] T lenfositler farklı yüzey proteinlerine sahip alt tipler içerirler, bunlar antijen sunan hücreler üzerindeki MHC sınıf II proteinleri ile etkileşime giren CD4(+) ve nükleusu olan her hücrede bulunan MHC sınıf I proteinleri ile etkileşime giren CD8(+) lenfositlerdir.[189] Tümör hücrelerinin çoğu MHC sınıf 1 molekülü taşıdıkları için CD8(+) T lenfositler tümör hücrelerini direk tanır ve öldürür ve CD4(+) T lenfositler tümör üzerindeki etkilerini sitotoksik T lenfositler ile etkileşimleri yoluyla gösterirler.[172] Bu hücreler birbirinden farklı ama kimi zaman da örtüşen fonksiyonlara sahiptirler.[189]

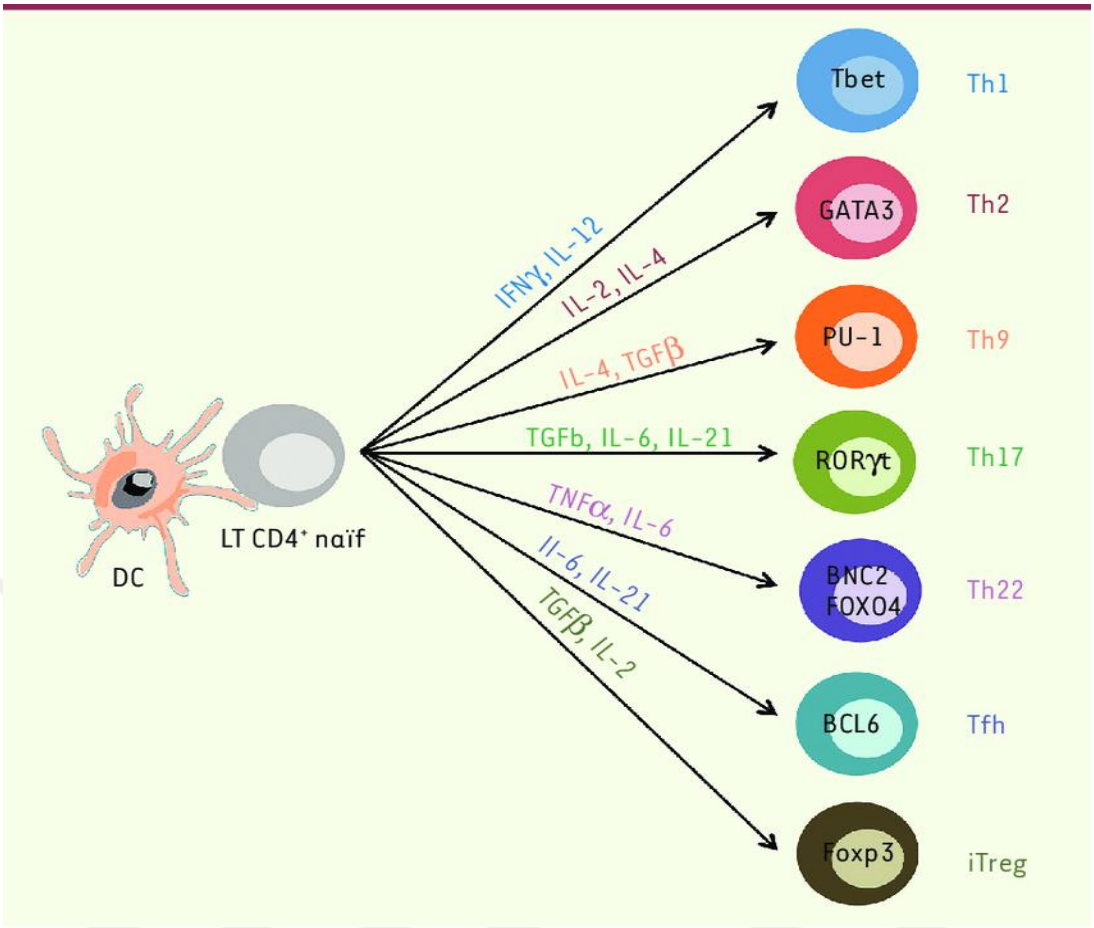
2.6.5. Regulatuar T Lenfositer

CD4(+) T lenfositler; T lenfositlerin büyük bir kısmını oluşturur. Aktive edildikten sonra bulundukları mikroçevreye göre çeşitli efektör alt tiplere farklılaşırlar.[190] T helper 1, T helper 2, T helper 9, T helper 17, foliküler T helper ve

regülatuar T (T reg) hücresi alt tipleri bulunur. Şekil: Bu alt tipler farklı genetik ve epigenetik modifikasyonlara sahiptirler.

Treg lenfositler CD4+/CD25+ fenotip ile karakterizedir.[191] FOXP3 T reg lenfositleri kontrol eden en önemli transkripsiyon faktörüdür.[192] TGF- β sinyal yollarıyla aktive olan Smad2 ve Smad3, FOXP3'ü indükleyerek Treg farklışmasına katkıda bulunur.[193] Treg lenfositlerde eksprese edilen FOXP3 (Forkhead box P3), forkhead/winged-helix transkripsiyon ailesinin bir üyesidir ve Treg'ların gelişiminde, fonksiyon kazanmasında ve immün sistemin düzenlenmesinde rol alır.[172] FOXP3 fonksiyon kaybı Treg yetmezliğine yol açarak otoimmün hastalıklara, fazla çalışması ise immün yetmezliğe sebep olur.[194,195] FOXP3 sadece hematopoetik hücrelerde değil tümör hücrelerinde de eksprese olmaktadır.[196] PD-L1, FOXP3'ün ekspresyonunu artırarak tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştırdığı için tümörlerde kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.[191]

T reg lenfositlerin hem protümörojenik ve antitümörojenik etkisi mevcuttur.[197] Tümör mikroçevresinde *Treg* fonksiyonu değişkendir. Eliminasyon evresinde sitotoksik T lenfosit etkinliğini artırarak antitümöral etki gösterirken, kronik denge fazında artmış Treg birikimi sitotoksik T lenfosit etkinliğini tümörün immünojenitesini maskeleyerek düşürmektedir ve protümörojenik etki gösterir.[172] Bu nedenle T reg lenfositlerin iyi yada kötü prognostik etkisi hala tartışmalı iken Treg infiltre tümörlerin kötü klinik gidişle seyrettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur.[194,198] Meme kanseri ile ilgili çalışmalardan birinde CD4(+)T hücrelerinin, daha önce tedavi görmemiş meme kanseri hastalarında daha iyi hastalıksız sağkalım ve neoadjuvan kemoterapi alan hastalarda patolojik tam yanıt (pCR) ile ilişkili olduğunu gösteren antitümör etkisi vurgulanmıştır.[199] Ayrıca Yüksek CD8(+) T lenfosit ve CD4(+) T lenfosit birlikteliği ÜNMK'de iyi prognostik gösterge olarak bulunmuştur.[197]



Şekil 15. CD4 (+) T lenfosit alt tipleri[200]

2.6.5.1. CD8(+) T Lenfositler

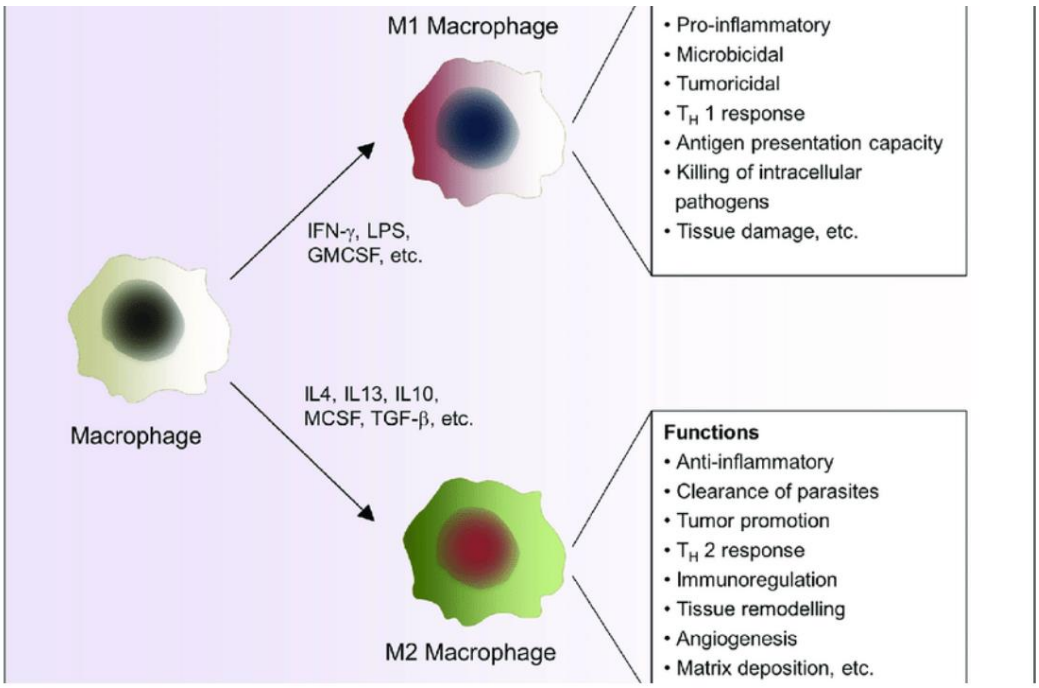
CD8(+) T lenfositler tümör hücrelerini direk öldürebildikleri için sitotoksik T lenfositler olarak da adlandırılırlar ve TIL içinde majör lenfosit grubunu oluşturmaktadırlar. Sitotoksik T lenfositler, anti-tümöral ve proinflamatuar etkiye sahiptirler. Sitotoksik TIL'lerin granüllerinde depolanan perforin ve granzimler, MHC sınıf I moleküllerine bağlı tümöral antijenler ile karşılaşıldığında hızla salınarak tümör hücresinin apoptotik ölümüne neden olurlar. Tümör çevresindeki sitotoksit T hücrelerin iyi prognostik faktör olduğu kolorektal kanserler, özefagus kanserleri, pankreas kanserleri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde gösterilmiştir.[201-204] Meme kanserlerinde sonuçlar bu kadar net değildir. Bazı çalışmalarda tümör mikroçevresinde yüksek sitotoksik-TIL düzeyleri iyi prognoz, uzun sağkalım ve tedaviye iyi yanıt ile birlikte olduğunu gösterirken bazı çalışmalar iyi prognostik belirteç için bağımsız bir faktör olmadığı göstermiştir.[198,199,205-207]

2.6.6. CD163 (M2 Makrofajlar)

Meme kanserlerinde bulunan immün sistem hücrelerine bakıldığında bazı olgularda makrofajların baskın olduğu ve mevcut hücrelerin %50'sinden fazlasını oluşturduğu gözlenmiştir.

Makrofajlar aktivasyonlarına göre 2 gruba ayırılırlar. M1 makrofajlar; klasik yoldan aktive olan ve M2 makrofajlar; alternatif yoldan aktive olan makrofajlardır.[183] Makrofaj aktivasyonu, Th1 sitokinler ve patojen ilişkili veya endojen tehlike sinyalleri tarafından tetiklenebilir, bu da klasik yoldan aktive edilmiş M1 makrofajların oluşumuna yol açar. Öte yandan anti inflamatuar mediatör olarak bilinen IL-4, IL-10, TGF-β ve M-CSF; çeşitli M2 anti-inflamatuar makrofaj tiplerini indükler (Şekil 16).[18,184]

M1 makrofajlar tümör karşıtı etkiye sahiptirler, fagositoz ve sitotoksik etki ile tümör hücrelerini öldürürler. M2 makrofajlar protümörojenik etki gösterir ve aynı zamanda doku tamirinde, anjiogenezde görev alırlar. Artmış M2 makrofaj seviyeleri agresif tümör davranışı ve kötü prognozla ilişkilidir.[183] Meme kanserlerinde yüksek tümör ilişkili makrofaj bulunması; yüksek tümör derecesi, hormon reseptör negatifliği, HER2 pozitifliği, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkilidir.[185] İmünohistokimyasal olarak CD68 hem M1 hem de M2 makrofajları gösterirken, CD 163 M2 makrofajlara daha spesifiktir.[186]



Şekil 16. Makrofaj tipleri ve fonksiyonları[18]

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Etik Kurul TTU-2022-14568 protokol numaralı projemiz, 4 Şubat 2022 tarihli toplantının 21 no'lu kararı ile belirtilen yazı ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı.

3.1. Olguların Seçimi

Ocak 2017 ve Aralık 2021 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında incelenmiş ve tanı almış meme rezeksiyon materyalleri hastanemiz bilgi yönetim sistemi (MERGENTECH) üzerinden taranarak belirlendi. Meme kanseri tanısı almış olgular arasından immünohistokimyasal yöntem ve/veya insitu hibridizasyon yöntemi ile üçlü negatif (ER, PR HER2 negatif) olan 127 olgudan neoadjuvant tedavi aldığı belirlenen hastalar ve yeterli tümör dokusu olmayanlar elenerek 52 olgu çalışmaya dahil edildi.

Olgulara ait H&E boyalı lamlar, tümör içeren bloklar arşivden çıkarıldı. Olgulara ait lamlar Olympus CX23 ışık mikroskobu ile tekrar değerlendirildi ve tümörü en iyi temsil eden ve yeterli alana sahip bloklar seçildi. Hastalara ait klinik verilere hastanemiz bilgi sisteminden ulaşıldı. Tümör tipleri 2019 DSÖ sınıflamasına göre revize edildi.

Laboratuvarımızda meme kanseri tanısında rutin işleyiş içerisinde uygulanan ER, PR, Cerb B2/ HER2 ekspresyon durumu, Kİ 67 proliferasyon indeksi Amerikan Klinik Onkoloji Topluluğu/ Amerikan Patologlar Birliği (ASCO/CAP) meme kılavuzuna göre değerlendirildi.[132,135,136,208] Tümör hücrelerinde ER ve PR nükleer boyanmasına bakılarak %1 üzerindeki boyanma varlığı pozitif olarak kabul edildi. Cerb B2 /HER 2 protein durumu değerlendirilirken immünohistokimyasal olarak membranöz boyanma 0, 1, 2 ve 3 pozitif olarak skorlandı. Skor 3 pozitif kabul edilirken, skor 2 olanlar HER2 gen durumu açısından in Situ Hibridizasyon (ISH) yöntemi ile değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen 52 olguya immünohistolokimyasal yöntem ile CD8, FOXP3, CD163 ve PD-L1 uygulandı.

3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem ve Cihazdaki Aşamaları

Olguların seçilen parafin bloklarından 5 µ kalınlığında kesitler dokuların pozitif şarjlı camlara alındı. Kesitler 60°C'lik etüvde bir saat bekledikten sonra 15 dakika ksilol

ile deparafinize edildi. Derecesi giderek azalan alkollerden geçirilerek hidrate edilip distile suda yıkandı. Hazırlanan kesitlerden CD8 (Tavşan Monoklonal, SP57; RTU, Roche-Ventana), CD163 (Fare Monoklonal; RTU; MRQ-26 cell morque) FOXP3 (Fare monoklonal, SC-53876, 1:500 dilüsyon, Santa Cruz) antikorları kullanıldı. PD-L1 immunhistokimyası için (Tavşan Monoklonal, SP142; RTU; Ventana) antikoru uygulandı. PD-L1 için optiview dab detection kit; CD8,CD163 ve FOXP3 için ultraview dab detection kit kullanıldı.

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

Boyalı preperatlar klinik bilgileri bilinmeksizin 3 patolog (ÖY, TT, ME) tarafından ışık mikroskopta değerlendirildi.

3.3. TIL Değerlendirilmesi

Tümör infiltre eden lenfositlerin değerlendirilmesinde dikkat edilecek kriterler 2014 yılında toplanan TIL uluslararası çalışma grubu tarafından belirlenmiştir.[161] Bu çalışmaya göre belirlenen kriterler şöyle sıralanmıştır:

- TIL'ler stromal alanı infiltre eden mononükleer inflamatuar hücrelerin stromal alana oranı hesaplanarak elde edilir. (stromal hücreler bu orana dahil edilmez)
- İnvaziv tümör sınırları içindeki TIL'ler değerlendirilmelidir.
- İnvaziv tümör sınırları dışındaki, DKİS ve normal meme dokusu çevresindeki TIL'ler değerlendirme dışında tutulmalıdır.
- Ezilme artefaktı, nekroz ve önceki biyopsiye sekonder hyalinizasyon içeren tümör alanlarındaki TIL'ler değerlendirme dışında tutulmalıdır.
- Tüm mononükleer inflamatuar hücreler (lenfositler ve plazma hücreleri) skora dahil edilirken polimorfonükleer lökositler değerlendirmeye alınmamalıdır.
- Bir hasta için 4-5 μm kalınlığında x200-400 büyütmede bir kesitin incelenmesi yeterli olarak kabul edilir.
- Hot-spot alana odaklanmadan tüm alanlar değerledirilmelidir.[161]

Olgulara ait hematoksilen& eozin boyalı kesitler X200 büyük büyütmede tümör stroması (stromal TIL) ve invaziv tümör içerisinde yer alan lenfositler %0-%100 aralıkları içerisinde skorlandı. İmmün hücrelerin oranlarına göre < %10 düşük, %10-%50 arasında olanlar orta ve >%50 olarak belirlenenler yüksek TIL kabul edildi.[209]

3.4. İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

PD-L1; İmmunhistokimyası PD-L1 SP142 değerlendirme kılavuzuna göre yapıldı.[210-212]

Bu kılavuza göre; PD-L1 (SP142) icin immunhistokimyasal incelemede en az 50 tümör hücresi ve ilişkili olduğu stromanın varlığı değerlendirmeye alındı. Tümör ilişkili lenfositlerdeki herhangi bir yoğunlukta ve ≥%1 boyanma pozitif olarak kabul edildi.

İmmün hücre Skoru (IHS) ; IHS 0, IHS1, IHS2 ve IHS3 olarak skorlandı.

Aynı şekilde tümör hücrelerinde (TH) ≥ %1 boyanma pozitif kabul edildi ve TH0, TH1, TH2 ve TH3 olarak skorlandı (Tablo 6).[212]

Tablo 6. PD-L1 Hem TH hem de İH için skorlama[212]

TH skor	% PD-L1	IH Skor	% PD-L1
TH0	<%1	IH0	<%1
TH1	≥%1 ve <%5	IH1	≥%1 ve <%5
TH2	≥%5 ve <%50	IH2	≥%5 ve <%10
TH3	≥%50	IH3	≥%10

TH: Tümör hücresi, İH: İmmün hücre

T lenfositlerin İmmünhistokimyasal olarak değerlendirilmesi:

İnvaziv tümör sınırları belirlendikten sonra x200-400'lük büyütme alanında FOXP3 ile nükleer boyanan CD4 Treg ve CD8 ile sitoplazmik boyanan CD8 T lenfosit oranları değerlendirildi. Boyanma izlenen olgularda (%0-100) 0-100 arasında yüzde olarak T reg ve sitotoksik T lenfosit oranı belirlendi. Ayrıca tümör hücrelerinde FOXP3 boyanması %0 ile %100 arasında olmak üzere kaydedildi.[161]

M2 tip makrofajların immünohistokimyasal yöntemle uygulanan CD163 ile değerlendirilmesi:

Çalışmamızda invaziv tümör sınırları içerisindeki M2 makrofajlar CD163 ile tespit edildi. Tümör infiltre eden makrofajlar intratümöral ve stromal olarak ayrı ayrı değerlendirildi. CD163 ile membranöz boyanma gösteren hücreler seçildi. Büyük büyütme alanında (x400) beş alan sayılıp ortalaması alındı.[20]

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik veriler olgulara ait hastane bilgi yönetim sisteminde kayıtlı olan patoloji raporlarından ve konsültasyon için gelmiş olguların ilk raporlarına bölümümüz

arşivinden ulaşıldı. Primer tümör ve lenf nodu evreleri American Joint Committee on Cancer (AJCC) kılavuzuna göre belirlendi.[43] Tümörlerin histolojik tipi Dünya Sağlık Örgütü (2019) önerilerine göre sınıflandırıldı.[43] Multifokalite, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, uzak metastaz varlığı ayrı ayrı kaydedildi.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 25.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerde ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Gruplar arasındaki sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, parametrik dağılım ön şart varsayımı sağlanmadığında Student T testi; parametrik dağılım ön şartı sağlandığında Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında da Ki-Kare testi kullanıldı. Sağkalım eğrisi için Kaplan-Meier yöntemi ve gruplar arasındaki sağkalım farklılıklarını hesaplamak için Long-rank testi uygulandı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Ocak 2017 ve Aralık 2021 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalımızda incelenen rezeksiyon materyalleri ve ayrıca konsültasyon için gelmiş ameliyat materyallerinden ER, PR ekspresyonu göstermeyen ve Cerb-B2/HER2 ekspresyonu/amplifikasyonu göstermeyen, neoadjuvan kemoterapi almamış yeterli tümör dokusu bulunan 52 adet olgu dahil edilmiştir.

4.1. Demografik Veriler ve Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızda yer alan 52 ÜNMK olgusunun tanı anında yaş ortalaması 48 (mean 48,0±11,9) (minimum: 32, maksimum: 83) arasında idi.

Tanı aldıklarında 15 olgu (%28,8) 30-39 arasında, 14 olgu (%26,9) 40-49 yaş arasında, 15 olgu (%28,8) 50-59 yaş arasında, 4 olgu (%7,6) 60-69 yaş arasında, 3 olgu (%5,7) 70-79 yaş arasında, 1 olgu (%1,9) 80-89 yaş arasında idi (Şekil 17).



Şekil 17. Olguların yaş dağılımı

Olguların tamamı kadın cinsiyettedir. Olguların 38'inde (%73,1) segmental mastektomi, 9'unda (% 17,3) mastektomi ve 5'inde (% 9,6) modifiye radikal mastektomi (MRM) cerrahi prosedürü uygulanmıştır. ≤ 2cm tümör boyutu olan

olguların %75'i segmental mastektomi, %12,5'i mastektomi, %12,5'i MRM cerrahisi yapılmış, >2cm tümör boyutu olan olguların %72,2'si segmental mastektomi, %19,4'ü subkutan yada sadece mastektomi ve %8,3'ü MRM cerrahisi yapılmıştır. Tümörlerin 23'ü (%46,0) sağ, 27'si (%54,0) sol meme yerleşimliydi (Tablo 7).

Hastaların ortanca takip süresi 33 (1-65) ay idi. Klinik takiplerinde lokal nükse rastlanmazken, beş olguda (%9,6) uzak metastaz saptandı. Olguların 9'unun (%17.3) takiplerde öldüğü tespit edildi.

Olguların beşinde (%9,6) tümör çok odaklı olup, 47'sinde (90,4) tek odakta idi.

Tümör boyutları değerlendirildiğinde ≤ 2 cm tümör çapı olan 24 (%46,2) olgu, >2 cm tümör çapı olan 28 (%53.8) mevcuttu. İzlenen tümörlerin en büyüğü 12 cm iken en küçüğü 0.9 cm çapında idi. Olguların patolojik (pT) evreleri; 24 olgu (%46,2) pT1, 24 olgu (%46,2) pT2, 4 (%7,7) olgu pT3 şeklinde idi.

Lenfovasküler invazyon olguların 18'inde (%34,6) görüldü, 34'ünde (%65,4) saptanmadı. Olguların 42'sinde lenf nodu örneklemesi mevcuttu. Lenf nodu metastazı 17'sinde (%32,7) mevcuttu, 25'inde (%48,1) lenf nodu metastazı görülmedi. Perinöral invazyon olguların dördünde (%7,7) mevcuttu. Patolojik lenf nodu (pN) evresi 25'inde (%48,1) N0, 14 olguda (%26,9) N1, 2 olguda (%3,8) N2, 1 olguda (%1,9) N3, 10 olgu (%19,2) lenf nodu durumu bilinmiyor idi.

TNM evresine göre olguların; 11'i (% 21,2) evre 1, 18'i (%34,6) evre 2A, 8'i (%15,4) evre 2B, 4'ü (%7,7) evre 3A ve 1'i % (1,9) evre 3C şeklinde olup lenf nodu durumu bilinmeyen 10 olgunun evrelemesi yapılamadı.

Histopatolojik olarak olguların; 40'ı (%76,9) invaziv karsinom özel tip içermeyen, 6'sı (%11,5) metaplastik karsinom ve 1'i (%1.9) mikropapiller, 1'i (%1.9) papiller, 1'i (%1.9) adenoid kistik karsinom, 2'si (%3,8) apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom ve 1'i (%1.9) olgu invaziv lobüler karsinom tanısı aldı (Tablo 7).

Tümörlerin histolojik dereceleri MBNG üzerinden değerlendirilmiş olup, 4 olgu (%8,9) derece 2, 41 olgu (%91,1) derece 3 idi (Tablo 7).

Tablo 7. Demografik ve histopatolojik bulgular

		n	**%**
Durumu	Sağ Eksitus	43 9	% 82,7 % 17.3
Tümör Yerleşimi	Sağ Sol	23 27	% 44,2 % 51.9

Tablo 7'nin devamı

Tanı	İnvaziv Duktal Karsinom (İDK)	40	% 76,9
	İnvaziv Lobüler Karsinom (İLK)	1	% 1.9
	Metaplastik Karsinom	6	% 11,5
	Özel tip meme karsinomu	5	% 7,7
Derece (MBNG)	Derece 2	4	% 8,9
	Derece 3	41	% 91,1
Patolojik T evresi	pT1	24	% 46,2
	pT2	24	% 46,2
	pT3	4	% 7,7
Lenf nodu metastazı	Var	17	% 32,7
	Yok	25	% 48,1
	Bilinmiyor	10	%19,2
Patolojik N	pN0	25	%48,1
	pN1	14	%26,9
	pN2	2	%3,8
	pN3	1	%1,9
	Nx	10	%19,2
Multifokalite	Tek	47	% 90,4
	Multifokal	5	% 9,6
Lenfovasküler invazyon	Var	18	% 34,6
	Yok	34	%65,4
Perinöral invazyon	Var	48	% 92,3
	Yok	4	% 7,7
Uzak metastaz	Var	5	%9,6
	Yok	47	%90,4

4.2. Klinik Bilgiler ile Prognostik Verilerin Değerlendirilmesi

4.2.1. Yaş ile Prognostik Verilerin Karşılaştırılması

Olguların tanı aldıkları yaş ortalaması 48, medyan değeri 47 (Mean±SD 48,0±11,9) olup en genç olgu 32, en ileri yaşlı olgu 83 yaşında idi (Tablo 8).

Tümör boyutuna göre karşılaştırıldığında ≤2 cm tümör boyutu olan olgularda ortalama yaş 47 (minimum 32- maksimum 73), >2cm tümör boyutu olan olguların ortalama yaşı 45 (minimum 32 maksimum 83) idi (p: 0,451).

Lenfovasküler invazyon görülen olgularda yaş ortalaması 49 (minimum 32-maksimum 83), lenfovasküler invazyon görülmeyen olgularda yaş ortalaması 34 (minimum 32 maksimum 70) idi (p 0, 603).

Lenf nodu metastazı saptanan olgularda yaş ortalaması 50 (minimum 32 maksimum 74), lenf nodu metastazı olmayan olgularda yaş ortalaması 46 (minimum 32-maksimum 83) idi (p: 0,305).

Perinöral invazyon görülen olgularda yaş ortalaması 33 (32 -83), perinöral invazyon görülmeyen olguların yaş ortalaması 47(minimum 32 – maksimum 83) idi (p 0,001).

Yaşayan olguların yaş ortalaması 47 (minimum 32 maksimum 73), eksitus olan olguların yaş ortalaması 44(minimum 32- maksimum 83) idi (p: 0,706).

4.2.2. Histolojik tip, derece ile prognostik verilerin karşılaştırılması

Tümör boyutu ≤2 cm olan olguların 19'ü (%79,1) invaziv karsinom NST, 2'i (%8,3) metaplastik karsinom, 3'i (%12,5) özel tip bir meme karsinomu histolojisinde idi. Tümör boyutu >2cm olan olguların 21'i(%75) invaziv karsinom NST, 4'ü (%14,2) metaplastik karsinom, 2'si (%7,1) özel tip meme karsinomu ve 1'i (%3,5) lobüler karsinom histolojisinde idi. (p=0,993).

Lenf nodu metastazı görülen olguların 10'u (%58,8) invaziv karsinom NST, 4'ü (%23,5) metaplastik karsinom, 2'si özel tip meme karsinomu (%11,8) (mikropapiller karsinom ve apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom) 1'i (%5,9) lobüler karsinom idi. Lenf nodu metastazı görülmeyen olguların 30'u (%85,7) invaziv karsinom NST, 2'si (%5,7) metaplastik karsinom, 3'ü (% 8,8) özel tip meme karsinomu idi. Histolojik tipler ile lenf nodu metastazı varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p: 0,094). Benzer olarak lenfovasküler invazyon varlığı ve yokluğu ile histolojik tipler arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu (p:0,398).

Olguların nükleer dereceleri 2 ve 3 idi. Tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve lenfovasküler invazyon açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p:0,599, p:1,000 ve p:1,000).

4.2.3. Mikroçevre

Olguların tümör infiltre eden lenfositleri incelendiğinde (TIL) 16 (%30,8) olguda düşük seviyede, 19 (%36,5) olguda orta seviyede, 17 (%32,7) olguda yüksek seviyede TİL izlendi. Düşük, orta ve yüksek TIL içeren tümörler şekilde gösterildi (Şekil 18-20).

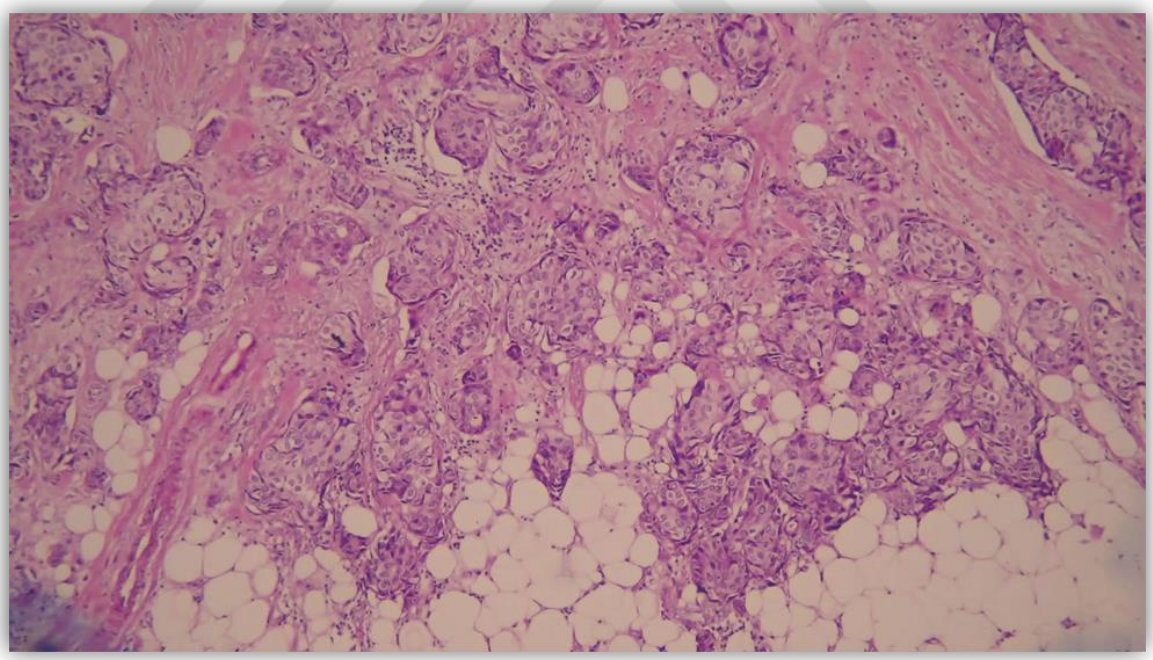
Tümör boyutuna göre TIL değerlendirildiğinde, ≤2 cm tümör boyutu olan olguların 7'si (%29,2) düşük, 8'i (%33,3) orta, 9'u (%37,5) yüksek TIL yoğunluğu sahip idi. Tümör boyutu >2cm olan olguların 9'unda (%32,1) düşük, 11'inde (%39,3) orta, 8'inde (%28,6) yüksek TIL yoğunluğu saptandı. Tümör boyutu ile TIL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0,941) (Tablo 8).

Lenfovasküler invazyon varlığı ile TIL yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,460) (Tablo 8).

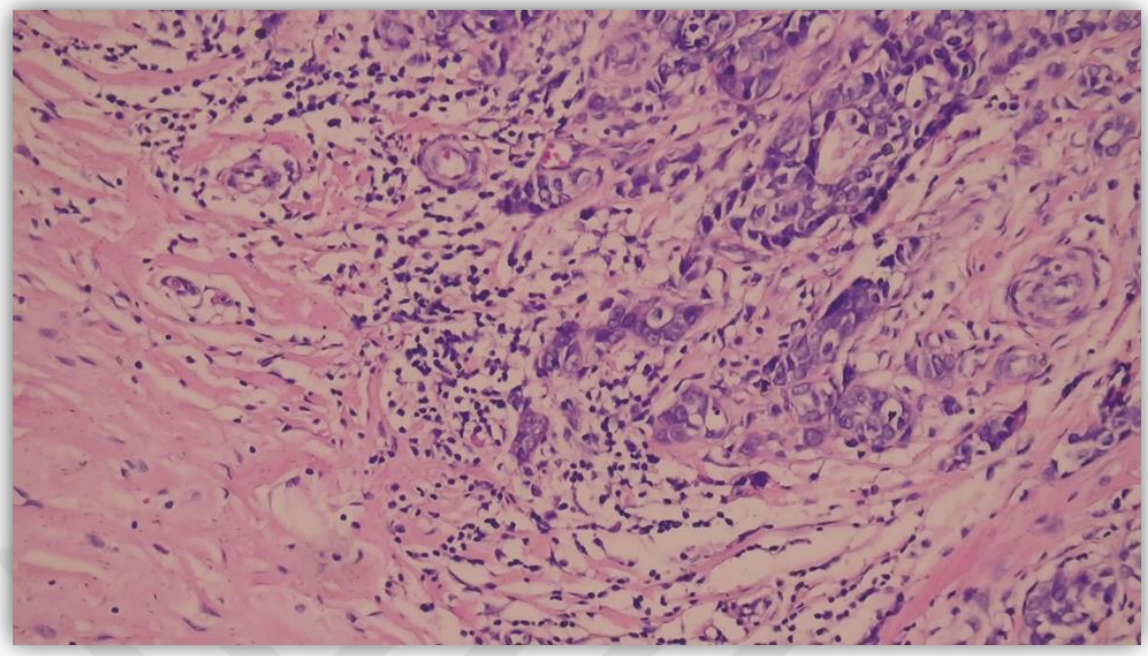
Lenf nodu metastazı olan olguların 6'sında (%35,3) düşük, 7'sinde (%41,2) orta, 4'ünde (%23,5) yüksek TIL yoğunluğu izlendi. Lenf nodu metastazı izlenmeyen olguların 10'unda (%28,6) düşük, 12'sinde (34,3) orta, 13'ünde (%37,1) yüksek TIL yoğunluğu saptandı. Lenf nodu metastazı ile TIL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p:0,617) (Tablo 8).

Yüksek TIL yoğunluğuna sahip olguların 3'ü (%17,6) evre 1, 5'i (%29,4) evre 2A, 2'si (%11,8) 2B 1'i evre 3A idi. Düşük TIL yoğunluğuna sahip olguların 2'si (%12,5) evre 1, 6'sı (%37,5) evre 2A, 3'ü (%18,8) evre 2B, 1'i (%6,3) evre 3A ve 1'i (%6,3) evre 3C idi. Klinik evre ile TIL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (p >0,05) (Tablo 9).

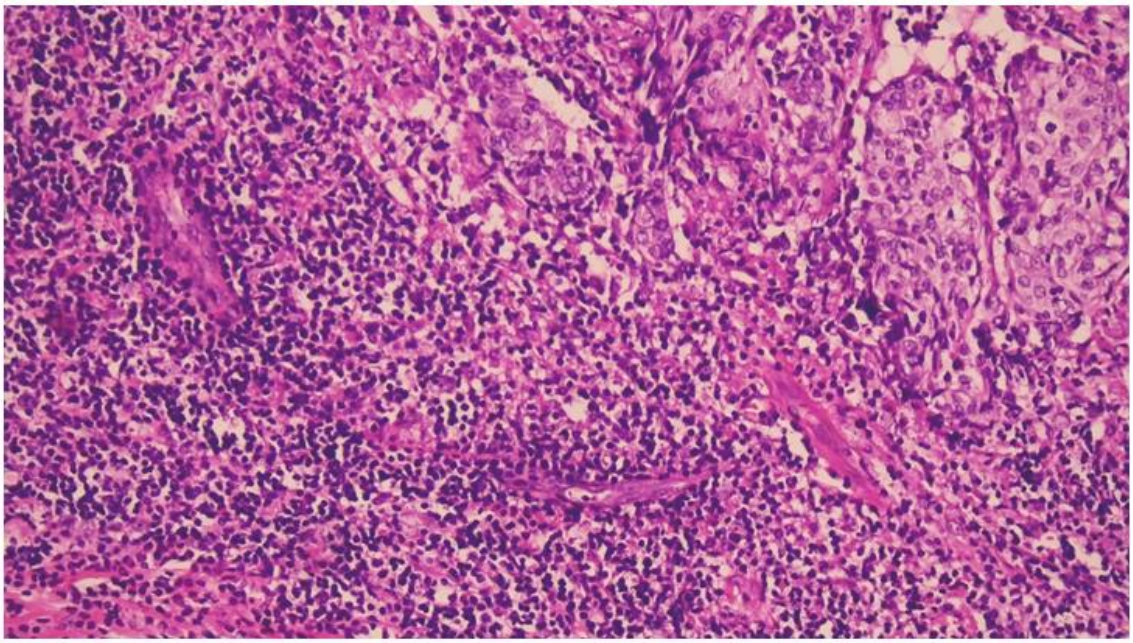
Yaşayan olguların 11'inde (%27,3) düşük, 16'sında (%36,4) orta, 16'sında (%36,4) yüksek TIL yoğunluğu izlendi. Eksitus olan olguların 5'inde (%55,6) düşük, 3'ünde (%33,3) orta, 1'inde (%11,1) yüksek TIL dikkati çekti. Mortaliteye göre TIL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0,153) (Tablo 9).



Şekil 18. Düşük TIL (Hematoksilen& eozin x100 büyütme)



Şekil 19. Orta seviye TIL (Hematoksilen&eozin x200 büyütme)



Şekil 20. Yüksek TIL seviyesi (Hematoksilen & eozin x200 büyütme)

Tablo 8. TIL değerlerinin tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve sağkalım ilişkisi

	Tümör infiltre eden lenfositler			p
	Düşük (<%10)	**Orta (%10-<%50)**	**Yüksek >%50**	
Tümör boyutu				
≤2cm	7(%29,2)	8 (%33,3)	9 (%37,5)	
>2cm	9 (%32,1)	11(%39,3)	8 (%28,6)	0,941
Lenf nodu metastazı				
Var	6 (%35,3)	7 (%41,2)	4 (%23,5)	
Yok	10 (%28,6)	12 (%34,3)	13 (%37,1)	0,617
Durumu				
Sağ	11 (%27,3)	16 (%36,4)	16 (%36,4)	
Eksitus	5 (%55,6)	3(%33,3)	1 (%11,1)	0,153

Tablo 9. TIL düzeylerine göre klinik evrelerin karşılaştırılması

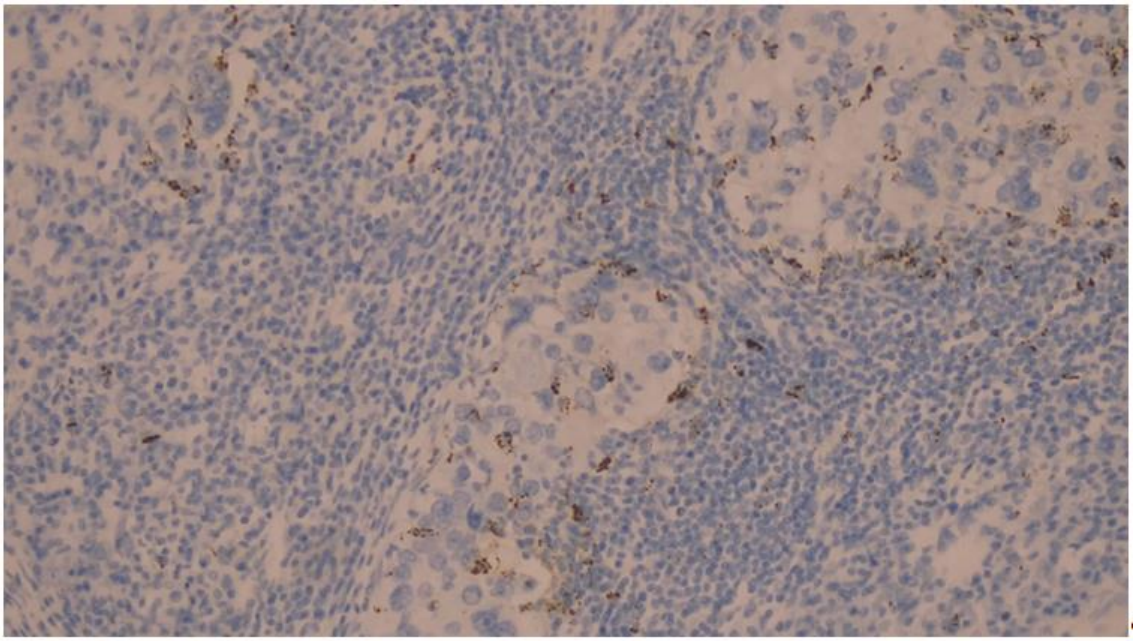
	TIL						p
	Düşük		**Orta**		**Yüksek**		
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	
Evre							
1	2	12,5	6	31,6	3	17,6	
2A	6	37,5	7	36,8	5	29,4	
2B	3	18,8	3	15,8	2	11,8	0,544
3A	1	6,3	2	10,5	1	5,9	
3C	1	6,3	0	0,0	0	0,0	
Bilinmiyor	3	18,8	1	5,3	6	35,3	

4.2.4. PD-L1

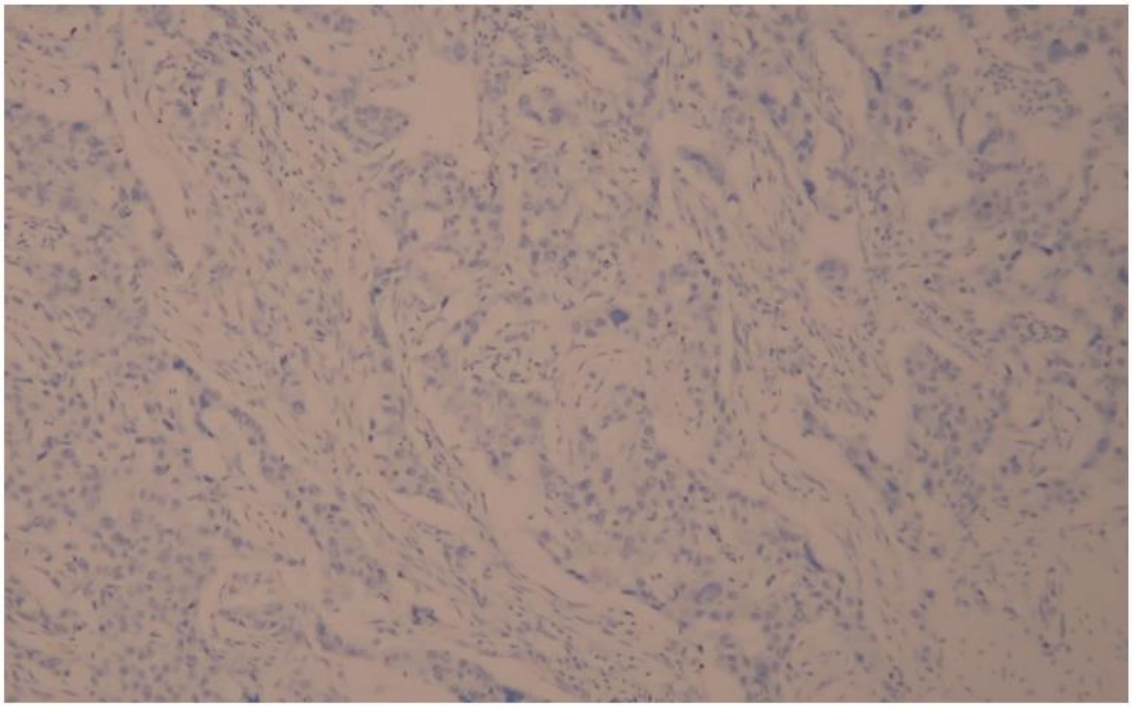
PD-L1 değerlendirmesi hem tümör hücrelerinde hem de immün hücrelerde yapıldı. İmmün hücreler için ≥%1 boyanma saptanması pozitif kabul edildi. Pozitif ve negatif olgular şekil: gösterildi (Şekil 21-24).

Olguların 25'inde (%48,1) PD-L1 immün hücrelerde pozitif, 27'sinde (%51,9) negatif sonuç verdi. immün hücre skoruna göre; olguların 8'i (%15,4) İHS1, 5'i (%9,6) İHS2, 12'si (%23,1) İHS3 idi (Tablo 10).

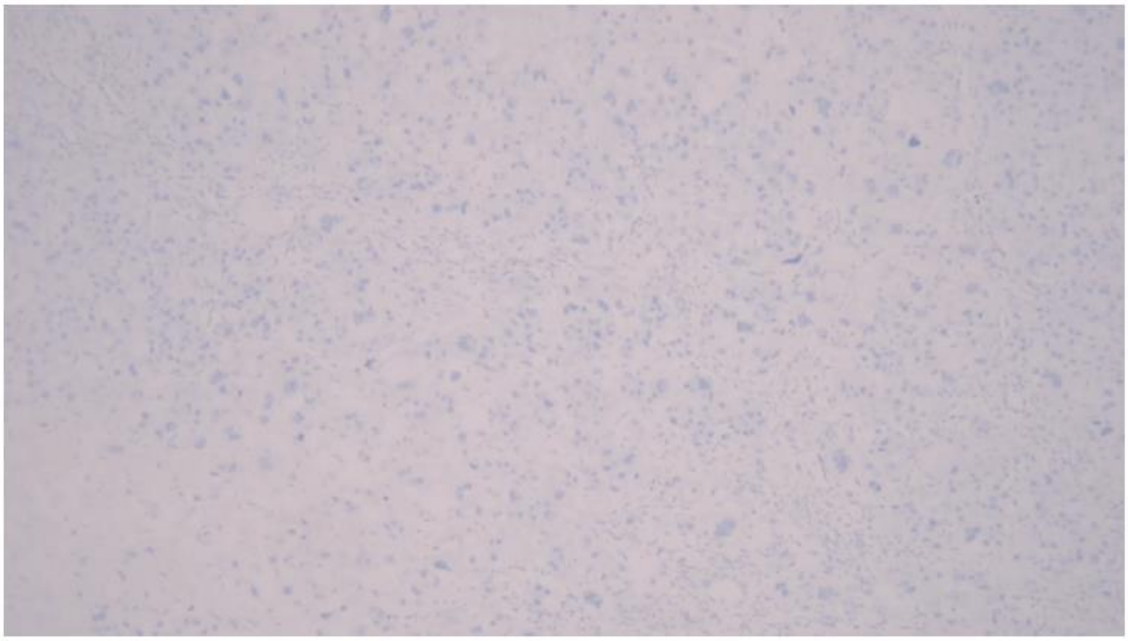
Tümör hücrelerinde 6 olguda (%11,5) PD-L1 boyanması izlenirken, 46'sında (%88,4) boyanma saptanmadı. Tümör hücre skoruna göre 46'sı(%88,4) THS0, 4'ü (%7,6) THS1, 2'si (% 3,8) THS2 idi (Tablo 10).



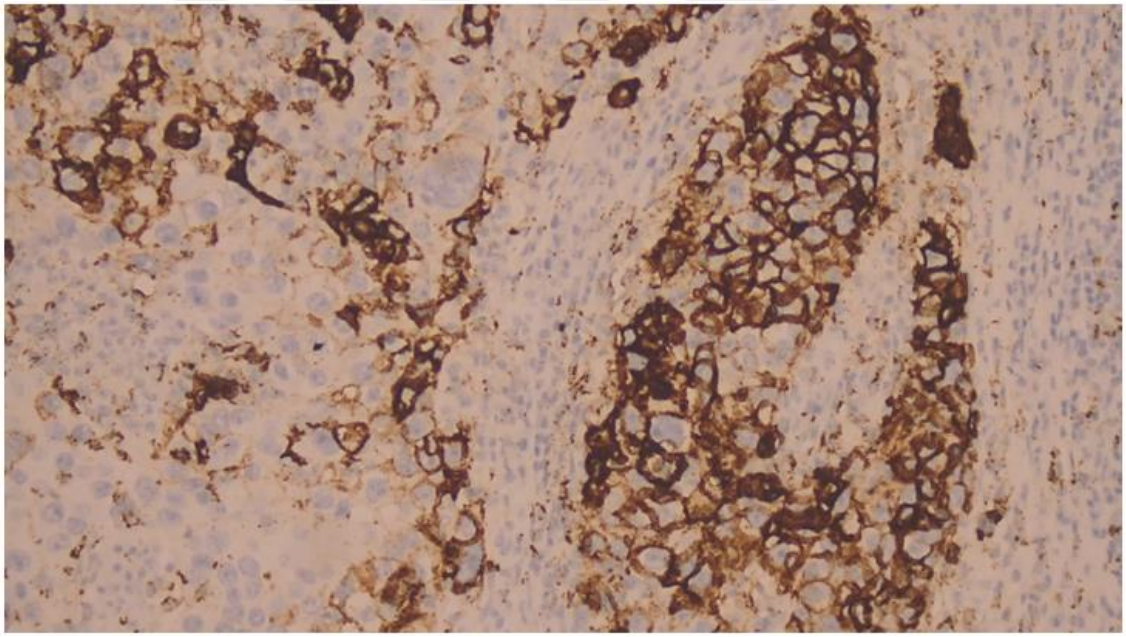
Şekil 21. İmmün hücrelerde PD-L1 pozitifliği (x200 büyütme)



Şekil 22. İmmün hücrelerde PD-L1 negatif sonuç (x100 büyütme)



Şekil 23. PD-L1 ile tümör hücrelerinde boyanma izlenmemiştir. (x100 büyütme)



Şekil 24. PD-L1 ile tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma. (x200 büyütme)

PD-L1 pozitifliğine göre prognostik parametreler incelendiğinde; PD-L1 immün hücrelerde tümör boyutu ≤2cm olan olguların 14'ünde (%58,4) ve >2 cm olan olguların 11'inde (%39,3) pozitif izlendi. Tümör boyutu ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p:0,274).

Ancak lenfovasküler invazyon varlığı ile PD-L1 boyanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha azdı (p: 0,044). Lenf nodu metastazı ile PD-L1 pozitifliği

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,120). Benzer şekilde klinik evreleri ile PD-L1 pozitifliği de istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0,148).

Sağkalım ve eksitus durumları karşılaştırıldığında; yaşayan olguların 23'ünde (%53,5) immün hücrelerde PD-L1 pozitif iken, eksitus olan olguların 2'sinde (%22,2) immün hücrelerde PD-L1 pozitif saptandı. Yaşayan ve eksitus olan olgularda PD-L1 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0,143).

Uzak metastaz ve perinöral invazyon izlenen olgu sayısı az olduğu için bu parametreler istatistiksel değerlendirmeye alınmadı.

PDL-1 ekspresyonu tümör hücrelerinde değerlendirildiğinde tümör boyutuna göre ≤2cm tümör boyutu olan olguların 3'ünde (%12,5), >2cm tümör boyutu olan olguların 3'ünde (%10,7) pozitif saptandı. (p: 0,671) istatistiksel olarak anlamlı değildi. Benzer şekilde lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı olan olgularda PD-L1 ekspresyonu (p: 0,479 ve p:0,472) olup istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Yaşayan olgulardan 6'sında (%13,9) tümör hücrelerinde PD-L1 pozitif, 37'sinde (%86,0) tümör hücrelerinde negatif idi. Eksitus olan olgularda ise tümörde PD-L1 boyanması izlenmedi. (p: 0,483)

Tablo 10. PD-L1 bulgularının incelenmesi

PD-L1 immün hücrelerde	**n (%)**
İHS-0 (<%1)	27 (%51,9)
İHS-1 (≥%1 ve <%5)	8 (%15,4)
İHS-2 (≥%5 ve <%10)	5 (%9,6)
İHS-3 (≥%10)	12 (%23,1)
PD-L1 IC	
Negatif (<%1)	27(51,9)
Pozitif (≥%1)	25(48,1)
PD-L1 tümör hücrelerinde	
THS-0 (<%1)	46 (%88,4)
THS-1 (≥%1 ve <%5)	4 (%7,7)
THS-2 (≥%5 ve <%50)	2 (%3,8)

PD-L1 ekspresyonu ile TIL değerlendirildiğinde (Tablo 11) TIL seviyesi arttıkça PD-L1 pozitifliğinde immün hücrelerde ve tümör hücrelerinde artış dikkati çekti ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. (p: 0,011 ve p: 0,012) Ayrıca TIL seviyesi arttığında PD-L1 pozitifliğinde artış saptandı ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,0001) (Tablo 12).

Tablo 11. PD-L1 ekspresyonun TIL seviyelerine göre dağılımı

		PD-L1 immün hücrelerde	p	PD-L1 tümör hücrelerinde	p
	n	Med(Min-Max)		Med(Min-Max)	
TIL					
Düşük TIL	16	0 (0-3)	**0,011**	0 (0-0)	**0,012**
Orta TIL	19	0,1 (0-40)		0 (0-5)	
Yüksek TIL	17	5 (0,1-40)		0 (0-30)	

Tablo 12. İmmün hücrelerde PD-L1 ekspresyon durumu ve TIL seviyelerine göre karşılaştırması

	PD-L1-İH				p
	Negatif		Pozitif		
	n	%	n	%	
TIL					
Düşük	14	51,9	2	8,0	
Orta	10	37,0	9	36,0	**0,001**
Yüksek	3	11,1	14	56,0	

Ayrıca PD-L1 pozitifliği ve diğer immün hücreler arasında (intratümöral ve stromal FOXP3(+) TIL, intratümöral ve stromal CD8(+) TIL pozitif korelasyon saptandı (p: 0,0001, p:0,0001, p: 0,003 ve p:0,0001).

4.2.5. Tümör Mikroçevresinde Tümör İlişkili İmmün Hücreler ve Dağılımı

4.2.5.1. CD8

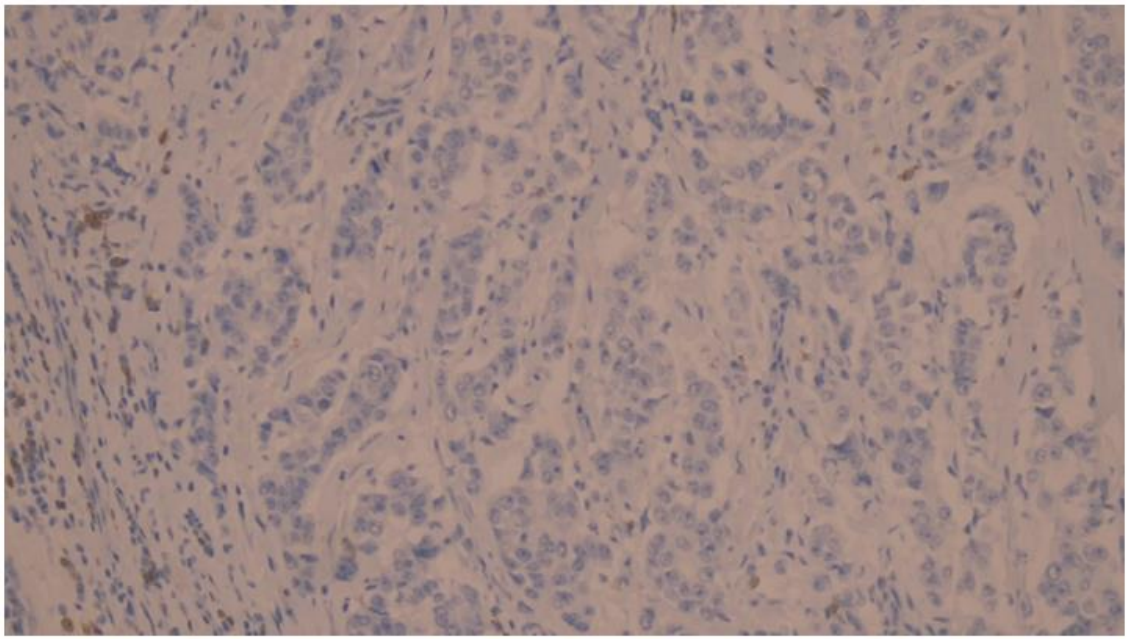
Olgularımızda CD8 immünekspresyonu gösteren TIL'ler stromal ve intratümöral kompartmanlar için ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 25-28, Tablo 14).

Prognostik parametrelere bakılmaksızın stromal CD8(+) TIL; median değeri %25 (Mean±SD 28,1±20,3) minimum 0, maksimum %75 idi.

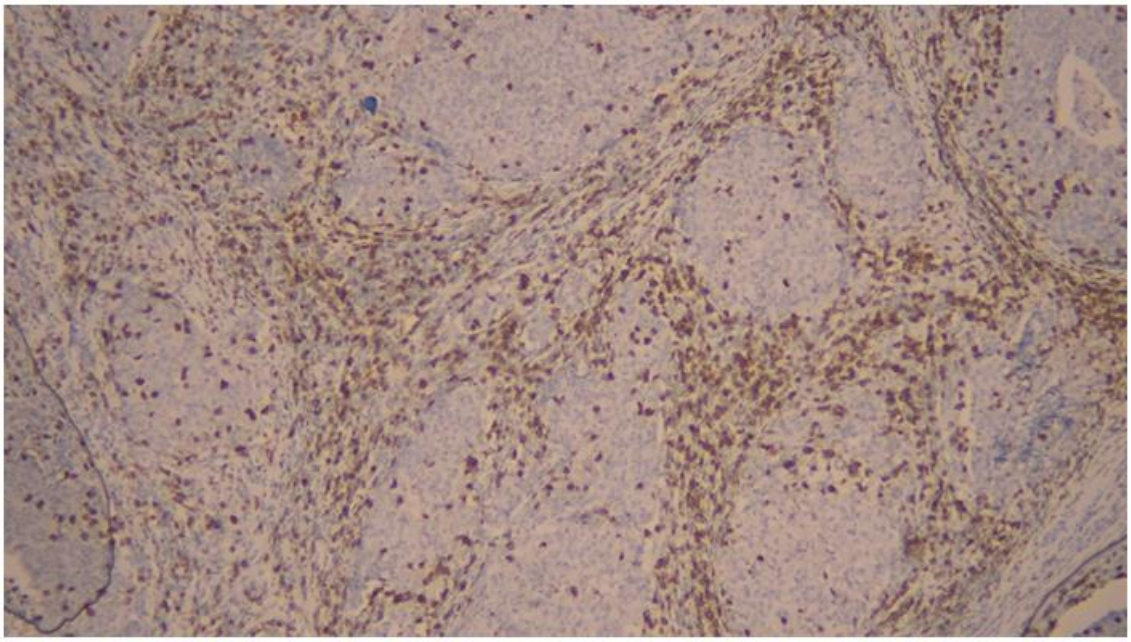
Prognostik parametrelere göre stromal CD8(+) TIL değeri ile tümör boyutu (p: 0,934), lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı (p: 0,248 ve p: 0,602) perinöral invazyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu (p: 0,960) Yaşayan olgularda stromal CD8(+) TIL değerleri median %30 (minimum 0, maksimum %75) olup, eksitus olan olgularda stromal CD8(+) TIL değerleri ortalama %10 (minimum 0, maksimum %45) idi. Yaşayan ve eksitus olan olguların stromal CD8(+) TIL değerleri karşılaştırıldığında yaşayan olgularda daha yoğun CD8(+) TIL varlığı dikkati çekti ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,003).

Aynı şekilde prognostik parametrelere bakılmadan intratümöral CD8(+) TIL medyan değeri %5 (Mean±SD 7,84±7,5) minimum 0, maksimum %28 idi.

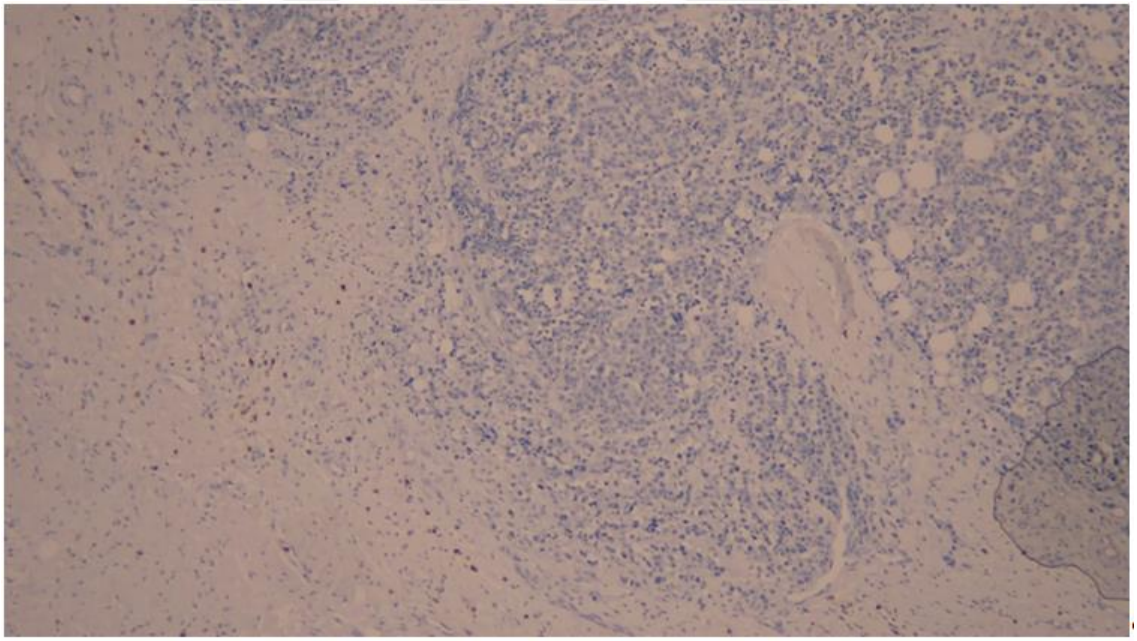
Prognostik parametreler ile intratümöral CD8(+) TIL değerlendirmesine bakıldığında tümör boyutu ile intratümöral CD8(+) TIL varlığı ve (p:0,756) lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı varlığı (p: 0,243 ve p:0,456) perinöral invazyon varlığı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p:0,906). Yaşayan olgularda intratümöral CD8(+) TIL değeri medyan %6, eksitus olan olgularda %2 idi. Yaşayan ve eksitus olan olguların intratümöral CD8 (+) TIL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki dikkati çekti (P:0,002).



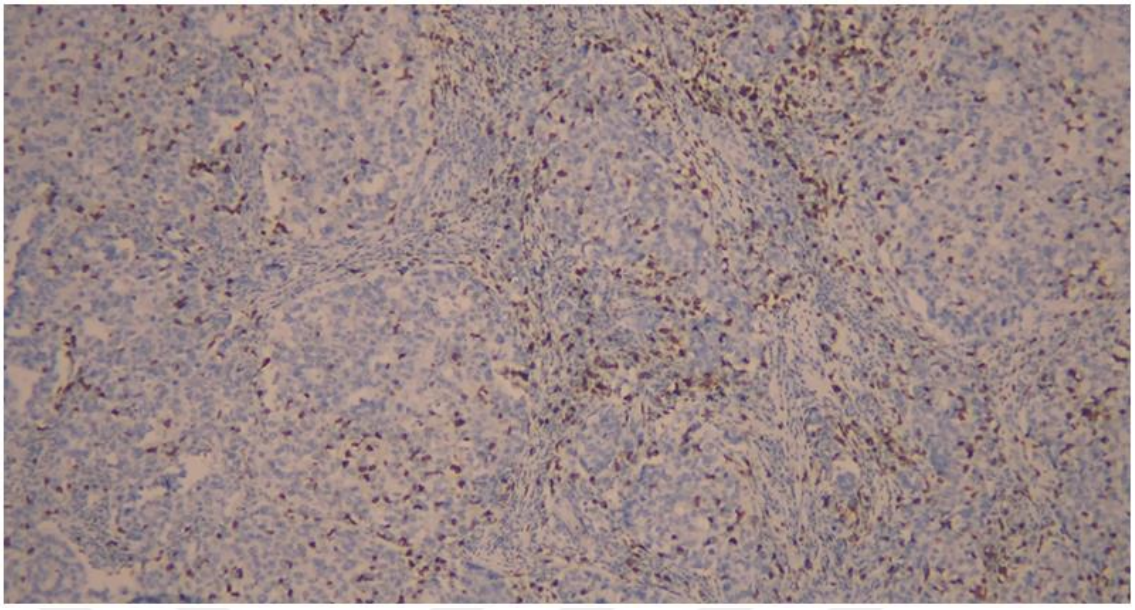
Şekil 25. Stromal CD8 (+) TIL (x200 büyütme)



Şekil 26. Stromal CD8(+) TIL (x100 büyütme)



Şekil 27. İntratümoral CD8 (+) TIL (x100 büyütme)



Şekil 28. İntratümöral CD8 (+) TIL (x100 büyütme)

4.2.5.2. FOXP3

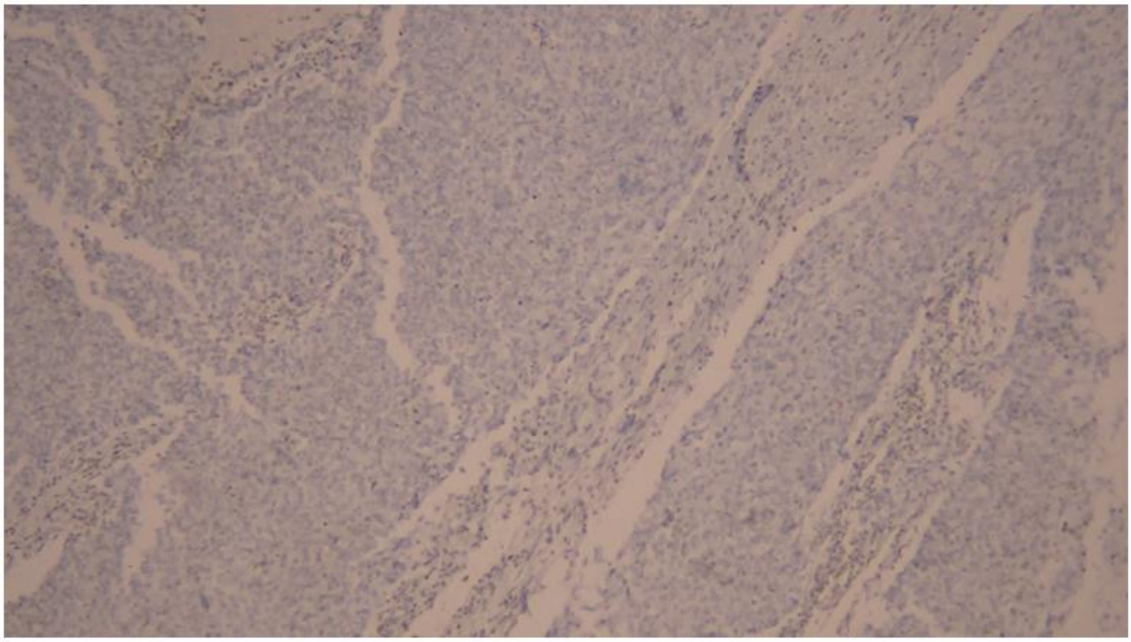
FOXP3 ile intratümöral ve stromal T reg hücreler ve tümör hücreleri değerlendirildi (Şekil 29-32; Tablo 14).

Prognostik parametrelere bakılmaksızın stromal FOXP3(+) TIL; median değeri %20 (Mean±SD 19,9±14,4) (minimum 0, maksimum %55) idi. İntratümöral FOXP3(+)TIL değerleri; median değeri %3 (Mean±SD 5,42±6,8) (minimum 0, maksimum %40) idi.

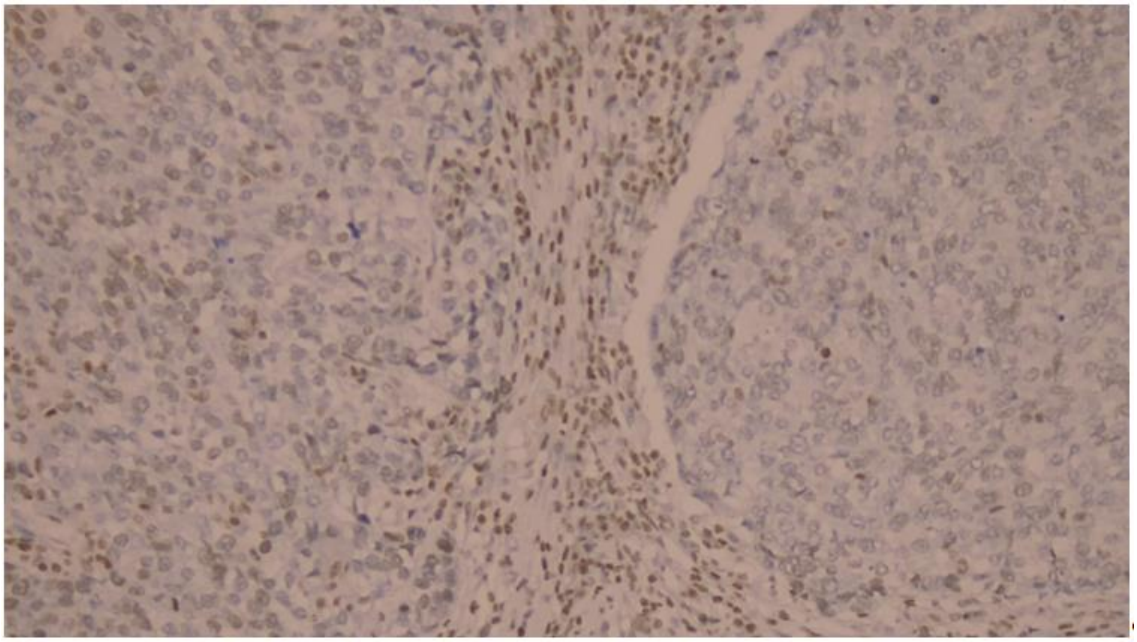
Tümör boyutuna göre hem stromal hem de intratümöral FOXP3(+) TIL değerleri ile tümör boyutu (p: 0,102 ve p: 0,144) lenfovasküler invazyon varlığı (p:0,119 ve p:0,632) lenf nodu metastazı varlığı (p: 0,269) (p:0,514) perinöral invazyon varlığı (p:0,539 ve p:0,778) ve sağkalım ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi (p:0,887) (Tablo 13).

Tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyon varlığı prognostik parametrelere bakılmaksızın değerlendirildiğinde medyan değeri %5 (Mean±SD 25,9±34,5) (minimum 0, maksimum %100) idi (Şekil 33).

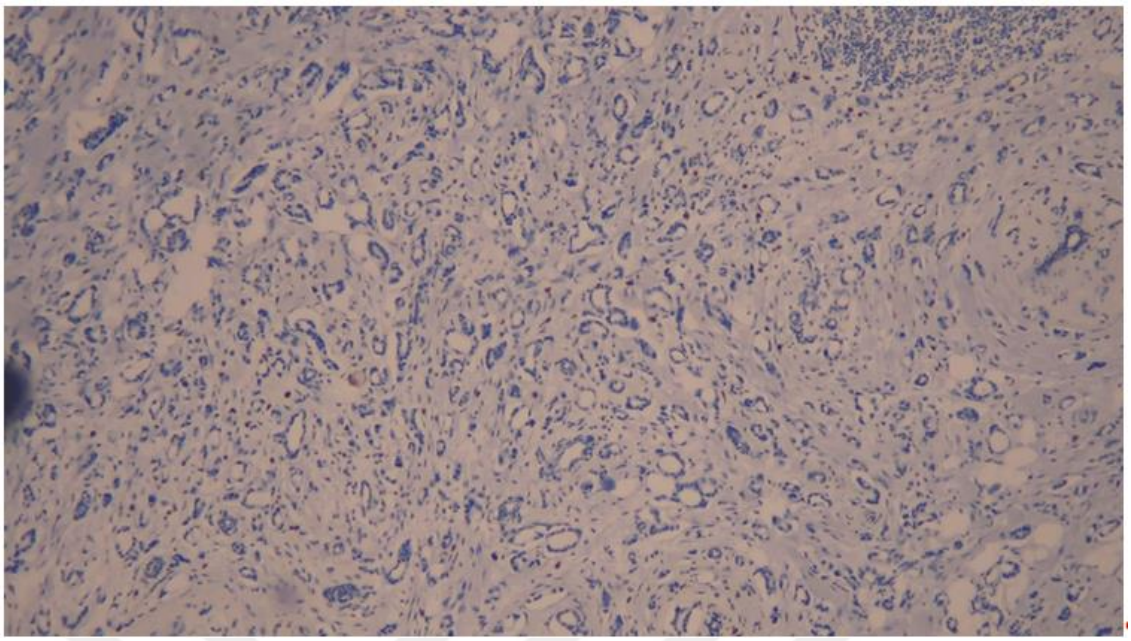
Tümör hücrelerinde FOXP3 varlığı prognostik parametrelerden tümör boyutu (p: 0,584), lenfovasküler invazyon (p:0,639) lenf nodu metastazı varlığı veya yokluğu (0,644) ve perinöral invazyon varlığı (p:1,000) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi.



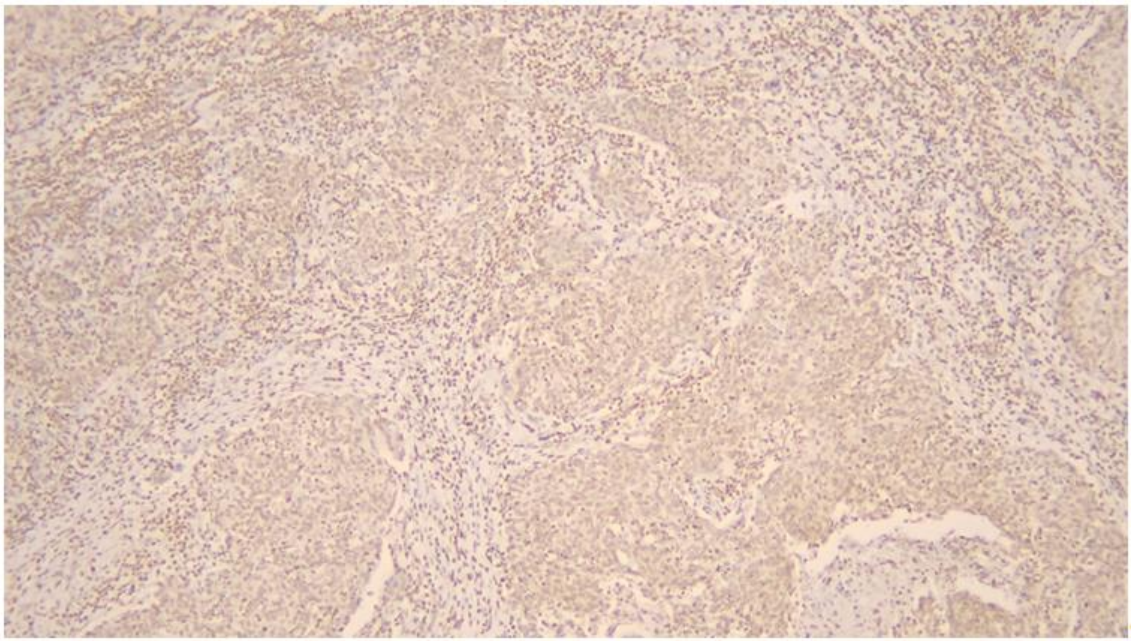
Şekil 29. Stromal FOXP3 (+) TIL (x100 büyütme)



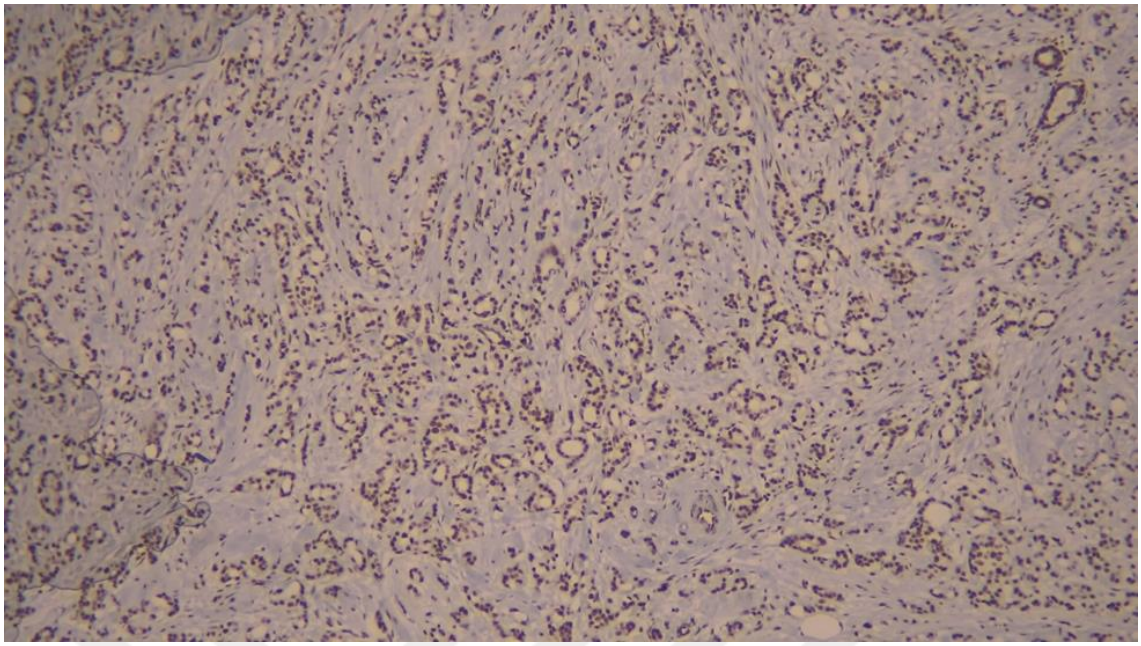
Şekil 30. Stromal FOXP3 (+) TIL (x200 büyütme)



Şekil 31. İntratümöral FOXP3(+) TIL



Şekil 32. İntratümöral FOXP3 (+)TIL (x100 büyütme)



Şekil 33. Tümör hücreleinde FOXP3 pozitifliği (x100 büyütme)

4.2.5.3. CD163

Tümör mikroçevresindeki makrofajlar da stromal ve intratümöral olarak değerlendirildi (Şekil 34-37; Tablo 14).

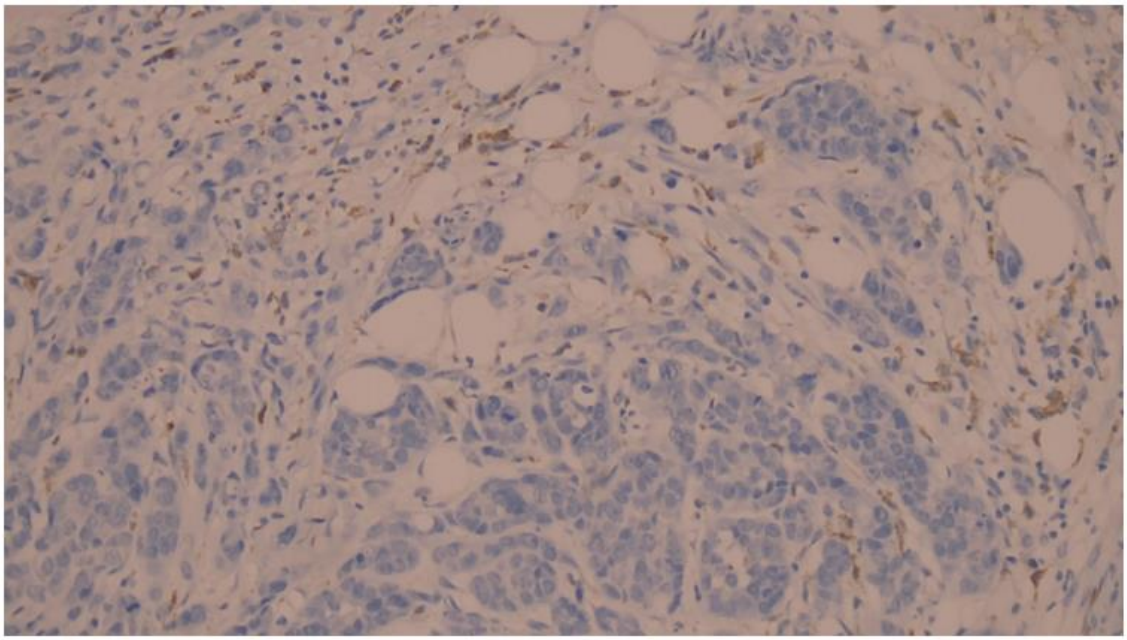
Prognostik parametrelere bakılmaksızın Stromal CD163(+)TİM medyan değeri 24 (Mean±SD 27,8±16,1) (minimum 0, maksimum 78) idi. İntratümöral CD163(+)TİM medyan değeri 8 (Mean±SD 10,7±9,2) (minimum 0, maksimum 33) idi.

Tümör ilişkili makrofajlardan stromal yerleşimli olanlar tümör boyutu (p: 0,432) lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı varlığı (p: 0,496 ve p: 0,389) Perinöral invazyon ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 13) (p:0,298).

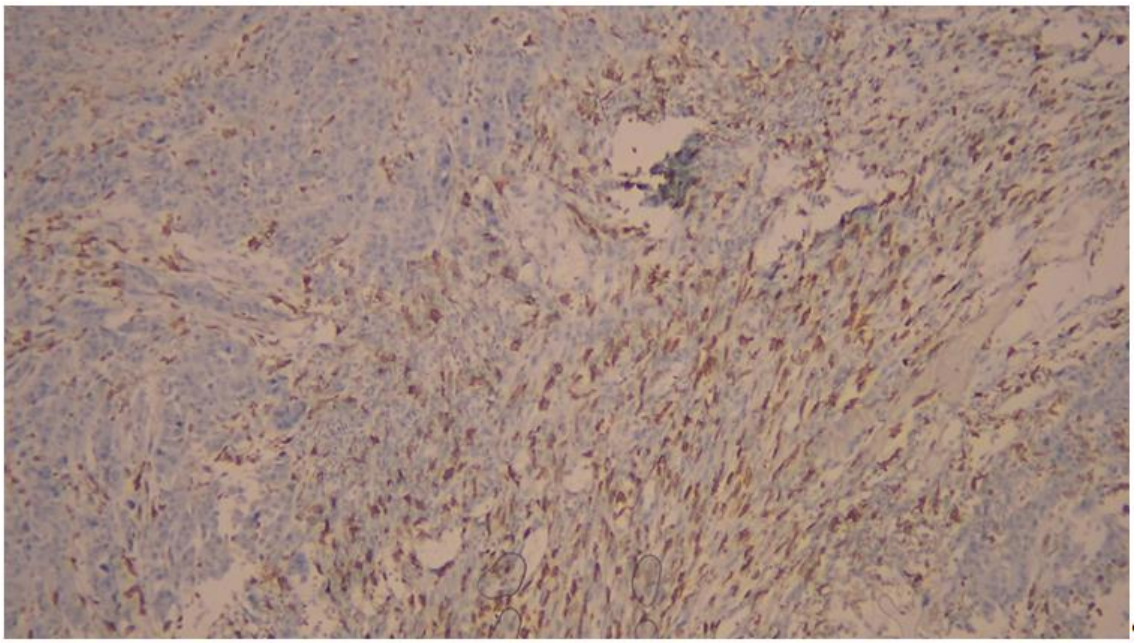
Yaşayan olgularda stromal CD163 (+) TİM değeri medyan 24 (minimum 8, maksimum 78) olup, eksitus olan olgularda stromal CD163 (+) TİM değeri medyan 17 (minimum 0, maksimum 55) idi. Aynı şekilde yaşayan olgular ile eksitus olan olgular arasında stromal CD163 (+) TİM karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (P:0,458).

Prognostik parametreler ile intratümöral CD163 (+) TİM karşılaştırıldığında; tümör boyutu (p: 0,155) lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı varlığı (p:0,368 ve p:0,430) perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu (p:0,349) Tablo 14).

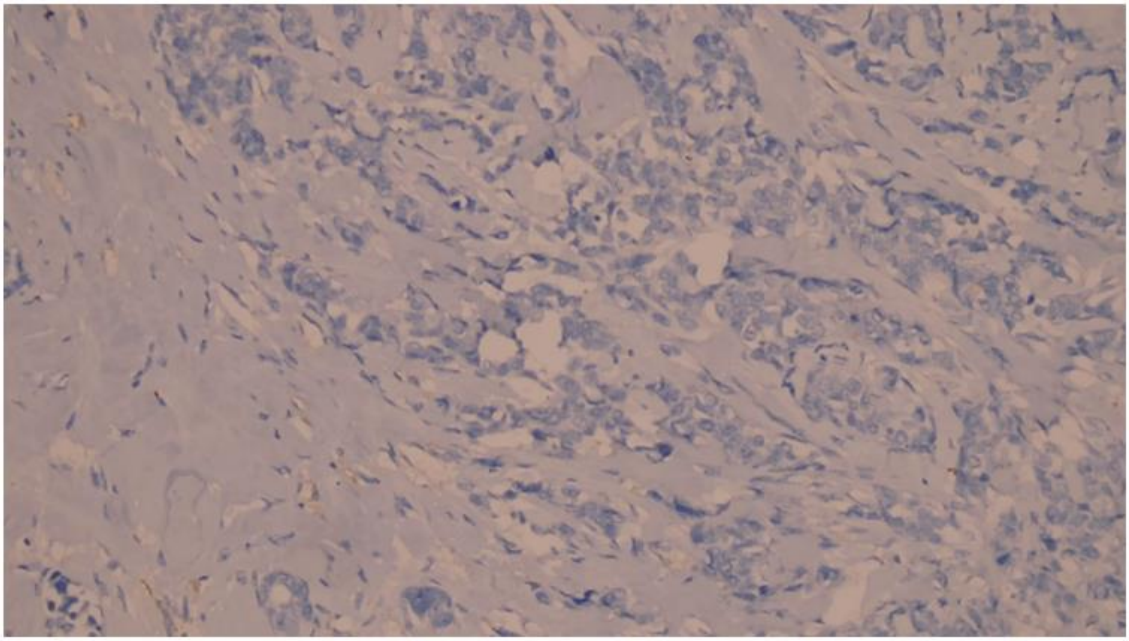
Yaşayan olgularda intratümöral CD163 (+) TİM değerleri meydan 8 (minimum 1, maksimum 33) olup, eksitus olan olgularda intratümöral CD163 (+) TİM değerleri medyan 5 (minimum 0, maksimum 22) idi ve istatistiksel olarak anlamlı değildi (P:0,535).



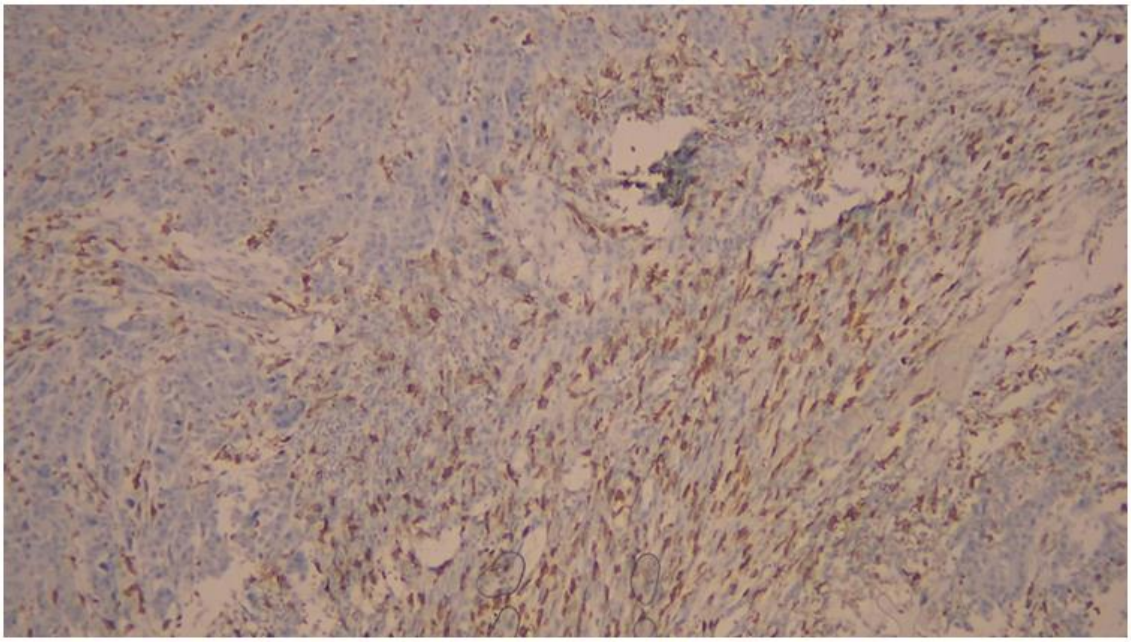
Şekil 34. Stromal CD163(+) TİM (x200 büyütme)



Şekil 35. Stromal CD163 (+)TİM (x100 büyütme)



Şekil 36. İntratümöral CD163(+) TİM (x200 büyütme)



Şekil 37. İntratümöral CD163(+) TİM (x100 büyütme)

İntratümöral ve stromal immün hücrelerin birbirleri ile immünohistokimyasal belirteçler yardımı ile karşılaştırılması.

İmmün hücrelerin birbirleri ile ilişkileri karşılaştırıldığında; intratümöral FOXP3 (+) Treg ve stromal FOXP3 (+) Treg'ler arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Ayrıca intratümöral FOXP3(+) ve stromal FOXP3(+) Treg'ler ile PD-L1, intratümöral ve

stromal CD163 (+) TİM arasında pozitif korelasyon vardı. Stromal FOXP3 (+) Treg'ler stromal ve intratümöral CD8 (+) TIL ile birlikte artış gösteriyordu ve istatistiksel olarak anlamlıydı. İmmün hücrelerde PD-L1 boyanması ile intratümöral ve stromal CD8 (+) TIL ve stromal CD163 (+) TİM arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (p: 0,014 ve p:0,035). Benzer şekilde intratümöral CD8 +TIL'ler artarken stromal CD8 (+) TIL'lerde ve intratümöral CD163 (+) TİM ve stromal CD163 (+) TİM de artış dikkati çekmiştir (p<0,05). Tablo 13'de İmmün hücrelerin birbirleri ile ilişkisi incelendi.

Tablo 13. İmmün hücrelerin birbirleri ile ilişkisi

		foxp3 S	**PD-L1 IH**	**CD8 İT**	**CD8 S**	**CD163 İT**	**CD163 S**	**ki67**
foxp3 İT	r	**0,76***	**0,48***	0,25	0,26	**0,41***	**0,36***	0,06
	p	**0,0001**	**0,0001**	0,079	0,067	**0,003**	**0,008**	0,696
foxp3 S	r		**0,43***	**0,30***	**0,34***	**0,29***	**0,28***	0,06
	p		**0,001**	**0,035**	**0,014**	**0,040**	**0,044**	0,657
PD-L1 IC	r			**0,41***	**0,51***	0,27	**0,37***	0,06
	p			**0,003**	**0,0001**	0,053	**0,008**	0,660
CD8 İT	r				**0,81***	0,13	0,13	-0,21
	p				**0,0001**	0,345	0,356	0,147
CD8 S	r					0,12	0,27	-0,24
	p					0,419	0,056	0,091
CD163 T	r						**0,85***	**0,62***
	p						**0,0001**	**0,0001**
CD163 S	r							**0,51***
	p							**0,0001**

İT: intratümöral, S: Stromal

Tablo 14. Verilerin genel dağılımı

	N	**Mean±SD**	**Median**	**Min-Max**
Yaş	52	48,0±11,9	47	32-83
İntratümöral FOXP3+ TIL	52	5,42±6,8	3	0-40
Stromal FOXP3 + TIL	52	19,9±14,4	20	0-55
Tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu	52	25,9±34,5	5	0-100
İntratümöral CD8+TIL	52	7,84±7,5	5	0-28
Stromal CD8+TIL	52	28,1±20,3	25	0-75
İntratümöral CD163+ TİM	52	10,7±9,2	8	0-33
Stromal CD163 + TİM	52	27,8±16,1	24	0-78
İmmün hücrelerde PD-L1 ekspresyonu	52	5,92±10,7	0	0-40
Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu	52	1,12±4,7	0	0-30

Tablo 15. Lenfovasküler invazyon ve TM boyutları ile ilgili parametreler arasındaki farklılıklar

	Lenfovasküler invazyon yok		Lenfovasküler invazyon var		p	Tm≤2 cm		Tm>2cm		p
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Patolojik Nodal evre										
pN0	32	94,1	3	16,7		10	62,5	15	57,7	0,766
pN1	2	5,9	12	66,7	**0,0001**	6	37,5	8	20,7	
pN2	0	0,0	2	11,1		0	0,0	2	7,6	
pN3	0	0,0	1	5,6		0	0,0	1	3,8	
Patolojik T evresi										
pT1	19	55,9	5	27,8		24	100,0	0	0	**0,0001**
pT2	14	41,2	10	55,6	0,066	0	0,0	24	85,7	
pT3	1	2,9	3	16,7		0	0,0	4	14,3	
Lateralite										
Sağ	16	50,0	7	38,9	0,559	13	56,5	10	37,0	0,274
Sol	16	50,0	11	61,1		10	43,5	17	67,0	
Histolojik tip										
Özel tip meme karsinomu	3	8,8	2	11,1		3	12,5	2	7,1	0,993
İnvaziv karsinom NST	28	82,4	12	66,7	0,398	19	79,1	21	75	
Metaplastik karsinom	3	8,8	3	16,7		2	8,3	4	14,2	
Lobüler karsinom	0	0,0	1	5,6		-	-	1	3,5	
mbng										
2	3	9,7	1	7,1	1,000	3	13,6	1	4,3	0,599
3	28	90,3	13	92,9		19	86,3	22	95,6	
TIL										
Düşük	9	26,5	7	38,9		7	29,2	9	32,1	0,941
Orta	12	35,3	7	38,9	0,460	8	33,3	11	39,3	
Yüksek	13	38,2	4	22,2		9	37,5	8	28,6	
PD-L1 IC										
İHS-0	14	41,2	13	72,2		10	41,6	17	60,7	0,563
İHS-1	6	17,6	2	11,1	0,130	3	12,5	5	17,9	
İHS-2	5	14,7	0	0,0		4	17	1	3,5	
İHS-3	9	26,5	3	16,7		7	29,2	5	17,9	
PD-L1 IC										
Negatif	14	41,2	13	72,2	0,044	10	41,6	17	60,7	0,274
Pozitif	20	58,8	5	27,8		14	58,4	11	39,3	
Th skor										
0	29	87,9	16	88,9		21	87,5	25	89,3	0,671
1	2	6,1	2	11,1	0,479	1	4,2	3	10,7	
2	2	6,1	0	0,0		2	8,3	0	0	
Perinöral	2	5,9	2	11,1	0,602	1	5,9	3	8,6	0,717
Lenf nodu metastazı	2	5,9	15	83,3	**0,001**	6	33,3	11	32,5	0,424
Lenfovasküler invazyon						5	29,4	13	37,1	0,100

Tablo 16. Verilerin genel dağılımı ile gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi

	Perinöral invazyon yok	Perinöral invazyon var	p	Lentovasküler invazyon yok	Lentovasküler invazyon var	p	Tm≤2 cm	Tm>2cm	p
Yaş	47 (32-83)	33 (32-83)	**0,001**	34 (32-70)	49 (32-83)	0,603	47 (32-73)	45 (32-83)	0,451
İntratümöral FOXP3+ TIL	3 (0-20)	4 (1-40)	0,778	4 (0-40)	3 (1-20)	0,632	2 (0-10)	4 (1-40)	0,144
Stromal FOXP3 + TIL	20 (0-55)	13 (5-30)	0,539	20 (0-55)	13 (3-45)	0,119	11 (0-30)	20 (1-55)	0,102
Tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu	5 (0-100)	10 (0-90)	1,000	5 (0-100)	2 (0-80)	0,639	2 (0-90)	5 (0-100)	0,584
İntratümöral CD8+TIL	5 (0-28)	6 (0-25)	0,906	6 (0-28)	5 (0-22)	0,243	6 (1-17)	5 (0-28)	0,756
Stromal CD8+TIL	25 (0-75)	25 (0-75)	0,960	25 (0-75)	20 (0-65)	0,248	25 (5-60)	25 (0-75)	0,934
İntratümöral CD163+ TİM	7 (1-33)	19 (0-32)	0,349	9 (1-33)	6 (0-23)	0,368	3 (1-33)	10 (0-33)	0,155
Stromal CD163 + TİM	23 (5-58)	45 (0-78)	0,298	23 (8-78)	27 (0-42)	0,496	21 (8-55)	24 (0-78)	0,432
Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu	0 (0-30)	0 (0-0)	0,698	0 (0-30)	0 (0-5)	0,860	15 (0-15)	0 (0-30)	0,782
İmmün hücrelerde PD-L1 ekspresyonu	1 (0-40)	0 (0-30)	0,631	2 (0-40)	0 (0-30)	**0,049**	1 (0-30)	0 (0-40)	0,507

Tablo 17. Lenf nodu metastazına varlığına göre karşılaştırmalar

		yaş	İntratümör CD8+ TIL	Stromal CD8+TIL	İntratümöral CD163+ TİM	Stromal CD163 + TİM	İntratümöral FOXP3+ TIL	Stromal FOXP3 + TIL	Tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu
Lenf nodu metastazı yok	N	25	25	25	25	25	25	25	25
	Median	46	5	25	8	22	4	2	0
	Minimum	32	1	0	1	8	1	1	0
	Maximum	83	28	60	33	55	20	55	100
Lenf nodu metastazı var	N	17	17	17	17	17	17	17	17
	Median	50	5	15	5	22	3	12	10
	Minimum	32	0	0	0	0	1	3	0
	Maximum	74	22	65	23	42	20	50	90
p		*0,359*	*0,456*	*0,602*	*0,430*	*0,389*	*0,514*	*0,269*	*0,644*

Tablo 18. Lenf nodu metastazı ve mortalite bulguları ile ilgili parametreler arasındaki farklılıklar

	Lenf nodu metastazı yok		Lenf nodu metastazı var		p	Yaşıyor		Ex		p
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Patolojik Nodal evre										
pN0	35	100,0	0	0,0		31	72,1	4	44,4	0,188
pN1	0	0,0	14	82,4	**0,001**	9	20,9	5	55,6	
pN2	0	0,0	2	11,8		2	4,7	0	0,0	
pN3	0	0,0	1	5,9		1	2,3	0	0,0	
Patolojik T evresi										
pT1	18	51,4	6	35,3		22	51,2	2	22,2	0,103
pT2	15	42,9	9	52,9	0,486	19	44,2	5	55,6	
pT3	2	5,7	2	11,8		2	4,7	2	22,2	
Histolojik tip										
Özel tip meme karsinomu	3	8,6	2	11,8		4	9,5	0	0,0	0,304
İnvaziv karsinom NST	30	85,7	10	58,8	0,094	32	76,2	9	100,0	
Metaplastik karsinom	2	5,7	4	23,5		6	14,3	0	0,0	
Lobüler karsinom	0	0,0	1	5,9						
mbng										
2	3	9,1	1	8,3	1,000	3	7,7	1	12,5	0,539
3	30	90,9	11	91,7		36	92,3	7	87,5	
TIL										
Düşük	7	28,0	6	35,3		11	27,3	5	55,6	0,153
Orta	11	44,0	7	41,2	0,874	16	36,4	3	33,3	
Yüksek	7	28,0	4	23,5		16	36,4	1	11,1	
PD-L1 IC										
İHS-0	15	42,9	12	70,6		20	46,5	7	77,8	0,354
İHS-1	6	17,1	2	11,8	0,198	7	16,3	1	11,1	
İHS-2	5	14,3	0	0,0		5	11,6	0	0,0	
İHS-3	9	25,7	3	17,6		11	25,6	1	11,1	
PD-L1 IC										
Negatif	11	42,9	12	70,6	0,120	20	46,5	7	77,8	0,143
Pozitif	14	57,1	5	29,4		23	53,5	2	22,2	
TH skor										
TH 0	30	88,2	15	88,2		36	85,7	9	100,0	0,483
TH 1	2	5,9	2	11,8	0,472	4	9,5	0	0,0	
TH 2	2	5,9	0	0,0		2	4,8	0	0,0	
Tümör boyutu										
≤2cm						22	32,6	2	22,2	0,223
>2cm						21	67,4	7	77,8	
Perinöral						3	7,0	1	11,1	0,791
Lenf nodu metastazı						12	27,9	5	55,6	0,113
Lenfovasküler invazyon						12	27,9	6	66,7	**0,050**

MORTALİTE 52 olgunun ortanca takip süresi 33 (1-65) olup klinik takiplerinde lokal nükse rastlanmazken, beş olguda (%9,6) uzak metastaz saptandı. Olguların 9'unun

(%17.3) takiplerde exitus olduğu tespit edildi. Mortaliteye göre sonuçlar değerlendirildiğinde, sadece stromal ve intratümöral CD 8(+) TIL son uçları ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında istatistik anlamlı olarak fark saptandı. Mortaliye göre immün hücrelerin ekspresyon durumları Tablo 19'da incelendi.

Eksitus olan olguların stromal ve intratümöral CD8(+) TIL ortanca değerlerinin yaşayanlara göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu; ölenlerin lenfovasküler invazyon oranlarının daha yüksek olduğu saptandı (p: <0,050).

Olgularda mortalite tümör evresi, lenf nodu evresi, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, perinöral invazyon ve histololojik tip ile eksitus olan ve sağ kalan olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (Tablo 19).

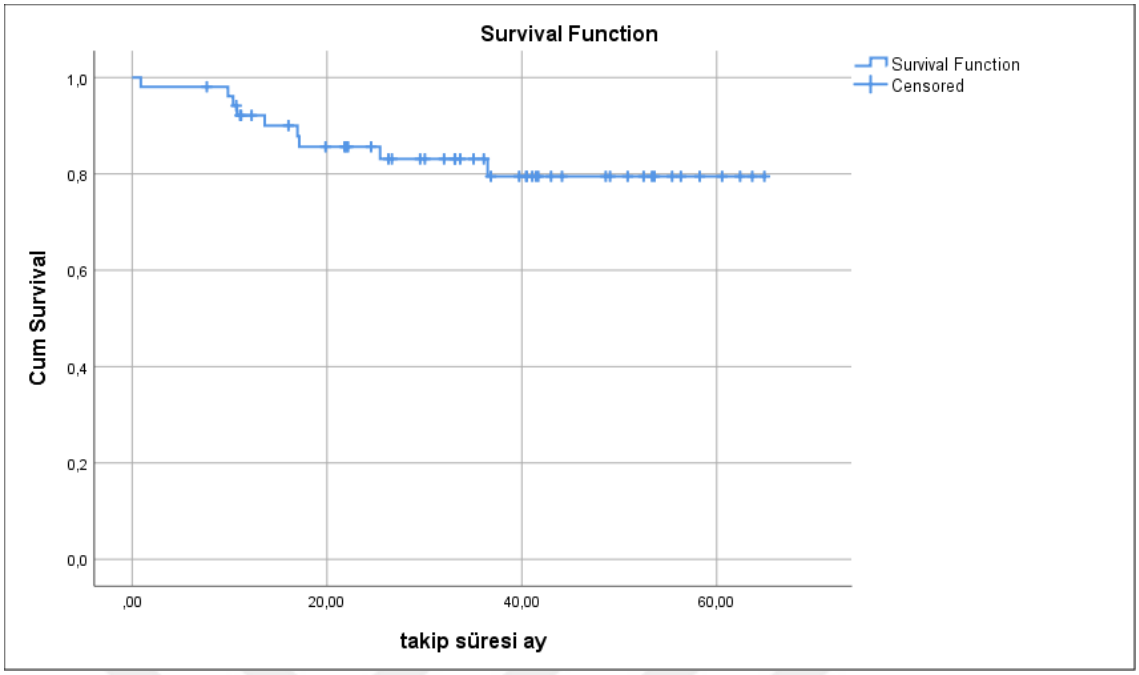
TIL yoğunluğu, PD-L1 immün hücre ve tümör hücre boyanması ile eksitus olan ve sağ kalan olgular arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0,153 ve p:0,143).

Tablo 19. Mortaliteye göre immün hücrelerin ekspresyon durumları

	Yaşıyor	**Ex**	**p**
Yaş	47 (32-73)	44 (32-83)	0,706
foxp3 İT	3 (0-40)	3 (1-10)	0,887
foxp3 S	20 (0-55)	10 (5-25)	0,327
foxp3 T	5(0-100)	22,5 (0-90)	0,794
CD8 İT	6 (0-28)	2 (0-5)	**0,002**
CD8 S	30 (0-75)	10 (0-45)	**0,003**
CD163 T	8 (1-33)	5 (0-22)	0,535
CD163 S	24 (8-78)	17 (0-55)	0,458
PD-L1 th	0 (0-30)	0(0-0)	0,519
PD-L1 ih	1 (0-40)	0(0-30)	0,142
Ki-67	60(10-90)	70(20-90)	0,156

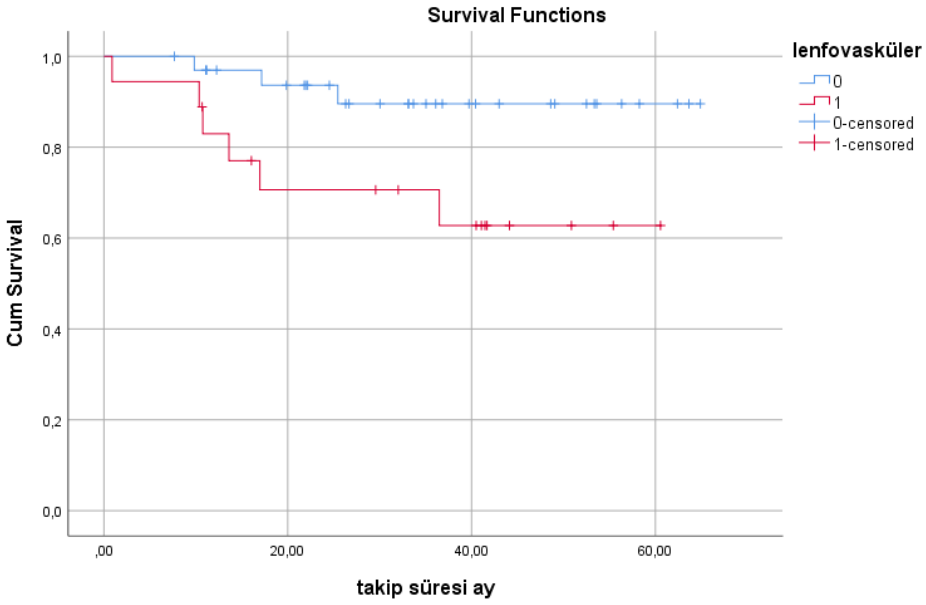
SAĞKALIM ANALİZLERİ

Çalışmaya dahil edilen hastaların tahmini yaşam sürelerinin 55.2±2.9 ay; 1 yıllık surveylerinin %90, 3 yıllık surveylerinin %83.1, 5 yıllık surveylerinin de %79.5 olduğu saptanmıştır.



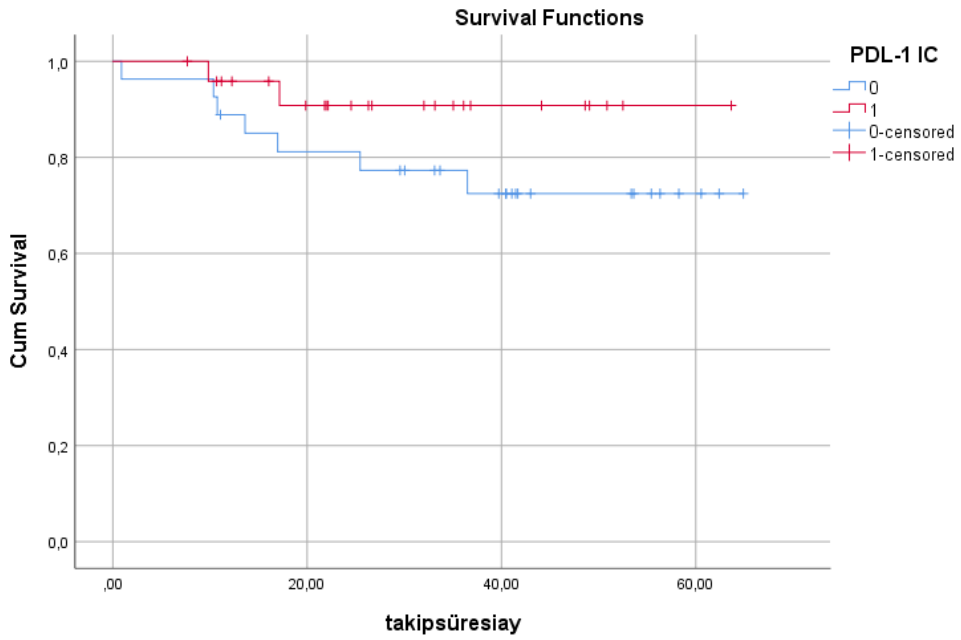
Şekil 38. Ortalama yaşam sürelerinin incelenmesi

Lenfovasküler invazyon gelişen hastaların tahmini yaşam sürelerinin 44.0±5.5 ay; lenfovasküler invazyon gelişmeyen hastaların tahmini yaşam sürelerinin 60.0±2.7 ay olduğu saptanmıştır. Lenfovasküler invazyon gelişen hastaların 3 yıllık surveylerinin %62.8; lenfovasküler invazyon gelişmeyen hastaların 3 yıllık surveylerinin % 89.6 olduğu saptanmıştır (p=0.031).



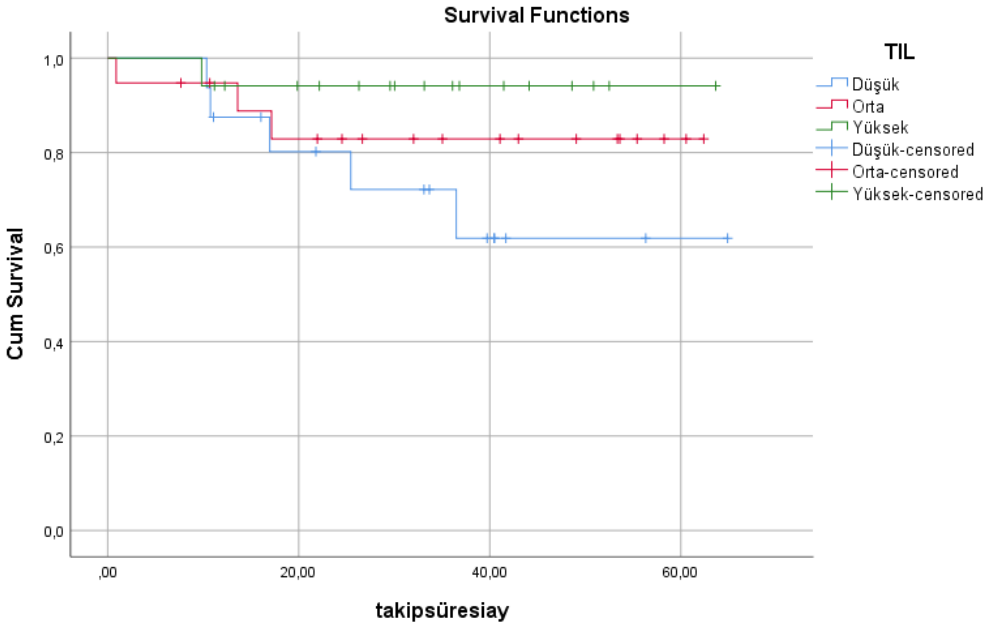
Şekil 39. Lenfovasküler varlığı ile ortalama sağkalım arasındaki ilişki

PD-L1 IH pozitif hastaların tahmini yaşam sürelerinin 59.1±3.1 ay; PD-L1 IH negatif hastaların tahmini yaşam sürelerinin 51.8±4.3 ay olduğu saptanmıştır. PD-L1 IH pozitif hastaların 3 yıllık surveylerinin % 90.8; PD-L1 IH negatif hastaların 3 yıllık surveylerinin % 72.5 olduğu saptanmıştır (p=0.179), (Şekil 40).



Şekil 40. PD-L1 IH varlığı ile ortalama sağkalım arasındaki ilişki (kırmızı çizgi (1) PD-L1 pozitif olgular, mavi çizgi (0) PD-L1 negatif olgular)

TIL düşük olan hastaların tahmini yaşam sürelerinin 48.5±5.9 ay; TIL orta olan hastaların tahmini yaşam sürelerinin 53.6±4.7 ay; TIL yüksek olan hastaların tahmini yaşam sürelerinin 60.5±3.1 ay olduğu saptanmıştır. TIL düşük olan 3 yıllık surveylerinin % 61.9; TIL orta olan hastaların 3 yıllık surveylerinin % 82.9; TIL yüksek olan hastaların 3 yıllık surveylerinin % 94.1 olduğu saptanmıştır (p=0.179).



Şekil 41. TIL sevilyeleri ile ortalama sağkalım arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür.[1,46] ÜNMK tüm karsinomların %15-20'sini oluşturmaktadır. Bu tümörler heterojen histolojik özelliklere sahiptirler ve diğer invaziv meme karsinomlarına göre daha agresif davranış gösterirler.[150] Bu tümörlerde radyoterapi ve kemoterapi ana tedavi seçenekleri olmasına rağmen daha sık rekürrens görülür. Olgularda genel sağkalım diğer luminal tip meme karsinomlarına göre daha kısadır[213] ve ÜNMK'leri daha yüksek dereceli olmaları, aksiller lenf nodu tutulumunun daha fazla görülmesi, daha genç yaşta tanı konulmaları nedeniyle diğer meme kanserlerinden ayrılırlar.[6]

Meme tümörlerinde; hasta yaşı, evre, tümör derecesi, tümör tipi, cerrahi sınır, lenfovasküler durum ve hormon reseptör durumu gibi konvansiyonel prognostik faktörlerin yanı sıra tümördeki gen ekspresyon profili ve tümör çevresindeki immün hücrelerin de prognoz üzerine etkileri yakın zamanda dikkat çeken araştırma konularındandır.[8,43,158,159,214]

Türkiye istatistiklerine göre ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınlardan %44,5'i 50-69 yaş arasında, %40,6'sı 25-49 yaş aralığında olup meme kanseri tanısı alma ortanca yaşı ise 53 olarak saptanmıştır.[46,47] Ancak ÜNMK'nin hormon pozitif gruba göre daha genç yaşta ortaya çıktığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda yaş ortalaması 48,4 ile 55 arasında değişkenlik göstermektedir.[7,21,157,215-219] Çalışmamızdaki en genç hasta 32, en yaşlı hasta 83 yaşında olup, olgularımızın yaş ortalaması 48 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda olguların %55,7 si 49 yaş altında, %44,3'ü 50 yaş ve üzerindedir. Yaş ortalamasına bakıldığında verilerin literatür ile uyumlu olduğu dikkat çekmektedir. Yaşayan olgular ile eksitus olan olguların yaşları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak yaşayan olguların yaş ortalaması 47 (32-73), eksitus olan olguların yaş ortalaması 44 (32-83) olup eksitus olan olgularda yaş ortalamasının diğer gruba göre daha genç olduğu dikkati çekmiştir.

Meme tümörlerinde tümör boyutu ve tümör boyutu ile belirlenen patolojik evre önemli bir prognostik parametredir. ÜNMK'ler ile ÜNMK-dışı tümörlerin boyutları karşılaştırıldığında ÜNMK'ler ortalama tümör boyutu daha büyük olarak saptanmaktadır. Dent ve ark.'nın çalışmalarında ÜNMK olgularının üçte ikisinde

(%62,7) tümör boyutu 2 cm'den büyük olarak bildirilmiştir.[157] Literatürde ÜNMK'lerin pT evrelerinin dağılımına bakıldığında pT1 ve 2'nin; pT3'e göre daha fazla yer aldığı görülmüştür.[7,157,220,221] Bizim çalışmamızda olguların %53,8'inde tümör boyutu 2 cm'den büyüktür. Tüm olguların %46,2'si pT1, %46,2'si pT2 ve %7,7'si pT3 ve eksitus olan olguların %55,6'sı pT2 ve %22,2'si pT3 şeklinde saptandı. Çalışmamızdaki olguların büyük kısmı literatür ile uyumlu olarak pT1 ve pT2'de yer almaktaydı.

Meme tümörlerinde bir diğer önemli prognostik parametre LVİ ve lenf nodu metastaz durumudur. Literatürde çeşitli çalışmalarda ÜNMK'lerde sık LVİ bildirilmektedir ve bu oran %25 ve %48 arasında değişkenlik göstermektedir.[157,222-224] Rubovzsky ve ark. ile Königsberg ve ark. çalışmalarında LVİ'nin kısa sağkalımla ve büyük tümör boyutu ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir.[224,225] Ancak ÜNMK ile ÜNMK-dışı tümörlerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada; LVİ ve lenf nodu metastazı varlığı arasında prognoz açısında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.[157] Bizim çalışmamızda ise olguların 18'inde (%34,6) LVİ, lenf nodu eksizyonu yapılan olguların 17'sinde (%32,7) lenf nodu metastazı tespit edildi. Yaş ile LVİ varlığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmadı (p:0,603). Ancak LVİ'nin nisbeten tümör boyutu 2 cm'den küçük olgularda daha az, 5cm'den büyük olgularda ve ileri yaşta daha fazla görüldüğü dikkati çekti. LVİ gelişen olguların tahmini yaşam süreleri 44 ay iken LVİ görülmeyen olguların tahmini yaşam süresi 60 ay olarak saptandı. LVİ görülen olgularda görülmeyen olgulara göre sağkalım oranları daha düşüktü ve bu istatistiksel olarak anlamlı idi. (p: 0,031)

Patolojik nodal evre metastatik lenf nodunun yerleşimine ve sayısına göre belirlenen bir parametredir. Literatürdeki ÜNMK'ler ile yapılan birçok çalışmada yaklaşık olarak olguların üçte birinde (%28-38) LN metastazı varlığı dikkat çekmektedir.[157,221,222,225,226] Bizim çalışmamızda olguların %80,8'inde lenf nodu eksizyonu yapılmış; nodal evreleri %48,1'i pN0, %26,9'u pN1, %3,8'i pN2 ve %1,9'u pN3 olarak saptanmıştır. Patolojik nodal evre ile yaş ve tümör boyutu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p:0,188).

TNM klinik evreleme sistemi; tümör boyutu, lenf nodu ve metastaz durumu gibi faktörlerin bir araya toplandığı ve bu parametrelere göre tedavi kararının belirlendiği en önemli prognostik faktördür. ÜNMK'lerde yapılan çalışmalarda klinik evreleri 1 ve 2 olan olguların; evre 3'e göre daha fazla yer aldığı gözlenmektedir.[7,220,221,227-229] Bizim çalışmamızda da olguların %90,4'ü evre 1 ve 2, %9,6'sı evre 3 şeklinde idi.

Meme tümörlerinde histolojik tip bir başka prognostik faktördür. Ancak ÜNMK farklı histolojik tiplerden oluşan heterojen bir grubu kapsamaktadır. İnvaziv karsinom NST en çok rastlanan histolojik tip olup bunu invaziv lobüler karsinom ve metaplastik karsinom takip etmektedir.[21,46,47,216,218,230,231] Çalışmamızda olguların %76,9'unu invaziv karsinom NST, %11,5'ini metaplastik karsinom ve kalan %11,6'sını mikropapiller, papiller, adenoid kistik karsinom, apokrin diferansiyasyon gösteren invaziv karsinom ve invaziv lobüler karsinom oluşturmaktaydı. Tümör tipi ile sağkalım, tümör boyutu, LVİ, LN metastazı, pT ve pN evresi gibi prognostik faktörler arasında istatistiksel olarak herhangi bir ilişki saptanmadı.

Meme tümörlerinde histolojik derecelendirme için farklı derecelendirme sistemleri kullanılmaktadır. Literatürde histolojik derecelendirmenin prognostik önemini vurgulayan çalışmalardan biri olan Henson ve ark.'larının yaptığı çalışmada 22.616 meme kanseri olgusundan evre 2- histolojik derece 1 olan olgular ile evre 1- histolojik derece 2 olguların benzer prognoz gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca 2cm'den küçük tümör boyutu olan derece 1 olguların lenf nodu metastazı olsa bile prognozlarının çok iyi olduğuna dikkati çekmişlerdir ve bu çalışmada hastalık evresi ile birlikte histolojik derecenin kullanılmasının klinik gidişi öngörmedeki başarıyı arttırdığı sonucuna varılmıştır.[232] ÜNMK'ler ise genellikle yüksek dereceli tümörlerdir ve çalışmalarda ÜNMK'lerin %66-96'sının derece 3 olduğu bildirilmiştir.[233-235]

Çalışmamızda histolojik derecelendirme MBNG sistemi kullanılarak belirlendi ve olguların %91,1'i nükleer derece 3, diğerleri derece 2 şeklinde gruplandırıldı. Nükleer derece ile sağkalım, tümör boyutu, LVİ ve lenf nodu metastazı, arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p:>0,05).

Bir diğer prognostik parametre olabileceği öngörülen parametre de tümöre karşı gelişen immün yanıttır. Bu immün yanıt tümör mikroçevresini oluşturmaktadır. Tümör mikroçevresinin immün hücreleri lenfositler ve makrofajlardır, ancak lenfositler baskın grubu oluştururlar ve bunlar tümör infiltre eden lenfositler (TIL) olarak adlandırılırlar. Mikroçevre içinde immün hücreler birbirlerini sitokin ve/veya reseptörler aracılığı ile aktive ya da inhibe ederler. Tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin yoğunluğu, alt popülasyonların oranları ve birbirleri ile ilişkileri prognoz ve sağkalım açısından önemlidir.[9,172] TIL'ler tüm meme kanserlerinde görülür ancak ÜNMK'lerde prognoza etkisi daha fazladır.[236] Çeşitli çalışmalardan TIL'ler ve alt popülasyonlarının dağılımı hakkında elde edilen verilerin sonucunda ÜNMK'ler için yeni tedavi seçenekleri

olabileceğine dair bilgiler ortaya çıkmıştır. Haschka ve ark. hücre proliferasyonu ve tümör mikroçevresi arasındaki ilişkinin, kanserde prognostik ve prediktif potansiyeli olduğunu ileri sürmüştür.[237]

Tümörlerde TIL skorlaması intratümöral ve stromal skor şeklinde yapılmaktadır. Ancak TIL çalışma grubu tümör hücre boyutunun küçük olduğu durumlarda intratümöral skorlamanın zor olabilmesi nedeniyle günlük pratikte sadece stromal TIL skorlamasının yapılmasını önermektedir.[161] Çalışmalarda meme karsinomlarında yoğun TIL varlığının uzun sağkalım ve kemoterapiye iyi yanıtla ilişkili olduğu bildirilmektedir.[238]

Çalışmamızda lenfositik yanıt TIL çalışma grubunun önerisi doğrultusunda değerlendirildi.[161] Olguların 16'sında (%30,8) düşük seviyede, 19'unda (%36,5) orta seviyede, 17'sinde (%32,7) yüksek seviyede TIL skoru saptandı. TIL seviyelerine göre gruplar prognostik parametreler ve PD-L1 ekspresyonu ile karşılaştırıldı. TIL seviyeleri ve klinik evre, tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve LVİ arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmadı ($p>0,05$). Ancak TIL seviyesi yüksek olan grupta daha az oranda lenf nodu metastazı görüldü. Artmış PD-L1 ekspresyonu immün hücrelerde yüksek TIL seviyesi ile birlikteydi ve bu istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$).

ÜNMK'lerde yüksek TIL seviyeleri daha iyi klinik gidiş ve uzun sağkalım ile ilişkilidir.[239,240] Bu sebeple TIL durumunun ÜNMK'ler için güçlü prognostik faktör olacağı sonucuna varılmıştır. Loi ve ark. oldukça yüksek sayıda hasta grubu ile yaptıkları çalışmalarında %10'luk intratümöral ve stromal TIL artışının ölüm riskinde sırasıyla %27 ve %17'lik bir azalmayla birlikte olduğunu saptamışlardır.[159,241-243] Çalışmamızın sağkalım analizlerinde yüksek TIL seviyesine sahip olguların sağkalımları, düşük TIL seviyesine sahip olguların sağkalımlarından daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu oran istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

Yüksek TIL seviyeleri ayrıca neoadjuvan kemoterapi sonrası patolojik tam yanıt (pCR) oranları ile de ilişkilidir.[238,244] Loi ve ark. çalışmalarında yüksek TIL seviyesini büyük tümör boyutu ile ilişkili bulurken,[159] lenf nodu metastazı ile ters orantı tespit etmişlerdir.[245] Ancak bazı çalışmalar da ise bizim çalışmamız gibi yüksek TIL seviyesi ile tümör boyutu ve lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.[10,239,240,246]

İmmün sistemin tümöre karşı yanıtında önemli noktalardan biri immün yanıt kontrol basamağı olan PD-1/PD-L1 reseptör etkileşim yolağıdır. PD-1 immün efektör

hücrelerin yüzeyinde bulunan ve tüm hücrelerde eksprese edilen transmembran bir proteindir. PD-1/ PD-L1 etkileşimi ile T hücre aktivasyonu, proliferasyonu, inflamatuar sitokinlerin salınımının inhibisyonu, apoptozis ve Treg diferansiyasyonunda artış gerçekleşmektedir. PD-1/PD-L1 yolağı esas olarak periferal T lenfosit toleransında ve inflamasyonda görev alır. Tümörlerde ise PD-L1 varlığı tümör hücrelerinin immün sistemden kaçış mekanizmalarından birisidir. Tümör PD-L1 ekspresyonunu arttırarak sitotoksik T hücresi aktivitesini engellemekte ve kendi anti-tümör immünitesini düzenlemektedir. Bu da immün hücrelerin kanser hücrelerine saldırmasını ve öldürmesini engelleyen bir mekanizmadır.[212]

Aslında PD-L1 ekspresyonu ÜNMK'lerde tümör hücrelerinden çok tümörü infiltre eden immün hücrelerde görülür ve bu yolla kansere karşı immün yanıt baskılanır.[247] Bu sebeple son yıllarda meme kanserinde PD-L1 ekspresyonu sadece prognostik açıdan değil, immünoterapinin tedavi etkinliği için de araştırmaya değer görülmektedir.[248]

Klasik kemoterapi rejimi uygulanan ÜNMK'lerde ortalama yaşam süresi değişmekle birlikte yaklaşık olarak 18 ay ya da daha az olarak bildirilmektedir. ÜNMK'lerde birincil tedavide sistemik kemoterapi ajanları kullanılmakta olup, uluslararası kılavuzlar tekli ajanlardan taksanların ya da antrasiklinlerin birinci basamak tedavide kullanımını desteklemektedir. İMpassion130 çalışmasında nab-paclitaxel tedavisine PD-L1 SP142 monoklonal antikoru olan Atezolizumab eklenmesi ile metastatik ÜNMK'lerde hastalıksız sağkalımın arttığı gösterilmiştir.[247] Atezolizumab ; PD-L1'in PD1 ve B7.1 reseptörleri ile bağlantısını inhibe etmek için tasarlanmış ve insansılaştırılmış bir monoklonal antikordur[212] ve benzeri çalışmalar üzerine önceki yıllarda Food And Drug Administration (FDA) PD-L1 (SP 142) pozitif metastatik ÜNMK olgularında Atezolizumab kullanımına onay vermiş ancak şu anda geçici bir süre ile onayı kaldırmıştır.[249]

İmmünohistokimya; PD-L1 değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmakta ve patologların tümör yapısı ve mikroçevresini birlikte değerlendirmesine olanak sağlamaktadır.[212] PD-L1 boyanma paterni ve boyandığı hücrelerin önemi, kullanılan antikor tipine göre de değişkenlik göstermektedir. PD-L1 ile ilgili çalışmaların bazılarında sadece TH, bazılarında ise hem TH hem de İH boyanması değerlendirilmiştir. Antikor seçiminin ekspresyonu yansıtmadaki önemi Karnik ve ark. tarafından araştırılmış ve Dako (22C3), Ventana (SP263) ve Bio Care (RbMCAL10)

gibi farklı antikorlar ile PD-L1 ekspresyonunu değerlendirmede anlamlı bir fark saptanmamıştır.[250] Aynı şekilde Schmidt ve ark.'ları ÜNMK olgularında üç farklı PD-L1 klonunu değerlendirdikleri çalışmada tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesi için 22C3 ve 28-8 klonunu, immün hücrelerde PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesi için SP142 klonu kullanılmıştır. 59 olgunun değerlendirildiği bu çalışmada tümör hücrelerinde PD-L1'in membranöz ve sitoplazmik boyanmasına göre negatif (0-<%1), pozitif (%1-50), güçlü pozitif (>%50) skor belirlenirken immün hücrelerde ≥%1 boyanma pozitif kabul edilmiştir. Olguların %40.7'sinde immün hücrelerde pozitiflik saptanmış, tümör hücrelerinde ise olguların %22'sinde her iki klonda pozitif membranöz boyanma izlenmiştir ve bulgular Karnik ve ark.'nın çalışmaları ile benzer şekildedir.[21,250]

Carter ve ark.'ları 499 ÜNMK'i olgusundan oluşan çalışmalarında; SP142 klonu için İHS ve 22C3 klonu için kombine skorun (CPS) prognostik parametrelerle ilişkisini değerlendirmişlerdir. Olguların %46'sında İH'de (IHS) ≥%1 boyanma saptanmıştır. PD-L1 pozitif grup PD-L1 negatif grup ile karşılaştırıldığında, PD-L1 pozitif grubun büyük tümör boyutu, yüksek lenf nodu evresi (N), yüksek histolojik derece, yüksek Ki-67 oranı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yüksek stromal TIL seviyelerinin PD-L1 pozitifliği ile korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.[251]

Aynı şekilde Huang ve ark.'larının çalışmasında PD-L1 için 22C3 ve 28-8 klonunun TH'de ekspresyonunun büyük tümör boyutu, histolojik derece, yüksek Ki-67 oranı, ER ve PR negatifliği, ÜNMK subtipi ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlar ve İH'de PD-L1 ekspresyonunun ise olumlu prognostik belirteç olabileceğini göstermişlerdir.[248] Qin ve ark. çalışmalarında 870 meme kanseri olgusunda yüksek PD-L1 ekspresyonunun genç yaş, LVİ, daha büyük tümör boyutu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Ayrıca PD-L1'in ÜNMK olgularında diğer tiplere göre daha fazla oranda pozitiflik gösterdiğini tespit etmişlerdir.[252]

Ancak Mehan ve ark. 103 invaziv meme kanseri olgusunu içeren çalışmalarında PD-1 ve PD-L1'in immün hücrelerde pozitifliğinin yaş, tümör boyutu, nodal durum, uzak metastaz, klinik evre, hormon reseptör durumu, Ki-67 proliferasyon oranı ve tümör derecesi ile ilişkili olmadığını sonucuna varmıştır.[253] Sadece ÜNMK'lerinden oluşan daha az olgu sayısına sahip başka bir çalışmada tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı, tümör derecesi gibi prognostik faktörler ile PD-L1 ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.[254]

Biz çalışmamızda SP142 klonunu kullandık. PD-L1 ile 52 olgunun 25'inde (%48,1) immün hücrelerde, 6'sında (%13,5) tümör hücrelerinde pozitif boyanma saptadık. İmmün hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu ile tümör boyutu karşılaştırıldığında; hem tümör boyutu 2 cm'den küçük olan olguların hem de tümör boyutu 2 cm'den büyük olan olguların arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit etmedik (p:0,274). Çalışmamızda LVİ olan olguların %27,8'inde PD-L1 pozitif iken LVİ olmayan olguların %58,8'inde pozitiflik dikkati çekti ve bu istatistiksel olarak anlamlı idi (p:0,044). LVİ ile PD-L1 ekspresyonunun karşılaştırılması literatür ile uyumlu olup PD-L1 pozitif olgularda LVİ daha az görülmekteydi ve PD-L1 ekspresyonu ile LVİ durumu arasında negatif yönde bir ilişki mevcuttu.

Al-jussani ve ark. ÜNMK olgularında immün hücrelerde PD-L1 ekspresyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında PD-L1 pozitifliğinin yüksek TIL ile birliktelik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ancak PD-L1 pozitifliği diğer prognostik parametreler ile ilişkili bulunmamıştır.[216] Aynı şekilde bizim çalışmamızda da yüksek TIL oranına olgularda artmış PD-L1 ekspresyonu saptanmış ve yüksek TIL skoru ve PD-L1 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Özkan ve ark.'larının 51 ÜNMK olgusundan oluşan çalışmalarında PD-L1 (SP142) ekspresyonu ile histopatolojik veriler karşılaştırıldığında immün hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonu tümör boyutu, lenf nodu metastazı, ki-67 proliferasyon indeksi ve peritümöral lenfoid folikül varlığı ile arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Ancak PD-L1 pozitifliği uzun sağkalım ile ilişkili bulunmuştur.[246] Çalışmamızda sağkalım analizleri incelendiğinde PD-L1 pozitif olguların genel sağkalım oranı PD-L1 negatif olgulardan daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. (p:0,179) Sonuç olarak PD-L1 ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda prognostik parametreler ile anlamlı sonuç elde edilememesi çalışmaların PD-L1'in prognostik bir parametre olmasından çok tedaviye yön verebilecek bir belirteç olduğu sonucunu doğrulamaktadır.

Meme tümörlerinde prognozu etkileyeceği düşünülen bir diğer önemli unsur tümör mikroçevresinde yer alan immün hücrelerdir. Tümör mikroçevresini oluşturan immün hücreler meme karsinomlarında heterojendir ve baskın grubu CD8 (+) sitotoksik T lenfositler oluşturmaktadır.[198] Sitotoksik T lenfositlerin uzun sağkalım, tedaviye iyi yanıt ve iyi prognoz ile ilişkili olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur.[206,255]

Chen ve ark. inceledikleri 50 ÜNMK olgusunda saptadıkları yüksek CD8(+) TIL düzeyinin uzun sağkalım ve küçük tümör boyutu ile ilişkili olduğunu göstermişler, ancak hasta yaşı, histolojik derece, lenf nodu metastazı ve proliferasyon indeksi ile ilişki saptamamışlardır.[256] Mahmoud ve ark.'ları moleküler alt tip ayırmaksızın baktıkları meme kanserlerinde yüksek sitotoksik TIL düzeyinin genç yaş, yüksek histolojik derece, ER/PR negatifliği ve uzun sağkalım ile ilişkili bulmuştur.[206] Matsumoto ve ark.'ları 164 ÜNMK olgusunda TIL'lerde CD4 ve CD8(+) ekspresyonunun klinik önemini araştırdıkları çalışmalarında stromal ve/veya intratümöral CD8(+) TIL seviyelerinin tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı ve histolojik subtip ile ilişkili olmadığı sadece histolojik derece ile ilişkili olduğu sonucuna varmış, sağkalım analizlerine göre de bağımsız prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir.[197]

Bizim çalışmamızda intratümöral CD8(+) TIL ortalaması %7,84±7,5 ve medyan %5, stromal CD8(+)TIL ortalaması ise %28,1±20,3 olup medyan %25 idi. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak stromal CD8(+) TIL düzeyi intratümöral CD8(+) TIL düzeyinden yüksekti. CD8(+)TIL'ler (stromal ve intratümöral) ile tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Ancak LVİ ve lenf nodu metastazı olmayan olgularda daha yüksek oranda CD8 (+) TIL varlığı dikkat çekti.

Çalışmamızda sitotoksik T lenfosit infiltrasyonu saptanmayan 2 invaziv karsinom-NST olgusu mevcuttu, bu olguların ikisinde TIL düzeyi orta yoğunlukta olup tümör ilişkili diğer immün hücrelerden FOXP3(+) Treg ve CD163(+) M2 makrofaj düzeyleri ortanca değerlerin üzerinde saptandı. Olguların biri hala hayatta olup diğer olgunun tanı aldıktan yaklaşık 10 ay sonra eksitus olduğu tespit edildi.

Yine çalışmamızda yaşayan ve eksitus olan olguların sitotoksik T lenfosit infiltrasyonlarında hem stromal komponentte hem de intratümöral komponentte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Yaşayan olguların CD8 T lenfosit infiltrasyonu eksitus olan olgulardan daha fazla idi ($p <0,05$). Tümör tiplerine göre CD8(+) TIL varlığına bakıldığında histolojik tipler ve CD8(+) TIL varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Farklı PD-L1 klonlarının kullanıldığı üç çalışmada artmış CD8(+) TIL varlığı ile PD-L1 ekspresyonu seçilen klondan bağımsız istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Artmış CD8(+) TIL görülen olgularda PD-L1 pozitifliği saptanması nedeniyle bu iki belirtecin birlikte kullanımının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.[246,257,258] Daha önce

de belirtildiği gibi çalışmamızda stromal ve intratümöral CD8(+) TIL ile PD-L1 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon dikkati çekti. İntratümöral ve/veya stromal CD8(+) TIL oranı arttığında TIL'deki PD-L1 pozitiflik oranı artmaktaydı ve sonuçlarımız literatür ile uyumlu idi.

CD8 (+) TIL'lerin immün hücreler ile ilişkisine bakıldığında intratümöral ve stromal CD8(+) TIL değerleri farklılık gösteriyordu ve aralarında pozitif korelasyon mevcuttu (p:0,0001). Ayrıca stromal FOXP3 ekspresyonunda artış görülen olgularda intratümöral ve stromal CD8 ekspresyonunda da artış izlendi ve bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı idi (p:0,035 ve p:0,014).

Tümör mikroçevresinde bir diğer önemli immün hücre grubu CD4(+) T lenfositlerdir. CD4(+) T lenfositlerin meme kanserinin progresyonundaki rolü hala netlik kazanmamıştır. Bu nedenle tümöre karşı immün yanıtta CD4(+) T lenfositlerin alt tipleri ve fonksiyonlarının anlaşılması ÜNMK'lerin immünoterapisi için önemlidir. CD4(+) T lenfositler yardımcı ve regülatuar olarak 2 ana gruba ayrılır. Regülatuar T lenfositler CD4(+) T ekspresyonu yanı sıra CD25 ve FOXP3 ekspresyonu da gösterirler. FOXP3 Treg'ler için oldukça önemli bir belirteçtir. FOXP3(+) Treg'ler otoimmün yanıtın inhibisyonunda görev aldığı ve tümöre karşı immün yanıtta görev alan CD8(+) ve diğer CD4(+) T lenfositlerin aktivitesini baskıladığı saptanmıştır.[236,259]

Benzer şekilde Shimizu ve ark.'ları tarafından farelerle yapılan çalışmalarında Treg'lerin antitümör immün yanıtı inhibe ettiğini göstermişlerdir.[260] Sutmuller ve ark.'ları Treg'lerin azalmasının etkili bir antitümör cevaba neden olduğunu saptamışlardır.[261] Literatürde over,[262] akciğer,[263] hepatosellüler[264] ve pankreas[202] kanserlerinde yüksek FOXP3(+) TIL yoğunluğunun kötü gidişle ilişkili, özefagus[265] ve kolorektal[266] kanserlerinde ise iyi sağkalımla ilişkili olduğu bulunmuştur. ÜNMK'lerinde ise tümör mikroçevresinde daha yoğun FOXP3 (+) Treg saptanmış ve bunun tümöre karşı immün yanıtı baskılayarak kötü prognoz göstergesi olduğu kabul edilmiştir.[267]

Mahmoud ve ark.'nın 1445 meme karsinomunu dahil ettikleri çalışmalarında FOXP3(+)TIL artışı ile prognostik faktörlerden tümör boyutu, lenf nodu metastazı, LVİ ve tümör derecesi istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır.[268] Bates ve ark. invaziv meme karsinomu, DCİS ve normal meme dokusu alanlarında FOXP3(+) Treg'leri inceledikleri çalışmada, invaziv ve DCİS alanlarında normal meme dokusuna göre daha fazla Treg olduğunu tespit etmişlerdir. Yüksek FOXP3 seviyesi invaziv tümörde erken

nüks ve lenf nodu metastazı ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.[267] West ve ark.'larının 175 ER negatif meme kanseri olgusunu içeren çalışması ise yüksek FOXP3 seviyelerinin uzun dönemde rekürrenssiz sağkalım (RFS) ile ilişkili olduğunu gösteren nadir çalışmalardandır.[269]

Çalışmamızda intratümöral FOXP3(+) TIL ortalaması 5,42±6,8 medyan %3, stromal FOXP3(+) TIL ortalaması 19,9±14,4 medyan %20 idi. Tüm olgularda FOXP3 ekspresyonu gösteren immün hücreler görüldü. FOXP3 (+) TIL'ler stromal ve intratümöral alanda ayrı ayrı değerlendirilmiş ve prognostik parametrelerle ve diğer immün hücreler ile oranı karşılaştırıldı. Tümör boyutu 2cm'den büyük olan olgularda intratümöral ve stromal yerleşimli FOXP3(+) T reg ortanca değerleri daha yüksekti, ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. (p:0,102) Benzer şekilde stromal FOXP3(+) Treg ortanca değerleri lenf nodu metastazı olan olgularda olmayanlara göre daha yüksekti ancak anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0,269). Yine LVİ, perinöral invazyon ve mortalite ile FOXP3(+) Treg infiltrasyonu karşılaştırıldığında sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatürdeki çalışmaların bir kısmında FOXP3(+) Treg değerleri ile tümör boyutu ve LVİ arasında bir ilişki saptanmazken,[198,255,267,270,271] ÜNMK'leri ile yapılan çalışmaların bazılarında yüksek FOXP3(+) Treg yoğunluğu; yüksek histolojik derece, lenf nodu metastazı LVİ ve uzun genel sağkalım ile ilişkili bulunmuştur.[271-273]

Stenström ve ark. Treg'lerin meme kanserine bağlı sağkalım için bağımsız prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir.[274] Liu ve ark. ise çalışmalarında yüksek FOXP3(+) TIL düzeyinin yüksek CD8 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.[255] Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak stromal FOXP3 (+) TIL'ler ile intratümöral ve stromal CD8+TIL'ler arasında pozitif korelasyon saptandı. Diğer immün hücrelerle de korelasyonlarına bakıldığında stromal FOXP3(+) Treg'lerin; stromal ve intratümöral CD163(+) TİM'ler ile ve PD-L1 ekspresyonu ile güçlü pozitif korelasyon gösterdiği dikkati çekti ($p<0,01$) Artmış intratümöral FOXP3(+) Treg; stromal FOXP3(+) Treg, stromal ve intratümöral CD163 (+) TİM ve PD-L1 ekspresyonunda artışı ile birlikteydi ($p<0,01$). Tümöre karşı immün yanıtta tümör stromasında aynı işlevlere sahip hücre gruplarının birlikte arttığı izlendi. Ancak artmış FOXP3(+) TIL'ler ile tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı, perinöral invazyon ve sağkalım arasında ilişkili saptanmadı ($p>0,05$).

Literatürde FOXP3 ekspresyonun sadece Treg'lerde değil tümör hücrelerinde de saptandığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Li ve ark. meme kanserlerinde FOXP3 ekspresyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında FOXP3'ün meme karsinomlarında normal dokuya göre daha fazla eksprese edildiğini ve iyi prognoz ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir ve iyi prognozun FOXP3 ekspresyonunun *Toll-like* reseptör yolu, JAK/STAT yolu, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır.[12] Takenaka ve ark. tümörde FOXP3 ekspresyonunun lenf nodu metastazı ve kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.[272] Çalışmamızda tümör hücrelerinde gözlenen FOXP3 ekspresyonu ortalaması %25,9 olup medyan %5 idi. Tümörde FOXP3 boyanması ile stromal veya intratümöral FOXP3+TIL'ler arasında herhangi bir ilişki izlenmedi ($p>0,05$). Tümör hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu ile tümör boyutu karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da 2 cm'den büyük tümör boyutu olan olgularda median değerin daha büyük olduğu dikkati çekti. Tümörde FOXP3 ekspresyonu; LVİ, lenf nodu metastazı, mortalite ve sağkalım ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak fark gözlenmedi ancak lenf nodu metastazı olan ve eksitus olan olguların medyan değeri olmayanlara göre daha yüksekti.

Tümör mikroçevresinde lenfositlerden sonra ikinci önemli hücre grubu tümör ilişkili makrofajlardır. Tümör ilişkili makrofajlar son zamanlarda tümör büyümesinde ve kanser progresyonunda önemli bir faktör olarak raporlanmaktadır. Makrofajların aktivasyonunda iki yolak rol oynar; klasik yoldan aktive edilenler M1 ve alternatif yoldan aktive edilenler M2 makrofajlardır. M1 makrofajlar CD68 ekspresyonuna sahip olup antitümör etki gösterirken, M2 makrofajlar da ise hem CD68 hem de CD163 ekspresyonu izlenir. M2 makrofajların büyüme faktörü ve kemokin salgılayarak tümör büyümesini ve metastazını kolaylaştırdığı düşünülmektedir.[275-277]

Çalışmamızda hem stromal hem de intratümöral CD163(+)TİM yoğunluğunu değerlendirdik. İntratümöral alanda CD163(+) TİM ortalaması 10, medyan 8 ve stromal alanda CD163(+) TİM ortalaması 27, medyan 24 idi. İntratümöral ve stromal CD163(+) TİM değerleri birbirleri ile pozitif korelasyon göstermekteydi. Benzer şekilde stromal ve/veya intratümöral CD163(+) TİM artışı stromal ve/veya intratümöral FOXP3(+) TIL artışı ve PD-L1 ekspresyonu ile korelasyon gösterirken intratümöral ve/veya stromal CD8(+) TİL ile herhangi bir ilişki saptanmadı. Ayrıca CD163(+) M2 makrofaj değerleri ile tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı, perinöral invazyon ve sağkalım arasında herhangi bir ilişki bulunmadı. Ancak tümör boyutu büyük olan olgularda stromal ve

intratümöral CD163+ TİM oranı nispeten daha yüksekti. Aynı şekilde intratümöral ve stromal CD163 (+) TİM değerleri yaşayan olgularda eksitus olan olgulara göre daha fazlaydı. Yüksek CD163 (+) TİM varlığı ile mortalite arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p>0,05).

Jamiyan ve ark. çalışmalarında ÜNMK'lerde intratümoral ve stromal M2 makrofajların M1 makrofajlara göre kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.[11] Medrek ve ark. 121 meme karsinomunda M1 ve M2 makrofajları incelemişler, stromal M2 makrofajların; yüksek histolojik derece, büyük tümör boyutu, yüksek proliferasyon indeksi hormon reseptör negatifliği ve kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.[278] Ayrıca, Yang ve ark. artmış stromal CD163(+) TİM'lerin olumsuz klinikopatolojik faktörler ve daha kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.[186] Ancak bazı çalışmalarda ise TİM varlığı ile tümör boyutu, HER2 durumu arasında ilişki saptanmazken bazılarında yukarıda bahsedildiği gibi yüksek histolojik derece, lenf nodu metastazı ve yüksek Ki-67 oranı ile ilişkili bulunmuştur.[19,279] Biz de çalışmamızda ki-67 proliferasyon indeksi ile stromal ve intratümöral CD163(+)TİM değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptadık. Yani artmış CD163(+) TİM varlığı yüksek ki-67 proliferasyon indeksi ile birlikteydi.

Adams ve ark. CD163 ekspresyonunu araştırdıkları 180 ÜNMK'inde CD163 ekspresyonu ile PD-L1 ve FOXP3 ekspresyonları arasında pozitif korelasyon saptanmışlar ve kısa sağkalımla ilişkili olduğunu göstermişlerdir.[280] Çalışmamızda benzer şekilde CD163 ekspresyonu ile PD-L1 ve FOXP3 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptadık, ancak yaşayan olgularda stromal ve intratümöral CD163(+) TİM medyan değerleri eksitus olanlara göre daha yüksek olsa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.[278]

ÜNMK'ler immün mikroçevre açısından oldukça zengin tümörlerdir. Çalışmamızda prognozu ve klinik gidişi kötü olan ÜNMK'lerden immün mikroçevresi zengin olanların sağkalımlarının daha fazla olduğu, yaşayan olgularda ise stromal ve intratümöral CD8(+) TIL oranlarının eksitus olan olgulara göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu tespit ettik. İmmünoterapide kullanılan PD-L1 pozitifliğinin yüksek TIL düzeyleri ile ve artmış CD8 ekspresyonu ile ilişkili olduğu sonucuna vardık. Bu bize PD-L1 ekspresyonu ile birlikte TIL yoğunluğunun ve CD8(+) TIL varlığının tespitinin immünoterapi için seçilecek hastalarda yol gösterecek yardımcı belirteçler arasında olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca immünolojik mikroçevredeki hücrelerin natürü, yoğunluğu ve lokalizasyonu prognozu etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Bu tümörlerde immünolojik mikroçevreyi değerlendirmede CD8, FOXP3, PD-L1 ve CD163 oldukça yararlı belirteçlerdendir. Literatürde, çeşitli çalışmalarda bu belirteçlerin ekspresyonlarının farklı prognostik etkileri bildirilmiştir. Çalışmamızda, biz de bu biyobelirteçlerin sağkalım ve konvansiyonel prognostik parametreler ile ilişkisini ve ÜNMK'lerde mikroçevrenin önemini kendi verilerimizle vurgulamaya çalıştık. Ancak özellikle ÜNMK'lerde immünolojik mikroçevreyi daha iyi anlamak, prognozu tayin etmek ve immunoterapiyi yönlendirebilmek için daha fazla sayıda hasta içeren çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmaya alınan 52 olgu kadın hastalardan oluşmaktadır ve yaş ortalaması 48'dir.
2. En genç olgu 32 yaşında olup, en yaşlı olgu 83 yaşında tanı almıştır.
3. Olguların çoğunluğu 50 yaş altındadır ve tanı yaşı genç olan olguların sağkalımı daha düşüktür.
4. Olguların 40'ı (%76,9) invaziv karsinom NST, 6'sı (%11,5) metaplastik karsinom, 1'i (%1,9) invaziv lobüler karsinom, 5'i (%7,7) özel bir tip meme karsinomu histolojisindedir.
5. Olguların TNM evresine göre 11'i (% 21,2) evre 1, 18'i (%34,6) evre 2A, 8'i (%15,4) evre 2B, 4'ü (%7,7) evre 3A ve 1'i (%1,9) evre 3C şeklindedir.
6. İnvaziv karsinom ve özel tip meme karsinomlarının 41'i (%91,1) nükleer derece 3, 4'ü (%8,9) nükleer derece 2 idi.
7. Olgularda tanı anında uzak metastaz saptanmazken, 5 olguda daha sonra uzak metastaz tespit edildi.
8. Olguların 18'inde (%34,6) LVİ mevcut olup, 34'ünde (%65,4) LVİ görülmedi, LVİ olan olguların sağkalımı daha düşük bulundu. (p:0,031)
9. LVİ olan olgularda lenf nodu metastazı varlığı istatistiksel olarak anlamlı idi (p:0,0001).
10. Lenf nodu metastazı olguların 17'sinde (%32,7) görülürken, 25 (%48,1) olguda metastaz saptanmadı.
11. Olguların sadece 4'ünde (%7,7) perinöral invazyon görüldü.
12. Perinöral invazyon daha genç yaştaki hastalarda tespit edilmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı idi. (p:0,001)
13. Yaş; tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı, tümör tipi ve sağkalım ile ilişkili bulunmadı.
14. Tümör boyutu ile lenf nodu metastazı, LVİ, perinöral invazyon, histolojik tip, histolojik derece, tümör yerleşim lateralitesi, patolojik T ve N evresi arasında ilişki saptanmadı.
15. Olguların takip süreleri 1 ay ile 65 ay arasında değişmekte olup ortalama takip süresi 33 ay idi.

16. Olguların tahmini yaşam süreleri 55.2±2.9 ay; 1 yıllık sağkalım %90, 3 yıllık sağkalım %83.1, 5 yıllık sağkalım %79.5 olarak tespit edildi.
17. TIL yoğunluğu düşük, orta ve yüksek olarak gruplandırıldığında en geniş grubu orta seviyede TIL içeren olgular oluşturmaktaydı. Olguların 16'sında (%30) TIL yoğunluğu düşük, 19'unda (%36,5) orta,17'sinde (%32,7) yüksekti.
18. TIL yoğunluğu grupları ile prognostik parametreler karşılaştırıldığında tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı, klinik evre ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.
19. Yüksek oranda TIL içeren olgularda daha fazla PD-L1 pozitifliği görüldü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,0001).
20. PD-L1 olguların 25'inde (%48,1) pozitif, 27'sinde (%51,9) negatif sonuç verdi. Immün hücre skoruna göre; olguların 8'i (%15,4) İHS1, 5'i (%9,6) İHS2, 12'si (%23,1) İHS3 idi.
21. Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu gösteren 6 (%11,5) olgu mevcuttu.
22. PD-L1 pozitifliği saptanan olgularda daha az LVİ görülmüş olup bu istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,044).
23. PD-L1 pozitifliği tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve klinik evre ile ilişkili değildi.
24. Yaşayan 43 olgunun 23'ünde (%53,5), eksitus olan 9 olgunun 2'sinde (%22,2) PD-L1 pozitifliği saptandı. PD-L1 pozitifliği ile mortalite arasında ilişki saptanmadı (p:0,143).
25. Sağkalım analizlerinde PD-L1 pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0,179).
26. İmmün hücrelerde PD-L1 ekspresyonu ile diğer immün belirteç ekpresyonları karşılaştırıldığında stromal ve intratümöral FOXP3 ve CD8 ve intratümöral CD163 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon mevcuttu.
27. TIL'lerden CD8(+) T lenfositler ile büyük tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon arasında ilişki bulunmadı.
28. Yaşayan olgularda stromal ve intratümöral CD8(+) medyan değeri eksitus olan olgulardan daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,003 ve p:0,002).

29. İmmün hücrelerde stromal ve intratümöral CD8 ekspresyonu artığında stromal FOXP3 ve PD-L1 ekspresyonunun arttığı görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla p:0,014, p:0,035, p:0,0001 ve p:0,03).

30. TIL'leri oluşturan diğer immün hücre grubundan FOXP3(+) Treg'ler tümör boyutu büyük olan olgularda daha yoğun olmasına rağmen stromal ve intratümöl FOXP3 (+) Treg'ler ile tümör boyutu ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi.

31. FOXP3 (+) Treg'ler ile LVİ, lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlı sonuç saptanmadı.

32. İntratümöral ve stromal Treg'lerideki FOXP3 ekspresyonu stromal ve intratümöral CD163 ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösteriyordu. Tümöre karşı immün yanıtın baskılanmasında rol alan bu iki hücre grubunun birlikte artması istatistiksel olarak da anlamlıydı (p:<0,05).

33. Ayrıca intratümöral ve stromal FOXP3 ekspresyonu PD-L1 ekspresyonu ile de pozitif korelasyon gösteriyordu.

34. Prognostik parametreler ile intratümöral CD163(+) M2 makrofajlar karşılaştırıldığında; tümör boyutu, LVİ, lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmedi.

35. Yaşayan olgular ile eksitus olan olgular arasında da CD163 (+) M2 makrofaj infiltrasyon oranlarında arasında anlamlı farklılık izlenmedi.

7. KAYNAKLAR

1. **Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A.** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians,* **2018;** 68(6):394-424.

2. **Work ME, Andrulis IL, John EM, Hopper JL, Liao Y, Zhang FF, et al.** Risk factors for uncommon histologic subtypes of breast cancer using centralized pathology review in the Breast Cancer Family Registry, *Breast cancer research and treatment*, **2012;** 134(3):1209-20.

3. **Li C, Uribe D, Daling JR.** Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer,* **2005;** 93(9):1046-52.

4. **Rosen PP.** *Rosen's breast pathology,* Lippincott Williams & Wilkins, **2001**.

5. **Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al.** Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* **2011;** 121(7):2750-67.

6. **Borri F, Granaglia A.** *Pathology of triple negative breast cancer*. Seminars in cancer biology, Elsevier, **2021**.

7. **Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood MK.** Triple-negative breast cancer in the elderly: Prognosis and treatment, *The breast journal,* 2017;23(6):630-7.

8. **Elston CW, Ellis IO.** Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology* **1991;** 19(5):403-10.

9. **Li JJ, Tsang JY, Tse GM.** Tumor Microenvironment in Breast Cancer-Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment, *Cancers,* **2021;** 13(16):4233.

10. **Ren X, Wu H, Lu J, Zhang Y, Luo Y, Xu Q, et al.** PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PD-L1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer, *Cancer biology & therapy,* **2018;** 19(5):373-80.

11. **Jamiyan T, Kuroda H, Yamaguchi R, Abe A, Hayashi MJ.** CD68-and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast, *Virchows Archiv,* **2020;** 477(6):767-75.

12. **Li J, Zhang X, Liu B, Shi C, Ma X, Ren S, et al.** The expression landscape of FOXP3 and its prognostic value in breast cancer, *Annals of Translational Medicine,* **2022;** 10(14).

13. **He J, Hu Y, Hu M, Li BJSr.** Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer, *Scientific reports,* **2015;** 5(1):1-9.

14. **Lotfinejad P, Asghari Jafarabadi M, Abdoli Shadbad M, Kazemi T, Pashazadeh F, Sandoghchian Shotorbani S, et al.** Prognostic role and clinical significance of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple-negative breast cancer (TNBC): a systematic review and meta-analysis study, *Diagnostics,* **2020;** 10(9):704.

15. **Ji M, Liu Y, Li Q, Li X-D, Zhao W-Q, Zhang H, et al.** PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation, *Journal of translational medicine,* **2015;** 13(1):1-6.

16. **Dong Y, Sun Q, Zhang XJO.** PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer, *Oncotarget,* **2017;** 8(2):2171.

17. **Muenst S, Schaerli A, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser R, et al.** Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer, *Breast cancer research and treatment,* **2014;** 146(1):15-24.

18. **Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai RJO.** Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation, *Oncotarget,* **2018;** 9(25):17937.

19. **Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, Wang W, Xia W, et al.** CD68-and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis, *Journal of Cancer,* **2019;** 10(19):4463.

20. **Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, Hämäläinen K, Tammi M, Tammi R, et al.** High numbers of macrophages, especially M2-like (CD 163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer, *Histopathology,* **2015;** 66(6):873-83.

21. **Schmidt G, Guhl MM, Solomayer E-F, Wagenpfeil G, Hammadeh ME, Juhasz-Boess I, et al.** Immunohistochemical assessment of PD-L1 expression using three different monoclonal antibodies in triple negative breast cancer patients, *Archives of Gynecology and Obstetrics,* **2022;** 1-7.

22. **Cowin P, Wysolmerski JJ.** Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2010;** 2(6):3251.

23. **Javed A, Lteif A.** Development of the human breast. Seminars in plastic surgery, Thieme Medical Publishers, **2013**.

24. **Mills S.** Histology for pathologists: Lippincott Williams & Wilkins, **2019**.

25. **Moinfar F.** Essentials of diagnostic breast pathology: a practical approach: Springer Science & Business Media, **2007**.

26. **Falco G, Bordoni D, Magalotti C, Coiro S, Ragazzi M, Ornelli M, et al.** Nipple Areola Complex, *Nipple-Areolar Complex Reconstruction: Principles and Clinical Techniques*, **2018;** 137.

27. **Moore KL, Dalley AF.** Clinically oriented anatomy: Wolters kluwer india Pvt Ltd, **2018**.

28. **Dabbs DJ.** Breast Pathology E-Book: Elsevier Health Sciences, **2016**.

29. **Bland KI, Copeland III EM.** The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases, *Surgery R*, **1993;** 92(5):973-4.

30. **Harris JR, Lippman ME, Osborne CK, Morrow M.** Diseases of the Breast: Lippincott Williams & Wilkins, **2012**.

31. **Ellis H, Mahadevan VJS.** Anatomy and physiology of the breast, *Surgery (Oxford)*, **2013;** 31(1):11-4.

32. **Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC.** Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book: Elsevier health sciences, **2014**.

33. **McGuire KP.** Breast anatomy and physiology. Breast Disease: Springer, **2016:**1-14.

34. **Russo J, Rivera R, Russo IJ.** Influence of age and parity on the development of the human breast, *Breast cancer research and treatment*, **1992;** 23(3):211-8.

35. **Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, Chauhan H, Jones JL, Walker RAJTJoPAJotPSoGB, et al.** Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, **2002;** 198(4):450-7.

36. Kohler S, Rouse RV, Smoller BR. The differential diagnosis of pagetoid cells in the epidermis, *Modern Pathology: an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc,* **1998;** 11(1):79-92.

37. Lakhtakia RJ. A brief history of breast cancer: Part I: Surgical domination reinvented, *Sultan Qaboos University Medical Journal,* **2014;** 14(2):166.

38. Koerner FC. A brief historical perspective on the pathology of the breast: from Cheatle to Azzopardi and beyond. Seminars in Diagnostic Pathology, Elsevier, **2004**.

39. Investigators WG. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama,* **2002;** 288(3):321-33.

40. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality, *Breast cancer research,* **2004;** 6(6):1-11.

41. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal AJ, et al. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality RatesInternational Variation in Female Breast Cancer Rates, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention,* **2015;** 24(10):1495-506.

42. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians,* **2021;** 71(3):209-49.

43. Allison KH, Brogi E, ellis IO, FOX SB, Morris EA. WHO Classification of Tumours Breast Tumors. **2019:**5.

44. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study, *Jama,* **2006;** 295(21):2492-502.

45. Parise CA, Bauer KR, Caggiano VJCrioh. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity, *Critical reviews in oncology/hematology,* **2010;** 76(1):44-52.

46. T.C. Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kanser İstatistikleri 2021 [Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri.

47. Özdoğan M. Türkiye Kanser İstatistikleri 2020 [Available from: https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/.

48. Cancer İAFRO. Turkey global cancer observatory 2020 [Available from: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf.

49. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral VJ. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis, *British journal of cancer,* **2009;** 100(3):538-44.

50. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt S, Tan PH, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast. **2012**.

51. Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RMJBeBA-RoC. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer,* **2015;** 1856(1):73-85.

52. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun S-S, Van Den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies, *Jama,* **1998;** 279(7):535-40.

53. Suzuki R, Orsini N, Mignone L, Saji S, Wolk AJ. Alcohol intake and risk of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status-a meta-analysis of epidemiological studies, *International Journal of Cancer,* **2008;** 122(8):1832-41.

54. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis, *Journal of the National Cancer Institute,* **2013;** 105(8):515-25.

55. Luo J, Margolis KL, Wactawski-Wende J, Horn K, Messina C, Stefanick ML, et al. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study, *BMJ,* **2011;** 342.

56. Vainio H, Kaaks R, Bianchini FJ. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence, *European journal of cancer prevention,* **2002;** 94-100.

57. Humans IW. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. **2012;** 100:1.

58. Colditz GA, Rosner BJ. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study; *American journal of epidemiology,* **2000;** 152(10):950-64.

59. **Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al.** Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer, *Journal of clinical oncology,* **2015;** 33(4):304.

60. **González-Rivera M, Lobo M, López-Tarruella S, Jerez Y, del Monte-Millan M, Massarrah T, et al.** Frequency of germline DNA genetic findings in an unselected prospective cohort of triple-negative breast cancer patients participating in a platinum-based neoadjuvant chemotherapy trial, *Breast cancer research and treatment,* **2016;** 156(3):507-15.

61. **Bright CJ, Rea DW, Francis A, Feltbower RG.** Comparison of quadrant-specific breast cancer incidence trends in the United States and England between 1975 and 2013, *Cancer Epidemiology,* **2016;** 44:186-94.

62. **Soo MS, Rosen EL, Baker JA, Vo TT, Boyd BA.** Negative predictive value of sonography with mammography in patients with palpable breast lesions, *American Journal of Roentgenology,* **2001;** 177(5):1167-70.

63. **Moy L, Slanetz PJ, Moore R, Satija S, Yeh ED, McCarthy KA, et al.** Specificity of mammography and US in the evaluation of a palpable abnormality: retrospective review, *Radiology,* **2002;** 225(1):176-81.

64. **Grin A, Horne G, Ennis M, O'Malley FP.** Measuring extent of ductal carcinoma in situ in breast excision specimens: a comparison of 4 methods, *Archives of pathology & laboratory medicine,* **2009;** 133(1):31-7.

65. **Schnitt SJ, Connolly JL.** Processing and evaluation of breast excision specimens: a clinically oriented approach, *American journal of clinical pathology,* **1992;** 98(1):125-37.

66. **Bossuyt V, Provenzano E, Symmans W, Boughey J, Coles C, Curigliano G, et al.** Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration, *Annals of oncology,* **2015;** 26(7):1280-91.

67. **Guidi AJ, Tworek JA, Mais DD, Souers RJ, Blond BJ, Brown RWJAoP, et al.** Breast specimen processing and reporting with an emphasis on margin evaluation: a College of American Pathologists survey of 866 laboratories, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine,* **2018;** 142(4):496-506.

68. **Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS.** Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways, *Histopathology,* **2010;** 57(2):171-92.

69. Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?, *Journal of the National Cancer Institute* **2014;** 106(8):165.

70. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression, *The Journal of pathology*, **2011;** 223(2):308-18.

71. Brigham Hospital. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **2012;** 490(7418):61-70.

72. Kumar A, Abbas AK, Jon CJ. Aster: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, *Professional Edition*, **2015**.

73. Sanati SJ. Morphologic and molecular features of breast ductal carcinoma in situ, *The American Journal of Pathology*, **2019;** 189(5):946-55.

74. Goldblum J, Lamps LJGJ, Lamps LW, McKenney JK, Myers JL. Rosai, Elsevier AsspteP. Soft tissues. **2018:**1810-915.

75. Asjoe FT, Altintas S, Huizing MT, Colpaert C, Marck EV, Vermorken JB, et al. The value of the Van Nuys Prognostic Index in ductal carcinoma in situ of the breast: a retrospective analysis, *The breast journal*, **2007;** 13(4):359-67.

76. Kelley L, Silverstein M, Guerra LJ. Analyzing the risk of recurrence after mastectomy for DKİS: a new use for the USC/Van Nuys Prognostic Index, *Annals of surgical oncology* **2011;** 18(2):459-62.

77. Martinez V, Azzopardi JJ. Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants, *Histopathology*, **1979;** 3(6):467-88.

78. Quincey C, Raitt N, Bell J, Ellis I. Intracytoplasmic lumina–a useful diagnostic feature of adenocarcinomas. *Histopathology*, **1991;** 19(1):83-8.

79. DiCostanzo D, Rosen PP, Gareen I, Franklin S, Lesser MJ. Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of "classical" and variant tumors, *The American journal of surgical pathology*, **1990;** 14(1):12-23.

80. Dixon J, Anderson T, Page D, Lee D, Duffy SJ. Infiltrating lobular carcinoma of the breast, *Breast cancer research*. **1982;** 6(2):149-61.

81. **Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO.** High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma, *The American journal of surgical pathology,* **2007;** 31(3):417-26.

82. **Newman WJ.** Lobular carcinoma of the female breast. Report of 73 cases, *Annals of Surgery,* **1966;** 164(2):305.

83. **Sneige N, Wang J, Baker BA, Krishnamurthy S, Middleton LP.** Clinical, histopathologic, and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases, *Modern Pathology,* **2002;** 15(10):1044-50.

84. **Evers B, Speksnijder EN, Schut E, Ciampricotti M, Smalley MJ, Derksen PW, et al.** A tissue reconstitution model to study cancer cell-intrinsic and-extrinsic factors in mammary tumourigenesis, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland,* **2010;** 220(1):34-44.

85. **Boelens MC, Nethe M, Klarenbeek S, de Ruiter JR, Schut E, Bonzanni N, et al.** PTEN loss in E-cadherin-deficient mouse mammary epithelial cells rescues apoptosis and results in development of classical invasive lobular carcinoma, *Cell reports,* **2016;** 16(8):2087-101.

86. **Desmedt C, Salgado R, Fornili M, Pruneri G, Van den Eynden G, Zoppoli G, et al.** Immune infiltration in invasive lobular breast cancer, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute,* **2018;** 110(7):768-76.

87. **Anderson WF, Chu KC, Chang S, Sherman ME.** Prevention. Comparison of age-specific incidence rate patterns for different histopathologic types of breast carcinoma, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention,* **2004;** 13(7):1128-35.

88. **Weigelt B, Horlings H, Kreike B, Hayes M, Hauptmann M, Wessels L, et al.** Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland,* **2008;** 216(2):141-50.

89. **Page D, Dixon J, Anderson T, Lee D, Stewart H.** Invasive cribriform carcinoma of the breast, *Histopathology,* **1983;** 7(4):525-36.

90. **Louwman MW, Vriezen M, Beek MW, Nolthenius-Puylaert MC, Sangen MJ, Roumen RM, et al.** Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands, *International Journal of cancer,* **2007;** 121(1):127-35.

91. **Liu XY, Jiang YZ, Liu YR, Zuo WJ, Shao ZMJM.** Clinicopathological characteristics and survival outcomes of invasive cribriform carcinoma of breast: a SEER population-based study, *Medicine,* **2015;** 94(31).

92. **Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al.** Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade, *Breast cancer research,* **2010;** 12(4):1-12.

93. **Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar EJB.** A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma, *Breast cancer research and treatment,* **2008;** 111(3):541-7.

94. **Diab SG, Clark GM, Osborne CK, Libby A, Allred DC, Elledge RM.** Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas, *Journal of clinical oncology,* **1999;** 17(5):1442-.

95. **Weigelt B, Geyer FC, Horlings HM, Kreike B, Halfwerk H, Reis-Filho JS.** Mucinous and neuroendocrine breast carcinomas are transcriptionally distinct from invasive ductal carcinomas of no special type, *Modern Pathology,* **2009;** 22(11):1401-14.

96. **Rosa M, Mohammadi A, Masood SJ.** Lobular carcinoma of the breast with extracellular mucin: New variant of mucin-producing carcinomas?, *Pathology International,* **2009;** 59(6):405-9.

97. **Yu J, Bhargava R, Dabbs DJ.** Invasive lobular carcinoma with extracellular mucin production and HER-2 overexpression: a case report and further case studies, *Diagnostic pathology,* **2010;** 5(1):1-7.

98. **Haltas H, Bayrak R, Yenidunya S, Kosehan D, Sen M, Akin KJ.** Invasive lobular carcinoma with extracellular mucin as a distinct variant of lobular carcinoma: a case report, *Diagnostic Pathology,* **2012;** 7(1):1-6.

99. **Bari VB, Bholay SU, Sane KC.** Invasive lobular carcinoma of the breast with extracellular mucin-A new rare variant, *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR,* **2015;** 9(4):5.

100. **Koenig C, Tavassoli FA.** Mucinous cystadenocarcinoma of the breast, *The American journal of surgical pathology,* **1998;** 22(6):698-703.

101. **Wesseling J, Van Der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens JJ.** Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components, *The Journal of cell biology,* **1995;** 129(1):255-65.

102. Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens JJMbotc. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1, *Molecular biology of the cell,* **1996;** 7(4):565-77.

103. McDermott KM, Crocker PR, Harris A, Burdick MD, Hinoda Y, Hayashi T, et al. Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells, *International journal of cancer,* **2001;** 94(6):783-91.

104. Tang Sl, Yang JQ, Du ZG, Tan QW, Zhou YT, Zhang D, et al. Clinicopathologic study of invasive micropapillary carcinoma of the breast, *Oncotarget,* **2017;** 8(26):42455.

105. Wu Y, Zhang N, Yang QJB. The prognosis of invasive micropapillary carcinoma compared with invasive ductal carcinoma in the breast: a meta-analysis, *BMC cancer,* **2017;** 17(1):1-9.

106. Mills AM, Gottlieb EC, Wendroth MS, Brenin MC, Atkins KA. Pure apocrine carcinomas represent a clinicopathologically distinct androgen receptor–positive subset of triple-negative breast cancers, *The American Journal of Surgical Pathology,* **2016;** 40(8):1109-16.

107. Eusebi V, Millis R, Cattani M, Bussolati G, Azzopardi JJ. Apocrine carcinoma of the breast. A morphologic and immunocytochemical study, *The American journal of pathology,* **1986;** 123(3):532.

108. Tanaka K, Imoto S, Wada N, Sakemura N, Hasebe KJ. Invasive apocrine carcinoma of the breast: clinicopathologic features of 57 patients, *The breast journal,* **2008;** 14(2):164-8.

109. Vranic S, Tawfik O, Palazzo J, Bilalovic N, Eyzaguirre E, Lee LM, et al. EGFR and HER-2/neu expression in invasive apocrine carcinoma of the breast, *Modern Pathology,* **2010;** 23(5):644-53.

110. Pagani A, Sapino A, Bergnolo P, Bussolati G, Eusebi VJVA. PIP/GCDFP-15 gene expression and apocrine differentiation in carcinomas of the breast, *Virchows Archiv,* **1994;** 425(5):459-65.

111. Daemen A, Manning GJ. HER2 is not a cancer subtype but rather a pan-cancer event and is highly enriched in AR-driven breast tumors, *Breast Cancer Research,* **2018;** 20(1):1-16.

112. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Gomes M, Dufloth R, Zeferino LC, et al. Reappraisal of immunohistochemical profiling of special histological types of breast carcinomas: a study of 121 cases of eight different subtypes, *Journal of clinical pathology,* **2012;** 65(12):1066-71.

113. Lin FdML, Pincerato KM, Bacchi CE, Baracat EC, Carvalho FM. Coordinated expression of oestrogen and androgen receptors in HER2-positive breast carcinomas: impact on proliferative activity, *Journal of clinical pathology,* **2012;** 65(1):64-8.

114. Langlands F, Cornford E, Rakha E, Dall B, Gutteridge E, Dodwell D, et al. Imaging overview of metaplastic carcinomas of the breast: a large study of 71 cases, *The British journal of radiology,* **2016;** 89(1064):20140644.

115. Schroeder MC, Rastogi P, Geyer Jr CE, Miller LD, Thomas AJ. Early and locally advanced metaplastic breast cancer: presentation and survival by receptor status in surveillance, epidemiology, and end results (SEER) 2010-2014, *The oncologist,* **2018;** 23(4):481-8.

116. Rakha EA, Coimbra ND, Hodi Z, Juneinah E, Ellis IO, Lee AH. Immunoprofile of metaplastic carcinomas of the breast, *Histopathology,* **2017;** 70(6):975-85.

117. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland J, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours, *Histopathology,* **2006;** 49(1):10-21.

118. Cao L, Niu YJ. Triple negative breast cancer: special histological types and emerging therapeutic methods, *Cancer biology & medicine,* **2020;** 17(2):293.

119. Sharma R, Goel R, Lipi L, Sachdev RJ. Adenoid cystic carcinoma: a rare breast carcinoma. *Pathologica,* **2017;** 109(4):412-3.

120. Welsh JL, Keeney MG, Hoskin TL, Glazebrook KN, Boughey JC, Shah SS, et al. Is axillary surgery beneficial for patients with adenoid cystic carcinoma of the breast?, *Journal of Surgical Oncology,* **2017;** 116(6):690-5.

121. Aktepe F, Sarsenov D, Özmen VJ. Secretory carcinoma of the breast, *Cancer,* **2016;** 12(4):174.

122. Diallo R, Tognon C, Knezevich S, Sorensen P, Poremba CJ. Secretory carcinoma of the breast: a genetically defined carcinoma entity, *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie* **2003;** 87:193-203.

123. Del Castillo M, Chibon F, Arnould L, Croce S, Ribeiro A, Perot G, et al. Secretory Breast Carcinoma, *The American Journal of Surgical Pathology,* **2015;** 39(11):1458-67.

124. Li D, Xiao X, Yang W, Shui R, Tu X, Lu H, et al. Secretory breast carcinoma: a clinicopathological and immunophenotypic study of 15 cases with a review of the literature, *Modern Pathology,* **2012;** 25(4):567-75.

125. Di Tommaso L, Foschini MP, Ragazzini T, Magrini E, Fornelli A, Ellis IO, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the breast. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* **2004;** 444(1):13-9.

126. Lüchtrath H, Moll R. Mucoepidermoid mammary carcinoma. Immunohistochemical and biochemical analyses of intermediate filaments. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology.* **1989;** 416(2):105-13.

127. Elston CJ. Ellis 10. Assessment of histological grade. **2010:**365-84.

128. Cutler SJ, Freeman C, Black MM, Mork T, Harvei SJC. Further observations on prognostic factors in cancer of the female breast, *Cancer,* **1969;** 24(4):653-67.

129. MM B, FD SJS.. Nuclear structure in cancer tissues, *Gynecology, Obstetrics,* **1957;** 105(1):97-102.

130. Kurozumi S, Matsumoto H, Hayashi Y, Tozuka K, Inoue K, Horiguchi J, et al. Power of PgR expression as a prognostic factor for ER-positive/HER2-negative breast cancer patients at intermediate risk classified by the Ki67 labeling index. **2017;** 17(1):1-9.

131. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh LD, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. **2004;** 17(12):1545-54.

132. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **2010;**134(7):48-72.

133. Qureshi A, Pervez SJ. Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. **2010;** 60(5):350.

134. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. **2014;** 32(33):3744.

135. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, McShane LM, Dowsett MJJ. HER2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update summary. **2018;** 14(7):437-41.

136. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update.* **2018;** 142(11):1364-82.

137. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. **2011;** 103(22):1656-64.

138. Edition S, Edge S, Byrd DJ. AJCC cancer staging manual. **2017**.

139. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **2012;** 486(7403):346-52.

140. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **2009;** 27(8):1160.

141. Goldhirsch A, Winer EP, Coates A, Gelber R, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **2013**; 24(9):2206-23.

142. Sheffield BS, Kos Z, Asleh-Aburaya K, Wang XQ, Leung S, Gao D, et al. Molecular subtype profiling of invasive breast cancers weakly positive for estrogen receptor. **2016;** 155(3):483-90.

143. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **2007;** 109(1):25-32.

144. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. **1998;** 90(15):1138-45.

145. Schrijver WA, Selenica P, Lee JY, Ng CK, Burke KA, Piscuoglio S, et al. Mutation profiling of key cancer genes in primary breast cancers and their distant metastases. **2018;** 78(12):3112-21.

146. Zardavas D, Te Marvelde L, Milne RL, Fumagalli D, Fountzilas G, Kotoula V, et al. Tumor PIK3CA genotype and prognosis in early-stage breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. **2018;** 36(10):981.

147. Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. **2017;** 377(6):523-33.

148. Robson M, Tung N, Conte P, Im S-A, Senkus E, Xu B, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. **2019;** 30(4):558-66.

149. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz GJ. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. **2017;** 389(10087):2430-42.

150. Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. **2008;** 22(11):1233.

151. Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Smith LV, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. **2008;** 109(1):123-39.

152. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **2003;** 95(19):1482-5.

153. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **2004;** 10(16):5367-74.

154. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **2007;** 8(5):1-17.

155. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. **2016;** 11(6):0157368.

156. Hudis CA, Gianni LJ. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. **2011;** 16(1):1-11.

157. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **2007;** 13(15):4429-34.

158. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. **2018;** 19(1):40-50.

159. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the Fin HER trial. **2014;** 25(8):1544-50.

160. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **2013;** 31(7):860-7.

161. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, 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.

162. Abbas A, Lichtman A, Pillai SJ. Guneş Tıp Kitabevleri, 320s, Ankara. Çev: Camcioglu Y, Deniz G. Temel Immunoloji Immun Sistemin Islevleri ve Bozukluklari **2015:**4.

163. Janeway CAJ. The immune system in health and disease. **2001**.

164. Nathan MR, Schmid PJ. The emerging world of breast cancer immunotherapy. **2018;** 37:200-6.

165. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer GJ. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **2006;** 6(10):715-27.

166. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. **2014;** 27:16-25.

167. Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Walter CB, Krämer B, Grischke EM, et al. PD-1 and PD-L1 immune checkpoint blockade to treat breast cancer. **2016;** 11(6):385-90.

168. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. **2004;** 22:329-60.

169. Teng MW, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. **2012;** 72(16):3987-96.

170. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **2011;** 29(1):235-71.

171. Wein L, Luen SJ, Savas P, Salgado R, Loi SJ. Checkpoint blockade in the treatment of breast cancer: current status and future directions. **2018;** 119(1):4-11.

172. Yu P, Fu YXJ. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? **2006;** 86(3):231-45.

173. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, et al. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. **2009;** 58(9):1507-15.

174. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. **2010;** 207(3):637-50.

175. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. **2003;** 421(6925):852-6.

176. Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. **2015;** 67(2):4-17.

177. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AHJ. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **2010;** 236(1):219-42.

178. Holets LM, Hunt JS, Petroff MGJ. Trophoblast CD274 (B7-H1) is differentially expressed across gestation: influence of oxygen concentration. **2006;** 74(2):352-8.

179. Ota K, Azuma K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Tanizaki J, et al. Induction of PD-L1 Expression by the EML4–ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non–Small Cell Lung CancerPD-L1 Expression in NSCLC Positive for EML4–ALK. **2015;** 21(17):4014-21.

180. Hawkes EA, Grigg A, Chong GJ. Programmed cell death-1 inhibition in lymphoma. **2015;** 16(5):234-45.

181. Momtaz P, Postow M. Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. **2014;** 7:357.

182. Li X, Shi H, Zhang W, Bai C, He M, Ta N, et al. Immunotherapy and Targeting the Tumor Microenvironment: Current Place and New Insights in Primary Pulmonary NUT Carcinoma. **2021:**3951.

183. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. **2018**.

184. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. **2011;** 55(7-8-9):861-7.

185. Tang XJCl. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **2013;** 332(1):3-10.

186. Yang M, Li Z, Ren M, Li S, Zhang L, Zhang X, et al. Stromal infiltration of tumor-associated macrophages conferring poor prognosis of patients with basal-like breast carcinoma. **2018;** 9(13):2308.

187. Castaneda CA, Mittendorf E, Casavilca S, Wu Y, Castillo M, Arboleda P, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. **2016;** 7(5):387.

188. Kumar BV, Connors TJ, Farber DLJI. Human T cell development, localization, and function throughout life. **2018;** 48(2):202-13.

189. Germain RN. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. **2002;** 2(5):309-22.

190. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia BJC. CD4+ T cells: differentiation and functions. **2012;** 2012.

191. Li Z, Dong P, Ren M, Song Y, Qian X, Yang Y, et al. PD-L1 expression is associated with tumor FOXP3+ regulatory T-cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. **2016;** 7(7):784.

192. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **2003;** 4(4):330-6.

193. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone MJ. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. **2008;** 9(2):194-202.

194. Hori S, Nomura T, Sakaguchi SJS. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **2003;** 299(5609):1057-61.

195. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **2006;** 212(1):8-27.

196. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. **2009;** 27(11):1746-52.

197. Matsumoto H, Thike AA, Li H, Yeong J, Koo S-l, Dent RA, et al. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. **2016;** 156(2):237-47.

198. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. **2011;** 130(2):645-55.

199. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, De Wind A, et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. **2013;** 123(7):2873-92.

200. Rouers A, Jeger-Madiot R, Moris A, Graff-Dubois SJ. Follicular helper T cells and HIV-united for better and worse. **2017;** 33(10):878-86.

201. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. **1998;** 58(16):3491-4.

202. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. **2006;** 94(2):275-80.

203. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. **2004;** 28(1):26-31.

204. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. **2001;** 61(10):3932-6.

205. Seo AN, Lee H, Kim E, Kim H, Jang M, Lee H, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. **2013;** 109(10):2705-13.

206. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **2011;** 29(15):1949-55.

207. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. **2012;** 14(2):1-14.

208. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **2007;** 131(1):18-43.

209. Hida AI, Sagara Y, Yotsumoto D, Kanemitsu S, Kawano J, Baba S, et al. Prognostic and predictive impacts of tumor-infiltrating lymphocytes differ between Triple-negative and HER2-positive breast cancers treated with standard systemic therapies. **2016;** 158(1):1-9.

210. Erber R, Hartmann AJ. Understanding PD-L1 testing in breast cancer: A practical approach. **2020;** 15(5):481-90.

211. PD V. Ventana PD-L1 (SP142) Assay.

212. Vennapusa B, Baker B, Kowanetz M, Boone J, Menzl I, Bruey JM, et al. Development of a PD-L1 complementary diagnostic immunohistochemistry assay (SP142) for atezolizumab. **2019;** 27(2):92.

213. Vikas P, Borcherding N, Zhang WJ. The clinical promise of immunotherapy in triple-negative breast cancer. **2018;** 10:6823.

214. Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **2002;** 415(6871):530-6.

215. Darouich S, El Amine El Hadj O, Betaieb I, Goucha A, Dhiab T, Rahal K, et al. Triple negative breast cancer: A clinico-epidemiological and histopronostic study of 90 cases. **2017;** 95(1):37-44.

216. Al-Jussani GN, Dabbagh TZ, Al-Rimawi D, Sughayer MA. Expression of PD-L1 using SP142 CDx in triple negative breast cancer. **2021;** 51:151703.

217. He L, Wang Y, Wu Q, Song Y, Ma X, Zhang B, et al. Association between levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of primary breast tumors and prognostic outcomes: A meta-analysis. **2020;** 20(1):1-11.

218. Tavares MC, Sampaio CD, Lima GE, Andrade VP, Gonçalves DG, Macedo MP, et al. A high CD8 to FOXP3 ratio in the tumor stroma and expression of PTEN in tumor cells are associated with improved survival in non-metastatic triple-negative breast carcinoma. **2021;** 21(1):1-12.

219. Howard FM, Olopade OI. Epidemiology of triple-negative breast cancer: a review. **2021;** 27(1):8-16.

220. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano VJ. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **2007;** 109(9):1721-8.

221. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. **2012;** 118(22):5463-72.

222. Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer: Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. **2016;** 95(35).

223. Ugras S, Stempel M, Patil S, Morrow MJ. Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status predict lymphovascular invasion and lymph node involvement. **2014;** 21(12):3780-6.

224. Rubovszky G, Horváth Z, Tóth E, Láng I, Kásler MJ. Significance of histomorphology of early triple-negative breast cancer. **2012;** 18(4):823-31.

225. Königsberg R, Pfeiler G, Klement T, Hammerschmid N, Brunner A, Zeillinger R, et al. Tumor characteristics and recurrence patterns in triple negative breast cancer: A comparison between younger (< 65) and elderly (⩾ 65) patients. **2012;** 48(16):2962-8.

226. Leon-Ferre RA, Polley MY, Liu H, Gilbert JA, Cafourek V, Hillman DW, et al. Impact of histopathology, tumor-infiltrating lymphocytes, and adjuvant chemotherapy on prognosis of triple-negative breast cancer. **2018;** 167(1):89-99.

227. Edge SBJS. AJCC cancer staging manual. **2010;** 7:97-100.

228. Fayaz S, Demian GA, El-Sherify M, Eissa H, Aziz M, Abuzallouf SJ. Triple negative breast cancer: 10-year survival update of the applied treatment strategy in Kuwait. **2019;** 1(29):53-9.

229. Ishikawa Y, Horiguchi J, Toya H, Nakajima H, Hayashi M, Tagaya N, et al. Triple-negative breast cancer: Histological subtypes and immunohistochemical and clinicopathological features. **2011;** 102(3):656-62.

230. Dieci M, Mathieu M, Guarneri V, Conte P, Delaloge S, Andre F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. **2015;** 26(8):1698-704.

231. Hou Y, Nitta H, Parwani AV, Li ZJ. PD-L1 and CD8 are associated with deficient mismatch repair status in triple-negative and HER2-positive breast cancers. **2019;** 86:108-14.

232. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga MJC. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. **1991;** 68(10):2142-9.

233. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni LJ. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? **2010;** 7(12):683-92.

234. **Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al.** Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **2007;** 9(5):1-14.

235. **Ray M, Polite BN.** Triple-negative breast cancers: a view from 10,000 feet. **2010;** 16(1):17-22.

236. **Stovgaard ES, Nielsen D, Hogdall E, Balslev EJ.** Triple negative breast cancer–prognostic role of immune-related factors: a systematic review. **2018;** 57(1):74-82.

237. **Haschka M, Karbon G, Fava LL, Villunger AJ.** Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? **2018;** 19(3):45440.

238. **Dieci M, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al.** Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. **2014;** 25(3):611-8.

239. **Yeong J, Lim JCT, Lee B, Li H, Ong CCH, Thike AA, et al.** Prognostic value of CD8+ PD-1+ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer. **2019;** 7(1):1-13.

240. **Erken N, Shi HJ, Zhou Y, Shao N, Zhang J, Shi Y, et al.** High PD-L1 expression is closely associated with tumor-infiltrating lymphocytes and leads to good clinical outcomes in Chinese triple negative breast cancer patients. **2017;** 13(9):1172.

241. **Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen KJ.** The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **2016;** 11(4):0152500.

242. **Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al.** In Situ Tumor PD-L1 mRNA Expression Is Associated with Increased TILs and Better Outcome in Breast CarcinomasPD-L1 mRNA Positivity and Outcome in Breast Cancer. **2014;** 20(10):2773-82.

243. **Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al.** Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. **2017;** 2(2):150.

244. **Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al.** Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. **2015;** 33(9):983-91.

245. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Rappa F, Marasa S, et al. CD1a down-regulation in primary invasive ductal breast carcinoma may predict regional lymph node invasion and patient outcome. **2008;** 52(2):203-12.

246. Sahin Ozkan H, Ugurlu MU, Yumuk PF, Kaya HJ. Prognostic role of immune markers in triple negative breast carcinoma. **2020;** 26(4):2733-45.

247. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **2018;** 379(22):2108-21.

248. Huang W, Ran R, Shao B, Li HJ. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. **2019;** 178(1):17-33.

249. Soare GR, Soare CAJD. Immunotherapy for breast cancer: first FDA approved regimen. **2019;** 7(1).

250. Karnik T, Kimler BF, Fan F, Tawfik OJ. PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. **2018;** 72:28-34.

251. Carter JM, Polley M-YC, Leon-Ferre RA, Sinnwell J, Thompson KJ, Wang X, et al. Characteristics and Spatially Defined Immune (micro) landscapes of Early-stage PD-L1–positive Triple-negative Breast Cancer. **2021;** 27(20):5628-37.

252. Qin T, Zeng YD, Qin G, Xu F, Lu JB, Fang WF, et al. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. **2015;** 6(32):33972.

253. Mehan A, Anthony ML, Paul P, Syed A, Chowdhury N, Rao S, et al. Expression of Programmed Cell Death-1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Breast Cancers and Its Association with Clinicopathological Parameters. **2022;** 14(01):027-31.

254. Doğukan R, Uçak R, Doğukan FM, Tanık C, Çitgez B, Kabukcuoğlu FJ. Correlation between the expression of PD-L1 and clinicopathological parameters in triple negative breast cancer patients. **2019;** 15(4):235.

255. Liu S, Foulkes WD, Leung S, Gao D, Lau S, Kos Z, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. **2014;** 16(5):1-12.

256. Chen Z, Chen X, Zhou E, Chen G, Qian K, Wu X, et al. Intratumoral CD8+ cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. **2014;** 9(4):95475.

257. Salisbury T, Abozina A, Zhang C, Mao E, Banyi N, Leo J, et al. Histological subtype is associated with PD-L1 expression and CD8+ T-cell infiltrates in triple-negative breast carcinoma. **2022;** 57:151901.

258. Gonzalez-Ericsson P, Stovgaard E, Sua L, Reisenbichler E, Kos Z, Carter J, et al. International Immuno-Oncology Biomarker Working Group The path to a better biomarker: application of a risk management framework for the implementation of PD-L1 and TILs as immuno-oncology biomarkers in breast cancer clinical trials and daily practice. **2020;** 250(5):667-84.

259. Sanchez K, Page D, McArthur HL. Immunotherapy in breast cancer: an overview of modern checkpoint blockade strategies and vaccines. **2016;** 40(2-4):151-62.

260. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi SJ. Induction of tumor immunity by removing CD25+ CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **1999;** 163(10):5211-8.

261. Sutmuller RP, Van Duivenvoorde LM, Van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte–associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. **2001;** 194(6):823-32.

262. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **2004;** 10(9):942-9.

263. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. **2006;** 107(12):2866-72.

264. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. **2007;** 25(18):2586-93.

265. Yoshioka T, Miyamoto M, Cho Y, Ishikawa K, Tsuchikawa T, Kadoya M, et al. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. **2008;** 98(7):1258-63.

266. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. **2009;** 27(2):186-92.

267. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **2006;** 24(34):5373-80.

268. Mahmoud S, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AH, Ellis IO, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. **2011;** 127(1):99-108.

269. West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K, deLeeuw RJ, Nelson BH, et al. Tumour-infiltrating FOXP3+ lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer.* **2013;** 108(1):155-62.

270. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang JJB. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. **2016;** 16(1):1-8.

271. Chung YR, Kim HJ, Jang MH, Park SY. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocyte subsets in breast cancer depends on hormone receptor status. **2017;** 161(3):409-20.

272. Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, et al. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. **2013;** 1(4):625-32.

273. Lee S, Cho EY, Park YH, Ahn JS, Im YH. Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. **2013;** 52(1):73-81.

274. Stenström J, Hedenfalk I, Hagerling CJ. Regulatory T lymphocyte infiltration in metastatic breast cancer-an independent prognostic factor that changes with tumor progression. **2021;** 23(1):1-12.

275. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. **2011;** 89(4):557-63.

276. Gordon SJ. Alternative activation of macrophages. **2003;** 3(1):23-35.

277. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena PJJ. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **2009;** 86(5):1065-73.

278. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson KJB. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. **2012;** 12(1):1-9.

279. Klingen TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LAJ. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. **2017;** 69:72-80.

280. Adams TA, Vail PJ, Ruiz A, Mollaee M, McCue PA, Knudsen ES, et al. Composite analysis of immunological and metabolic markers defines novel subtypes of triple negative breast cancer. **2018;** 31(2):288-98.