T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAYDARPAŞA NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

GENEL CERRAHİ KLİNİĞİ

MEME KANSERİNDE İMMÜN BİYOMARKERLARIN NEOADJUVAN KEMOTERAPİYE YANITI DEĞERLENDİRMEDEKİ ROLÜ

Dr. Umut KINA KILIÇASLAN

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022

T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAYDARPAŞA NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

GENEL CERRAHİ KLİNİĞİ

MEME KANSERİNDE İMMÜN BİYOMARKERLARIN NEOADJUVAN KEMOTERAPİYE YANITI DEĞERLENDİRMEDEKİ ROLÜ

Dr. Umut KINA KILIÇASLAN

Prof. Dr. Meryem Günay Gürleyik

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022

TEŞEKKÜR

Tüm uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, gerekli imkanları sağlayan, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, tüm yardım ve emekleri için tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Günay GÜRLEYİK'e, engin bilgi, sabır ve tecrübeleri ile bize yol gösteren değerli hocam Op. Dr. Mehmet TALU'ya başta olmak üzere bilgi ve tecrübelerini bizlere aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan ÖZKAN, Op. Dr. Metin Tilki, Doç. Dr. Cebrail AKYÜZ, Op. Dr. Ali Sürmelioğlu, Doç. Dr. Oğuzhan SUNAMAK, Op. Dr. Hakan ÖZDEMİR, Op. Dr. Zehra ÜNAL ÖZDEMİR, Op. Dr. Doğan ERDOĞAN, Op. Dr. Sevcan ALKAN KAYAOĞLU, Op. Dr. Evren BESLER, Op. Dr. Süleyman TOKER, Op. Dr. Ayşegül AKTAŞ'a ayrıca asistanlık eğitimimde bir dönem birlikte çalıştığım değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet Ali UZUN, Prof. Dr. Ali AKTEKİN, Prof. Dr. Aysun ŞİMŞEK, Doç. Dr. Hasan ABUOĞLU, Op. Dr. Gülten ÇİÇEK OKUYAN, Op. Dr. İsmail Ege SUBAŞI, Op. Dr. Hakan UZUNOĞLU'na, tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Fügen AKER ve Dr. Sibel AYDIN AKSU'ya, Yeditepe Üniversitesi'nden Prof. Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL ve Öğr. Gör. Başak ARU'ya, Prof. Dr. Cemil Taşçıoğlu Şehir Hastanesi'nden Doç. Dr. Semra GÜNAY ve Doç. Dr. Arzu AKAN'a

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma, abilerime ve ablalarıma

Servis ve ameliyathanelerde beraber çalıştığımız tüm hemşire, sekreter ve personellere,

Varlıklarıyla bana her zaman güç veren, sevgisini ve desteğini her daim hissettiğim çok değerli aileme,

İyi günde ve kötü günde her zaman yanımda olan desteğini esirgemeyen eşim ve arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Umut KINA KILIÇASLAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
TABLOLAR iii
ŞEKİLLER iv
KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1 MEME KANSERİ 4
2.1.1 Epidemiyoloji 4
2.1.2 Risk Faktörleri 6
2.1.3 Tanı ve Tarama Yöntemleri 6
2.1.4 Meme Kanserinin Histopatolojik Tipleri 7
2.1.5 Moleküler Sınıflandırma 8
2.1.6 Evreleme 9
2.1.7Tedavi 12
2.1.7.1 Cerrahi: 12
2.1.7.2 Kemoterapi: 13
2.1.7.3 Radyoterapi: 13
2.1.7.4 Aksillanın yönetimi: 13
2.2 İMMÜNOLOJİ 14
2.2.1 Kanser İmmünolojisi 14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 17
4. BULGULAR 19
5. TARTIŞMA 48
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
7. KAYNAKLAR 54
8. ÖZGEÇMİŞ ..... **Error! Bookmark not defined.**
EK 1: ..... **Error! Bookmark not defined.**

TABLOLAR

Tablo 1: Klinikopatolojik özellikler 20
Tablo 2: Marker Ölçümlerinin Dağılımı 22
Tablo 3: Yaş ile Markerlerin İlişkisi 22
Tablo 4: HER2 Sonuçlarına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 23
Tablo 5: Ki-67 Ölçümü ile Markerlerin İlişkisi 24
Tablo 6: LVI Varlığına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 25
Tablo 7: PNI Varlığına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 26
Tablo 8: Histolojik Gradelere Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 27
Tablo 9: Nükleer Gradelere Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 29
Tablo 10: Tedavi Öncesi T ile Markerlerin İlişkisi 30
Tablo 11: Tedavi Öncesi N ile Markerlerin İlişkisi 31
Tablo 12: Moleküler Tiplere Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 33
Tablo 13: Postoperatif Bulgulara İlişkin Dağılımlar 35
Tablo 14: ypT durumuna Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 37
Tablo 15: NAK Sonrası PatolojikNDurumunaGöre Markerlerin Değerlendirilmesi 38
Tablo 16: MD Anderson Sınıflamasına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 40
Tablo 17: MD Anderson Düzeyleri ile Markerlerin İlişkisi 41
Tablo 18: RCB ile Markerlerin İlişkisi 41
Tablo 19: TIL Düzeylerine Göre Markerlerin Değerlendirilmesi 42
Tablo 20: Marker Ölçümlerinin İlişkisi 44

ŞEKİLLER

Şekil 1: Tümör mikro çevresinde rol oynayan önemli mekanizma ve etkileşimler ... 3
Şekil 2: Kadınlarda insani gelişme indeksi yüksek/çok yüksek olan ülkeler ve insani gelişme indeksi düşük olan ülkelerdeki kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş insidans ve mortalite oranları ... 5
Şekil 3: Yaş dağılımı ... 20
Şekil 4: Histolojik gradelere göre CD45-CD24+ ölçümleri dağılımı ... 28
Şekil 5: Preoperatif N durumunagöre CD45+PDL1+ ölçümleri dağılımı ... 32
Şekil 6: Moleküler alt tiplere göre CD45+PD1+ ölçümleri dağılımı ... 34
Şekil 7: MD Anderson sınıflaması dağılımı ... 36
Şekil 8: ypN durumuna göre CD45-CD24+ ölçümleri dağılımı ... 39
Şekil 9: Marker Ölçümlerinin İlişkisi ... 48

KISALTMALAR

AJCC : American Joint Committee on Cancer

BI-RADS : Breast Imaging Reporting and Data Systems

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

DCIS : Duktal Karsinoma in Situ

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ECM : Ekstrasellüler matriks

ER : Östrojen Reseptör

FISH : Fluorescence in situ Hybridisation

HER 2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HG : Histolojik grade

KETEM : Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezleri

LCIS : Lobuler Karsinoma in Situ

LVI : Lenfovasküler invazyon

NAK : Neoadjuvan Kemoterapi

NK : Natural killer

NG : Nükleer grade

PCR : Patolojik Tam Yanıt

PD-1 : Programmed Death-1

PD-L1 : Programmed Death- Ligand 1

PNI : Perinöral invazyon

PR : Progesteron Reseptör

RCB : Residual cancer burden

SEER : Surveillance Epidemiology and End Results

TIL : Tümör infiltre eden lenfosit

TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TME : Tümör mikro çevresi

TNM : Tümör Nod Metastaz

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda neoadjuvan tedavi öncesi tümör dokusundan elde ettiğimiz immün kontrol noktası proteinleri ile hastaların klinikopatolojik özellikleri ve konvansiyonel kemoterapi yanıtı ilişkisini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Temmuz 2020- Ocak 2021 arasında Luminal A grubu dışındaki neoadjuvan kemoterapi alacak olan 61 hastadan tedavi öncesi kalın igne ile tümör merkezinden biyopsi alındı, akan hücre ölçer ile CD45+ popülasyon üzerinden alınan lenfosit kapısında PD1, CTLA-4, TIM-3, CD24 ve CD44 protein ifade seviyeleri, CD45- popülasyonda ise CD326, CD24, CD44 ve PD-L1 protein ifade seviyeleri ölçüldü. Ayrıca tümör stromasında bulunan CD326+ hücreler üzerinde CD44 ve CD24 seviyeleri değerlendirildi. NAK sonrası tedavi yanıtları Md Anderson RCB skoru ile değerlendirildi. İstatistiki değerlendirme için IBM SPSS Statistics 23 programı ile uygun yöntemler kullanıldı.

Bulgular: İmmun markerlar ile olguların yaş, HER-2, LVI, NG, tedavi öncesi T, ypT, MD Anderson RCB durumları arasında ilişki saptanmamıştır. Kİ 67 ile PD-1/ PD-L1 korele görülüp, PNI ile PD-L1 ve CD24 ölçümleri arasında anlamlılığa yakın ilişki saptanmıştır. HG 3 olan olgularda CD24 ifadesinin fazla oldugu saptanmıştır. Üçlü negatif olgularda PD1 + lenfositlerin fazlalığı anlamlılığa yakın düzeyde bulunmuştur. NAK sonrası aksiller tam yanıtlı olgularda CD24 pozitifliği görülmüştür. TIL düzeyleri yüksek olgularda CTLA4+lenfositler arasında korelasyon saptanmıştır. PCR olan olgularda lenfositler ile lenfositlerdeki PD-1 ve PD-L1 ifadesi arasında negatif korelasyon görülmüştür. İyi yanıtlı olgularda TIM3ve PD-L1arasında korelasyon görülürken az yanıtlı olgularda lenfosit ve CTLA4 arasında korelasyon görülmüştür. Yanıtsız olgularda ise anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: Ki 67 yüksek olgularda PD-1/ PD-L1 ve üçlü negatif grupta PD-1 yüksekliği kötü prognozlu bu olgularda immünoterapi açısından bir gösterge olarak değerlendirilebilir. NAK sonrası ypN0 gruplardaki CD24 pozitifliği aksiller hastalıkta kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkilendirilebilir. Ancak henüz meme kanseri

alanında gelişmekte olan immünoloji ve immünterapi için daha geniş hasta profili ile daha fazla veriye ihtiyacımız bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: CTLA-4, Meme kanseri, Neoadjuvan kemoterapi, PD-1, PD-L1, TIM-3

ABSTRACT

Aim: We investigated relationship between immune checkpoint proteins obtained from tumor tissue before NACT and clinicopathological characteristics and their response to conventional chemotherapy.

Materials and Methods: Tru-cut biopsies were taken from tumor center before treatment from 61 patients who will receive NACT, except for Luminal A, between July 2020 - January 2021. PD1, CTLA-4, TIM-3, PD1, CTLA-4, TIM-3, CD24 and CD44 protein expression levels, CD326, CD24, CD44 and PD-L1 protein expression levels in CD45- population were measured. CD44 and CD24 levels were evaluated on CD326+ cells in the tumor stroma. Treatment responses after NAC were evaluated with MD Anderson RCB score. Appropriate statistical methods were used with IBM SPSS Statistics-23 program.

Results: There is no correlation between immune markers and age, HER-2, LVI, NG, pre-treatment T, ypT, MD Anderson RCB status. Ki-67 and PD-1/ PD-L1 were correlated. Close correlation was found between PNI and PD-L1, CD24 measurements. In cases with HG3, CD24 expression was high. In triple negative cases, expression of PD1 was found close to significance. CD24 positivity was observed in cases with axillary complete response. A correlation was found between CTLA-4 in cases with high TIL levels. There was negative correlation between lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression in lymphocytes in cases with PCR. Correlation was observed between TIM3 and PD-L1 in cases with good response, while a correlation was observed between lymphocytes and CTLA-4 in cases with poor response. No significant correlation was found in unresponsive cases.

Conclusion: PD-1/PD-L1 elevation in Ki-67 high cases and PD-1 elevation in triple negative group can be evaluated as an indicator for immunotherapy. CD24 positivity in ypN0 groups may be associated with good response to chemotherapy in axillary disease. We need more data with wider patient profile for immunology and immunotherapy.

Keywords: Breast cancer, CTLA-4, Neoadjuvant chemotherapy, PD-1, PD-L1, TIM-3

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri Türkiye'de ve dünyada en sık tanı alan kanser olup, Türkiye'de kadın kanserlerinin 4'te birini meme kanseri oluşturmaktadır. Sağlık istatistikleri yıllığının 2019 verilerine göre meme kanserine bağlı ölümler; malignitelere bağlı ölümlerde akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra 3. sırada gelirken, tüm ölümlerin %1'ini oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bu meme kanseri görülme sıklığının arttığını ancak meme kanserine bağlı ölümlerin ise azaldığı izlenmiştir. Bu konuda tarama çalışmalarının ve erken teşhisin rol oynadığı düşünülmektedir. Ülkemizde 2016 ve 2019 Türkiye İstatistik Kurumunun verileri karşılaştırıldığında 15 yaş üzeri kadınlarda son 1 yıl içerisinde mamografi çektirme oranlarının arttığı görülmektedir (1).

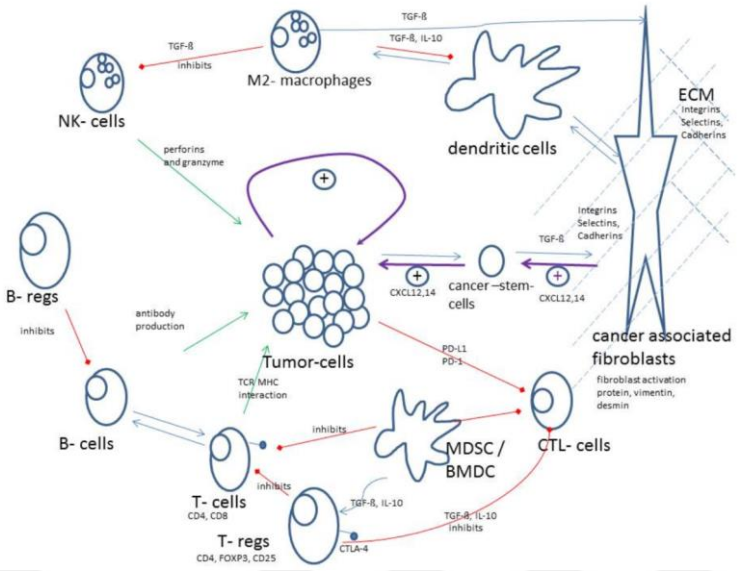
Meme kanserinin seyri ve tedavisinde hangi evrede saptandığının yanında bir çokfaktör önemli rol oynamaktadır. Tümör boyutu, aksiller lenf nodu tutulumu, hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün histolojik alt tipi, moleküler alt tipi (hormon reseptör pozitifliği, HER 2 ((Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) ekspresyonu), Ki-67 proliferasyon indeksi, LVI ve PNI(lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon), hücresel ve nükleer sınıflaması, tümör nekrozu varlığı, genetik mutasyon varlığı tümör davranışını etkileyebilecek parametrelerdir. AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer) 8. TNM(Tümör Nod Metastaz) evrelemesinde anatomik evrelemeye ek olarak ER(östrojen reseptörü), PR(progesteron reseptörü) , HER 2 durumu ve histolojik evrenin (HG) dahil edildiği prognostik evreleme dikkati çekmektedir (2,3).

Meme kanserini tedavi etmek için radikal mastektomi ile başlanan bu yolculukta, cerrahi tedavinin yeri gittikçe azalmış ve yerini medikal tedavilere bırakmıştır. Kemoterapi, hormonoterapi, radyoterapi ve cerrahi başlıca tedavi yöntemlerimiz olup, hastalığın evresine göre seçilecek tedavi modaliteleri değişmektedir. Erken evre kanserlerde öncelikli olarak cerrahi tedavi tercih edilmekteyken, lokal ileri meme kanserlerinde neoadjuvan kemoterapi (NAK) temel tedavi yöntemimiz haline gelmiştir. Günümüzde NAK'ıngittikçe yaygınlaşmasının

birçok sebebi bulunmaktadır. Tümör boyutunu ve aksiller lenf nodu pozitifliğini gerileterek, cerrahinin deeskalasyonu böylece cerrahi ile birlikte oluşabilecek komplikasyonların azalmasını sağlaması, NAK'a verilen yanıt ile prognoza dair fikir vermesi, üçlü negatif meme kanserlerinde cerrahi sonrası yeni ajanların kullanılmasına olanak sağlaması bunlardan en çarpıcıları olmaktadır.

Moleküler sınıflamaya göre hormon reseptörü pozitif olan Luminal subtipler hormonoterapiden fayda görürken, NAK'a daha düşük yanıt gösterirler ve daha iyi prognozludurlar. HER 2 ifade eden tümörlerde ise HER 2'ye karşı geliştirilen monoklonal antikorlar kullanılabilir. Üçlü negatif grup için ise günümüzde özelleştirilmiş ek tedavi modalitesi standart olarak kullanılmamaktadır. Özellikle non luminal moleküler tiplerin kemoterapi yanıtı daha iyi olarak görülmekle beraber prognozları daha kötüdür. Bu sebeple bu gruplarda erken evrelerde bile NAK kullanımı tartışılmaktadır (4). Ancak kemoterapiye yanıtsızlık durumu başta hormonoterapi ve anti HER 2 tedavi ihtimali olmayan üçlü negatif grup olmak üzere tüm meme kanseri hastaları için ek tedavi yöntemi ve kemoterapiden alınacak yanıtı öngörebilecek parametrelerin arayışına yöneltmiştir. Bu noktada tümör immünolojisi dikkat çekerek yeni çalışmaların odağı olmuştur.

Tümör mikroçevresi(TME) kanser dokusunun ve kanser kök hücrelerinin etkileşim halinde olduğu inflamatuar hücreler, fibroblastlar, ekstraselüler matriks(ECM),damarsal yapıların tümünü ifade eder. TME malign hücrelerin çevre ile iletişimini sağlayarak büyüme ve yayılmasına zemin hazırlayabilir. ECM yoluyla büyüme faktörleri ve kemokinler iletilirken, anjiogenez yoluyla tümörün beslenmesi sağlanabilir, inflamatuar hücreler yoluyla tümör hem yok edilmeye çalışılırken, hem de immün sistemden saklanarak büyüme ve diğer dokulara taşınmayı sağlayabilir. TME'deki immün hücreler ve malign hücreler arasındaki immün yanıtı düzenlemek için immün kontrol mekanizmaları devreye girer. Şekil 1 de bu mekanizmada yer alan önemli faktörler şematize edilmiştir.



Şekil 1: Tümör mikro çevresinde rol oynayan önemli mekanizma ve etkileşimler (5)

Programmed Death-1(PD-1), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) ve TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) gibi birçok immün kontrol noktası tanımlanmış olup bu reseptörlerin ligandları ile etkileşimi aşırı immün yanıtı engellemek üzere başta T hücre olmak üzere üzerinde ifade edildikleri hücrelerin aktivasyonlarını sınırlarlar. TME ve tümörü infiltre eden lenfositlerde (TIL) bu durum görüldüğünde tümör hücrelerinin tanınmasını ve yok edilmesini engelleryerek tümör progresyonuna zemin hazırlar.

Tlenfosit ve tümör hücreleri üzerinde CTLA-4 görülebilir ve eş uyaran oluşturmak için CD28 ile yarışarak uyarılmayı engeller. CTLA-4'e karşı geliştirilen ipilimumab malign melonomda olmak üzere ilk kez kullanıma giren immün kontrol noktası inhibitörüdür.

Liagandı olan PD-L1(Programmed Death- Ligand 1) ile birleşerekPD-1 uyarı sağladığında immüntolerans oluşturur. Antijen sunan hücrelerde yer alan PD-L1 artışı aynı zamanda CD80'nin CD28'e bağlanmasını da engelleyerek eş uyaran oluşmasını da engeller. T hücrelerinin yanı sıra NK(natural killer) hücreler, B hücreleri gibi immün hücrelerde de ifade edildiğinden, buradaki yanıtı da inhibe eder. PD-1/PD-L1 yolağını inhibe eden nivolumab ve pembrolizumab gibi

moleküller küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve melanom gibi kanser tiplerinde denenmiştir (6)

Yardımcı T hücrelerinde olmak üzere TIM-3 myeloid hücrelerde yaygın olarak ifade edilmektedir. Otoimmün hastalıklarda yaygın görülen TIM-3 için geliştirilen anti TIM-3 tedaviler genel olarak PD-1 veya CTLA-4 tedavilerine kısmi yanıt veren hastalarda kombine tedaviler için denenmektedir(7).

Standart kemoterapötiklerin tek etkileri hücre ölümü yoluyla değil aynı zamanda immüniteyi uyararak da görülmektedir. Hücre ölümü sonrası açığa çıkan antijenler veya tüm vücutta kemoterapi sonrası meydana gelen sistemik etkiler ile immün sistem üzerine etki eder(8).

Biz çalışmamızda neoadjuvan tedavi öncesi tümör dokusunda akan hücre yöntemiyle elde ettiğimiz immün kontrol noktası proteinleri ile konak immünitesi ve konvansiyonel kemoterapi yanıtı ilişkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

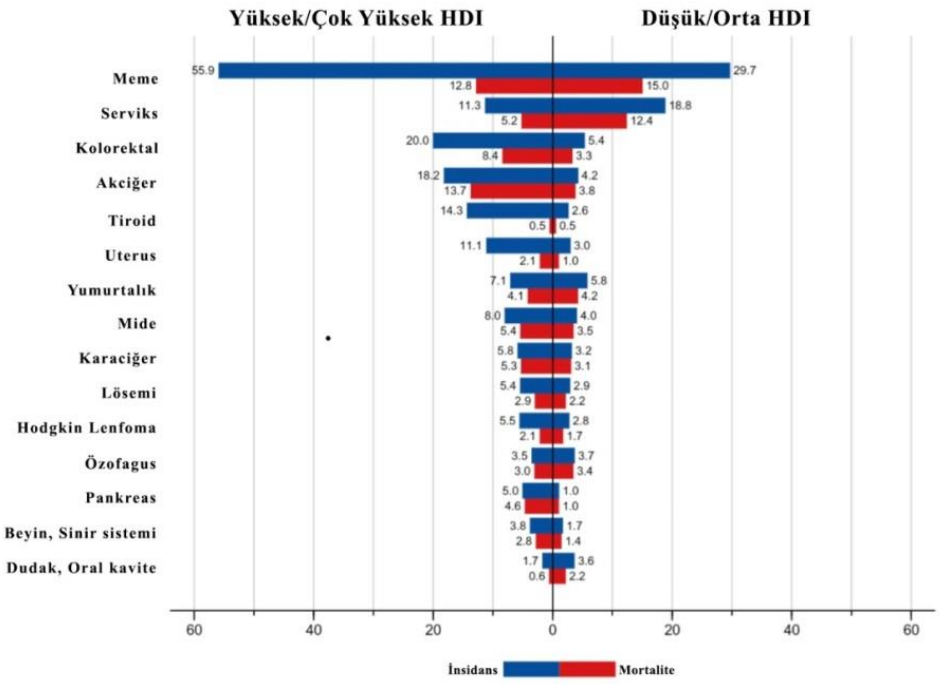
2.1 MEME KANSERİ

2.1.1 Epidemiyoloji

Meme kanseri GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünyada her iki cinsiyet için en sık yeni tanı alan kanser olup, kadınlar arasında ise kansere bağlı ölümlerde ilk sırada gelmektedir(9).Yine GLOBOCAN 2020 ve Türkiye Birleşik Veri Tabanı'nın en son yayınlanan 2017 verilerine göre kadınlarda %23,9 ile en sık tanı alan kanser türüdür (10,11) .

Ülkemizde 4 kanser tanısı alan kadından 1'i meme kanseri iken, bu hastaların çoğunluğu erken veya lokalize evrede başvurmaktadır. Ancak %11 hasta metastatik hastalığa sahip iken tanınmıştır.

İnsani gelişme indeksi yüksek olan ülkelerde insidansın daha yüksek olduğu görülürken, henüz gelişmekte olan ülkelerde ise gelişmiş ülkelere oranla mortalitenin daha yüksek olduğu görülmektedir. Şekil 2 insani gelişme indeksine göre en sık görülen kanserlerin mortalite ve insidanslarını göstermektedir. Bu durum genel olarak risk faktörlerine yüksek maruziyet ve tarama imkanlarının daha ulaşılabilir olması ile ilişkilendirilmiştir(12).



Şekil 2: Kadınlarda insani gelişme indeksi yüksek/çok yüksek olan ülkeler ve insani gelişme indeksi düşük olan ülkelerdeki kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş insidans ve mortalite oranları- GLOBOCAN 2020

2.1.2 Risk Faktörleri

Meme kanseri görülme riski kadınlarda erkeklere oranla 100 kat daha fazla iken artan yaşla beraber artış görülmektedir. Artmış östrojen maruziyeti en önemli risk faktörlerinden biridir.

Erken menarş, geç menapoz, beyaz ırk, kadın cinsiyet, ailede kanser öyküsü, memede proliferatif lezyon varlığı, radyasyon öyküsü ve dens meme yapısı gibi değiştirilemeyen faktörler meme kanseri riskini arttırmaktadır. Ancak ilk doğum yaşı ve doğum sayısı, alkol kullanımı, vücut kitle endeksi ve bel çevresi, fiziksel aktivitelerin kısıtlı olması, hormon replasman tedavileri modifiye edilebilecek risk faktörleri arasındadır. Özellikle vücut kitle indeksindeki artış postmenapozal dönemde görülen meme kanseri riskinde artış oluşturmaktadır(13,14).

Görülen BRCA1, BRCA2, tp53 ve CHECK-2 genlerindeki gibi mutasyonlar beraberinde eşlik edebilecek birçok kanserle beraber meme kanseri riskini arttırır (15).

2.1.3 Tanı ve Tarama Yöntemleri

En basit tarama yöntemi kendi kendine meme muayenesi ve klinik meme muayenesi olup, son dönemde bu yöntemlerin erken dönem meme kanseri saptama ve sağkalım üzerine olan etkileri tartışılmaktadır. Ülkemiz tarama programı kapsamında halen 20 yaş üstü kadınlara her ay kendi kendine meme muayenesi önerilmektedir.

Mamografi tarama programının ve erken tanıdaki en önemli basamak olup ülkemizde 40 ile 69 yaş arasındaki kadınlara 2 yılda bir Aile Sağlığı Merkezleri ve KETEM(Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezleri) tarafından uygulanır. Kraniokaudal ve mediolateralaroblik olmak üzere 2 düzlemde çekim alınır. Tanı için mamografi kullanılır iken ek çekimler yapılabilir. Bu yöntemin düşük doz radyasyon içermesi veya dansitesi yüksek memelerde yeterli bilgi verememesi kısıtlayıcı olarak gözükse bile mortalite üzerine olan olumlu etkisi ile efektif olarak kullanılabilecek bir yöntemdir. Günümüzde mamografi sonuçları BI-RADS (Breast Imaging

Reporting and Data Systems) kullanılarak yorumlanmaktadır ve bu sistem klinisyene takip açısından net yönlendirmelerde bulunmaktadır.

Ultrasonografi meme yapısı itibari ile mamografinin yetersiz kaldığı alanlarda, solid-kistik ayrımının yapılmasında, aksiller lenf nodu varlığının değerlendirilmesinde, apse ve mastit varlığında, gebelik döneminde ve biyopsi yapılırken sıklıkla kullandığımız ancak kişi bağımlı olması nedeniyle kısıtlayıcılığı olan bir yöntemdir.

Tomosentez daha ince kesitlerle 3 boyutlu görüntünün yaratıldığı bir mamografi yöntemi olup tanı oranını arttırdığı belirtilmiştir.

Manyetik rezonans görüntüleme özellikle yüksek risk altındaki kadınlarda (ailede veya hastada BRCA veya kanser riski arttıran genetik mutasyonun bulunması, göğüs duvarına radyasyon öyküsü vb) tarama programına eklenmesi önerilmektedir. Mamografinin yetersiz kaldığı noktalarda, operasyon geçmişi olan, implantı bulunan veya gebeliği bulunan hastalarda tercih edilebilir. Pahalı bir yöntem olması ve yalancı pozitifliğinin fazla olması ise testin olumsuz yönlerindendir.

Tanı sonrasında ise metastaz taraması amacıyla akciğer grafisi, tomografi veya pozitron emisyon tomografisi kullanılabilir.

2.1.4 Meme Kanserinin Histopatolojik Tipleri

1) Non-invaziv epitelyal tümörler

a) Duktal karsinoma in situ (DCIS)

- Papiller, Komedo, Kribriform ve Solid tipler

b) Lobüler karsinoma in situ (LCIS)

- Pleomorfik
- Florid

2) İnvaziv epitelyal tümörler

a) İnvaziv Lobüler Karsinom (%10)

b) İnvaziv Duktal Karsinom

- İnvaziv duktal karsinom, özel tip belirtilmemiş(%50-70)

- Tübüler Karsinom(%2-3)
- Müsinöz Karsinom (%2-3)
- Medüller Karsinom (%5)
- İnvaziv kribriform karsinom(%1-3)
- İnvaziv papiller karsinom (%1-2)
- Adenoid Kistik Karsinom(%1)
- Metaplastik Karsinom (%1)

3) Mikst Tümörler

a) Fillodes tümörler (benign ve malign)
b) Karsinosarkomlar
c) Anjiosarkomlar
d) Adenosarkomlar(16).

2.1.5 Moleküler Sınıflandırma

Meme kanserleri immünohistokimyasal yöntemler ile öncelikli olarak ER, PR, HER2 gen amplifikasyonu ve Ki67 pozitifliği ölçülerek 4 ana profile ayrılmıştır (17).

Luminal A ve B hormon pozitif subtipler olup ER pozitiftirler. Çoğunlukla buna PR pozitifliği eşlik eder. HER2 negatif olan ve Ki67 değeri düşük ölçülen olgular luminal A olarak gruplanırken, HER2 pozitifliği olan veya Ki67 değeri yüksek olan gruplar luminal B olarak gruplandırılırlar. Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %60'ını Luminal A, %20'sini ise Luminal B grubu oluşturur. Luminal A kanserler hormonoterapiye karşı en iyi yanıt veren, iyi prognozlu gruptur. Luminal B kanserlerin ise hormonoterapiye olan yanıtı A gruba göre düşük kemoterapi yanıtı daha iyi beklenir. Daha nadir görülmekle beraber non Luminal gruplara göre daha iyi prognozludurlar.

Hormon reseptörü negatif olan ve HER2 pozitifliği olan olgular HER2 pozitif grup olarak adlandırılmakta olup vakaların %10'unu oluşturur. Kötü prognoz, erken dönem nüks, hormonoterapilere yanıtsız olarak bilinirler. Anti HER2 tedaviler ile

daha iyi yanıtlar alındığı görülmekle beraber HER2 pozitifliği tek başına kötü prognoz göstergesidir.

Östrojen reseptörü, PR ve HER2 negatif olanlar üçlü negatif olarak adlandırılmakta ve genellikle yüksek Ki67 değerlerine sahip olmaktadırlar. Vakaların yaklaşık %10'unu oluştururlar (18,19). En agresif, kötü prognozlu subtiptir. Erken dönemde nükslerin; akciğer ve beyin olmak üzere, metastazların görüldüğü tipler olmakla beraber kemoterapiye yanıtları iyidir.

2.1.6 Evreleme

En son AJCC tarafından 2017 yılında yayınlanan, TNM sistemi en yaygın kullanılan evreleme sistemidir. Son güncellemeler ile anatomik evreleme ile birlikte grade ve reseptör durumları da göz önüne alınarak prognostik evreleme de düzenlenmiştir.

Primer Tümör

Tx Değerlendirilemeyen primer tümör

T0 Primer tümör bulgusu yok

Tis DCIS veya Paget hastalığı

T1 En büyük çapı ≤ 2 cm

- **T1mic** En büyük çapı ≤ 0.1 cm mikroinvaziv tümör
- **T1a** Tümör çapı >0.1 cm, ≤ 0.5 cm
- **T1b** Tümör çapı >0.5 cm, ≤ 1 cm
- **T1c** Tümör çapı > 1 cm, ≤ 2 cm

T2 Tümör çapı > 2 cm, ≤ 5 cm

T3 Tümör çapı > 5 cm

T4Tümör boyutundan bağımsız göğüs duvarı ve/veya cilt tutulumu. Sadece dermis invazyonu T4 olarak değerlendirilmez.

- **T4a** Göğüs duvarı tutulumu. (Göğüs duvarı tutulumu olmadan, pektoral kas invazyonu ya da yapışıklığı T4 kabul edilmemektedir)
- **T4b** İnflamatuvar kanser bulguları bulunmadan, ciltte ülserasyon ve/veya aynı taraf memede satellit nodüler ve/veya ödem (peau d'orange-portakal kabuğu görünümü)

T4c T4a ve T4b

T4d İnflamatuar karsinom

Bölgesel Lenf Nodları (Klinik)

Nx Değerlendirilemiyor

N0 Lenf nodu metastazı yok

N1 Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında hareketli metastatik lenf nodları

N1mi Mikrometastaz (, 0,2mm den büyük, 2mmden küçük)

N2 Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında yapışık veya fikse lenf nodları veya aksiller lenf nodlarında metastaz olmadan, klinik olarak tespit edilen internal mammaryan lenf nodlarında metastaz.

N2a Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında birbirine yapışık, fikse veya diğer yapılara fikse olmuş lenf nodu metastazı

N2b Aksiller lenf nodlarında metastaz olmadan klinik olarak tespit edilen sadece internal mammaryan lenf nodlarında metastaz

N3 Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında metastaz olsun ya da olmasın aynı taraf infraklavikuler lenf nodu metastazı (Düzey III); veya aksiller lenf nodu metastazı ile birlikte klinik olarak tespit edilmiş aynı taraf internal mammaryan lenf nodlarında metastaz veya aksiller ya da internal mammaryan lenf nodlarında metastaz olsun ya da olmasın aynı taraf supraklavikuler lenf nodlarında metastaz

N3a Aynı taraf infraklavikuler lenf nodlarında metastaz

N3b Aynı taraf aksiller ve internal mammaryan lenf nodlarında metastaz

N3c Supraklavikuler lenf nodu metastazı

Bölgesel Lenf Nodları (Patolojik)

pNx Değerlendirilemiyor

pN0 Metastaz yok ya da sadece izole tümör hücresi mevcut.

pN0(i+) Sadece izole tümör hücresi

pN0(mol+)izole tümör hücresi yok ancak pozitif moleküler bulgular mevcut.

pN1 Mikrometastazlar veya 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz ve/veya klinik olarak negatif internal mammaryan lenf nodlarında tespit edilen mikro ya da makrometastaz

pN1mi0,2-2mm arası mikrometastaz

pN1a1-3 lenf nodunda, en az bir tanesi 2 mm'den büyük metastaz

pN1b Aynı taraftaki internal mammaryan lenf nodlarında metastazlar(izole tümör hücresi hariç)

pN1c pN1a ve pN1b

pN2 4-9 lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodlarında metastaz olmaksızın klinik olarak tespit edilen internal mammaryan lenf nodlarında metastaz

pN2a 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz

pN2b Aksiller lenf nodunda metastaz olmaksızın klinik veya patolojik olarak tespit edilen internal mammaryan lenf nodu metastazları

pN3 10 veya daha fazla lenf nodunda metastaz; veya infraklavikuler lenf nodunda metastaz (Düzey III); veya bir ya da daha fazla düzey I, II aksiller lenf nodu metastazı varlığında aynı taraf internal mammaryan lenf nodlarında klinik olarak tespit edilen metastaz; veya klinik olarak tespit edilemeyen, internal mammaryan lenf nodunda mikro veya makrometastaz ve 3'den fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya aynı taraf supraklavikuler lenf nodlarında metastaz

pN3a 10 ya da daha fazla aksiller lenf nodu metastazı (en az birinde 2 mm'den daha büyük tümör depoziti); veya infraklavikuler lenf nodu metastazı (Düzey III)

pN3b Bir ya da daha fazla aksiller lenf nodu metastazı varlığında aynı taraf internal mammaryan lenf nodlarında klinik olarak tespit edilebilen lenf nodu metastazı; veya klinik olarak tespit edilemeyen biyopsi ile saptanan internal mammaryan lenf nodlarında mikro veya makrometastaz ve 3'den fazla aksiller lenf nodunda metastaz

pN3c Supraklavikuler lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz

M0 Uzak metastaza ait klinik ve radyolojik bulgu yok

cM0(i+) Uzak metastaza ait klinik veya radyolojik bulgu yok fakat metastaza ait semptom ve bulgusu olmayan hastada kanda, kemik iliğinde veya bölgesel olmayan lenf nodlarında 0.2 mm'den büyük olmayan moleküler veya mikroskopik olarak saptanmış tümör hücreleri

cM1 Klinik ve radyolojik olarak saptanmış uzak metastaz

pM1 Uzak organlarda, histolojik olarak tanımlanmış herhangi bir metastaz veya bölgesel olmayan lenf nodlarında 0,2mm den büyük metastaz

2.1.7Tedavi

Meme kanseri için başlıca 3 tedavi modalitesi kullanılmaktadır. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi. Bu modalitelerin kullanımı hastalığın evresi, moleküler alt tipi, yerleşimi, hastanın yaşı ve genel durumu gibi birçok etkene bağlı olarak değişmektedir.

2.1.7.1 Cerrahi: Radikal mastektomi ile başlayan cerrahi yerini gittikçe daha az invaziv seçeneklere bırakmıştır. Mastektomi, meme koruyucu cerrahi, onkoplastik cerrahi uygulanabilecek olup cerrahi yöntemler arasında sağkalım açısından anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir(20,21).

Memede yaygın malign kalsifikasyonların olması, temiz cerrahi sınır ile (invaziv karsinom için boyalı sınırda tümör olmaması, DCIS için <2mm olmak üzere) çıkartılamayacak multisentrik tümörler, inflamatuar meme kanseri ve operasyon sonrası radyoterapi almayı engelleyecek durumlar (gebelik, göğüs duvarına RT öyküsü vb.) olması durumunda meme koruyucu cerrahi ve onkoplastik meme koruyucu cerrahi tercih edilemez. Yine bağ doku hastalıklarının bulunması, küçük memede büyük tümör rölatif kontraendikasyon olarak kabul edilebilir(22).

2.1.7.2 Kemoterapi: Adjuvan, neoadjuvan veya palyatif olarak kemoterapi uygulanabilir.

Lokal ileri hastalıkta tümör boyutunu küçültmek meme koruyucu cerrahiye uygun hale getirebilmek, aksilla pozitif hastalıklarda aksillanın negatifleşmesini bekleyerek diseksiyondan hastayı korumak ve hastanın kemoterapi yanıtını görerek prognoz ve kullanılabilecek rejimler hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamak adına gün geçtikce daha sık kullandığımız bir modalite haline gelmektedir. Neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi arasında hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım arasında fark gösterilmemiştir(23–25).

Hormon reseptörü pozitif vakaların hormonoterapiden fayda gördükleri bilinmektedir. Bu sebeple östrojen reseptör modülatörleri veya aromataz inhibitörleri kullanılabilir. HER 2 reseptör pozitifliği olan hastalarda ise anti-HER2 tedaviler verilmektedir(26).

2.1.7.3 Radyoterapi: Meme koruyucu cerrahi sonrası tüm hastalara, pektoral kas invazyonu olan hastalara ve aksiller tutulumu olan hastalarda postoperatif radyoterapi rekürrensi azaltmak amacıyla uygulanmaktadır. Yine ileri derecede cilt tutulumu olan ve cerrahiye uygun olmayan hastalarda palyatif amaçla uygulanabilir(27).

2.1.7.4 Aksillanın yönetimi: Klinik olarak negatif olan ve NAK'a yönlendirilmemiş olan erken evre meme kanserli hastalarda cerrahi tedaviye sentinel lenf nodu biyopsisi eklenir. Ancak klinik negatif hastalarda sentinel lenf nodunda 2 adete kadar görülen pozitiflikler nedeniyle yapılan aksiller diseksiyonun sağkalıma etkisi olmadığı gösterilmiştir (28).

Neoadjuvan kemoterapi sonrası aksilla tekrar değerlendirilir ve pozitif olması durumunda aksiller lenf nodu diseksiyonu uygulanır. Ancak NAK sonrası radyolojik ve klinik olarak negatifleşen aksillada sentinel lenf nodu eksizyonu yapılır ve pozitiflik olması durumunda aksiller diseksiyon uygulanır(29).

2.2 İMMÜNOLOJİ

İnsan vücudu edinsel ve doğal bağışıklık olmak üzere 2 ana yol üzerinden kendisinden olan ile olmayanı ayırarak kendisinden olmayan ile savaşır.

Doğal bağışıklık içerisinde, vücudun bariyer sistemleri(cilt, mide asit salgısı gibi) ve non spesifik yanıt oluşturan fagositik hücreler, kompleman sistemleri, akut faz reaktanları, doğal öldürücü hücreler gibi süreçler bulunur.

Edinsel bağışıklık ise hücresel ve hümoral olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Hümoral bağışıklıktan temel olarak B lenfositler sorumlu iken, hücresel bağışıklıktan T lenfositler sorumludur.

2.2.1 Kanser İmmünolojisi

Kanser hücreleri immün sistem tarafından üzerinde bulundurdukları antijenler sayesinde kendinden olmayan olarak tanınır. Bu antijenler mutasyona uğrayan normal proteinler, onkogen ya da tümör baskılayıcı genlere ait ürünler veya normal proteinler aşırı ifade edilmesi sonucu ortaya çıkabilir. Bunun sonucunda gelişen immün yanıtta hem edinsel hem doğal bağışıklık rol oynamaktadır.

Yeni gelişen tümöral hücreler insan vücudunda inflamatuar yanıt başlatır. Tümör karşıtı yanıtı oluşturmadaki en önemli faktör sitotoksik T lenfositler önemli yer tutmaktadır. Dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin CD8+ T lenfositlere eş uyaranlar ile antijen sunması ile T lenfositler aktive olur(30,31).

Tümör mikro çevresi tümörü çevreleyen fibroblast, stromal hücreler, immün hücreler ve adipositler gibi hücreleri barındıran tümör stromasına dokunun pH değeri, oksijenlenmesi ve ECM'e eklenmesi ile meydana gelen ortamdır. Tümör gelişiminde öncelikle anti tümör yanıtı oluşturacak immün hücreler mikroçevrede hakim iken zaman içerisinde yerini tümör gelişimine katkıda bulunan immünsuprese bir ortama bırakır.

Tümörün immün düzenlenmesinin 3 aşaması mevcuttur. Tümöral dokunun immün sistemi aktive etmesi ile başta sitotoksik T lenfositler olmak üzere tümör

eradike edilmeye çalışılır. Tümör hücrelerinin tamamının yok edilmesi durumu bize bertaraf etme(eliminasyon) evresini anlatır.İmmün sistem tarafından tanınan hücreler elimine edilir iken, immün sistem tarafından tanınmayan hücreler çoğalmaya devam ederler. Tümör hücreleri tamamen eradike edilemeyerek, immün yanıt ile sınırlandırılıldığında tümör denge(eqiulibrum) fazında kalır. Tümör hücrelerinin immün sistem tarafından baskılanamadığı ve tümör gelişiminin devam ettiği durumda ise kaçış evresine girilmiş olur (32).

İmmün yanıttan kaçmak için tümör dokuları MHC sınıf I ya da antijenler gibi immün sistemi uyaracak reseptörlerini azaltırken, immün sistemde negatif geri besleme yolaklarını uyarma yoluna gidebilir. Bu negatif geri besleme yolaklarından inhibitör reseptörler olup immün kontrol noktaları olarak da adlandırılırlar. Bu reseptörler ve ligandları periferik immün tolerasın sağlanmasında ve kronik inflamasyonda oluşacak aşırı yanıtın engellemesinde görev alırlar. Başta PD-1, CTLA-4 ve TIM-3 olmak üzere birçok inhibitör reseptör tanımlanmıştır (6).

CTLA-4:

CD28:B7 süper ailesinin bir üyesidir ve regülatör T hücreleri üzerinde eksprese edilir. T hücre aktivasyonu için T hücredeki CD28 ve antijen sunan hücrelerdeki CD80/86 eş uyaranları gerekmektedir. CTLA-4 CD80 ve 86'ya CD28'e göre daha yüksek bağlanma özelliği gösterir. Eş uyarım sağlanamaması üzerine Thücreleri aktive olamaz. CTLA-4 aynı zamanda 80 ve 86'nın hücre yüzeyinden kaldırılmasını sağlayarak diğer T hücrelerin de aktifleşmesini engellemiş olur (33,34).

PD-1/PD-L1:

B lenfosit, T lenfosit, NK hücreler gibi birçok hücrede ifade edilen PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere 2 çeşit ligandı bulunur. PD-1 CD28:B7 süper ailesinin bir üyesidir.PD-L1 yaygın olarak hücrelerde ifade edilirken PD-L2 hematopoetik hücrelerde daha çok görülür. PD-1 eksprese eden bu hücrelere, ligandının bağlanması ile aşırı immün yanıt ve otoimmünizasyon engellenir. Bunun yanında PD-L1 CD80'e de bağlanarak T hücre aktivasyonunu engeller. IL 2 gibi sitokinlerin

de salınımı engellenir. Kanser hücreleri üzerinde bulunan artmış PD-1'in ligandı ile aktivasyonu sonrası anerji veya apopitoz gelişerek immün sistemden kaçış gerçekleşir. Yine kanser hücrelerindeki PD-1 yolağının kanser oluşumun, epitelyal mezenkimal dönüşümü, metastaz ve invaziv hastalık riskini arttırdığı ve ilaç rezistansı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (35). Birçok tümörde gösterilen yüksek PD-L1 düzeyleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

TIM-3:

T hücreleri, dendritik hücreler, NK hücreler gibi birçok hücrede eksprese edilir ve TIM gen ailesinin bir üyesidir. TIL ve periferik tümöre spesifik T lenfositlerde TIM 3 ifadesi görülmüştür. TIM-3 ligandına bağlandığında(galectin-9,fosfatidilserin, high-mobility grup protein B1 gibi) Th1 ve 17 yanıtını azaltır, periferal tolerans gelişmesine katkıda bulunur. Otoimmün hastalıklarda ve kronik inflamasyonda arttığı görülen TIM-3 ekspresyonunun CD4+ ve CD8+ T hücrelerindeki TNF ve IFN-gama gibi sitokin yanıtını azalttığı görülmüştür TIM-3 in özellikle kronik hastalıklarda T hücre tükenmişliğinin göstergesi olduğu görülmüştür (7,36).

CD45:

Tüm lenfositler üzerinde ifade edilen özellikle T lenfositlerin aktivasyonu için gerekli olan bir tirozin fosfotaz işlevi gösteren reseptör ilişki proteindir (37).

CD24:

Birçok tümör hücresi üzerinde ifade edilen bir protein olup, kötü prognoz, artmış tümör boyutu, yüksek nükleer grade ve lenf nodu tutulumu ile ilişkilendirilmiştir. Kanser kök hücrelerinde ise düşük seviyede ifade edildiği görülmüştür. (38)

CD44:

Normal ve tümör hücreleri üzerinde bulunabilen yüzey membran proteinidir. Normal dokularda hyaluronik asit metabolizması üzerinde rol oynarken tümör hücresi üzerindeki fazla ifadesi metastaz ile ilişkilendirilir.(39)

EPCAM:

Epitel adezyon molekülü olan EPCAM normal ve kanser hücreleri üzerinde bulunabilir. EPCAM pozitif olan tümör hücreleri CD44 zengin, CD24 fakir özellikleri gösterdiğinde tümör öncü kök hücresi olarak değerlendirilir.(40)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde HNEAH-KAEK 2020/84 kararı ile alınan etik onam ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2020/073 nolu proje kapsamında alınan maddi destek ile Kasım 2020 ve Ocak 2022 tarihleri arasında 18 yaş üzerinde, meme kanseri nedeniyle NAK alması kararlaştırılan 61 olgu incelendi. Bu hastaların kalın iğne ile alınan biyopsileri immünohistokimyasal yöntemler ve gerekli olduğu noktalarda FISH(fluoresan in situ hibridizasyon) kullanılarak belirlendi. Luminal A molekuler alt tipe sahip hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Yapılan örneklem hesabı sonucu minimum olgu sayısı 81 olarak belirlendi ancak bu çalışma sürecinde meydana gelen COVID-19 salgını sebebiyle hastane başvurularının azaldığı, takipsiz hastaların arttığı görüldü. Bunun sonucu olarak da örneklem hesabında belirtilen olgu sayısına erişilemedi.

Luminal A dışındaki neoadjuvan alması planlanan meme kanseri hastalarından kemoterapi öncesi marker koyulması aşamasında tümör merkezinden USG eşliğinde 14G kalın iğne kullanılarak biyopsi alındı.

Tümör infiltre lenfositler ile kanser kök hücrelerinde immün kontrol noktası proteinlerinin analizinde akan hücre ölçer kullanıldı. Çalışmada alınan kalın iğne biyopsi örnekleri, 100 ünite/mL penisilin ve 10 µg/mL of streptomisin içerikli steril hücre kültürü besiyeri (RPMI 1640, Cytiva Life Sciences, Katalog No: SH30255.01) içinde Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, Doku Tipleme Laboratuvarı'na teslim edildi. Biyopsi örnekleri bistüri yardımı ile steril hücre kültürü petrilerinde mekanik olarak parçalandı. Besiyeri uzaklaştırılmış ve örnekler 1 mL HBSS tampon solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 14025092) içine alınarak 50 ünite Kollajenaz IV (Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 17104019) ile dört saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 70 µM por büyüklüğüne sahip filtreden geçirilerek tek hücre süspansiyonu elde edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu, Ca+2 ve Mg+2 içermeyen fosfat tamponlu salin (DPBS, Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 14190144) çözelti ile bir kez yıkandıktan sonra hücreler sayılarak DPBS içinde 1×10^6 hücre/mL süspansiyon elde edildi. Hücreler anti-PD1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-TIM-3, anti-CD24, anti-CD44, anti-CD45 ve anti-CD326 antikorları ile karanlıkta 20 dakika inkübe edilerek işaretledi. Hücreler Forward Scatter/Side Scatter kadranından seçilerek CD45 ifadelerine göre tümör hücreleri (CD45- popülasyon) ile lenfositler (CD45+ popülasyon) olarak ayrılmıştır. CD45+ popülasyon üzerinden alınan lenfosit kapısında PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CD24 ve CD44 protein ifade seviyeleri, CD45- popülasyonda ise CD326, CD24, CD44 ve PD-L1 protein ifade seviyeleri ölçüldü. Ayrıca tümör stromasında bulunan CD326+ hücreler üzerinde CD44 ve CD24 seviyeleri değerlendirildi. Her tüpte en az 2×10^5 hücre değerlendirildi. Çalışmada Beckman Coulter DxFLEX akan hücre ölçer kullanılıp, analizler CytExpert for DxFLEX yazılımı ile gerçekleştirildi.

Hastalara siklofosfamid, 5 florourasil, antrasiklin beraberinde gerekli ise taksanlar ve HER-2 eksprese eden gruba ek olarak trastuzumab NAK rejimi için uygulandı.

Neoadjuvan kemoterapi sonrası opere edilen hastaların postoperatif piyes patoloji raporları incelendi. MD Anderson RCB(residual cancer burden) hesaplayıcısı kullanılarak hem primer tümörün, hem lenf nodlarının tedavi yanıtı birlikte değerlendirildi. Hesaplanan RCB değerlerinin karşılığı sınıflamalar geride

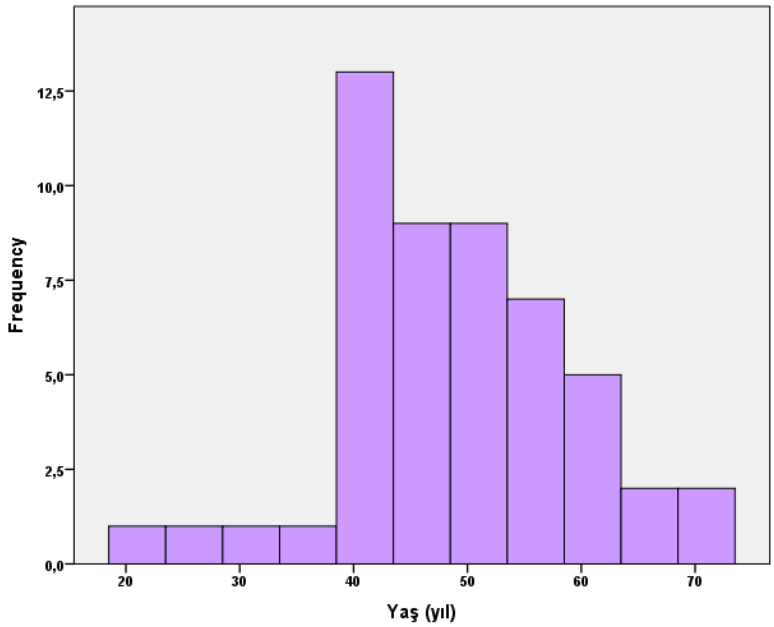
memede ya da aksillada invazif hastalığın kalmaması durumunda RCB 0 patolojik tam yanıt (PCR), RCB 1 minimal rezidüel hastalık, RCB 2 kısmi rezidüel hastalık ve RCB 3 tedavi yanıtının olmaması olarak değerlendirildi. Hematoksilen eozin ile boyanan piyeslerde tümör infiltre lenfositler yüzde ile bildirildi.

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 23 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı.

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum, çeyreklikler) kullanıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk testi, Çarpıklık-Basıklık testi ve grafiksel değerlendirmeler ile sınanmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test ve ikili karşılaştırmalarında Bonferroni Dunn test kullanıldı. Nicel değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde Spearman's Korelasyon Analizi kullanıldı. Anlamlılık en az $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 11/2020 ile 01/2022 tarihleri arasında 61 kadın olgu dahil edilmiştir. Bu olgulardan 2 tanesi metastatik hastalık geliştirmesi üzerine , 8 olgu da takipsiz kaldığı için çalışma dışı bırakılarak 51 kadın olgu ile sonuçlandırılmıştır.. Olguların yaşları 21 ile 72 arasında değişmekte olup, ortalama 49,20±10,19 yıldır; %51,0'i (n=26) 50 yaşın altında iken, %49,0'u (n=25) 50 yaş ve üzerindedir. Olguların yaş dağılımı Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: Yaş dağılımı

Tablo 1: Klinikopatolojik özellikler

Pre NAK		**n**	**%**
Patoloji (bx)	**Apokrin invaziv duktal**	1	2,0
	İnvaziv duktal	47	92,0
	İnvaziv lobuler	1	2,0
	İnvaziv lobuler, taşlı yüzük hc	1	2,0
	Medüller karsinom	1	2,0
ER	**Negatif**	16	31,4
	Pozitif	35	68,6
PR	**Negatif**	25	49,0
	Pozitif	26	51,0
HER2	**Negatif**	29	56,9
	Pozitif	22	43,1
Ki-67	**Medyan (Min-Max); Ort±Ss**	57,5 (20-90)	55,26±24,86
Moleküler alt tip	**LUM B**	35	68,6
	HER2	5	9,8

	TNBC	11	21,6
Tümör boyut (mm)	**Medyan (Min-Max); Ort±Ss**	27 (7-90)	28,64±12,84
T	**T 1**	8	15,7
	T 2	40	78,4
	T 3	1	2,0
	T 4	2	3,9
N	**N 0**	11	21,6
	N 1	29	56,8
	N 2	11	21,6
TIL	**Medyan (Min-Max); Ort±Ss**	10 (0-90)	34,51±37,69
Histolojik Grade	**Grade 1**	1	2,0
	Grade 2	16	31,3
	Grade 3	34	66,7
Nükleer Grade	**Grade 1**	1	2,0
	Grade 2	11	21,3
	Grade 3	39	76,5
PNI	**Yok**	42	82,4
	Var	9	17,6
LVI	**Yok**	33	64,7
	Var	18	35,3

ER: östrojen reseptörü, PR: progesteron reseptörü, LUM B: Luminal B, TNBC: üçlü negatif meme kanseri, TIL: tümör infiltran lenfosit, PNI: perinöral invazyon, LVI: lenfovasküler invazyon

Olguların tanı anındaki muayene, kalın iğne biyopsi örnekleri ve görüntüleme yöntemlerinden elde edilen klinikopatolojik özellikler Tablo-1'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Marker Ölçümlerinin Dağılımı

	Medyan (Min-Max)	**Ort±Ss**
CD45+	1,5 (0,1-32,8)	3,43±5,53
CD45+TIM3+	2,1 (0,15-48,81)	5,94±9,69
CD45+CTLA4+	1,75 (0-29,69)	4,47±6,56
CD45+PD1+	4,04 (0-42,26)	6,82±8,57
CD45+PDL1+	5,97 (0,79-61,29)	11,17±13,10
CD45+CD24+	6,2 (0-75,71)	16,19±20,54
CD45+CD44+	4,17 (0,07-82,19)	8,88±13,65
CD45-EPCAM+	46,39 (1,33-90,94)	48,18±19,22
CD45-CD24+	4 (0,03-69,3)	12,25±17,29
CD45-PDL1+	14,25 (0,41-65)	18,45±14,78
CD45-EPCAM+CD24+	9,53 (0-98,52)	18,40±21,36
CD45-EPCAM+CD44+	10,81 (0,3-98,52)	16,33±20,54

Neoadjuvan kemoterapi başlanmadan önce alınan trucut biyopsi örneklerinde çalışılan immün kontrol noktası proteinlerinin dağılımı Tablo-2'de verilmiştir.

Tablo 3: Yaş ile Markerlerin İlişkisi

Markerler	**Yaş (yıl)**	
	r	**p**
CD45+	-0,073	**0,610**
CD45+TIM3+	-0,079	**0,582**
CD45+CTLA4+	0,128	**0,370**
CD45+PD1+	-0,053	**0,710**
CD45+PDL1+	0,095	**0,508**
CD45-PDL1+	0,032	**0,826**
CD45-CD24+	0,196	**0,167**

r: Spearman's Korelasyon Katsayısı

Tablo 3 te olguların yaşları ile tüm parametrelerin ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadığı görülmektedir. (p>0,05).

Tablo 4: HER2 Sonuçlarına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		HER2		
		Negatif (n=29)	**Pozitif (n=22)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,2 (0,4-2,7)	2,2 (0,5-4,9)	**0,346**
	Ort±Ss	2,78±4,09	4,28±7,02	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,8 (0,9-5)	3,3 (0,6-6,7)	**0,783**
	Ort±Ss	5,56±8,99	6,45±10,74	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,6-6,1)	2 (1,1-5,2)	**0,594**
	Ort±Ss	5,32±8,18	3,35±3,32	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	4,9 (1,2-9,7)	3,4 (1,8-9,4)	**0,805**
	Ort±Ss	7,84±10,48	5,47±5,01	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	6,7 (3,8-13,4)	5 (2,2-10,8)	**0,392**
	Ort±Ss	13,02±15,61	8,73±8,53	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	15,1 (8,2-30,8)	13,7 (8,8-23,2)	**0,864**
	Ort±Ss	18,71±15,82	18,11±13,65	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	4 (0,7-14,2)	5,2 (0,6-24,5)	**0,470**
	Ort±Ss	11,97±19,46	12,61±14,37	

Mann Whitney U Test Q_1:Birinci çeyreklik Q_3:Üçüncü çeyreklik

Tablo 4'te HER2 statüsüne göre olguların tüm ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Tablo 5: Ki-67 Ölçümü ile Markerlerin İlişkisi

Markerler	Ki-67 (%)	
	r	**p**
CD45+	-0,254	**0,075**
CD45+TIM3+	-0,074	**0,610**
CD45+CTLA4+	0,079	**0,586**
CD45+PD1+	0,337	**0,017***
CD45+PDL1+	0,352	**0,012***
CD45-PDL1+	0,066	**0,647**
CD45-CD24+	0,223	**0,120**

r: Spearman's Korelasyon Katsayısı *p<0,05

Tablo 5'te olguların Ki-67 ölçümleri ile markerlar karşılaştırılmıştır. Olguların Ki-67 (%) ölçümleri ile lenfositler ve lenfosit üzerindeki TIM3, CTLA4+ ve de tümör stroması üzerindeki PDL1 ve CD24 ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p>0,05).

Olguların Ki-67 (%) ölçümleri ile lenfosit üzerindeki PD1 ölçümleri arasında pozitif yönlü (Ki-67 (%) ölçümü arttıkça, PD1+ ölçümü de artan) istatistiksel olarak anlamlı zayıf ilişki saptanmıştır (r=0,337; p=0,017; p<0,05).

Olguların Ki-67 (%) ölçümleri ile PDL1+lenfosit ölçümleri arasında pozitif yönlü (Ki-67 (%) ölçümü arttıkça, PDL1+ ölçümü de artan) istatistiksel olarak anlamlı zayıf ilişki saptanmıştır (r=0,352; p=0,012; p<0,05).

Tablo 6: LVI Varlığına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		LVI		
		Yok(n=33)	**Var (n=18)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,8 (0,5-5)	1,1 (0,2-2,2)	**0,102**
	Ort±Ss	4,23±6,42	1,96±2,98	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,2 (0,6-5)	2,7 (1-6,7)	**0,349**
	Ort±Ss	6,13±10,85	5,60±7,38	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,6 (0,6-6,1)	1,9 (1,3-5,4)	**0,370**
	Ort±Ss	4,34±6,74	4,69±6,41	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	4 (1,8-9,4)	3,5 (1,1-11,4)	**0,522**
	Ort±Ss	7,48±9,82	5,61±5,66	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,8 (2,5-8,6)	8,4 (3,8-22,2)	**0,310**
	Ort±Ss	9,36±11,52	14,48±15,39	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	15,1 (8,1-23,7)	14,2 (10,3-21,3)	**0,898**
	Ort±Ss	18,68±15,13	18,03±14,54	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,8 (0,5-24,3)	6,9 (0,9-14,2)	**0,679**
	Ort±Ss	14,00±20,49	9,04±8,50	

Mann Whitney U Test Q_1:Birinci çeyreklik Q_3:Üçüncü çeyreklik

LVI: lenfovasküler invazyon

Lenfovasküler invazyon varlığına göre olguların bakılan immün parametreleri ile karşılaştırıldığında istatistiki farklılık olmadığı Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 7: PNI Varlığına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		PNI		
		Yok (n=42)	**Var (n=9)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,5-4,5)	1,2 (0,4-2,2)	**0,436**
	Ort±Ss	3,72±5,94	2,05±2,87	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,9 (0,6-5,2)	4,3 (1-5,3)	**0,474**
	Ort±Ss	6,00±10,09	5,68±8,10	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,9-6,1)	1,9 (0,7-5,2)	**0,934**
	Ort±Ss	4,43±6,39	4,66±7,76	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	4 (1,1-9,4)	4,4 (2,7-11,4)	**0,272**
	Ort±Ss	6,18±7,53	9,81±12,51	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,5 (3,4-10,8)	6,2 (3-14,5)	**0,648**
	Ort±Ss	10,58±12,60	13,93±15,75	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	13,1 (7-23,2)	21,3 (15,1-30,8)	**0,073**
	Ort±Ss	17,42±15,40	23,26±10,92	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,2 (0,5-17)	14,2 (6,6-20,8)	**0,052**
	Ort±Ss	10,59±16,30	20,01±20,59	

Mann Whitney U Test

PNI: perinöral invazyon

Tablo 7'de PNI varlığına göre olguların CD45+, CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PD1+, CD45+PDL1 ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Perinöral invazyon varlığına göre olguların PDL1+tümör stroması ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, anlamlılığa yakın

bulunmuştur (p=0,073; p>0,05). PNI görülenlerin PDL1+ tümör stromasıölçümünün, PNI görülmeyenlerden yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Perinöral invazyon varlığına göre olguların tümör stromasındaki CD24 ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, anlamlılığa yakın bulunmuştur (p=0,052; p>0,05). PNI görülenlerin CD45-CD24+ ölçümünün, PNI görülmeyenlerden yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Tablo 8: Histolojik Gradelere Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		Histolojik Grade			
		•Grade1 (n=1)	**Grade2 (n=16)**	**Grade3 (n=34)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,72	2,2 (0,7-4,7)	1,2 (0,4-3,7)	**0,355**
	Ort±Ss	2,72	3,25±4,15	3,53±6,21	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	0,96	2,1 (0,6-7,7)	2,4 (0,8-5)	**0,884**
	Ort±Ss	0,96	7,03±12,47	5,58±8,38	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	0,68	2,2 (1,3-6,7)	1,7 (0,5-5,2)	**0,270**
	Ort±Ss	0,68	4,65±4,87	4,49±7,35	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,62	2 (1-5,7)	5,2(2,4-1,5)	**0,070**
	Ort±Ss	2,62	3,96±4,10	8,29±9,84	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	14,5	4,7 (2,4-10,9)	6,4(3,8-2,1)	**0,349**
	Ort±Ss	14,5	10,57±15,35	11,35±12,34	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	30,84	13,6 (9,2-23,4)	14,2(8,2-22)	**0,934**
	Ort±Ss	30,84	17,36±12,88	18,60±15,82	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	6,6	1 (0,1-6,9)	5,9(0,9-4,3)	**0,013***
	Ort±Ss	6,6	5,33±9,40	15,67±19,41	

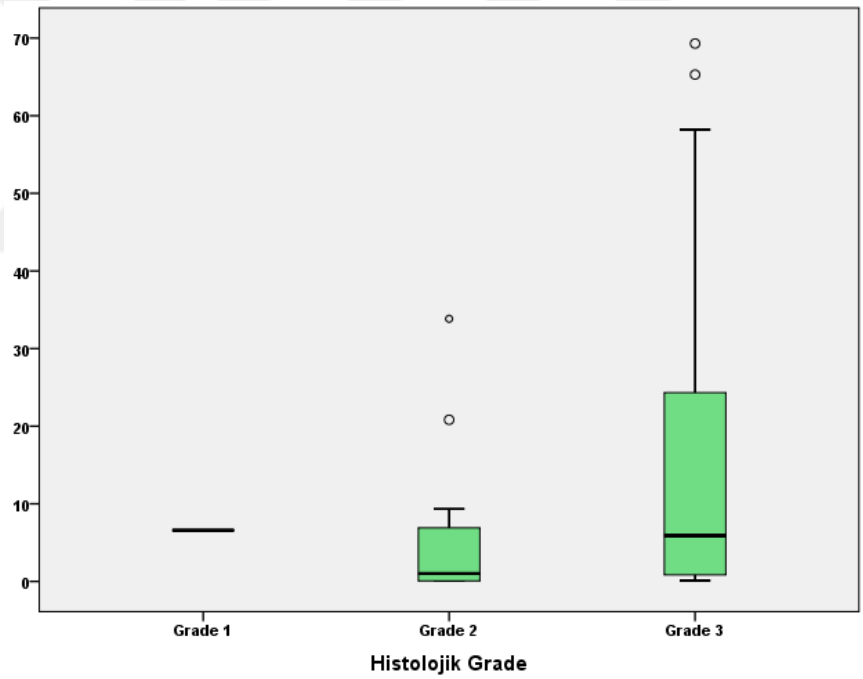
•Gruptaki kişi sayısı az olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır

Mann Whitney U Test *p<0,05

Histolojik grade göre olguların CD45+, CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PDL1+, CD45-PDL1+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Tablo 8'de dikkat çekici olan HG'e göre olguların PD1+lenfosit ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, anlamlılığa yakın bulunmuştur (p=0,070; p>0,05). Grade 3 olguların PD1+lenfosit ölçümünün, Grade 2 olgulardan yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Gradegöre olguların CD24+ tümör stroması ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan farklılık (p=0,013; p<0,05) Şekil 4 'te gösterilmiştir. Grade 3 olguların CD45-CD24+ ölçümleri, Grade 2 olgulardan daha yüksektir.



Şekil 4: Histolojik gradelere göre CD45-CD24+ ölçümleri dağılımı

Tablo 9: Nükleer Gradelere Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		Nükleer Grade			
		•Grade1 (n=1)	Grade2 (n=11)	Grade3 (n=39)	p
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	0,11	2,4 (1,5-5,5)	1,2 (0,3-3,7)	**0,070**
	Ort±Ss	0,11	4,40±4,87	3,24±5,78	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	8,6	1,2 (0,3-6,1)	2,1 (0,8-5,2)	**0,504**
	Ort±Ss	8,6	4,77±7,82	6,21±10,34	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,08	1,7 (0,7-7,3)	1,9 (0,8-5,4)	**0,944**
	Ort±Ss	1,08	5,08±7,29	4,38±6,50	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,08	4,9 (1,1-6,9)	4 (1,7-9,7)	**0,743**
	Ort±Ss	1,08	5,28±4,87	7,40±9,41	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	61,29	5 (1,7-14,5)	6 (3,4-12,1)	**0,615**
	Ort±Ss	61,29	9,53±10,53	10,35±11,36	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	0,41	21 (10,3-31,7)	14,1 (8,2-22)	**0,468**
	Ort±Ss	0,41	21,31±14,44	18,11±14,88	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	0,24	1,3 (0,1-14,2)	4,5 (0,8-22,7)	**0,182**
	Ort±Ss	0,24	7,72±11,57	13,84±18,60	

•Gruptaki kişi sayısı az olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır

Mann Whitney U Test

Tablo 9'da NG'e göre olguların lenfositölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, anlamlılığa yakın bulunduğu görülmektedir (p=0,070; p>0,05). Grade 2 olguların lenfosit ölçümünün, Grade 3 olgulardan yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Nükleer grade göre olguların CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PD1+, CD45+PDL1+, CD45-PDL1+ ve CD45-CD24+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Tablo 10: Tedavi Öncesi T ile Markerlerin İlişkisi

		Tedavi öncesiT			
		T1 (n=8)	**T2 (n=40)**	**T3/4 (n=3)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,6 (0,5-4,7)	1,4 (0,3-3,6)	3,6 (0,5-17,3)	**0,627**
	Ort±Ss	2,35±2,12	3,37±5,75	7,10±8,94	
CD45+ TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,7 (2,4-10)	1,6 (0,7-4,9)	0,7 (0,2-2,7)	**0,144**
	Ort±Ss	7,86±8,35	5,92±10,26	1,17±1,33	
CD45+ CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,1 (0,7-4,7)	1,8 (0,8-5,3)	8,9 (1,6-10,1)	**0,333**
	Ort±Ss	4,70±8,32	4,24±6,42	6,86±4,59	
CD45+ PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,4 (2-15,2)	4 (1,7-9,4)	0,9 (0-6,9)	**0,272**
	Ort±Ss	7,99±6,95	6,90±9,12	2,62±3,75	
CD45+ PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	11 (5-29)	5,4 (3-11)	6,5 (1,6-10,8)	**0,320**
	Ort±Ss	19,12±20,14	9,95±11,39	6,30±4,59	
CD45- PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	7 (3,4-25,2)	15,3(9,6-23,4)	13,1(10,4-31,7)	**0,369**
	Ort±Ss	16,12±20,41	18,92±14,04	18,40±11,63	
CD45- CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,5 (0,5-19,4)	4,1 (0,7-19,9)	7,3 (0,1-33,8)	**0,923**
	Ort±Ss	8,47±11,08	12,90±18,48	13,72±17,79	
CD45- EPCAM+ CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	9,1 (6,4-18,9)	9,8 (3,7-28,4)	0,8 (0-55,3)	**0,647**
	Ort±Ss	21,30±31,80	17,80±18,70	18,68±31,68	
CD45- EPCAM+ CD44+	Medyan (Q_1-Q_3)	11,4(5,5-13,9)	8,4 (3,5-18,8)	37,7(10,8-60,1)	**0,224**
	Ort±Ss	20,07±32,08	14,09±16,92	36,22±24,67	

Kruskal Wallis Test

Tablo 10’da istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Tablo 11: Tedavi Öncesi N ile Markerlerin İlişkisi

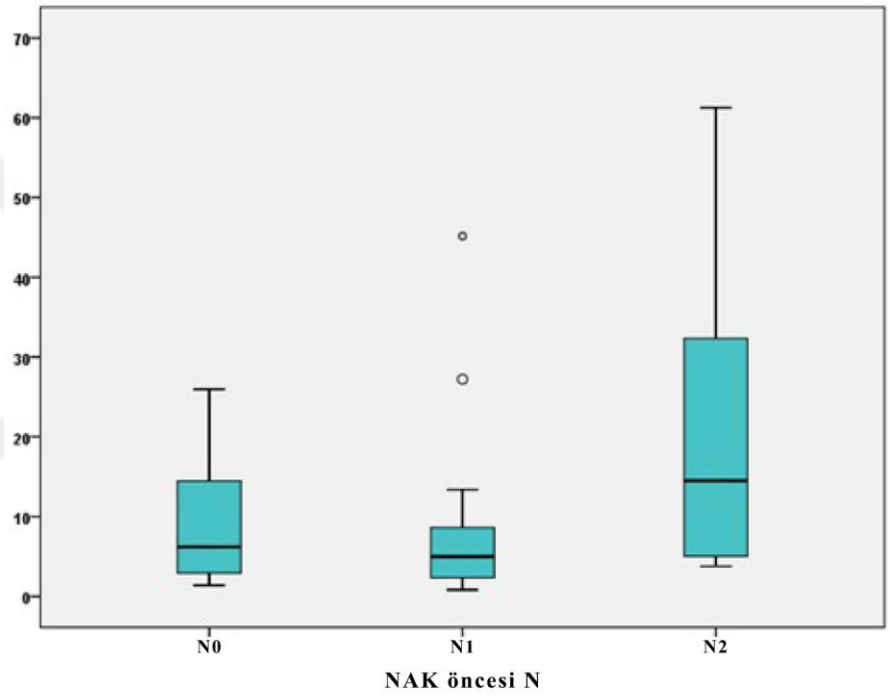
		Tedavi Öncesi N			
		N 0 (n=11)	**N 1 (n=29)**	**N 2 (n=11)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,5 (0,2-5,1)	1,8 (0,6-3,6)	1,2 (0,3-4,9)	**0,721**
	Ort±Ss	3,75±5,34	3,65±6,33	2,52±3,38	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,8 (0,7-5,2)	1,5 (0,6-4,1)	4 (1-21,5)	**0,358**
	Ort±Ss	7,37±14,13	4,30±7,05	8,84±10,58	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1 (0,4-5,2)	1,9 (1,1-6,1)	1,8 (1,1-16,6)	**0,546**
	Ort±Ss	2,74±3,35	4,12±5,86	7,12±9,83	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,8 (2,7-11,6)	4 (1,2-9,4)	2,6 (1,1-14,1)	**0,439**
	Ort±Ss	7,29±5,38	6,22±8,21	7,93±12,12	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	6,2 (2,5-22,2)	5 (2,3-8,6)	14,5 (5-32,3)	**0,031***
	Ort±Ss	9,81±9,73	7,71±8,98	21,66±19,48	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	22 (13,1-31,7)	11,8 (7-16,6)	15,5 (8,1-37,7)	**0,116**
	Ort±Ss	25,81±18,89	14,62±11,56	21,18±15,85	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	19 (1,2-25)	1,3 (0,5-10,4)	4,5 (1,8-14,2)	**0,242**
	Ort±Ss	19,05±18,39	10,06±16,31	11,22±18,61	
CD45-EPCAM+CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	17,9 (7,4-36,7)	6,6 (2,9-27,2)	11,1 (4,6-25,3)	**0,141**
	Ort±Ss	22,36±17,17	15,19±19,04	22,90±30,02	
CD45-EPCAM+CD44+	Medyan (Q_1-Q_3)	15 (1,8-25,4)	10,8 (4,6-18,8)	7,7 (3,7-12,5)	**0,823**
	Ort±Ss	16,50±17,09	15,67±18,82	17,89±28,65	

Kruskal Wallis Test *p<0,05

Preoperatif N durumuna göre olguların CD45+, CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PD1+, CD45-PDL1+, CD45-CD24+, CD45-

EPCAM+CD24+ ve CD45-EPCAM+CD44+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı Tablo 11'de görülmektedir (p>0,05).

Preoperatif N durumu olguların PDL1+lenfosit ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,031; p<0,05). Şekil 5'te bu dağılım görülmektedir. Farklılığı yaratan grubu belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; evre 2 olguların lenfosit üzerindeki PDL1+ ölçümleri, evre 1 olgulardan daha yüksektir (p=0,027; p<0,05). Diğer grupların ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).



Şekil 5: Preoperatif N durumunagöre CD45+PDL1+ ölçümleri dağılımı

Tablo 12: Moleküler Tiplere Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

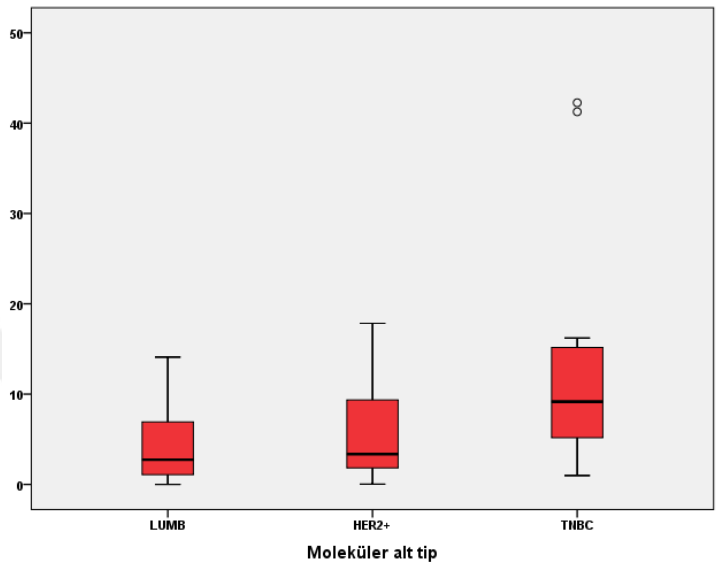
		Moleküler alt tip			
		LUMB (n=35)	**HER2 (n=5)**	**TNBC (n=11)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,2 (0,5-4,5)	4,5 (0,1-5)	0,5 (0,3-1,3)	**0,131**
	Ort±Ss	3,36±4,00	8,51±13,77	1,34±2,27	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,6 (0,8-6,7)	4,1 (0,9-5,2)	1,1 (0,3-5)	**0,500**
	Ort±Ss	6,61±10,70	5,34±6,34	4,09±7,66	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,6 (1,3-6,1)	1,1 (1-1,9)	0,5 (0,1-6,1)	**0,110**
	Ort±Ss	4,98±6,74	2,40±2,68	3,77±7,36	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,9 (1,2-7)	5,7 (1,1-5,8)	9,2 (4,9-16,2)	**0,067**
	Ort±Ss	4,90±4,82	4,58±3,58	13,94±14,56	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5 (2,5-12,7)	5 (2-6)	8,6 (5,8-32,3)	**0,103**
	Ort±Ss	10,25±12,40	5,36±4,20	16,75±16,55	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	13,1 (8,2-23,2)	11,7 (8,1-16,4)	15,5 (13,1-41,3)	**0,427**
	Ort±Ss	17,13±13,50	14,75±10,27	24,32±19,49	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	3 (0,5-14,2)	10,4 (0,5-25)	14,2 (0,8-58,2)	**0,325**
	Ort±Ss	8,60±11,58	14,66±16,23	22,77±27,61	

Kruskal Wallis Test

LUM B: Luminal B TNBC: üçlü negatif meme kanseri

Moleküler alt tiplere göre olguların CD45+, CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PDL1+, CD45-PDL1+ ve CD45-CD24+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Tablo 12’de görüldüğü üzere moleküler alt tiplere göre olguların PD1+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, anlamlılığa yakın bulunmuştur (p=0,067; p>0,05). Üçlü negatif olguların PD1+lenfosit ölçümünün, Luminal B grubu olgulardan yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.



LUM B: Luminal B, TNBC: üçlü negatif meme kanseri

Şekil 6: Moleküler alt tiplere göre CD45+PD1+ ölçümleri dağılımı

Neoadjuvan kemoterapinin tamamlanmasının ardından opere olan hastaların patoloji raporlarına ait özellikler Tablo 13’te verilmiştir.

Postoperatif tümör boyutları 0 ile 19,9 cm arasında değişmekte olup, ortalama 1,80±3,35 cm ve medyan 1 cm’dir. Olguların %31,4’ünün (n=16) tümör boyutu 0’dır.

Kemoterapi sonrası patolojik T durumu incelendiğinde; %31,4’ünün (n=16) evre 0, %9,8’inin (n=5) evre 1a, %7,8’inin (n=4) evre 1b, %27,5’inin (n=14) evre 1c, %9,8’inin (n=5) evre 2, %2,0’sinin (n=1) evre 3, %2,0’sinin (n=1) evre 4, %2,0’sinin (n=1) evre 4b, %3,9’unun (n=2) is, %3,9’unun (n=2) mic olduğu belirlenmiştir.

Tablo 13: Postoperatif Bulgulara İlişkin Dağılımlar

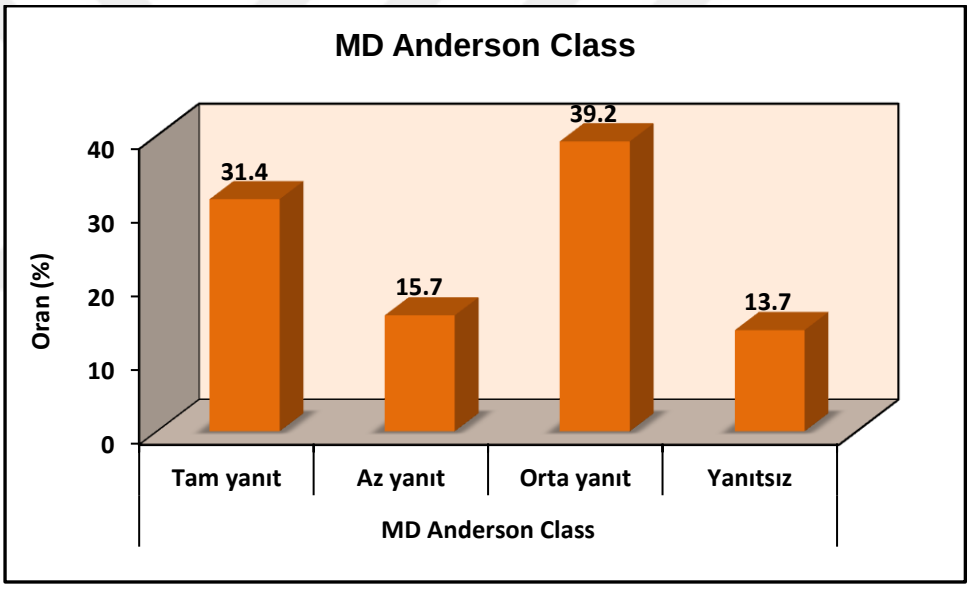
Post NAK operasyon piyesi		**n**	**%**
Patoloji	**İn situ duktal**	2	5,5
	İnvaziv duktal	28	77,7
	İnvaziv duktal musinöz komponent	1	2,8
	İnvaziv duktal+ tubuler karsinom	1	2,8
	İnvaziv lobüler	1	2,8
	İnvaziv meme ekstraselüler müsinöz komponent içeren(%10)	1	2,8
	İnvaziv mikst(duktal +%10 solid papiller)	1	2,8
	Metaplastik karsinom	1	2,8
Tümör boyut (cm)	**Medyan (Min-Max); Ort±Ss**	1 (0-19,9)	1,8±3,35
T	**ypT0**	16	31,4
	ypT 1a	5	9,8
	ypT 1b	4	7,8
	ypT 1c	14	27,5
	ypT 2	5	9,8
	ypT 3	1	2,0
	ypT 4	2	4,0
	ypTis	2	3,9
	ypTmic	2	3,9
N evre	**ypN 0**	32	62,7
	ypN 1a	12	23,5
	ypN 2a	5	9,8
	ypN 3a	1	2,0
	ypNmi	1	2,0
RCB	**Medyan (Min-Max); Ort±Ss**	1,6 (0-4,6)	1,56±1,35
MD AndersonClass	**Class 0 (tam yanıt)**	16	31,4
	Class 1 (az yanıt)	8	15,7
	Class 2 (orta yanıt)	20	39,2
	Class 3 (yanıtsız)	7	13,7

Olguların %58,8'inin (n=30) aksilla negatifken, %41,2'sinin (n=21) pozitiftir.

NAK sonrası patolojik N durumu incelendiğinde; %62,7'sinin (n=32) evre 0, %23,5'inin (n=12) evre 1a, %9,8'inin (n=5) evre 2a, %2,0'inin (n=1) evre 3a ve %2,0'inin (n=1) mi olduğu belirlenmiştir.

Olguların RCB ölçümleri 0 ile 4,6 arasında değişmekte olup, ortalama 1,56±1,35'dir.

MD Anderson RCB sınıflaması incelendiğinde; %31,4'ünde (n=16) tam yanıt, %15,7'sinde (n=8) az yanıt, %39,2'sinde (n=20) orta yanıt ve %13,7'sinde (n=7) yanıtsız olduğu Şekil 7'de görülmektedir.



Şekil 7: MD Anderson sınıflaması dağılımı

Tablo 14: ypT durumuna Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		ypT 0 (n=16)	**Diğerleri (n=35)**	
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,1 (0,5-4,7)	1,5 (0,4-3,4)	**0,700**
	Ort±Ss	2,91±2,93	3,66±6,41	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	2 (0,7-5,7)	2,1 (0,7-5,3)	**0,984**
	Ort±Ss	6,44±12,09	5,72±8,57	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,2-4,7)	1,8 (0,9-6,1)	**0,340**
	Ort±Ss	2,77±2,98	5,24±7,58	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,5 (2,5-9,4)	3,7 (1,1-9,7)	**0,405**
	Ort±Ss	7,75±9,76	6,39±8,09	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,5 (5-11,4)	6,2 (2,3-13,4)	**0,570**
	Ort±Ss	10,85±11,82	11,32±13,81	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	13,7 (8,5-31,9)	15,1 (8,2-21,3)	**0,465**
	Ort±Ss	21,77±17,56	16,93±13,33	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,2 (1,3-29,8)	4 (0,5-17)	**0,194**
	Ort±Ss	16,94±21,55	10,11±14,82	

Mann Whitney U Test

Olguların NAK sonrası Tve N durumlarının markerlarla olan karşılaştırılması sırasıyla Tablo 14 ve 15'te verilmiştir.

Tablo 15: NAK Sonrası Patolojik N Durumuna Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

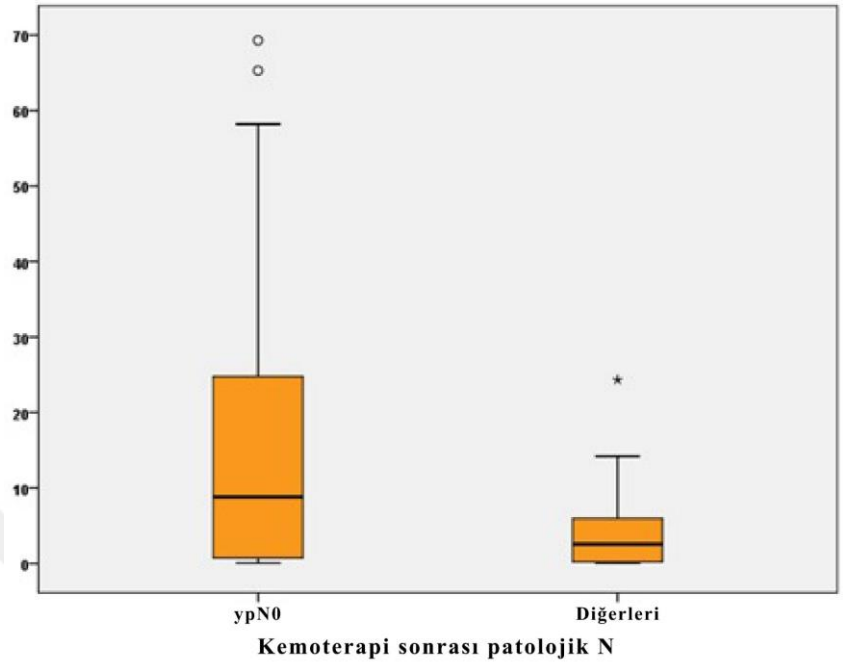
		ypN 0 (n=32)	**Diğerleri(n=19)**	
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,2 (0,3-4)	2,2 (0,5-4,9)	**0,306**
	Ort±Ss	3,53±6,52	3,25±3,44	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,2 (0,5-5,3)	2,6 (1,1-6,7)	**0,375**
	Ort±Ss	5,67±9,92	6,41±9,55	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,7-5,6)	1,9 (1,1-6,9)	**0,375**
	Ort±Ss	3,66±5,08	5,83±8,49	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,5 (2,1-10,5)	2,6 (1,1-7)	**0,075**
	Ort±Ss	8,37±10,03	4,20±4,38	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	6,4 (3,8-12,7)	5 (2,3-12,7)	**0,350**
	Ort±Ss	11,59±12,31	10,46±14,66	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	15,2 (9,6-31,7)	12,8 (2,6-20,1)	**0,141**
	Ort±Ss	20,96±16,13	14,22±11,34	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	8,8 (0,8-24,8)	2,6 (0,2-6,6)	**0,041***
	Ort±Ss	16,83±20,05	4,55±6,18	

Mann Whitney U Test *p<0,05

ypN durumuna göre olguların CD45+, CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PD1+, CD45+PDL1+ veCD45-PDL1+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

ypN durumuna göre tümör stromasındaki CD24+ ölçümleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,041; p<0,05); evre 0 olguların

ölçümleri, Şekil 8’ de gösterildiği gibi diğer evrelerden daha yüksektir.



Şekil 8: ypN durumuna göre CD45-CD24+ ölçümleri dağılımı

Tablo 16: MD Anderson Sınıflamasına Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		MD Anderson Class				
		Class0 (n=16)	**Class 1 (n=8)**	**Class 2(n=20)**	**Class 3 (n=7)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	2,1 (0,5-4,8)	1 (0,5-3,5)	1,6 (0,3-2,9)	2,2 (0,4-8)	**0,870**
	Ort±Ss	4,65±8,04	2,45±3,24	2,89±4,43	3,27±3,61	
CD45+ TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,2 (0,5-5,7)	3,9 (1,5-8,1)	2,7 (0,7-6)	1,2 (1-2,1)	**0,827**
	Ort±Ss	6,22±12,17	6,67±8,71	5,84±8,53	4,78±9,54	
CD45+ CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,3 (0,2-4,6)	2,3 (1,1-5,6)	1,8 (1,3-5,5)	1,3 (0,5-6,9)	**0,523**
	Ort±Ss	2,62±3,01	5,39±8,07	5,16±7,31	5,67±8,80	
CD45+ PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,5 (2,1-9,4)	6,7 (1,9-15,2)	3,4 (1,2-6,4)	2,9 (1-11,5)	**0,602**
	Ort±Ss	7,63±9,84	8,28±7,05	5,77±9,23	6,28±5,81	
CD45+ PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,5 (4,1-11,4)	6,9 (1,7-19,5)	5,4 (3-9,4)	6,9 (3,8-14,5)	**0,907**
	Ort±Ss	10,66±11,94	11,22±11,81	11,59±15,90	11,07±10,42	
CD45- PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	15,3(8,5-31,9)	14 (6,5-29,9)	12,9(7,6-18,3)	16,3(11,8-30,8)	**0,602**
	Ort±Ss	22,00±17,46	20,03±18,90	14,72±11,47	19,19±11,89	
CD45- CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	5,2 (1,2-29,8)	7,4 (0,3-29,2)	2,9 (0,4-13,2)	5,3 (0,8-14,2)	**0,676**
	Ort±Ss	16,86±21,61	14,22±16,58	9,28±16,07	7,96±8,57	

Kruskal Wallis Test

Tablo 17: MD Anderson Düzeyleri ile Markerlerin İlişkisi

Markerler	MD Anderson Sınıflaması	
	r	p
CD45+	-0,045	**0,753**
CD45+TIM3+	0,008	**0,955**
CD45+CTLA4+	0,137	**0,339**
CD45+PD1+	-0,116	**0,417**
CD45+PDL1+	0,005	**0,973**
CD45-PDL1+	-0,091	**0,526**
CD45-CD24+	-0,123	**0,389**

r: Spearman's Korelasyon Katsayısı

Tablo 18: RCB ile Markerlerin İlişkisi

Markerler	RCB	
	r	P
CD45+	-0,032	**0,826**
CD45+TIM3+	0,032	**0,823**
CD45+CTLA4+	0,113	**0,428**
CD45+PD1+	-0,177	**0,214**
CD45+PDL1+	-0,062	**0,667**
CD45-PDL1+	-0,116	**0,420**
CD45-CD24+	-0,139	**0,330**

r: Spearman's Korelasyon Katsayısı

RCB: Residual cancer burden

Olguların MD Anderson RCB sınıfları ve ölçümlerinin karşılaştırmaları ve korelasyonlarıTablo 16,17 ve 18'de gösterilmiş olup CD45+, CD45+TIM3+, CD45+CTLA4+, CD45+PD1+, CD45+PDL1+, CD45-PDL1+ ve CD45-CD24+ ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 19: TIL Düzeylerine Göre Markerlerin Değerlendirilmesi

		TIL		
		< %50 (n=32)	**≥ %50 (n=19)**	**p**
CD45+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,6 (0,5-3,2)	1,5 (0,3-5,5)	**0,740**
	Ort±Ss	3,13±5,90	3,93±4,96	
CD45+TIM3+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,7-4,9)	2,7 (0,7-10,3)	**0,447**
	Ort±Ss	5,17±9,68	7,25±9,84	
CD45+CTLA4+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,6 (0,6-2,8)	3,4 (1,1-8,9)	**0,028***
	Ort±Ss	3,00±4,86	6,94±8,29	
CD45+PD1+	Medyan (Q_1-Q_3)	3,4 (1,7-6,4)	5,5 (1,1-11,5)	**0,539**
	Ort±Ss	5,30±4,95	9,37±12,28	
CD45+PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	5 (2,7-8,8)	7,7 (5-22,2)	**0,075**
	Ort±Ss	8,09±8,27	16,36±17,71	
CD45-PDL1+	Medyan (Q_1-Q_3)	13,4 (6,4-21,5)	15,3 (8,8-37,3)	**0,271**
	Ort±Ss	16,82±14,78	21,20±14,77	
CD45-CD24+	Medyan (Q_1-Q_3)	1,7 (0,6-20,9)	5,3 (0,3-20,8)	**0,579**
	Ort±Ss	10,71±14,84	14,85±20,98	

Mann Whitney U Test *p<0,05

TIL: Tümör infiltran lenfosit

Tablo 19'da TIL düzeyleri %50 nin altı ve üstü olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır. TIL düzeylerine göre CD45+, CD45+TIM3+, CD45+PD1+, CD45+PDL1+, CD45-PDL1+ ve CD45-CD24+ ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05). TIL düzeylerine göre CTLA4+ lenfosit ölçümleri ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p=0,028; p<0,05);

TIL düzeyi 50 ve üzerinde olan grubun ölçümleri, TIL düzeyi 50'nin altında olanlardan daha yüksektir.

Tumor infiltran lenfosit düzeylerine göre tümör epiteli, tümör epitelindeki CD24 ve lenfositteki CD24 ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). TIL düzeyi 50 ve üzerinde olan grupta tümör epitelindeki CD44+ ve lenfositteki CD44+ ölçümlerinin, TIL düzeyi 50'nin altında olanlardan yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0,015$; $p=0,021$; $p<0,05$).

Tablo 20: Marker Ölçümlerinin İlişkisi

MD Anderson Class			CD45+	CD45+TIM3+	CD45+CTLA4+	CD45+PD1+	CD45+PDL1+	CD45-PDL1+	CD45-CD24+
Class 0	**CD45+**	r	1,000	0,018	-0,006	-0,559	-0,515	-0,221	-0,600
		p		**0,948**	**0,983**	**0,024***	**0,041***	**0,412**	**0,014***
	CD45+TIM3+	r	-	-	0,056	-0,385	-0,334	-0,012	0,006
		p	-	-	**0,837**	**0,141**	**0,206**	**0,966**	**0,983**
	CD45+CTLA4+	r	-	-	1,000	0,038	0,319	-0,100	-0,268
		p	-	-	-	**0,888**	**0,229**	**0,712**	**0,315**
	CD45+PD1+	r	-	-	-	1,000	0,728	0,418	0,253
		p	-	-	-	-	**0,001****	**0,107**	**0,345**
	CD45+PDL1+	r	-	-	-	-	1,000	0,166	0,275
		p	-	-	-	-	-	**0,538**	**0,302**
	CD45-PDL1+	r	-	-	-	-	-	1,000	0,374
		p	-	-	-	-	-	-	**0,154**
	CD45-CD24+	r	-	-	-	-	-	-	1,000
		p	-	-	-	-	-	-	-

Class 1	**CD45+**	r	1,000	0,357	-0,024	-0,024	-0,095	0,238	-0,690
		p	-	**0,385**	**0,955**	**0,955**	**0,823**	**0,570**	**0,058**
	CD45+TIM3+	r	-	1,000	0,190	0,452	0,500	0,881	0,190
		p	-	-	**0,651**	**0,260**	**0,207**	**0,004****	**0,651**
	CD45+CTLA4+	r	-	-	1,000	0,048	0,238	-0,024	0,048
		p	-	-	-	**0,911**	**0,570**	**0,955**	**0,911**
	CD45+PD1+	r	-	-	-	1,000	0,857	0,238	0,095
		p	-	-	-	-	**0,007****	**0,570**	**0,823**
	CD45+PDL1+	r	-	-	-	-	1,000	0,357	0,143
		p	-	-	-	-	-	**0,385**	**0,736**
	CD45-PDL1+	r	-	-	-	-	-	1,000	0,357
		p	-	-	-	-	-	-	**0,385**
	CD45-CD24+	r	-	-	-	-	-	-	1,000
		p	-	-	-	-	-	-	-
Class 2	**CD45+**	r	1,000	-0,075	0,591	0,009	-0,403	-0,054	-0,541
		p	-	**0,753**	**0,006****	**0,970**	**0,078**	**0,821**	**0,014***
	CD45+TIM3+	r	-	1,000	0,188	-0,211	0,041	-0,081	-0,039
		p	-	-	**0,427**	**0,373**	**0,865**	**0,734**	**0,870**
	CD45+CTLA4+	r	-	-	1,000	-0,241	0,032	0,101	-0,348
		p	-	-	-	**0,307**	**0,895**	**0,673**	**0,132**
	CD45+PD1+	r	-	-	-	1,000	0,253	0,510	0,296
		p	-	-	-	-	**0,283**	**0,022***	**0,205**
	CD45+PDL1+	r	-	-	-	-	1,000	0,277	0,186
		p	-	-	-	-	-	**0,238**	**0,433**
	CD45-PDL1+	r	-	-	-	-	-	1,000	0,521
		p	-	-	-	-	-	-	**0,018***
	CD45-CD24+	r	-	-	-	-	-	-	1,000
		p	-	-	-	-	-	-	-

Class 3	**CD45+**	r	1,000	-0,464	-0,357	0,286	-0,214	0,321	0,179
		p	-	**0,294**	**0,432**	**0,535**	**0,645**	**0,482**	**0,702**
	CD45+TIM3+	r	-	1,000	0,571	0,357	0,179	0,000	0,393
		p	-	-	**0,180**	**0,432**	**0,702**	**1,000**	**0,383**
	CD45+CTLA4+	r	-	-	1,000	0,679	0,679	0,143	-0,214
		p	-	-	-	**0,094**	**0,094**	**0,760**	**0,645**
	CD45+PD1+	r	-	-	-	1,000	0,571	0,571	0,214
		p	-	-	-	-	**0,180**	**0,180**	**0,645**
	CD45+PDL1+	r	-	-	-	-	1,000	0,536	0,107
		p	-	-	-	-	-	**0,215**	**0,819**
	CD45-PDL1+	r	-	-	-	-	-	1,000	0,571
		p	-	-	-	-	-	-	**0,180**
	CD45-CD24+	r	-	-	-	-	-	-	1,000
		p	-	-	-	-	-	-	-

r: Spearman's Korelasyon Katsayısı *p<0,05 **p<0,01

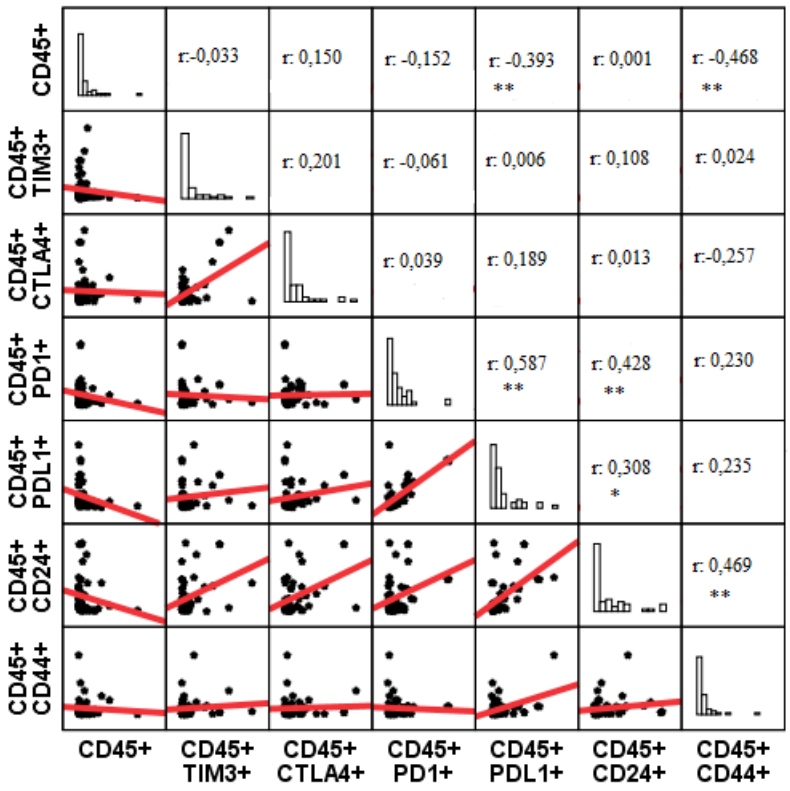
Tablo 20 ve Şekil 9'da markerların kendi aralarındaki korelasyonları ve NAK yanıt oranlarına göre karşılaştırılması gösterilmiştir.

MD Anderson sınıflamasına göre tam yanıt olanlarda; lenfosit ile üzerindeki PD1, PDL1 ve stromadaki CD24 ölçümleri arasında negatif yönlü istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). Lenfositteki PD1 ile PDL1 ölçümleri arasında ise pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı iyi düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$).

MD Anderson sınıflamasına göre iyi yanıt olanlarda; lenfositteki TIM3 ile tümör dokusundaki PDL1ölçümleri arasında pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı iyi düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). Lenfositteki PD1 ile PDL1 ölçümleri arasında ise pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı iyi düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$).

MD Anderson sınıflamasına göre kısmi yanıt olanlarda; lenfosit ile buradaki CTLA4 ölçümleri arasında pozitif yönlü ve stromal CD24 ölçümleri arasında negatif yönlü istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). PD1+lenfosit ile tümör stromal PDL1ölçümleri arasında pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). Tümör stromasındaki PDL1+ ile CD24+ ölçümleri arasında pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde ilişki saptanmıştır ($p<0,05$).

MD Anderson sınıflamasına göre yanıtsız olanlarda; markerler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 9: Marker Ölçümlerinin İlişkisi

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada meme kanserli hastalarda immün kontrol noktası proteinlerinin ifadesinin, hastaların klinikopatolojik özellikleri ve NAK'a verdikleri yanıtla olan ilişkisinin ortaya koyulması amaçlandı. Özellikle melanom ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri başta olmak üzere birçok solid tümör üzerinde etkileri gösterilerek tedavi seçenekleri arasına giren immün kontrol noktası inhibitörleri ile ilgili çalışmalar meme kanseri üzerinde de sürmektedir(41,42).

Meme kanseri dünya çapında 2020 verilerine göre en sık tanı alan kanser olup tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, hedeflenmiş tedaviler ve cerrahi standart olarak kullanılmaktadır. Prognozu öngörmede ve cerrahiyi küçülterek komorbiditeleri azaltmadaki etkileri sebebiyle NAK gün geçtikçe yaygınlaşan bir kullanıma sahiptir. Ancak tüm kanserlerde olduğu gibi tedaviye direnç ve nüks gibi durumlar yeni tedavi modaliteleri arayışını beraberinde getirir. Günümüzde en yaygın konulardan biri kanser immünolojisi ve immünoterapilerdir. İmmun yanıtın düzenlenmesinde görev alan immün kontrol noktası proteinleri ve ligantlarına karşı geliştirilmekte olan tedaviler birçok solid tümörde tedavi sürecinde yerini almıştır. İmmünolojik olarak kabul edilmesinin ardından meme kanserinde de bu alanda çalışmalar başlamıştır. Standart yanıtların alınamayabildiği immünoterapiler için kişiselleştirilmiş tedavi planları gündeme gelirken, immünite ile kanser ilişkisini ortaya koyacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır(43,44).

Meme kanseri üzerinde anti PD-1 etki gösteren pembrolizumab öncelikle metastatik ya da lokal nüksü olan anrezektabl üçlü negatif meme kanserinde 2020 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayını aldı, ardından da 2021 yılında yine pembrolizumab yüksek riskli erken evre üçlü negatif meme kanseri için onaylandı. Meme kanserindeki immünoterapi çalışmaları çoğunluklar PD-1,PDL-1 ve CTLA -4 üzerine yoğunlaşmaktadır(45–48). TIM-3 ise PD-1/PD-L1 tedavileri ile kombine olarak kullanılabileceği öngörülen yeni nesil immün kontrol noktası proteinleri olarak görülüp, aynı zamanda meme kanserinde kemoterapi yanıtını da arttırabileceği görülmüştür(49). Biz de çalışmamızda tümör hücreleri ve lenfositler üzerinde PD-1,PD-1, CTLA-4 ve TIM-3 düzeylerini ölçtük.

Amerikan SEER verilerine göre meme kanserinin medyan görülme yaşı 63 olup 50 yaş altı ve üstünde belirgin fark görülürken, bizim çalışmamızda ise 49,20±10,19 olup 50 yaş altı ve üstü dağılımları eşit görülmektedir.

Artan yaş ile birlikte verilecek immün yanıtın değişmesi öngörülebilir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ileri yaş ile birlikte PD-1 ve CTLA-4 ifadesinin arttığı görülmüştür(50).133 meme kanseri hastası üzerinde yapılan çalışmada ise TIL

üzerindeki PD-1 ekspresyonu araştırılmış olup yaş ile korelasyonu görülmemiştir(51). Bizim çalışmamızda da ölçüm yaptığımız immün kontrol noktası proteinleri ile yaş arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Bu sebeple prediktif olarak immün kontrol noktası proteinlerinin değerlendirilmesi ve immünoterapi için yaşın belirleyici özelliği bulunmamaktadır.

Meme kanserinde immünkontrol noktası proteinlerinin ekspresyonu farklı çalışmalarda bilinen prognostik klinikopatolojik kriterler ile ilişkilendirilmiştir. ER/PR negatifliği, tümör büyüklüğü, yüksek histolojik ve nükleer grade, LVI, PNI, yüksek Kİ67 seviyesi gibi birçok klinikopatolojiközellik değerlendirilmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. (52–54).CTLA-4 üzerine yapılan bir çalışmada klinikopatolojik özellikler ile ilişki gösterilememişken(55) bir başka çalışmada histolojik grade ve aksiller lenf nodu pozitifliği ile olan ilişkisinin sağkalımı göstermede etkili olduğu söylenmiştir(56). TIM-3 ile ilgili tümör boyutu, lenf nodu, moleküler sınıflandırma ve Ki67 ile ilişki gösterilmiştir(57). Bizim çalışmamızda Ki 67 ölçümü ile lenfosit üzerinde PD-1 ve PD-L1 ölçümlerinin korele olduğu görülmüştür. Diğer belirteçler ile korelasyon saptanamamış olup tümör proliferasyonunun artması ile PD-1/PD-L1 aksının aktive olduğu görülmüştür.

Çalışmalar arasında görülen farklılıkların belirteçlerin ölçülmesinde kullanılan yöntemlere, ölçümlerin tedavi öncesi veya sonrasında yapılmasına, hasta gruplarının homojenitisine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülebilir. Çalışmamıza benzer özellikte hasta grubu ile kemoterapi öncesi örnekleri değerlendiren bir çalışmada Ki67 ile PD-L1 arası korelasyon gösterilmiştir(58). HG değerlendirildiğinde Grade 3 olgularda Grade 2 olgulara göre daha fazla CD45+ PD1 ekspresyonu görülmektedir. Yine aynı şekilde tümör hücreleri üzerinde CD24 ekspresyonunun histolojik grade 3 olan olgularda daha yüksek olduğu olduğu görülmüştür.

Metastaz ile ilişkilendirilen CD24 proteinin küçük hücreli dışı akciğer kanserleri üzerinde yapılan bir çalışmada PNI ve grade ile ilişkisi gösterilmiştir(59). Çalışmamızda PD-L1+ tümör hücrelerinin PNI görülen olgularda istatistiksel anlamlılığa yakın

derecede yüksek bulunmuştur. Olgu sayısının arttırılması sonrası PNI ilişkisinin ortaya konması beklenmekte olup, prognostik olarak kullanılabilir.

Meme kanseri üzerinde yapılan CD24 ile ilişkili araştırmalarda HER 2 pozitifliği ve lenf nodu ile ilişkisi gösterilmiş olsa da bizim çalışmamızda bu yönde anlamlı istatistiksel farklılık görülmemiştir. Tanı anındaki T evreleri ile saptanmadı ancak, N2 olgularda lenfosit üzerinde PD-L1 ifadesinin yüksek olduğu görülmüştür. Tanı anında PD-L1 seviyesi yüksek görülen N2 hastalarda NAK ile birlikte immünoterapinin de bir seçenek olduğu düşünülebilir.

Özellikle klinik olarak daha fazla çalışılmış olan PD-1 ve CTLA-4 başta olmak üzere bu proteinlerin ekspresyonlarının immünolojik olarak daha aktif olarak sınıflandırılan üçlü negatif meme kanserinde daha çok görüldüğü bildirilmektedir(52,60–62). Çalışmamızda CD45+hücrelerde PD-1 ölçümlerininin üçlü negatif grupta daha fazla olduğu görülmüş olup literatürü desteklemiştir. Bu durum PD-1 ölçümünün bireysel bazda immünoterapi için iyi bir gösterge olabileceğine işaret etmektedir. Diğer immün kontrol noktası proteinleri ile moleküler alt tipler arasında anlamlı ilişkiye saptanmamıştır.

Neoadjuvan kemoterapi sonrası PCR en önemli prognostik faktörlerdendir. Tedavi sonrası tümör boyutunun küçülmesi meme koruyucu cerrahi ihtimalini arttırır ve lenf nodlarının negatifleşmesi beraberinde birçok morbiditeyi getiren aksiller diseksiyondan kaçınmamızı ve hastaların yaşam konforunu arttırmamızı sağlar. PCR daha çok agresif tümörlerde görülürken, PCR görülen hastalarda hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımın arttığı görülmüştür(63).Çalışmamızda tedavi sonrası hastalarımızın tümör boyutlarının ortalaması 28.64'ten 1.8'e gerilemiş, 21 hastada ise tedavi sonrası aksiller tam yanıt alınarak diseksiyon yapılmasına gerek kalmamıştır. 16 hasta ise patolojik tam yanıt elde etmiştir. Kemoterapiye verilen yanıtı belirtirken objektif değerlendirmenin sağlanabilmesi tümör yatağını, tümörün selüleritesini, in situ tümör varlığını, lenf nodu metastazının boyutunu ve kaç lenf nodunda olduğunu ölçerek bir indeks ya da sınıflama olarak sunan MD Anderson RCB hesaplayıcısı kullanıldı(64).

Tedavi sonrası opere edilen hastaların T evreleri ile belirteçler arasında belirgin korelasyon görülmemiştir. Bu bulgu NAK sonrası tümörün tedaviye verdiği yanıtı öngörmede ve NAK sonrası immünoterapi kullanımı açısından hem total yanıtlı hastalarda hem de rezidüel hastalığı olan hastalarda ön bilgi olarak kullanılamayacağını göstermektedir. NAK sonrası rezidü aksiller hastalığı kalmayan olgularda CD24 ekspresyonunun fazla olduğu görülmüştür. Tedavi öncesinde anlamlı bulunmayan bu bulgu CD24 ekspresyonu fazla olan hastaların kemoterapiye yanıtının daha iyi olduğu şeklinde yorumlanarak hastalar öncelikli olarak kemoterapiye yönlendirilebilir.

Çalışmamızda kemoterapi yanıtını immün kontrol noktaları üzerinden değerlendirdiğimizde MD Anderson RCB skoru ile immün kontrol noktası proteinleri ve TIL arasında bir ilişki görülmedi. Literatürde immün kontrol noktası proteinlerinin kemoterapi yanıtı ile ilişkisini gösteren kesin bir kanı bulunmamaktadır. Asano ve ark. üçlü negatif grupta PD-1ve PD-L1 yüksekliğininrezidüel hastalıkla ilişkisinin olduğu söylenirken, Ghosh ve arkadaşları ise yine üçlü negatif meme kanserinde PD-L1 İle PCR arasında ilişki gösterememiştir(58,65).Stromal CTLA-4 ile PCR arasında ilişki göstermiştir(66).Cabıoğlu ve arkadaşları ise CTLA-4 ve TIM-3 ekspresyonunun kemoterapiye kötü yanıtla ilişkili olduğunu ortaya koyarken PD-1 ve PD-L1 ile ilişkisini gösterememiştir(67).Biz de çalışmamızda markerlar ile kemoterapi yanıtı arasında ilişki görmedik ancak immün markerların birbirleri ile korelasyonları kemoterapi yanıtına göre incelendiğinde; komplet yanıt veren olgularda TIL ile lenfositler üzerindeki PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Tama yakın yanıt gösteren hastalarda ise TIM3+ lenfositler ile tümöral PD-L1 düzeylerinin korelasyonu görülmüştür. Bu hastalar rezidü hastalık için korelasyonu görülen bu proteinler üzerinden kombine tedavi çözümleri için aday olabilirler. Kemoterapi yanıtı az olan grup dışında PD-1 ve PD-L1 arasında görülen pozitif yönlü ilişkiler reseptör-ligand ilişkisi sebebiyle beklenen bulguları desteklemiştir.

Tümör mikro çevresinde yer alan TIL tümörün inflame olup olmadığını gösterir. İnflame olan tümörler üzerinde araştırılmaya başlanan immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini göstermede de önemli bir prognostik faktör olduğu

belirtilmektedir(68). TIL düzeyi ile immün kontrol noktası proteinleri arasında ilişki olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur(69,70).Çalışmamızda ise CTLA-4 ile yüksek TIL oranları arasında ilişki gösterilmişken, PD-1 ve PD-L1 arasında ilişki görülmemiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmadaki bulgularımız Ki 67 ile lenfosit üzerindeki PD-1/PD-L1 aksı arasındaki korelasyonuortaya koymuş olup, yine lenfosit üzerindeki PD-1 ifadesinin üçlü negatif tümörlerde daha fazla olduğunu göstermiştir. Daha agresif seyreden bu olguların immünoterapi için bir gösterge olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Neoadjuvan kemoterapi sonrası aksiller tam yanıt gösteren oldularda ise CD 24 ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir. Tedavi öncesi CD24 yüksekliği bulunan aksiller tutulumlu hastaların kemoterapideniyi yanıt alabileceğini göstermektedir.

Tedavi ve prediktif özellikleri ile meme kanseri alanında gelişmeye devam eden immün kontrol noktaları hakkında daha geniş olgu profili ile daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Başara BB, Çağlar İS, Aygün A, Özdemir TA, Kulali B, Uzun SB, et al. Sağlık İstatistikği 2019 [Internet]. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilgi Sistemleri Genel Müdürlüğü. 2021. 294 p. Available from: https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/40564,saglik-istatistikleri-yilligi-2019pdf.pdf

2. Lian C-L, Li G-Q, Zhou P, Wang J, He Z-Y, Wu S-G. Triple-negative breast cancer outcomes: Does AJCC 8th staging improve chemotherapy decision-making. The Breast [Internet]. 2021 Oct;59:117–23. Available from: https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.06.009

3. Narayan P, Flynn J, Zhang Z, Gillespie EF, Mueller B, Xu AJ, et al. Perineural invasion as a risk factor for locoregional recurrence of invasive breast cancer. Sci Rep [Internet]. 2021 Dec 17;11(1):12781. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-021-92343-4

4. Montemurro F, Nuzzolese I, Ponzone R. Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? Expert Opin Pharmacother [Internet]. 2020 Jun 12;21(9):1071–82. Available from: https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1746273

5. Arneth B. Tumor Microenvironment. Medicina (B Aires) [Internet]. 2019 Dec 30;56(1):15. Available from: https://www.mdpi.com/1648-9144/56/1/15

6. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. Front Oncol [Internet]. 2018 Mar 28;8(MAR):1–14. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00086/full

7. Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor

immunity. Immunol Rev [Internet]. 2017 Mar;276(1):97–111. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12520

8. Galluzzi L, Humeau J, Buqué A, Zitvogel L, Kroemer G. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2020 Dec 5;17(12):725–41. Available from: https://www.nature.com/articles/s41571-020-0413-z

9. Globocan 2020 Breast fact sheet [Internet]. [cited 2021 Aug 25]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf

10. Kara F, Keskinkılıç B. Türkiye kanser istatistikleri 2017. 2021; Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf

11. Globocan 2020 Turkey fact sheets. 2021;264:2020–1. Available from: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf

12. 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 Cancer J Clin [Internet]. 2021 May 4;71(3):209–49. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660

13. Lilleborge M, Falk RS, Sørlie T, Ursin G, Hofvind S. Can breast cancer be stopped? Modifiable risk factors of breast cancer among women with a prior benign or premalignant lesion. Int J Cancer [Internet]. 2021 Sep 15;149(6):1247–56. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33680

14. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med [Internet]. 2016 Aug 25;375(8):794–8. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMsr1606602

15. Atıcı AE, Gulluoglu BM. Genel cerrahi. AKÇA T, KARADENİZ ÇAKMAK G, EMRE AU, editors. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2019. 354 p.

16. Townsend CM. J, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. SABISTON TEXTBOOK of SURGERY The Biological Basis of Modern Surgical Practice. 21th Editi. Elsevier; 2021. 827–829 p.

17. Inic Z, Zegarac M, Inic M, Markovic I, Kozomara Z, Djurisic I, et al. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. Clin Med Insights Oncol [Internet]. 2014 Jan 11;8:CMO.S18006. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/CMO.S18006

18. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol [Internet]. 2019 Aug;30(8):1194–220. Available from: https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173

19. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. Virchows Arch [Internet]. 2014 Jul 31;465(1):1–14. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00428-014-1593-7

20. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Study Comparing Breast-Conserving Surgery with Radical Mastectomy for Early Breast Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2002 Oct 17;347(16):1227–32. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa020989

21. Leyrer CM, Berriochoa CA, Agrawal S, Donaldson A, Calhoun BC, Shah C, et al. Predictive factors on outcomes in metaplastic breast cancer. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2017 Oct 8;165(3):499–504. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10549-017-4367-5

22. Sabel MS. Surgical Considerations in Early-Stage Breast Cancer: Lessons Learned and Future Directions. Semin Radiat Oncol [Internet]. 2011 Jan;21(1):10–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2010.08.002

23. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative Chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. J Clin Oncol [Internet]. 2008 Feb 10;26(5):778–85. Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.15.0235

24. Asselain B, Barlow W, Bartlett J, Bergh J, Bergsten-Nordström E, Bliss J, et al. Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. Lancet Oncol [Internet]. 2018 Jan;19(1):27–39. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29242041

25. Petruolo O, Sevilimedu V, Montagna G, Le T, Morrow M, Barrio A V. How Often Does Modern Neoadjuvant Chemotherapy Downstage Patients to Breast-Conserving Surgery? Ann Surg Oncol [Internet]. 2021 Jan 8;28(1):287–94. Available from: https://doi.org/10.1245/s10434-020-08593-5

26. Cameron AM. Current Surgical Therapy. 13th editi. 2020. 670–675 p.

27. Sofi AA, Mohamed I, Koumaya M, Kamaluddin Z. Local therapy in metastatic breast cancer is associated with improved survival. Am J Ther [Internet]. 2013 Sep;20(5):487–92. Available from: https://journals.lww.com/00045391-201309000-00006

28. Giuliano AE, Ballman K V., McCall L, Beitsch PD, Brennan MB, Kelemen PR, et al. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node

Metastasis. JAMA [Internet]. 2017 Sep 12;318(10):918. Available from: http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2017.11470

29. Morrow M, Khan AJ. Locoregional Management After Neoadjuvant Chemotherapy. J Clin Oncol [Internet]. 2020 Jul 10 [cited 2021 Jan 31];38(20):2281–9. Available from: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.19.02576

30. Swoboda A, Nanda R. Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. In: Gradishar WJ, editor. Cancer Treat Res [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 155–65. (Cancer Treatment and Research; vol. 173). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-70197-4

31. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji İmmün Sistemin Fonsiyonları ve Bozuklukları. 1.Baskı. Camcıoglu Y, Deniz G, editors. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2007. 181 p.

32. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. J Clin Invest [Internet]. 2007 May 1;117(5):1137–46. Available from: http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI31405

33. Chikuma S. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. In: Yoshimura A, editor. Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 99–126. Available from: http://link.springer.com/10.1007/82_2017_61

34. Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. In: Xu J, editor. Advances in Experimental Medicine and Biology [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 7–32. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_2

35. Hudson K, Cross N, Jordan-Mahy N, Leyland R. The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy

Treatment. Front Immunol [Internet]. 2020 Oct 21;11(October):1–18. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.568931/full

36. Du W, Yang M, Turner A, Xu C, Ferris R, Huang J, et al. TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. Int J Mol Sci [Internet]. 2017 Mar 16;18(3):645. Available from: http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/645

37. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. Immunol Cell Biol [Internet]. 1997 Oct;75(5):430–45. Available from: http://doi.wiley.com/10.1038/icb.1997.68

38. Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. CD24: from A to Z. Cell Mol Immunol [Internet]. 2010 Mar 15;7(2):100–3. Available from: http://www.nature.com/articles/cmi2009119

39. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2017 Mar 7;5(MAR). Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00018/full

40. Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. Cell Adh Migr [Internet]. 2012 Jan 31;6(1):30–8. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.18953

41. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH. A Review of Cancer Immunotherapy: From the Past, to the Present, to the Future. Curr Oncol [Internet]. 2020 Apr 1;27(12):87–97. Available from: https://www.mdpi.com/1718-7729/27/12/5223

42. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2020 Feb 27;382(9):810–21. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1910549

43. Barzaman K, Moradi-Kalbolandi S, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Khorramdelazad H, Safari E, et al. Breast cancer immunotherapy: Current and novel approaches. Int Immunopharmacol [Internet]. 2021 Sep;98(June):107886. Available from: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107886

44. Franzoi MA, Romano E, Piccart M. Immunotherapy for early breast cancer: too soon, too superficial, or just right? Ann Oncol [Internet]. 2021 Mar;32(3):323–36. Available from: https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.022

45. Polk A, Svane I-M, Andersson M, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in breast cancer – Current status. Cancer Treat Rev [Internet]. 2018 Feb;63:122–34. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.12.008

46. Hartkopf AD, Taran F, Wallwiener M, Walter CB, Krämer B, Grischke E, et al. PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade to Treat Breast Cancer. Breast Care [Internet]. 2016;11(6):385–90. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/453569

47. Emens LA, Adams S, Cimino-Mathews A, Disis ML, Gatti-Mays ME, Ho AY, et al. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immunotherapy for the treatment of breast cancer. J Immunother Cancer [Internet]. 2021 Aug;9(8):e002597. Available from: https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2021-002597

48. Kwapisz D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. Cancer Immunol Immunother [Internet]. 2021 Mar 5;70(3):607–17. Available from: https://doi.org/10.1007/s00262-020-02736-z

49. de Mingo Pulido Á, Gardner A, Hiebler S, Soliman H, Rugo HS, Krummel MF, et al. TIM-3 Regulates CD103+ Dendritic Cell Function and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. Cancer Cell [Internet]. 2018 Jan;33(1):60-74.e6. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610817305238

50. Shimada Y, Hayashi M, Nagasaka Y, Ohno-Iwashita Y, Inomata M. Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4+ T cells. Exp Gerontol [Internet]. 2009 Aug;44(8):517–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2009.05.003

51. Zhao Y-J, Zhang J, Shi F, Hu Z-P, Wu J-P, Wu G-J, et al. Expression of PD-1 on CD4 + Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Tumor Microenvironment Associated with Pathological Characteristics of Breast Cancer. J Immunol Res [Internet]. 2018 Jul 4;2018:1–8. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/5690258/

52. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. Oncotarget [Internet]. 2015 Mar 10;6(7):5449–64. Available from: https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.3216

53. Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2013 Jun 12;139(3):667–76. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10549-013-2581-3

54. Buisseret L, Garaud S, de Wind A, Van den Eynden G, Boisson A, Solinas C, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. Oncoimmunology [Internet]. 2017 Jan 2;6(1):e1257452. Available from: https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1257452

55. Yu H, Yang J, Jiao S, Li Y, Zhang W, Wang J. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. Cancer Immunol Immunother [Internet]. 2015 Jul 17;64(7):853–60. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00262-015-1696-2

56. Fang J, Chen F, Liu D, Gu F, Chen Z, Wang Y. Prognostic value of immune checkpoint molecules in breast cancer. Biosci Rep [Internet]. 2020 Jul 31;40(7):1–13. Available from: https://portlandpress.com/bioscirep/article/40/7/BSR20201054/225643/Prognostic-value-of-immune-checkpoint-molecules-in

57. Zhang H, Xiang R, Wu B, Li J, Luo G. T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in invasive ductal breast carcinoma: Clinicopathological correlations and association with tumor infiltration by cytotoxic lymphocytes. Mol Clin Oncol [Internet]. 2017 Oct;7(4):557–63. Available from: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2017.1360

58. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Morisaki T, et al. Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. J Transl Med [Internet]. 2018 Dec 4;16(1):87. Available from: https://doi.org/10.1186/s12967-018-1458-y

59. Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung S-W, Lee C-T, Chung J-H. CD24, a Novel Cancer Biomarker, Predicting Disease-Free Survival of Non-small Cell Lung Carcinomas: A Retrospective Study of Prognostic Factor Analysis from the Viewpoint of Forthcoming (Seventh) New TNM Classification. J Thorac Oncol [Internet]. 2010 May;5(5):649–57. Available from: http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d5e554

60. Peng Z, Su P, Yang Y, Yao X, Zhang Y, Jin F, et al. Identification of CTLA-4 associated with tumor microenvironment and competing interactions in triple negative breast cancer by co-expression network analysis. J Cancer [Internet]. 2020;11(21):6365–75. Available from: http://www.jcancer.org//creativecommons.org/licenses/by/4.0/

61. Kern R, Panis C. CTLA-4 Expression and Its Clinical Significance in Breast

Cancer. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) [Internet]. 2021 Dec 20;69(1):16. Available from: https://doi.org/10.1007/s00005-021-00618-5

62. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. TIM-3 expression in breast cancer. Oncoimmunology [Internet]. 2018 Nov 2;7(11):e1502128. Available from: https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1502128

63. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. Lancet [Internet]. 2014 Jul;384(9938):164–72. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613624228

64. Peintinger F, Sinn B, Hatzis C, Albarracin C, Downs-Kelly E, Morkowski J, et al. Reproducibility of residual cancer burden for prognostic assessment of breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. Mod Pathol [Internet]. 2015 Jul 1;28(7):913–20. Available from: http://www.nature.com/articles/modpathol201553

65. Ghosh J, Chatterjee M, Ganguly S, Datta A, Biswas B, Mukherjee G, et al. PDL1 expression and its correlation with outcomes in non-metastatic triple-negative breast cancer (TNBC). Ecancermedicalscience [Internet]. 2021 Apr 6;15. Available from: https://ecancer.org/en/journal/article/1217-pdl1-expression-and-its-correlation-with-outcomes-in-non-metastatic-triple-negative-breast-cancer-tnbc

66. Kaewkangsadan V, Verma C, Eremin JM, Cowley G, Ilyas M, Eremin O. Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer. J Immunol Res [Internet]. 2016;2016:1–25. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/4757405/

67. Cabioglu N, Onder S, Oner G, Karatay H, Tukenmez M, Muslumanoglu M, et al. TIM3 expression on TILs is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced triple-negative breast cancer. BMC Cancer [Internet]. 2021 Dec 6;21(1):357. Available from: https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-021-08054-6

68. Linette GP, Carreno BM. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Checkpoint Inhibitor Era. Curr Hematol Malig Rep [Internet]. 2019 Aug 11;14(4):286–91. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11899-019-00523-x

69. Schalper KA. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes. Oncoimmunology [Internet]. 2014 Jun 25;3(6):e29288. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/onci.29288

70. Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 Expression Is Increased in a Subset of Basal Type Breast Cancer Cells. Samant R, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Feb 14;9(2):e88557. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0088557