T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ANTALYA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

İÇ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

HER2 POZİTİF, HORMON RESEPTÖR NEGATİF LOKAL İLERİ MEME KANSERİ HASTALARINDA TÜMÖR REGULATUAR T HÜCRE (TREG) İNFİLTRASYONUNUN NEOADJUVAN TEDAVİYE PATOLOJİK TAM YANIT ORANLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Yasemin Koca

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANTALYA/2024

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ANTALYA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

İÇ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

HER2 POZİTİF, HORMON RESEPTÖR NEGATİF LOKAL İLERİ MEME KANSERİ HASTALARINDA TÜMÖR REGULATUAR T HÜCRE (TREG) İNFİLTRASYONUNUN NEOADJUVAN TEDAVİYE PATOLOJİK TAM YANIT ORANLARI ÜZERINE ETKİSİ

Dr. Yasemin Koca

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Derya Kıvrak Salim

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

Bu tez Onkoloji ve İmmunoterapi Derneği tarafından 0702227144 proje numarası ile desteklenmiştir.

"Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir."

ANTALYA/2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER i
TEŞEKKÜR iii
SİMGE VE KISALTMALAR iv
ŞEKİL LİSTESİ vi
TABLO LİSTESİ vii
ÖZET ix
ABSTRACT x
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 2
2.1.RİSK FAKTÖRLERİ 2
2.1.2. Kadın Cinsiyet 2
2.1.3. Beyaz Irk 2
2.1.4. Vücut Ağırlığı 2
2.1.5. Premenopozol Dönem 3
2.1.6. Postmenepozol Dönem 3
2.1.7. Boy Durumu 3
2.1.8. Östrojen Seviyeleri 3
2.1.9. Kemik Minarel Yoğunluğu 3
2.1.10. Diğer Hormonal Faktörler 3
2.1.11. Üreme Faktörleri 4
2.1.12. Meme Kanseri Öyküsü 4
2.1.13. Genetik Geçişli Mutasyonlar 4
2.1.14. Yaşam Tarzı Faktörleri 4
2.2 MEME KANSERİ PATOLOJİSİ 5
2.2.1. Meme Histolojisi 5
2.2.2. Memenin İntraduktal Proliferatif Lezyonları 5
2.2.2.1. Olağan Duktal Hiperplazi 5
2.2.2.2. Atipik Duktal Hiperplazi 6
2.2.2.3. Duktal Karsinoma İn situ 6
2.2.3. Duktal Karsinoma İn Sitularda İmmunohistokimyasal Bulgular 7
2.2.4. İnvaziv Meme Karsinomları 7
2.2.5. Meme Karsinomlarında Histolojik Değerlendirme 7
2.3. MEME TÜMÖRLERİNDE HER2/NEU GENİNİN MOLEKÜLER DEĞERLENDİRİLMESİ 8
2.3.1. HER2'nin İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi 10
2.3.2. HER2'nin İn Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi 11
2.4. MEME KANSERİNDE EVRELEME VE SINIFLANDIRMA TNM EVRELEMESİ 11

2.4.1. Rejyonal Nodal Evreleme (N Evresi) 14
2.4.2. Uzak Metastaz Evrelemesi 15
2.5. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK VE PREDİKTİF FAKTÖRLER 15
2.5.1. Prognostik Faktör 15
2.5.2. Prediktif Faktör 15
2.6. PATOLOJİK FAKTÖRLER 15
2.6.1. Tümör Evresi 15
2.6.2. Tümör Morfolojisi 16
2.6.3. Peritümöral Lenfovasküler İnvazyon 16
2.6.4. Ki-67 16
2.7. MEME KANSERİNDE TEDAVİ 16
2.7.1. Lokal İleri HER2 Pozitif Meme Kanserinde Neoadjuvan Kemoterapi ... 17
2.8. KANSER İMMUNOLOJİSİ 20
2.8.1. Tümör İnfiltre Lenfositler 23
2.8.2. B Lenfositler 24
2.8.3. T Lenfositler 24
2.8.4. TREG ve Kanser İmmünolojisi 25
3. MATARYEL VE METOD 27
3.1. Olguların Seçimi 27
3.2. İmmunohistokimyasal Boyama 28
3.3. Lenfosit İnfiltrasyonlarının Değerlendirilmesi 28
3.4. İmmunohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi 29
3.5. İstatistiksel Analiz 29
4.1.Klinik ve Histopatolojik Özellikler 30
4.2. Patolojik Evreye Göre T Hücre İnfiltrasyon Özellikleri 33
4.3. Patolojik Tam Yanıt Durumuna Göre T Hücre İnfiltrasyon Özellikleri 34
4.4. Menopoz Durumuna Göre T Hücre İnfiltrasyon Özellikleri 37
4.5. Çok Değişkenli Analizler: 38
4.6. Sağkalım Analizleri 38
4.7. Tedavi Toksisitesi 39
5. TARTIŞMA 40
6. SONUÇLAR 47
KAYNAKÇA 49

TEŞEKKÜR

Asistanlık ve tezimin planlanması, yürütülmesi ve yazımı aşamalarında desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, Antalya EAH'de yatmakta olan bu tezin, tanı, teşhis, iyileştirme ve taburcu süreçlerine bir doktor hassasiyetiyle yaklaşan, süreci anne şefkatiyle yürüten hem yol göstericim hem de yol arkadaşım olabilen, mesai mevhumunu bir kenara bırakarak her an, tüm koşullardan azade bana destek olan ve Türk bilim dünyasına eklediği onlarca kalitenin yanı sıra bana da zaman ayırmakta her daim cömert olan kıymetli danışmanım, meslek büyüğüm ve bilim insanı Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji bölümü öğretim üyesi,

Doç. Dr. Derya KIVRAK SALİM'e,

Bu tezin sonuçlandırılmasındaki tüm basamaklarda sonsuz emeği olan, akademik çalışma ilke ve prensipleriyle bu tezi gerçek bir bilim tezi haline getiren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen,

Prof.Dr. Banu ÖZTÜRK'e

Bu tezin yürütülmesinde çok büyük emeğe sahip, çalışmanın laboratuvar kahrını çeken ve bulguların elde edilmesinde heyecanını ortaya koyan, bilim dünyasına yaptığı onlarca pelerinli kahramanlıklara bir yenisini ekleyen ve boğulduğumu düşündüğüm onlarca zamanda bana hiç usanmadan can simidi olan kıymetli hocam Tıbbi Patoloji öğretim üyesi,

Doç. Dr. Canan SADULLAHOĞLU'na,

Tezimin laboratuvar çalışmalarının eksiksiz yürütülebilmesi için, canı gönülden destek olan,

Onkoloji ve İmmunoterapi Derneği'ne

Tanrının bana seni seviyorum deme şekli olduğunu düşündüğüm, koşulsuz ve süresiz destekleri ile tüm başarılarımın görünmeyen mimarı, desteklerinden her zaman emin olacağım, hayatımın en önemli parçası olan, varlıklarıyla hayatımdaki her boşluğu dolduran kısaca beni ben yapan canım aileme,

Yoğun çalışma koşullarına rağmen tüm tez sürecinde bana desteklerini esirgemeyen Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç hastalıkları kliniğinin tüm çalışanlarına, saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Yasemin KOCA Antalya/2024

SİMGE VE KISALTMALAR

AC-TH(P)	Doksorubisin, siklofosfomid, paklitaksel veya docataksel, trastuzumab (pertuzumab)
BX	Biyopsi
ca	Kanser
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DC	Dendritik hücre
DCIS	Duktal karsinoma in situ
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DFS	Hastalıksız Sağ Kalım
ECD	Ekstraselluler domain
ER	Östrojen reseptörü
FİSH	Fluorescence in situ hibridizasyon
FLT 3	FMS ile ilişkili tirozin kinaz 3
FOXP3	Forkhead box P3
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GSK	Genel sağkalım
HER2	İnsan epidermal büyüme fatörü reseptörü 2
HLA	Human lökosit antijen
HSK	Hastalıksız sağkalım
ISH	İn situ hibridizasyon
IDFS	İnvaziv hastalıksız sağkalım
İT	İntratümöral alan
iTREG	İndüklenmiş T regulatuar hücre
M	Metastatik hastalık
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MAPK	Mitojen ile aktive olan protein kinaz
MDSC	Myeloid kaynaklı baskılayıcı hücre
MHC	Major histouyumluluk kompleksi
MVD	Mikrovasküler damarlanma yoğunluğu
N	Nodal evre
NAKT	Neoadjuvan kemoterapi

NK	Doğal öldürücü hücre
NO	Nitrik oksit
nTREG	Doğal T regulatuar hücre
OS	Toplam sağkalım
pCR	Patolojik tam yanıt
PD-1	Programlanmış hücre ölüm proteini- 1
PFS	Progresyonsuz Sağ Kalım
PGE2	Prostoglandin E2
PI3K	Fosfotidilinositol 3-kinaz
PR	Progesteron reseptörü
PT	Peritümöral alan
RCC	Renal hücreli karsinom
RNI	Azot ara ürünü
ROS	Reaktif oksijen radikali
SEER	Surveillance epidemilogy and end results
T	Tümör boyutu
TAM	Tümörle ilişkili makrofaj
TCH(P)	Docataksel, karboplatin ve trastuzumab (pertuzumab)
TDLÜ	Terminal duktal lobüler ünite
Th	Yardımcı T helper
TREG	T Regulatuar hücre
TNBC	Triple negatif meme kanseri
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
wPCbH(P)	Karboplatin, paklitaksel, trastuzumab (pertuzumab)

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1.MEME DUKTAL SİSTEM ŞEMASI..... 5
ŞEKİL 2. HER2 HEDEFLİ TEDAVİ SONRASI PCR ORANLARI 19
ŞEKİL 3. PATOLOJİK TAM YANIT DURUMUNA GÖRE IDFS..... 39

TABLO LİSTESİ

Tablolar dizini **Sayfa**

TABLO 1. MODİFİYE BLOOM-RİCHARDSON METODU İLE MEME TÜMÖRLERİNİN HİSTOLOJİK 8
TABLO 2. HER2 POZİTİF MEME KANSERİ ÖZELLİKLERİ..... 10
TABLO 3. HER2'NİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRİLMESİ... 11
TABLO 4. AMERİCAN JOİNT COMMİTTE ON CANCER/TNM MEME KANSERİ EVRELEMESİ 13
TABLO 5. AMERİCAN JOİNT COMMİTTE ON CANCER/TNM MEME KANSERİ EVRELEMESİ 14
TABLO 6. AMERİCAN JOİNT COMMİTTE ON CANCER/TNM MEME KANSERİ EVRELEMESİ 15
TABLO 7. ÇALIŞMAYA DAHİL OLMA VE ÇIKARILMA KRİTERLERİ TABLOSU..... 27
TABLO 8. HASTALARIN DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ 30
TABLO 9. HASTALARIN DEMOGRAFİK VE HÜCRESEL ÖZELLİKLERİ 31
TABLO 10. PATOLOJİK TAM YANITA ULAŞMA DURUMUNA GÖRE DEMOGRAFİK, KLİNİK VE PATOLOJİK ÖZELLİKLER 32
TABLO 11. HASTALIK EVRESİNE GÖRE NAKT SONRASI LENFOSİT İNFİLTRASYON ORANLARI 34
TABLO 12. PATOLOJİK TAM YANIT DURUMUNA GÖRE TÜMÖR LENFOSİT İNFİLTRASYON ORANLARI 34
TABLO 13. PATOLOJİK TAM YANITA ULAŞMA DURUMUNA GÖRE TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN HÜCRESEL DEĞİŞKENLER 35
TABLO 14. PCR GRUBUNDA HÜCRE KARŞILAŞTIRMASI 36
TABLO 15. NON PCR GRUBUNDA HÜCRE KARŞILAŞTIRMASI 36
TABLO 16. İNTRATÜMÖRAL VE PERİTÜMÖRAL T LENFOSİTLERİN KORELASYON ANALİZLERİ 37
TABLO 17. MENOPOZ DURUMLARINA GÖRE HÜCRE EKSPRESYON ORANLARI 37
TABLO 18. PATOLOJİK TAM YANITA ULAŞAMAMA RİSKİNİ BELİRLEYEN FAKTÖRLER 38

TABLO 19. NEOADJUVAN TEDAVİ ŞEMALARINA GÖRE HEMATOLOJİK VE KARACİĞER TOKSİSİTE ORANLARI..... 39
TABLO 20. LİTERATÜRDE MEME KANSERİ DIŞINDAKİ EPİTELYAL TÜMÖRLER VE TREG İLİŞKİLİ YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR 41
TABLO 21. LİTERATÜRDE MEME KANSERİ VE TREG İLE İLGİLİ YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR..... 42

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda neoadjuvan tedavi uygulanan Her2 pozitif, hormon reseptör negatif lokal ileri meme kanserli hastalarda intratümöral Treg infiltrasyonunun patolojik tam yanıt üzerine etkisini ortaya koymak ve patolojik tam yanıt üzerinde etkili olabilecek diğer klinik, patolojik ve hücresel değişikleri saptamayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bölümü'nde Ocak 2015 ile Ocak 2022 tarihleri arasında tedavi ve takip edilmiş, tümör doku örneklerine ve tedavi bilgilerine ulaşılabilen 18 yaş ve üstü lokal ileri HER2 pozitif, hormon reseptör (HR) negatif neoadjuvan tedavi almış 55 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Deneyimli iki ayrı patolog tarafından patoloji materyallerinde kesitlere immunohistokimyasal yöntemle CD4, CD25 ve FOXP3 boyanması incelendi. Tümör infiltre eden T hücre (Treg ve Thelper) düzeylerinin patolojik tam yanıt üzerindeki etkisi araştırıldı.

Bulgular: Toplam 55 lokal ve lokal ileri evre, HER2+, HR- meme kanserli hasta tarandı ve verilerine ulaşılan 45 (median yaş: 50) hasta istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Neoadjuvan tedavi sonrası 34 hasta patolojik tam yanıtlı izlenirken 11 hastada patolojik tam yanıta ulaşılamamıştır. NACT sonrası Th ve Treg infiltrasyonu erken evre ve lokal ileri evre arasında farklılık göstermemiştir. Patolojik tam yanıt veren hastalarda intratümöral ve peritümöral Th düzeylerinin patolojik tam yanıt alınamayanlara göre daha düşük olduğu izlenmiştir. Patolojik tam yanıt alınan hastalarda intratümöral ve peritümöral alanda Treg infiltrasyonunun patolojik tam yanıt alınmayanlara göre düşük olduğu saptanmıştır. Tümör içi ve mikroçevresi ayrı ayrı değerlendirildiğinde hücresel farklılık izlenmedi. Ancak tümör içi Treg infiltrasyonun pCR'a ulaşamama riskini 10.8 kat artırdığı görüldü.

Tartışma ve Sonuç: Tümör mikroçevresindeki farklı immün hücrelerin bazıları iyi prognozla ilişkili, bazıları ise immun gözetimi engellediği, anjiogenezi ve invazyon yeteneğini arttırdığı için kötü prognozla ilişkilidir. Çalışmamız agresif bir meme kanseri grubu olan Her2+HR- lokal ileri meme kanserinde NAKT sonucunda hücresel değişikliklerin incelendiği ilk çalışma olup, NAKT sonrası yüksek Treg infiltrasyonunun patolojik tam yanıta ulaşamama riskini artıran bağımsız bir prediktör olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, T regulatuar hücre, patolojik tam tanıt

ABSTRACT

Aim: In our study we aim to reveal the effect of the intratumoral Treg infiltration on the pathological complete response and to find out other clinic-pathologic and cellular variables effective on pathologic complete response

Patients and Method: Fifty-five patients, aged 18 years and over, who were treated and followed up in the Medical Oncology Department of Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi between January 2015 and January 2022, and whose tumor tissue samples and treatment information were available, were included in the study. Paraffin blocks of biopsy and operation tissues were eavaluated by two different pathologists reviewing immunohistochemical staining with CD4, CD25 and FOXP3. The effect of tumor infiltrating T cell (Tregs and Th cells) quantitiy on pathological complete response is searched

Results: 55 local and local advanced stage HER2 positive breast cancers were included in the study and the final 45 patients (median age 50) were statistically analyzed. While 34 patients were observed to have a pathological complete response after neoadjuvant treatment, pathological complete response was not achieved in 11 patients. Th and Treg infiltration after NACT did not differ between early stage and locally advanced stage. Intratumoral and peritumoral Th levels were observed to be lower in patients with a pathological complete response than in those without a pathological complete response. Similarly, in patients with a pathological complete response, Treg infiltration in the intratumoral and peritumoral area was found to be low compared to non pathologic complete responders. There is no cellular difference in intratumoral area and tumor microenvironment. But increased intratumoral Treg infiltration increased the probability of non PCR status by 10.8 times.

Discussion and Conclusion: Some of the different immune cells in the tumor microenvironment are associated with good prognosis, while others are associated with poor prognosis because they inhibit immune surveillance and increase angiogenesis and invasion ability.

Our study is the first to evaluate cellular changes after NACT in Her2+HR- locally advanced breast cancer, an aggressive breast cancer group, and it was determined that high Treg infiltration after NACT is an independent predictor that increases the risk of not achieving a pathological complete response**.**

Key Words: Breast cancer, regulatory T cells, Pathologic complete response

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (HER) pozitifliği meme kanserli hastaların yaklaşık %15-20'sinde görülmektedir (1). Hastaların %65'i lokal, %27'si ise lokal ileri evrede başvurmakta olup evre 2 ve 3 için 5 yıllık genel sağ kalım (GSK) oranı sırasıyla %93 ve %72'dir. HER2 pozitiflik agresif hastalık ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Ama HER2'yi hedefleyen tedavilerle özellikle erken evre ve lokal ileri evre hastaların sağ kalım sonuçlarında iyileşmeler elde edilmiştir. Lokal veya lokal ileri meme kanserinde neoadjuvan kemoterapi uygulamanın adjuvan uygulamaya göre hastalıksız sağ kalım (HSK) veya GSK üstünlüğü olamamakla birlikte patolojik tam yanıt (pCR) sağlanması uzamış sağ kalımla ilişkilidir (2). Tümör mikroçevresi, tümörün biyolojik davranışını etkileyen birçok hücresel ve moleküler faktör içerir(3). Tümörü infiltre eden immun hücreler bu mikroçevrenin esas oyuncularıdır (3). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla mikroçevrede etkili farklı immun hücrelerin bir kısmının iyi prognozla ilişkili olup bir kısmının ise immun gözetimi engellediği, anjiogenezi ve invazyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir. Tümörü infiltre eden immun hücrelerin klinikopatolojik öneminin yanı sıra son dönem immunoterapilerin etkinliği ve sağ kalım üzerine etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Doğal ve edinsel immun yanıtın karakteristik farklı hücreleri ile infiltre olan aynı tip tümörlerde farklı prognozlar gözlenmesi, tümör infiltre eden immun hücrelerin sistematik analizinin potansiyel önemini arttırmıştır. FOXP3 eksprese eden düzenleyici T (Treg) hücreleri tümör immünitesini baskılar (4). Treg hücreleri, kanser hastalarında sıklıkla kötü prognoz ile ilişkilidir ve tümör dokularında fazla miktarda bulunur (4).

Amaç: Bu çalışmanın birinci amacı, HER2 pozitif hormon reseptör negatif meme kanserinde neoadjuvan tedavi almış hastalarda Treg hücre alt gruplarının orantısal olarak karşılaştırmalı analizini yapmaktır. İkinci amacı ise, belirlediğimiz bu intratümöral Treg infiltrasyonun pCR üzerine etkisini ortaya koymak ve tedavi yanıtı üzerine prediktif etkisi olup olmadığını belirlemekti.

2.GENEL BİLGİLER

Meme kanseri kadın popülasyonda sık görülen kanser türüdür (5). Akciğer kanserinden sonra kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (6). Meme kanseri insidansı bölgesel olarak farklılık göstermekte olup Kuzey Amerika, Avustralya ile Batı ve Kuzey Avrupa'da sık görülürken, en az Asya ve Afrika'da görülür (7).

Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri yılda 260 bin vaka ve 40 bin ölümden sorumludur (7). Meme kanserinin patogenezinde değiştirilebilir ve değiştirilemez faktörler rol oynamaktadır (8). Örneğin kalıtsal genetik değişiklikler, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi etkenler önem arz etmektedir (9). Meme kanseri mortalite oranları 1970'lerden sonra düşüş göstermeye başlamış olup bu düşüş artmış meme kanseri tarama yöntemleri, neoadjuvan ve adjuvan tedavideki gelişmelere ilişkilidir (10).

2.1.RİSK FAKTÖRLERİ

2.1.1. Yaş

Meme kanseri riski, yaşın ilerlemesi ile birlikte artmakta olup 'Surveillance Epidemilogy and End Results (SEER) verilerine göre bu risk 49 yaşa kadar 1/49 iken, 70 yaş ve üzerinde risk artmakta olup, 1/14 olarak saptanmıştır (11). Meme kanseri tanısı alan hastaların mortalite ve morbitide durumları tanı anındaki yaşla ilişkilidir ve 70 yaşın üzerindeki hastalarda tüm riskler yüksektir bunun önde gelen nedenleri 70 yaş ve üzerindeki hastalarda yaşla ilişkili komorbiditelerinden kaynaklanmaktadır (12).

2.1.2. Kadın Cinsiyet

Meme kanseri, erkeklerle karşılaştırıldığında kadınlarda 100 kat fazla görülür (7).

2.1.3. Beyaz Irk

Meme kanseri etnik kökenle ilişkili olup beyaz ırkta daha fazla görülmektedir (8).

2.1.4. Vücut Ağırlığı

Obezite; kanserin önde gelen önlenebilir nedenidir. Risk artışının yanında nüks ve artmış ölüm oranlarıyla ilişkilidir (13). Fakat vücut kitle indeksi ile meme kanseri riski hastanın menopoz durumuna göre farklılıklar gösterir (13).

2.1.5. Premenopozol Dönem

Premenepozol dönemdeki yüksek vücut kitle indeksi düşük meme kanseri riski taşımakta olup yapılmış çalışmalar düşük serum progesteron seviyesi ile ilişkilendirmiştir (14).

2.1.6. Postmenepozol Dönem

Over östrojen üretiminin bulunmadığı postmenopozal kadınlarda yüksek vücut kitle indeksi artmış meme kanseri riski yağ dokusu kaynaklı yüksek plazma östradiol seviyesi ile ilişkilidir (13). Yağ dokudaki östrojen sentezi hem obezite hem de yaşlanma ile birlikte artar (15).

2.1.7. Boy Durumu

Menopoz durumundan bağımsız uzun boy kanser riskinde artışa neden olmaktadır (16).

2.1.8. Östrojen Seviyeleri

Menopoz durumundan bağımsız yüksek östrojen seviyesi meme kanseri görülme riskini arttırmakta olup, östrojenin meme dokusu üzerindeki proliferatif etkisinden kaynaklanmaktadır (17).

2.1.9. Kemik Minarel Yoğunluğu

Östrojen hem kemik doku metabolizması hem de meme proliferasyonunda rol oynar (18). Kemik doku östrojene karşı yüksek duyarlılığa sahip olup kemik mineral yoğunluğu östrojen maruziyetinin uzun dönem takibi için biyobelirteç olarak kullanılabilirken yüksek kemik mineral yoğunluğuna sahip kadınların yüksek östrojen maruziyeti meme kanseri riskinde artışa neden olmaktadır (18).

2.1.10. Diğer Hormonal Faktörler

Androjenlerin premenopozal ve postmenopozal dönemde yüksek seviyeleri meme kanseri riskinde artışa neden olmaktadır (19).

İnsülin yolağı ve ilişkili hormonlar: Diyabet meme kanseri için bir risk faktörü olarak görülmese de insülin büyüme faktörü-1 için yapılan prospektif çalışmalarda premenopozal ve postmenopozal kadınlarda kanser riskinde artışa neden olacağına dair görüşler mevcuttur (20).

Menopozal dönemde hormon replasman tedavisi kullanımı meme kanseri ile ilişkilidir (21). Kullanım süresi ve hormon formulasyon tipi önemli risk faktörüdür (21). Uzun kullanım süresi en yüksek riske sahip olmakla birlikte kısa dönem (3 yıldan az) kombine östrojen-progesteron kullanımı ile meme kanseri görülme riskinde artışa neden olmamaktadır (22).

2.1.11. Üreme Faktörleri

Erken menarş yüksek meme kanseri riski taşımakta olup 15 yaş ve sonrasında menarş olanlarda 13 yaş ve öncesi menarş olanlara göre daha az ER/progesteron reseptörü pozitif meme kanseri gelişme riski bulunmaktadır (22).

Hiç doğum yapmamış kadınlarda doğum yapmış kadınlara göre daha fazla meme kanseri gelişme riski taşımakta olup doğum yapmış kadınlarda doğumdan sonraki bir-iki yıl içerisinde meme kanseri gelişme riski daha fazla olsa da doğum yapmış olmak daha sonraki dekadlarda meme kanserinden koruyucu etkiye sahiptir (23).

Gebe kalma yaşı ilerledikçe kanser riski artmaktadır, 20 yaşında doğum yapanlarda %20 azalırken, 25 yaşında doğum yapanlarda %10 azalmakta 35 yaşında doğum yapanlarda ise %5 artmaktadır (24).

2.1.12. Meme Kanseri Öyküsü

İnvaziv meme kanseri ya da duktal karsinoma in situ öyküsü varsa diğer memede kanser gelişme riski artmış olup 2010 SEER verilerine göre; primer meme kanseri olan kadınlarda karşı memede kanser gelişme riski %4 olarak bulunmuştur (25).

Birinci derece kadın akrabada meme kanseri öyküsü varsa iki kat, birince derece iki akrabada meme kanseri öyküsü varsa üç kat risk artışı mevcut olup tanı yaşı da önemlidir: 30 yaş altı kişide meme kanseri görülmüşse risk 3 katına çıkarken, 60 yaş ve üzerinde meme kanseri görülmüşse risk 1.5 kat artmaktadır (21).

2.1.13. Genetik Geçişli Mutasyonlar

Genetik mutasyonlar meme kanserinin önlenemeyen nedenlerinden ve sıklığı %5-6 arasındadır (26). BRCA1, BRCA2, p53, STK11, CDH1, PALB2, PTEN genleri rol almaktadır (27).

2.1.14. Yaşam Tarzı Faktörleri

Alkol kullanımı meme kanseri gelişmesinde risk artışına neden olup önlenebilir risk faktörüdür (28).

Sigara kullanımı meme kanseri riskinde artışa neden olur ve kullanıma başlama yaşı, süresi ve paket sayısı riskle ilişkilidir (27).

Genç yaşta göğüs bölgesine iyonizan radyasyon uygulanması meme kanseri görülme riskini arttırdığı görülmektedir. (29).

2.2 MEME KANSERİ PATOLOJİSİ

2.2.1. Meme Histolojisi

Meme yağ doku, bağ doku, duktal sistem ve lobüler sistem olmak üzere çeşitli bileşenleri içeren heterojen bir yapıya sahiptir, hormonal düzenleme altında döngüsel olarak büyüyen ve değişen bağ ve glandüler yapılara sahiptir (30). Bağ doku içerisinde asinus ve duktuslar bulunur (30). Asinuslar sekresyondan sorumlu olup bir araya gelerek lobülleri oluşturur (30). Memenin temel birimi terminal duktal lobüler ünite (TDLÜ) , asinuslar ile asinusların drene olduğu duktuslardan oluşur ve prolaktine yanıt olarak süt üretimini gerçekleştirir (30). 10 ile 100 asinus birleşerek lobülü, 20-40 lobül birleşerek meme lobunu oluşturur ve her memede yaklaşık 15-20 adet meme lobu bulunur (30).

Duktusları ve lobuler sistemi döşeyen epitel çift katlıdır ve iki tabakadan oluşur (30). İç boşluğa bakan kısımda küboidal luminal hücrelerden oluşurken dış kısmı miyoepitelyal hücrelerden oluşur (30). Miyoepitelyal hücreler anti-angionik ve anti-invaziv faktörlerin salgılanması ile tümör hücrelerinin stromal invazyonunu baskılar. Ayrıca miyoepitelyal tabaka korunmuş ise bening, miyoepitelyal tabakada kayıp mevcut ise invaziv lezyonlar görülür (30).



Şekil 1.Meme duktal sistem şeması

2.2.2. Memenin İntraduktal Proliferatif Lezyonları

İntraduktal proliferatif lezyonlar meme dokusu içerisindeki kanallarda meydana gelen epitelyal proliferasyon lezyonlar grubunda yer alır üç gruba ayrılır ve histopatolojik özellikleri, biyolojik belirteçleri ve invaziv kansere ilerleme riskleri açısından farklılık göstermektedirler (26).

İntraduktal lezyonlar özelliklerine göre 3 gruba ayrılır:

1. **Olağan(atipisiz-basit) duktal hiperplazi**
2. **Atipik duktal hiperplazi**
3. **Duktal karsinoma in situ**

2.2.2.1. Olağan Duktal Hiperplazi

Kanallardaki hücre sayısının artması ile ilişkili olup ilişkili olup meme kanseri riskinde 1.5-2 kat artışa neden olmaktadır (31). Hastaların çoğunda herhangi bir

semptom görülmez, immunohistokimyasal olarak östrojen reseptör antikoru ile boyanma, CK5/6 ile mozaik paternde ekspresyon ve Ki-67 ile düşük proliferasyon gösterir (32).

2.2.2.2. Atipik Duktal Hiperplazi

Memenin duktal-lobüler sistemindeki hücrelerin anormal artışı ile oluşan prekanseröz lezyondur ve tanısı meme biopsisi ile konulur, yapılan biopsilerin %4'ünü atipik duktal hiperplazi oluşturur ve meme kanseri geliştirme riskini 3-5 kat arttırmaya neden olduğu için yakın takip gerektirir (33). Atipik duktal hiperplazi düzenli olarak sıralanmış küçük küboidal hiperkromatik hücrelerden oluşur ve östrojen reseptörü ile kuvvetli ekspresyon, Ki-67 ile düşük proliferasyon görülür (32).

2.2.2.3. Duktal Karsinoma İn situ

'İn situ' terimi kanser hücrelerinin sınırlı bir alan içinde kaldığını, bazal membran boyunca invazyon yapmadan proliferasyon artışı olarak tanımlanan duktal-lobüler sisteminin sınırlı neoplastik hücre proliferasyonudur (34). Doğal seyri tümörün derecesi ve histolojik tipine göre değişim göstermektedir (34). Tarama yöntemlerinin yagınlaşması ile saptanma oranı artmıştır (34).

Duktal karsinoma in situ (DCIS) sitonükleer özelliklere göre düşük, orta ve yüksek dereceli olmak üzere 3 gruba ayrılır (34).

Düşük dereceli duktal karsinoma in situ: Küçük, uniform, düzenli dağılım gösteren malign hücrelerden oluşurlar, mitoz azdır ve nadir nekroz içeren intraduktal epitelyal proliferasyon olup atipik duktal hiperplazi ile benzer özellikler göstermekle birlikte Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) önerisine göre ayırıcı tanıda en çok kullanılan kantitatif kriterler

- Yan yana en az iki duktusun homojen tutulumu veya
- Boyutu >2mm lik bir duktusun tutulumu olup, bu özellikler mevcutsa düşük dereceli karsinoma in situ olarak değerlendirilir (35).

Orta dereceli karsinoma in situ lezyonu oluşturan hücrelerin düşük ve yüksek dereceli karsinoma in situnun tanısal olarak gerekli yapısal ve sitolojik özelliklerini karşılamadığı hafif ve orta derece pleomorfizm gösteren mikropailler lezyonlara sahip vakalara verilen isimdir (36).

Yüksek dereceli karsinoma in situ tanınması en kolay gruptur: Hücreler pleomorfik, düzensiz aralıklı ve genellikle hücre boyutunda varyasyon izlenen malign hücrelerin intraduktal proliferasyonudur (37).

2.2.3. Duktal Karsinoma İn Sitularda İmmunohistokimyasal Bulgular

Duktal karsinoma in situların, invaziv karsinom ile ayrımında myoepitelyal tabakanın korunmuş olması ayrım yapılmasında önemlidir bu nedenle miyoepitelyal hücrelere spesifik immun belirteçler kullanılır bunlar; S-100, aktin, kalponin, p63, p40, CD10 ve CK5/6, 14 ve 17 gibi yüksek molekül ağırlığına sahip keratinlerdir (36). İnvaziv karsinomlarda malign myoepitelyal hücre tabakası intakt değildir (35).

Her invaziv karsinom, duktal karsinoma in situdan gelişir, düşük dereceli duktal karsinoma in situların %14-60'ında invaziv karsinom geliştiği bildirilmiştir (38). Yüksek dereceli karsinoma in situlara tedavi uygulanmasına bağlı olarak invaziv karsinom gelişme riski daha az bilinmektedir (38).

2.2.4. İnvaziv Meme Karsinomları

İnvaziv, meme kanseri, 2018 global istatistik verilerine göre kadınlarda en sık görülen kanser türü olmakla birlikte kadınlarda görülen kanserlerin dünya genelinde %23'ünü gelişmiş ülkelerde ise %27'sini oluşturmaktadır (39).

2.2.5. Meme Karsinomlarında Histolojik Değerlendirme

Meme karsinomlarında histolojik derecelendirme 'Scarff-Bloom-Richardson Derecelendirme Sistemi Elston-Ellis Modifikasyonu-Nottingham Histolojik Skorlama Sistemi' ne göre yapılmaktadır (40).

Bu derecelendirme sistemi nükleer pleomorfizm, mitoz sayısı ve gland/tübül formasyonuna göre ayrı ayrı değerlendirme yaparak skoru belirlemekte olup tümörde fazla tübül formosyonu, pleomorfizminin az olması, az sayıda mitozun olması düşük skor almaktayken solid patern, belirgin pleomorfizm ve fazla sayıda mitoz yüksek skor almaktadır ve toplam skor 3-5 ise düşük derece (derece 1), skor 6-7 ise orta derece (derece 2) ve 8-9 ise yüksek derecedir (derece 3) (40).

Tablo 1. Modifiye Bloom-Richardson metodu ile meme tümörlerinin histolojik derecelendirilmesi

	Glandüler/Tübüler Diferansiasyon	Nükleer Pleomorfizm	Mitoz(x40'lık büyütmede 10 BBA'da
Grade 1 Skor 3-5 İyi Diferansiye	Tümörün>%75'i	Küçük nükleus, hafif pleomorfizm	0-3
Grade 2 Skor 6-7 Orta Diferansiye	Tümörün %10-75'i	Açık veziküler nükleus, izlenebilen nükleolus, orta dereceli pleomorfizm	4-7
Grade 3 Skor 8-9 Az Diferansiye	Tümörün<%10	Belirgin nükleolus ve pleomorfizm	8 ve üzeri

2.3. MEME TÜMÖRLERİNDE HER2/NEU GENİNİN MOLEKÜLER DEĞERLENDİRİLMESİ

İnvaziv duktal karsinomların %70-80'i östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) pozitiftir ve %15-20'sinde HER2 protein ekspresyonu ve gen amplifikasyonuna sahiptir (1). HER2 'human epidermal growth factor reseptör 2' olarak bilinen bir protein adıdır ve HER2 geni 17.kromozomda lokalize olup p185 proteinini kodlar, p185 normal meme epitelinde büyüme faktör reseptörüdür ve transmembran proteindir (41). HER2 ekspresyonunun asıl önemi prognoz hakkında bilgi vermesinden kaynaklanmaktadır (41). HER2'nin aşırı ekspresyonu meme kanserinde kötü prognoz belirtecidir, veriler 1 cm'den küçük tümörlerde bulunmasında bile kötü prognostik değerini koruduğunu göstermektedir (41). HER2/Neu 'epidermal growth factor reseptor' ailesine ait transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar (1). Bu reseptörler yapısal olarak üç spesifik bölge içerir; ekstraselluler domain (ECD), zar kapsayan bölge ve sitoplazmik tirozin kinaz alanıdır (1). Yapılmış bazı çalışmalar, ileri evre meme kanseri olan hastalarda artmış ECD'nin hormonlara, kemoterapiye ve trastuzumab'a artmış yanıt vereceğini göstermiştir (42). Reseptörlerin aktivasyonu homodimer ve heterodimer reseptör komplekslerinin oluşumuyla gerçekleşir (42). Bu

reseptör kompleksleri, kanser gelişimi ve ilerlemesi için gerekli olan farklı hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonu ile sonuçlanan çeşitli substratları fosforile eder (42). HER2'den spesifik olarak etkilenen yollar; fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-AKT ve mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yollarını içerir (42). PI3K yolunun aktivasyonu, AKT'nin fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır ve bu da fosforilasyon yoluyla birden fazla hedefi aktive eder (42). PI3K-AKT yolunun diğer etkileri arasında, siklin D1'in down regülasyonu ve p27 (siklin bağlımlı kinaz inhibitörü) transkripsiyonunun azalması ve sonuç olarak artan hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasıyla sonuçlanan süreçler başlar (43). Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre büyümesini sağlar (44). Anormal MAPK sinyal iletimi artan ya da kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve apoptoza dirence neden olmaktadır (45).

Mitojenle aktive edilen protein kinaz yolağı (MAPK) sinyal iletim molekülleri Ras, Raf, MEK, ERK'ten oluşmakta olup ekstraselüler büyüme faktörleri, tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak bu yolağı uyarır (45). MAPK yolağı sinyal iletim molekülleri aracılığı ile sinyal iletim kaskadını aktive eder ve sonuç olarak MAPK yolağı aktivasyonu hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasını sağlayan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açar (46). MAPK sinyal iletimi Ras protein reseptör tirozin kinazın aktive olmasıyla başlar (45). Aktive olan Ras, Raf proteinlerinin membrana toplanarak aktive olmasını sağlar (43). Raf, yolaktaki bir protein kinaz olan MEK'i fosforiller (45). MEK, birden fazla transkripsiyon faktörünü aktive eden ERK'yi fosforiller, aktive ERK, transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücre proliferasyonu ve sağkalımını düzenleyen proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonuna yol açar (43).

BRAF genindeki mutasyonlar, MAPK sinyal iletim yolağında BRAF ya da B Raf olarak bilinen onkogenik Raf molekülü oluşumuna neden olur (47). Mutasyona uğramış BRAF molekülleri, sinyal iletimine başlar, MEK ve ERK aracılığı ile sinyal iletimine yol açar (47). Regülasyonu bozulan sinyal iletimi büyüme faktörlerinden bağımsız aşırı hücre çoğalması ve sonuç olarak spesifik malignitelere yol açar (42).

İnvaziv meme kanserlerinde HER2 durumunu tespit etmemizdeki amaç trastuzumab, lapanitib, pertuzumab gibi HER2'yi hedefleyen tedavilerden fayda görecek hastaları saptamaktır (48).

İmmunohistokimya kullanılarak HER2 protein ekspresyonu; 'fluorescence in situ hybridization (FISH)' kullanılarak HER2 gen amplifikasyonu değerlendirilir (48).

Tablo 2. HER2 pozitif meme kanseri özellikleri

HER2 Pozitif Meme Kanseri Özellikleri
Artan çoğalma oranları
Yüksek histolojik ve nükleer derece
Düşük ER ve PR seviyeleri
Daha fazla anöploidi
MSS ve iç organlara metastaz eğilimi
Endokrin tedaviye direnç
HER2 hedefli tedaviye yanıt

2.3.1. HER2'nin İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

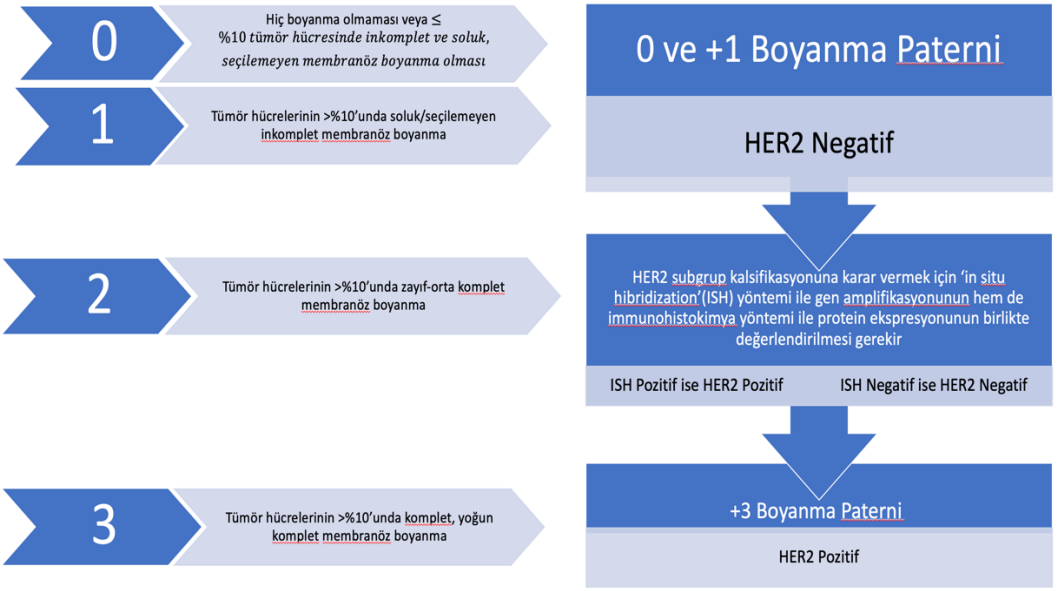
+3 boyanma paterni: Tümör hücrelerinin >%10'unda komplet boyanma.

+2 boyanma paterni: Tümör hücrelerinin>%10'unda zayıf-orta komplet membranöz boyanma.

+1 boyanma paterni: Tümör hücrelerinin >%10'unda soluk/seçilemeyen inkomplet membranöz boyanma.

0 boyanma paterni: Hiç boyanma olmaması veya %10>tümör hücresinde inkomplet ve soluk/seçilemeyen membranöz boyanma olması +3 vakalar HER2 pozitif olarak değerlendirilir. +2 vakalar uygun HER2 subgrup klasifikasyonuna karar vermek için hem'in situ hibridization (ISH)' ile gen amplifikasyonunun hem de immunohistokimya yöntemi ile protein ekspresyonunun birlikte değerlendirilmesi gerekir. +1 ve negatif vakalar HER2 negatif kabul edilir (49).

Tablo 3. HER2'nin immunohistokimyasal değerlendirilmesi



2.3.2. HER2'nin İn Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi

ISH, hücre çekirdeği yüzeyindeki belirli kromozal bölgelerin özellikli problar ile işaretlenerek kromozal bozuklukların saptanmasını sağlayan moleküler yöntem olup ISH tekniğinde işaretleyici olarak fluoresan madde kullanılırsa 'flurosen ISH (FISH)' kromojen kullanılırsa 'kromojenik ISH (CISH)', gümüş kullanılırsa 'silver ISH(SISH)' adı verilir (50).

Kor biopside HER2 sonucu negatif ise rezeksiyonda yeniden HER2 değerlendirilmesinin yapılacağı durumlar şunlardır:

- Tümör derecesi 3 ve kor biopside invaziv tümör oranı az ise,
- Rezeksiyonda kor biopsideki tümör ile farklı morfolojide yüksek dereceli karsinom saptanmışsa,
- Kor biopsi sonucu ISH ve immunohistokimyasal olarak belirsiz sonuç vermişse (50).

2.4. MEME KANSERİNDE EVRELEME VE SINIFLANDIRMA TNM EVRELEMESİ

Kanser evrelemesi için kullanılan TNM sistemi T (tümörü), lenf nodunu (N) ve metastaz (M) tümörün malignitesini sınıflandırmak için kullanılan uluslararası bir sınıflamayı ifade eder (38). Hastalığın evresini belirlemek, hem tedavi belirlenmesinde hem de prognoz hakkında bilgi vermektedir (38). Meme kanserinde

en son güncelleme 2017 yılında yapılmış olup anatomik evre gruplarına ek patolojik ve klinik evre grupları da dahil edilmiş olup prognozla ilgili daha güvenilir bilgi elde edilmesi sağlanmıştır (38). Klinik evre meme ve aksilla dahil fizik muayene bulguları ve/veya radyolojik görüntüleme teknikleri kullanılarak yapılan evrelemedir (38). Patolojik evreleme ise klinik evrelemeye ek çıkarılan meme dokusunun ve aksiller lenf nodlarının patolojik incelemesi ile yapılan evrelemedir. (38). Tam patolojik evrelendirme için tümörün cerrahi sınır negatif olacak şekilde tam eksizyonu gerekli olup genel olarak patolojik evreleme klinik evrelemeye göre daha iyi tahmine olanak sağlar (38).

Tablo 4. American Joint Committe on Cancer/TNM meme kanseri evrelemesi

Primer Tümör(T)
Tx:Primer tümör değerlendirilemedi
T0:Primer tümör kanıtı yok
Tis(DCIS):Duktal karsinoma in situ
Tis(Paget):Altta yatan meme parankimindeki invaziv ve/veya insitu(DCİS) karsinom ilişkili olmayan Paget hastalığı. Paget hastalığı ile ilişkili meme parankiminde mevcut olan karsinomlar ise parankimal hastalığın boyut ve karakteristiğine göre kategorize edilir.
T1:Tümörün en büyük çapı ≤20mm
T1mi:Tümörün en büyük çapı≤1mm
T1a:Tümörün en büyük çapı>1 ve ≤5mm
T1b:Tümörün en büyük çapı>5mm ve ≤10mm
T1c:Tümörün en büyük çapı>10mm ve ≤20mm
T2:Tümörün en büyük çapı>20mm ancak ≤50mm
T3:Tümörün en büyük çapı>50mm
T4:Herhangi bir boyuttaki tümörün göğüs duvarına ve/veya cilde(ülserasyon veya makroskopik nodül) direkt invazyonu-yalnızca dermis invazyonu T4 olrak tanımlanmaz.
T4a:Göğüs duvarına yayılım(Göğüs duvarı yapılarına invazyon olmaksızın yalnızca pektoral kasa yapışıklık veya invazyon T4 olarak tanımlanmaz)
T4b:İnflamatuar karsinom kriterlerini karşılamayan ülserasyon ve/veya ipsilateral nodül ve/veya ciltte ödem

2.4.1. Rejyonal Nodal Evreleme (N Evresi)

Lenf nod sınıflaması klinik ve patolojik olarak yapılır ve cN veya pN olarak ifade edilir, genellikle patolojik sınıflama tercih edilir (51). Aksiller, ipsilateral intramammarian ve supraklavikular lenf nodları rejyonel lenf nodu olarak değerlendirilir (51). Servikal veya kontralateral aksiller lenf nodu tutulumu uzak metastaz olarak değerlendirilir (51).

Tablo 5. American Joint Committe on Cancer/TNM meme kanseri evrelemesi

Bölgesel lenf nodları(N)
Nx:Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
N0:Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N0(i+):Bölgesel lenf nodlarında yalnızca izole tümör hücreleri(malign hücre kümeleri|<0.2mm)
N0(mol+):Revers trankriptaz polimeraz zincir reasksiyonu ile pozitif moleküler bulgular(izole tümör hücresi olmadan)
N1:Mikrometastaz;veya 1-3 aksiller lenf noduna metastaz ve/veya mikrometastazlı klinik olarak negatif internal mamaryan lenf nodları veya sentinel lenf nodu biopsisinde makrometastaz
N1mi:Mikrometastaz(yaklaşık 200 hücre, 2mm> hücre, hücre>0.2mm)
N1a:1-3 aksiller lenf noduna metastaz,en az bir metastaz>2 mm
N1b:İpsilateral internal mamaryan sentinel lenf nodu metastazı(izole tm hücreleri hariç)
N1c:N1a ve N1b birlikteliği
N2:4-9 aksiller lenf noduna metastaz veya aksiller lenf metastazı yokluğunda görüntüleme ile pozitif internal mamaryan lenf nodu metastaz varlığı
N2a:4-9 aksiller lenf nodu metastazı(en az bir tümör depoziti>2mm)
N2b:aksiller lenf nodu metastazı yokluğunda mikroskobik olrak saptanmış veya saptanmamış klinikçe tespit edilmiş internal mamaryan lenf nodu metastazı varlığı
N3:On veya daha fazla aksiller lenf noduna metastaz veya infraklavikular(level III aksiller) lenf nodlarına metastaz veya bir veya birden fazla level I,Iıaksiller lenf nodu metastazı ile birlikte görüntüleme ile saptanan poitif ipsilateral internal mamaryan lenf nodlarında sentinel lenf nodu biopsisi ile mikro/makro metastaz varlığı ile üçten fazla aksiller lenf nodu metastazı

2.4.2. Uzak Metastaz Evrelemesi

Tablo 6. American Joint Committe on Cancer/TNM meme kanseri evrelemesi

Uzak Metastaz(M)
M0:Klinik veya radyolojik uzak metastaz yok
M0(i+): Klinik radyolojik bulgusu olmayan hastada mikroskobik olarak 0.2mm> veya semptomu bulunmayan hastada periferik kan, kemik iliği veya diğer bölgesel olmayan nodal dokularda moleküler tekniklerle saptanmış uzak metastaz
M1: Klinik ve radyolojik olrak saptanmış uzak metastaz ve/veya histolojik olarak kanıtlanmış>2mm metastaz

2.5. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK VE PREDİKTİF FAKTÖRLER

2.5.1. Prognostik Faktör

Meme kanserinde prognostik faktörler, tedaviye başlamadan veya standart tedavi ile hastalığın doğal seyrini tanımlayan faktörlerdir (52). Bu faktörler, kimin tedaviye ihtiyaç duyabileceğinin tanımlanmasına yardımcı olur ve genellikle tümörün büyümesi, invazyon ve metastaz yapma kapasitesi hakkında bilgi verir (52).

2.5.2. Prediktif Faktör

Kanser hücresinin uygulanacak belli bir tedavi modalitesine karşı yanıt oranını hakkında bilgi verir ve tedavinin ana hedefidir (53).

2.6. PATOLOJİK FAKTÖRLER

2.6.1. Tümör Evresi

Evre prognostik bir faktör olup tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve metastaz olup olmamasına göre evrelenir ve ‘American Joint Committee on Cancer’e göre beş yıllık hastalıksız sağ kalım anatomik evreye göre: Evre I hastalık için %98-100, Evre II hastalık için %85-98 ve Evre III hastalık için %70-95 olarak saptanmıştır (54).

Tümör Boyutu (T): Primer tümörün en geniş çapı olup primer tümörün ne kadar alan kapladığı hakkında bilgi verir, nodal tutulumla ilişkilidir fakat iki faktörün prognostik değeri birbirinden bağımsızdır (55).

Nodal Evre (N): Nodal tutulum, ipsilateral aksiller metastatik lenf nodu sayısı güçlü ve bağımsız negatif prognostik faktör olup uzak metastazı olmayan hastalar

arasında, bölgesel hastalığa karşı (nod pozitif) lokalize hastalık için (nod negatif) beş yıllık sağ kalım oranları %99 ve %85 olarak değerlendirilmiştir (56).

Metastatik Hastalık (M): Meme kanserinde metastaz olması prognozun kötü olacağını gösterir (57). Metastatik hastalığa sahip hastalarda kür mümkün değildir ve ortalama yaşam süresi 2-3 yıldır (57). Primer tanı ile metastaz gelişmesi arasındaki süre uzadıkça prognoz daha iyi gidişat gösterir (58). Göğüs duvarı, kemikler, ve lenf nodu tutulumu olan hastalar uzamış progresyonsuz sağ kalıma sahipken, hepatik ve lenfantijik akciğer hastalığı olanlar daha kısa progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalıma sahiptirler (59).

2.6.2. Tümör Morfolojisi

En yaygın meme kanseri morfolojisi vakaların %70'ini oluşturan invaziv duktal karsinom ardından %10'luk kısmını oluşturan invaziv lobüler karsinom gelir (60). Yapılmış çalışmalarda ilk 5 yılda lobüler karsinomda nüks %16 iken altı yıldan sonra nüks invaziv, duktal karsinoma göre %54 daha fazla bulunmuştur (61).

2.6.3. Peritümöral Lenfovasküler İnvazyon

Lenfovasküler invazyon varlığı yüksek dereceli tümörlerde kötü prognostik gösterge olup lokal nüks ve ölüm için risk faktörüdür (62).

2.6.4. Ki-67

Ki-67, G0 dışında G1, S, G2 ve M fazlarında aktiftir bu da hücre proliferasyonuna neden olur, ki-67 nükleer antijendir tümör progresyon belirleyicisidir ve immunohistokimyasal yöntemlerle saptanır (63). Proliferasyonu yüksek tümörler kemoterapiye hassas olarak değerlendirilir bu nedenle tedavi öncesi Ki-67 seviyesi neoadjuvan kemoterapi yanıtının belirlenmesinde prediktif role sahiptir (64). Yüksek Ki-67 yüksek nüks ve azalmış meme kanseri sağkalımı ile ilişkilidir (65).

Neoadjuvan kemoterapi alan hastalardaki Ki-67 seviyesindeki tedaviye bağlı azalma, uzun dönem sağ kalımın göstergesidir (66).

2.7. MEME KANSERİNDE TEDAVİ

Metastatik olmayan meme kanserinde tedavinin ana hedefi tümörün memeden ve bölgesel lenf nodlarından temizlenmesi ve metastatik nüksün önlenmesidir (2). Metastatik olmayan meme kanserinin lokal tedavisi cerrahi rezeksiyon ve aksiller lenf nodlarının örneklenmesi veya çıkarılmasından oluşur (2). Sistemik tedavi neoadjuvan, adjıuvan veya her ikisini birden içerir (2). Tüm hormon pozitif tümörlerde kemoterapiye ek olarak ardışık hormon tedavisi verilirken HER2 pozitif tümörlerde

HER2'ye yönelik antikor tedavisi ve kemoterapi ardından hormon pozitif ise hormon tedavisi verilir (2).

2.7.1. Lokal İleri HER2 Pozitif Meme Kanserinde Neoadjuvan Kemoterapi

Lokal ileri hastalık T3 veya T4 tümörler ve N2 veya N3 hastalık ayrıca T4 ve inflamatuar meme kanserini içerir (67). Yeni tanı meme kanseri vakalarının %15-20'sini erken evre HER2 pozitif meme kanseri oluştururken %10-15'i lokal ileri HER2 pozitif hastalıkla ilişkilidir (68). Neoadjuvan tedavinin amacı tanı anında inoperabl olan lezyonun tedavi ile opere edilebilir hale gelmesini sağlamak, tümörün tedavi yanıtını monitörize etmek, neoadjuvan yanıta göre adjuvan tedaviyi yönlendirmek, sağ kalım şansını artırmak, araştırmalara imkan sağlamak, genetik testler sonuçlanana kadar zaman kazanmak, meme ve/veya bölgesel lenf düğümlerindeki hastalığın boyutunu azaltmak adjuvan tedavilere verilecek yanıt hakkında bilgi verir, mastektomi yerine meme koruyucu cerrahiye olanak vererek rekonstrüksiyon ilişkili risklerden kaçınmak, kozmetik sorunları iyileştirmek ve lenfödem gibi komplikasyonları azaltmakta dahil olmak üzere meme veya aksilla üzerinde daha az kapsamlı ameliyata izin vermeyi sağlarken subklinik mikrometastik hastalığı tedavi etmeyi amaçlar (69). HER2 kodlayan genin amplifikasyonu, hücre çoğalmasını, apoptotik sinyallere karşı direnci, artan hücre motilitesini ve neoanjiyogenezi destekleyen sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (70). Agresif biyolojiye sahip malignitelerde sitotoksik kemoterapilere karşı artmış bir duyarlılık izlenmiş olup bu hastalar NAKT'ye aynı oranda patolojik tam yanıt verebilir (70). Her 2 yolağı ve bu reseptörden etkilenen down stream yolakların aktivasyonunu bloke eden ajanların eş zamanlı olarak uygulanması kanserin kemosensitivitesini ve pCR oranını önemli ölçüde arttırır (71). Son birkaç yıldaki klinik çalışma sonuçları, yeni HER2 hedefli ajanlar ve HER2 hedefli tedavilerin kombinasyonları da dahil olmak üzere yeni yaklaşımların, HER2 ile aktive edilen sinyalizasyonu daha etkili bir şekilde bloke ettiğini, HER2 pozitif meme kanserlerinin duyarlılığını arttırdığını ve hastanın risk faktörlerine ve genel tıbbi durumuna göre neoadjuvan tedavi için seçenekleri genişlettiğini göstermektedir (70).

Neoadjuvan kemoterapi, alt tip ne olursa olsun, lokal (T1N1, T2N0, T2N1) ve lokal ileri (T3,T4, N2,N3 veya T4d hastalık) HER2 pozitif meme kanseri tanılı hastalar için NAKT kılavuzlarda standart tedavi olarak önerilmektedir (50). Lokal ileri meme

kanseri en az T3 hastalığı olan klinik IIB den klinik evre IIIC'ye kadar olan kanserler olarak tanımlanır (67).

Erken evre hastalıkta NAKT, hasta meme koruyucu cerrahi istiyor ancak hastanın meme boyutu, tümörün yeri veya tümörün boyutu nedeniyle meme koruyucu cerrahi ile suboptimal bir kozmetik sonuca sahip olması muhtemelse NAKT ile tümörün boyutu küçültülerek daha iyi bir sonuç elde edilme ihtimali varlığında NAKT verilebilir (72).

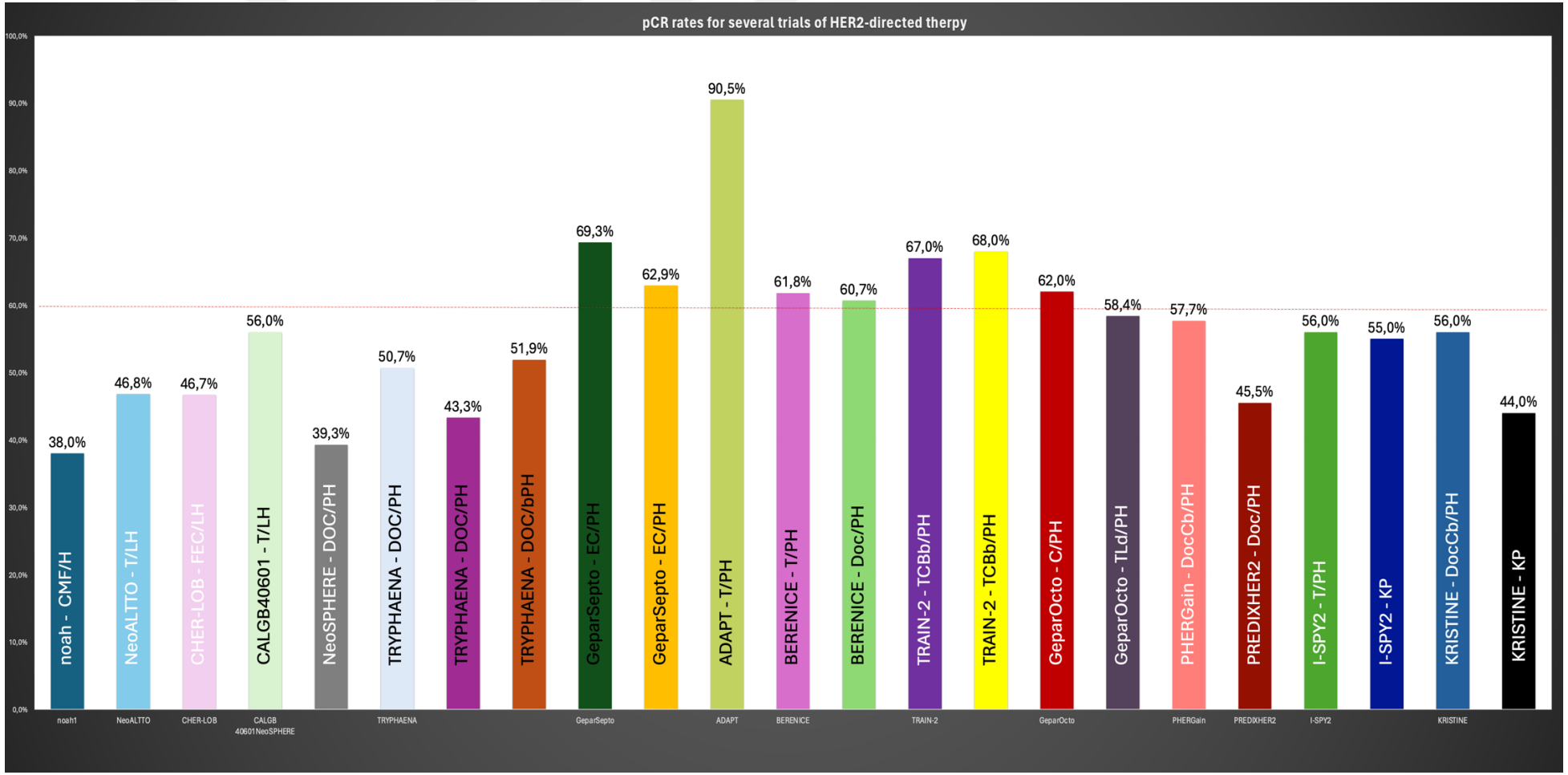
HER2 pozitif hastalığı olan hastalar için standart NAKT trastuzumab ± pertuzumab tedavisi olarak uygulanır (73). Dual HER2 blokaj artmış pCR ile ilişkili bulunmuştur (73).

Günümüzde uygulanan standart neoadjuvan kemoterapi şemaları:

TCH(P)--Eşzamanlı trastuzumab ile birlikte üç haftada bir docateksal ve karboplatin 6 kür olarak verilir ve bu tedavi rejimine ± pertuzumab (74).

wPCbH(P)--- Karboplatin ve paklitaksel ile haftalık veya üç haftalık trastuzumab 18 hafta boyunca verilir bu tedavi rejimine ± pertuzumab (75).

AC-TH(P)---Doksorubisin ve siklofosfomid birlikte iki haftada bir 4 kür ardından 12 hafta boyunca haftalık paklitaksel veya üç haftada bir docataksel 4 kür + trastuzumab + pertuzumab şeklinde uygulanır (76).



Şekil 2. HER2 hedefli tedavi sonrası pCR oranları

Antrasiklin içeren ve içermeyen kemoterapi rejimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada antrasiklin içeren kemoterapilerle tedavi edilen hastalarda artmış febril nötropeni, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda önemli oranda düşüş ve artmış akut lösemi görülme riskine sahiptirler (77).

Antrasiklinsiz taksan, karboplatin, trastuzumab ve pertuzumab kombinasyonunun antrasiklinli ardışık tedaviye göre benzer etkili ve daha az toksik olduğu litaratürde gösterilmiştir (78).

HER2 pozitif meme kanserinde standart NAKT, her 3 haftada bir docetaksel veya haftalık paklitakselden oluşmaktadır (79). Neoadjuvan tedaviye trastuzumab eklenmesi ile pCR oranını %23'ten %40'a çıkarmaktadır (74).

Trastuzumab'tan farklı bir epitopa bağlanan HER2, HER3 heterodimerlerinin oluşumunu engelleyen pertuzumabın eklenmesiyle patolojik tam yanıt oranları %68 - 90'lara ulaşmıştır (80). Fakat Pertuzumab'ın tedaviye eklenmesiyle tedavi ilişkili ishal insidansı ve şiddeti artmış, hematolojik toksisite sıklaşmıştır (81). Önemli komorbiditeleri veya düşük riskli (klinik evre I ve IIA) hastalığı olan hastalarda pertuzumab ilişkili toksisite olasılığı potansiyel faydadan daha ağır basmaktadır ki böyle hastalar için risk fayda tartışması yapılmalıdır (81).

2.8. KANSER İMMUNOLOJİSİ

Son yıllarda yapılmış olan çalışmalar kanserin gelişim ve ilerlemesinde konakçı immun sisteminin rol oynadığını göstermiştir (3). Kanser immünolojisi bir yandan tümör büyümesi ve direnç mekanizmasına katkı sağlarken diğer yandan tümörün yok edilmesine aracılık eden karmaşık bir mekanizmaya sahiptir (3). Tümör başlangıcını, oluşumunu, büyümesini ve ilerlemesini kontrol etme ve desteklemede immun sistemin rolünü anlamak, kanser tedavisi için çok önemlidir (3).

Tümörün immun sistemden kaçış mekanizması düşük human lökosit antijen (HLA) sınıf I ekspresyonuna sahip tümörlerin CD 8+T lenfositler ile daha az infiltre olmasına dayanmaktadır (82). CD8+T lenfositler ve CD4+T lenfositler tümör antijenlerini tanıma yeteneğine sahiptir (82). Tümör hücreleri üzerindeki seçici immun baskılanma, tümör hücresini immun kontrolden kaçmaya yatkın hala getiren anomalilerin oluşmasına neden olur (82). Bu anomaliler, majör histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf 1 protein ekspresyonunun yanı sıra tümör antijenlerinin kaybı ve mutasyonunu içerir (82).

T lenfositler immun sistemin tümöre saldırdığı ilk hücrelerdir (83). Genel olarak, CD8+ sitotoksik T lenfositler (CTL'ler) ve CD4+ yardımcı T (Th) 1 hücreler, interferon IFN-γ ve sitotoksinlerin üretimi ile kanser gelişimini önler (83). Bu aktif T hücreleri tümör hücresinin ölümünü kolaylaştıran tümör mikro-ortamına ev sahipliği yapar (83). Tümörler, immun sistemden kaçışa neden olacak tümör mikro-ortamındaki immun hücrelerin programlanmış hücre ölüm proteini 1(PD-1) yolu gibi inhibitör immun kontrol noktası yollarını up regüle eder (83). Tümör büyümesini aktif olarak teşvik eden diğer önemli mekanizmalar arasında, intratümöral myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve Treg'ler tarafından tümör antijenine özgü T hücrelerin inhibisyonu, Th1'ın Th2'ye protümörojenik immun yanıta geçişi, T hücresi ve dentritik hücre fonksiyonunu inhibe etmenin yanı sıra stromal yeniden şekillenme ve anjiogenezi teşvik eden faktörlerin üretimi yer alır (83).

İmmun yetmezliği olan veya immunsupresif tedavi alan hastalarda çeşitli kanserlerin artmış insidansı ve agresif seyrine dair çok sayıda rapor mevcut olup tüm bunlar bize immun sistemin malign tümörlerin oluşumunu kontrol etmede kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (84). Genel popülasyon ile karşılaştırıldığında organ nakilli hastalar ve AIDS'li kişilerde kanser insidansını değerlendiren çalışmalarda immun sistemin zayıflamasının bu kişilerde görülen kanser vakalarının artmasına neden olduğunu göstermiştir (85). Kansere karşı immun yanıt efektör ve supresor T hücrelerinin çeşitli alt kümelerinin fonksiyonel aktivitesi arasındaki dengeye bağlıdır (86). Supresor T hücreler, immun sistemin spesifik immun tepkilerini düzenlediği önemli bir mekanizmaya sahiptir, kanser hastalarında bu hücrelerin artması antitümör yanıta ve tedaviye verilen yanıtın azalmasına neden olmaktadır (87). İmmun sistemin baskılayıcı bölmesi, düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), miyeloid kökenli supressor hücreler (MDSC'ler), alternatif olarak aktive edilmiş (M2) veya tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ler) düzenleyici alt kümeleri, protümörojenik nötrofil (N2), tolerojenik veya düzenleyici tümörle ilişkili DC'ler (regDC'ler), düzenleyici B hücreleri ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinin spesifik alt kümeleri dahil olmak üzere immun hücrelerin birkaç heterojen alt kümesini içerir(88). İmmun kaçış, kanser hücrelerinin yanı sıra çevredeki stromal dokuların ve immun sistemin tümör kaynaklı değişikliklerin sonucudur (89). Kanserlerin hem doğuştan hem de kazanılmış anti-tümör immun yanıtları önlemek için çeşitli mekanizmalar kullandığı

bilinmektedir (89). İmmünsüpresif tümör mikroçevresi ile ilişkili immün yanıtsızlığa yol açan çok sayıda tanımlanmış mekanizma vardır (89). Malign hücreler tarafından antijen işleme ve sunumunun down regülasyonu, bazı kemokin ve sitokinlerin ekspresyonunun değişmesi, immun hücrelerde apoptoz indüksiyonu ve immun hücre fonksiyonunun baskılanması, immun tanınma ve eliminasyondan tümör kaçışına yol açar (90). Hem kazanılmış hem de doğuştan immun yanıtlar tümör mikro ortamında işlevsiz olabilir ve tümörle ilişkili farklılaşma ve immun hücrelerin fonksiyonel polarizasyonu, farklı mekanizmalar yoluyla tümör gelişimini, büyümesini ve ilerlemesini destekleyen protümörojenik potansiyele sahip spesifik immün hücre alt gruplarının birikmesine neden olur (91). Böylece immun sistem kanser gelişmesinde ikili bir rol oynar, sadece kanser hücrelerini yok ederek veya büyümelerini engelleyerek tümör büyümesini baskılamakla kalmaz, aynı zamanda immün yeterli bir konakta hayatta kalabilecek tümör hücrelerini seçerek veya tümör mikro-ortamında tümör büyümesini kolaylaştıran koşullar oluşturarak tümör büyümesini teşvik edebilirler (91).

Antijene spesifik Treg'ler öncelikli olarak DC'leri hedefler, uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu ve immun yanıtın oluşturulması sırasında antijen sunumu dahil olmak üzere DC'lerin fonksiyonlarını inhibe eder (92).

MDSC, esas olarak olgun makrofajlara, dentritik hücrelere ve granülositlere farklılaşmayan miyeloid progenitör hücrelerden oluşan heterojen bir hücre popülasyonunu temsil eder (93). Tümör mikroçevresi, siklooksijenaz 2, prostaglandinler, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), makrofaj koloni uyarıcı faktör(M-CSF), IL-6, IL-10, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), kök hücre faktörü, IL-3, FMS ile ilişkili tirozin kinaz 3 (FLT3) ve çeşitli tümör kaynaklı faktörlerin salınması yoluyla kanser kaynaklı myeloid kökenli supresor hücrelerin kompozisyonunu etkiler (93). MDSC'ler iki ana alt kümeye ayrılır. Bunlar granülositik PMN ve monositik MO-MDSC'lerdir. MDSC'ler ayrıca antijene özgü T hücre yanıtına ve mitojenle aktive olan T lenfositlere doğrudan immünsüpresif etki gösterir, bu nedenle antijen sunumunu engellerler (93). MDSC'lerin T hücre fonksiyonunun güçlü baskılayıcısı olmasının yanı sıra, son çalışmalar MDSC'lerin doğal öldürücü hücrelerin (NK) ve miyeloid hücrelerin aktivitesini modüle etme yeteneğini göstermiştir ve MDSC, Treg indüksiyonunuda etkilemektedir (94).

Kanserde düzenleyici DC'ler, T hücre polarizasyonunu, MDSC ve Treg farklılaşmasını ve aktivitesini kontrol ederek, premalign ortamda spesifik mikroçevre koşullarını etkileyerek antijene özgü ve spesifik olmayan T hücre yanıtsızlığına neden olabilir (95). Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), tümör progresyonunu teşvik etmede önemli role sahiptir (96). Malign tümör yükünün yaklaşık %50'si TAM'lardan oluşur (96). M2, immun hücrelerin işlevlerini inhibe eder ve IL-10, prostoglandin E2 (PGE2), nitrik oksit (NO), yüksek miktarda TGF-b ve reaktif oksijen türlerini serbest bırakarak tümör sağ kalımını, ilerlemesini, anjiyogenezi ve metastazı arttırabilir (96). TAM'ler tolerojenik FOXP3+ T hücreler ve IL-10'un etkisi ile tümörün immun kaçışına katkıda bulunur (96).

Tümör oluşumunda bir diğer neden inflamasyondur ve tüm tümörlerin gelişimi için önemli bir kofaktördür (97). Enfeksiyon durumunda, reaktif oksijen radikalleri (ROS), azot ara ürünleri (RNI), sitokinler ve kemokinleri içeren antimikrobiyal faktörler konakçı hücrelerde makrofaj, nötrofil, mast hücreler ve dendritik hücreler gibi koruyucu efektör hücreleri aktive eder (97). Enfeksiyonun devam etmesi durumunda, enfekte dokulara immun hücrelerin sürekli saldırısının bir sonucu olarak negatif durum gelişir ve kanser büyümesi indüklenir (97). Aktif enflamatuar hücreler, DNA hasarına ve genomik instabiliteye neden olan ROS ve RNI salgılar (97). Proinflamatuar sitokin ve kemokinlerin (IL-6, IL-8, IL-1b, CCL2, CCL20) üretimi, Ras, Myc ve RET gibi çeşitli onkoproteinleri aktive eder. Kronik inflamasyon, primer tümör lezyonunun oluşmasına yardımcı olur ve tümörün ilerlemesine ve metastatik yayılımına izin verir (97).

2.8.1. Tümör İnfiltre Lenfositler

Lenfositler malign tümörlere sızan immun sistemin ana hücreleridir ve tümör gelişimindeki rolleri o kadar önemlidir ki, modern kanser evreleme ve patolojik değerlendirmenin parametrelerinden biri lenfositik infiltrasyondur (98). Rutin histokimyasal boyama (hemotoksilen-eozin boyası) lenfositleri, farklı hücresel morfolojiye sahip küçük hücreler olarak kolayca tanımlar, ancak spesifik lenfosit tiplerini (B hücreleri, T hücreleri, NK hücreleri) tanıyamaz (98). Farklı lenfosit tipleri tümör bağışıklığında farklı rollere sahip olduğundan, tümörlerde toplam lenfositik yoğunluğun değerlendirilmesi sınırlı bir öneme sahiptir (98). Bunun yerine, modern

morfolojik teknikler, özellikle immünohistokimya, her lenfosit tipinin tümör gelişimindeki rolü hakkında değerli bilgiler sağlar (98).

2.8.2. B Lenfositler

Tümörü infiltre B lenfositler genellikle olgun B hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen bir fosfoprotein olan CD20 immohistokimyasal boya ile boyanarak tanınır (99). B lenfositleri tümör adacıklarında, tümör stromasında ve tümör invaziv marjinde bulunabilir (99). Tümörü infiltre eden lenfositlerin %40'ını B lenfositler oluşturur (100). Tümörü infiltre eden B hücreler, hedef proteinlerin işlevini doğrudan modüle edebilen veya tümör antijenlerinin opsonizasyonunu, antikora bağlı sitotoksisite yoluyla tümör immunitesini teşvik eden otontikorlar aracılığıyla sağlar (100).

2.8.3. T Lenfositler

T lenfositler, tümörü infiltre eden immün hücrelerin ana popülasyonunu temsil eder ve etkili tümör eradikasyonu için gereklidir (101). CD3, tüm olgun T lenfositlerde eksprese edilir, iki ana T lenfosit alt kümesi vardır. Bunlar T yardımcı hücreleri ve sitotoksik T hücreleri, sırasıyla CD4 ve CD8 ekspresyonları ile tanınırlar (102). CD4/CD25 veya CD4/FoxP3 antijenleri çift boyama ile Treg'leri ayırt etmeyi mümkün kılar (103). Bu hücreler, antitümör immun yanıtı baskılamada rol aldıkları için kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerekmekte, CD4+ Thelper, Thelper tip 1 (Th1) ve Thelper tip 2 lenfositler (Th2) dahil olmak üzere heterojen bir hücre sınıftır (103). Th1 hücreleri sitotoksik T hücrelerinin aktive edilmesinde temel role sahipken, Th2 humoral bağışıklığı uyarır (104). Anti-tümör immunitedeki rollerine bağlı olarak tümör infiltre T hücreleri genellikle olumlu prognoz ile ilişkilidir (104). Bu nedenle, patolojik ve klinik korelasyon dikkatli bir şekilde değerlendirilmeli ve tümör infiltre eden T hücrelerinin alt tipleri değerlendirilmelidir yöntem olarak önce toplam T hücre popülasyonu (CD3+) ve daha sonra bireysel hücre alt tipleri değerlendirilmelidir (104).

Tümör infiltre CD3+ T hücrelerinin yüksek yoğunluğu, çeşitli kanser türlerinde iyi prognozla ilişkilidir (105). Küçük hücre dışı akciğer karsinom, kolorektal karsinom gastrik karsinom, over karsinomu ve serviks kanserinde yapılan çalışmalar iyi prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (105, 106).

Tümör infiltre eden lenfositlerin spesifik alt tipleri arasında, sitotoksik T hücreler (CD8+), birçok kanser türünde iyi prognozla ilişkilidir (107).

Birçok çalışma, T yardımcı hücre alt tiplerini (Th1 ve Th2) klinik önemleri açısından değerlendirmiştir (107). Anti-tümör immun yanıt açısından, Th2 aktivasyonu Th1 aktivasyonundan daha az etkilidir (107). Son zamanlarda yapılmış olan bir çalışmada pankreas karsinomunda Th hücrelerinin bu alt tiplerini analiz etmiştir. (105). Th2 hücrelerinin (GATA-3+), Th1 hücrelerinden (T-bet+) önemli ölçüde daha sık olduğunu ve Th2/Th1 oranının düşük sağ kalımın bağımsız bir öngörücüsü olduğunu göstermektedir (104).

Tümör mikroortamında bulunan CD4+ T hücrelerinin bir başka alt kümesi, CD4+ CD25+ düzenleyici T hücrelerdir (108). Genellikle tümör infiltre eden lenfositlerin küçük bir fraksiyonunu temsil ederler (CD4+ hücrelerinin %5-10'u) ancak tümör geliştirme üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (108). Tümör mikroortamında bulunan aktif faktörler nedeniyle tümörlerde Treg hücrelerinin miktarı normal dokulara göre daha yüksek oranda bulunmaktadır (108). Treg'lerin birikimi hastalığın ilerlemesi ile ilişkilidir (108). Çeşitli neoplazmalardaki Treg hücrelerinin yüksek yüzdesi, antitümör immun yanıtı engelleyen ve tümör büyümesini destekleyen immun baskılayıcı bir mikroçevre oluşturur (108).

Özetle T lenfositler tümörü infiltre eden immun hücrelerin büyük bir kısmını oluşturur (108). Tüm malign neoplazma tiplerinde bulunurlar (108). Genel olarak, tümör infiltre eden T hücrelerinin yüksek yoğunluğu, Th1 ve sitotoksik CD8+ T hücreleri olumlu prognoz ile ilişkilidir (108).

2.8.4. TREG ve Kanser İmmünolojisi

Birçok kanser türünde tümör bölgesinde Treg'ler yoğun olarak bulunmaktadır (108). Treg'lerin farklı alt popülasyonları olmasına rağmen, çoğu çalışma yüksek CD25 seviyesi ve transkripsiyon faktörü forkhead box P3 (FOXP3)'ü eksprese eden CD+4 T lenfositlerin alt popülasyonu olarak tanımlanır (109). Treg'lerin varlığı efektör T hücrelerinin antitümoral fonksiyonlarını inhibe eder (109). Kolorektal ve pankreas kanserlerinde, çalışmalar IL-10 ve IL-17 üreten RORγt+ FOXP3+ Treg hücrelerinin kontrollere kıyasla kanser dokularında daha fazla olduğunu göstermiş ve RORγt+ FOXP3+ Treg hücrelerinin yoğun olduğu kanser türleri kötü prognozludur (109).

İki tip Treg hücresi tanımlanmıştır: Birinci tip T hücre seçimi ve olgunlaşma sürecinde timusta gelişen “Doğal” Treg (nTreg) hücreler, ikinci tip ise Antijen ve TGF beta'ya yanıt olarak periferik CD4+ T hücrelerinden farklılaşan "indüklenmiş" Treg (iTreg) hücreleridir (109). Tümör mikroçevresinde, TGF-b salgılayan MDSC’ler bol miktarda bulunur ve iTreg hücrelerinin farklılaşmasını kolaylaştırır, nTreg; CCL22 ve CCL28 gibi tümör veya miyeloid hücrelerden salgılanan kemokinler tarafından tümör bölgesine çekilir (110). Hipoksik mikroçevre, CCL28'in tümör hücrelerinden salgılanmasını indükler, böylece nTreg hücreleri tümör bölgesine yönelir, nTreg ve iTreg, immun yanıtı baskılayan özelliklere sahiptir (110). Her ikisi de, IL-10 ve TGF-b gibi inhibitör sitokinlerin salınması ve hücre -hücre temas yoluyla CD4+T ve CD8+T lenfositlerin, dendritik hücrelerin, NK ve B hücresinin aktivitesini inhibe eder (110). Ayrıca granzim salgılayarak efektör T hücrelerini lizize uğratabilir veya doğrudan hücresel temas yoluyla aktivitelerini inhibe edebilirler (4). Hipoksik kanser mikro ortamına alınan Treg hücrelerinin VEGF salgılayarak ve anjiyogenezi teşvik ederek tümör büyümesini arttırır (4). Treg’te eksprese edilen ICOS, LAG-3 ve TIM-3 olmak üzere Treg yüzeyinde düzenli olarak eksprese edilen ligandlar vardır (111). Bu ligandların tümörlerde PD-1'e bağlandığı bulunmuştur (111). Buradaki kusurlar otoimmun hastalıklarda dahil olmak üzere patolojik durumların gelişmesine yol açabilir veya konakçı immun yanıtın tümörün kaçmasını destekleyerek kanser ilerlemesini teşvik edebilir (111).

Kemokin ligand CCL2 ve reseptörü CCR2, çeşitli kanserlerin başlaması ve ilerlemesinde rol oynar (112). CCL2-CCR2 sinyal ekseni, patolojik anjiyogenezi teşvik eder, tümör hücrelerinin hayatta kalmasında, invazyonunda ve immün inhibitör hücrelerin toplanmasında kritik bir rol oynar (112). Tümör mikroortamında bulunan Treg’ler CCL2’ yi uyararak tümör büyümesine katkı sağlar (112).

Tümör mikroortamında bulunan büyüme faktörü B etkisi ile CD4+ T hücreler Treg hücrelerine dönüşür bu dönüşüm olayına plastisite denilir ve tümörün büyümesini, çoğalmasını ve agresif bir seyir almasına neden olur (113).

Yapılmış olan çalışmalar birçok kanser türünde intratümöral Treg yoğunluğunun artmasının kötü prognoz ön görücüsü olduğunu göstermiştir (109).

3. MATARYEL VE METOD

3.1. Olguların Seçimi

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbı Onkoloji Kliniği'nde Ocak 2015 ve Ocak 2022 tarihleri arasında tedavi görmüş HER2 pozitif (Her2+) ve hormon reseptör negatif (HR-) lokal ileri meme kanseri hastaların dosyaları ve hastane veri tabanını tarayarak retrospektif olarak incelenmiştir. Olguların yaş, cinsiyet, tanı anında diyabet varlığı, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, tanı anında evre, tümör grade'i, tümör histolojisi, ki-67 durumu, AR düzeyi, tedavi ilişkili advers olay, postoperatif TNM, NAKT türü ve süresi, relaps durumu, uzak organ metastazı, hastanın son durumu; sağ kalım ile ilgili prognostik bilgilere hastane otomasyon sisteminden, Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki hastaların izlem dosyalarından ve patoloji raporlarından ulaşılmıştır. Patoloji laboratuvar arşivinde tedavi öncesi kor biyopsi ve NAKT sonrası rezeksiyon bloklarına ulaşılan ve yeterli tümör dokusu bulunan 55 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 28.07.2022 tarihinde lokal etik kurul onayı alınmıştır.

Tablo 7. Çalışmaya dahil olma ve çıkarılma kriterleri tablosu

Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri	Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri
• 18 yaş üstü • Daha önce kanser tedavisi almamak • Otoimmun ve inflamatuar hastalığı olmamak • İmmunmodülatör, immun supresif tedavi ve steroid kullanmamak • Son 6 ayda antibiyotik kullanım öyküsü olmamak • Ciddi alerji öyküsü olmamak • İkinci bir malignitesi olmamak	• Dosya verilerine ulaşılamamak • Patoloji arşivinde bloklarına ulaşılamamak • Bloklarına ulaşılan fakat yetersiz tümör dokusu olmak

3.2. İmmunohistokimyasal Boyama

Seçilen olgulara ait %10 formalinde tespit edilip, parafine gömülmüş doku örneklerinden hazırlanan hematoksilen-eozin boyalı preparatlar hem tümör yeterliliği hem de morfolojik histopatolojik parametreler açısından tekrar değerlendirilmiştir. Her olgunun operasyon materyalinden, yeterli tümör hücresi içeren %10'luk tamponlu formalin ile fikse seçilmiş bloklara pozitif yüklü lamlara 2 µm kalınlığında 3 ayrı cama kesitler alınmıştır. Kesitler 70ºC sıcaklıkta 35 dakika bekletilerek deparafinize edilmiştir. Etüvden alınan kesitler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra Ventana Benchmark Ultra otomatik boyama cihazına yerleştirilmiştir. Primer antikorlar olarak CD4 (klon EP204 , monoklonal, Abcam, dilüsyon 1/100), CD 25 (klon EP218, monoklonal, Abcam, dilüsyon 1/50) ve FOXP3 (klon EP340, monoklonal, Abcam, dilüsyon 1/50) kullanılmıştır. CD25 antikoru kırmızı kromojen ve FOXP3 antikoru ise kahve renkli kromojen kullanılarak double boyama yapılmış, boyama işlemi bittikten sonra cihazdan alınan kesitler deterjanlı su ve ardından akan su ile yıkanarak durulanıp %96'lık alkolden geçirilmiştir. 60ºC etüvde 10 dakika kurutulduktan sonra ksilene alınmıştır. Tüm basamakların ardından lamlar kapatılarak ışık mikroskobunda incelemeye hazır hale getirilmiştir. Kesitlerde CD4 antikoru için sitoplazmik boyanma pozitif kabul edilmiştir. Double boyama yöntemi uygulanan CD25/FOXP3 için ise sitoplazmik kırmızı boyanma CD25 için nükleer kahve renkli boyanma FOXP3 için pozitif kabul edilmiştir. Her üç antikor için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanılmıştır.

3.3. Lenfosit İnfiltrasyonlarının Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal olarak boyanan hücrelerin (CD4+ Thelper ve CD4+CD25+FOXP3+ Treg'lerin) mutlak sayısı mikroskop altında 3 alanda sayılmıştır. Th ve TREG hücrelerin mutlak sayılarını 3 alan ortalaması her hasta için kaydedilmiş intratümöral ve peritümöral lenfosit infiltrasyon ortalaması NAKT sonrası cerrahi materyalde hesaplanmıştır. Biyopsi alanında görebildiği kadar hücre sayılıp ortalaması hesaplanmıştır. Her hasta için hesaplanan ortalamaların medianına göre tümör infiltrasyon oranları dikotomize edilmiş, median değer ve altı düşük, medianın üstü yüksek olarak değerlendirilmiştir. Düşük ve yüksek infiltrasyon oranlarına göre patolojik CR değerlendirilmesi yapılmıştır.

Lenfosit hücre gradienti, farklı bölgelerdeki (örneğin intratümöral/peritümöral veya biopsi/cerrahi intratümöral alan) hücrelerin sayılarının oranı olarak hesaplanmıştır. Lenfositlerin relative abundance (yoğunluğu), aynı bölgede tanımlanmış Treg'lerin tüm Th lenfositlere oranı olarak hesaplanmıştır (CD4+CD25+FOXP3+TREG 'ler/CD4+Th lenfositler).

3.4. İmmunohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi

Hazırlanan immünohistokimya preparatları iki başlıklı ışık mikroskopunda iki patolog tarafından Kim'in çalışması referans alınarak değerlendirilmiştir (metod-2). Hastalara ait tedavi öncesi kor biyopsi materyallerinde ışık mikroskobunda x10'luk büyütmede CD4 ve CD25/FOXP3 yoğun olarak boyandığı 3 alan belirlenip ışık mikroskobunda x40'luk büyütmede manuel olarak bu alanda ekspresyon gösteren hücreler sayılmıştır. NAKT sonrası rezeksiyon materyallerinde tümör adacıkları içinde ve tümör hücrelerine doğrudan değen T hücreler (Treg) intratümöral kabul edilirken tümör hücreleri arasındaki stromada yer alan ve tümör hücreleri ile temas etmeyen T hücreler (Treg) peritümöral (stromal) olarak değerlendirilmiş, yine ışık mikroskobunda x10'luk büyütmede CD4 ve CD25/FOXP3 yoğun olarak boyandığı hem intratümöral hem de peritümöral 3 alan belirlenip ışık mikroskobunda x40'luk büyütmede manuel olarak bu alanda ekspresyon gösteren üç ayrı noktada sayılmıştır. Hem intratümöral hemde peritümöral alan için her hastada ortalam alınıp ortalamaların median değerler hesaplanmıştır. Bu cut-uff değer olarak kabul edilerek yüksek / düşük olarak alt grublara ayrılmıştır. Hiç boyanma olmaması durumunda olgular negatif olarak kabul edilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler "IBM SPSS Statistics for Windows. Version 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corp., Armonk, NY, ABD)" kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler, kategorik değişkenler için n ve %, sürekli değişkenler için Mean±SD ve Median (IQR) olarak sunulmuştur. Sürekli değişkenler normallik varsayımlarından Kolmogorov Smirnow testi açısından incelenmiş olup $p<0.05$ olarak belirlenmiştir. Bundan dolayı İkili grup

karşılaştırmalarında nonparametrik testlerden Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Pearson Chi Square test ve Fisher's Exact test kullanılmıştır. Çeşitli klinik parametre grupları arasında IDFS sürelerinin karşılaştırılmasında Kaplan Meier yöntemi kullanılmıştır. PCR'ı öngörmede bağımsız prediktörleri belirlemek için çok değişkenli analizler yapıldı. $p<0.05$ istatistikçe anlamlı kabul edilmiştir.

4.1.Klinik ve Histopatolojik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen 55 kadın hastanın median yaşı 50 (min-max: 28-74), median tümör çapı 2,8 (min-max: 1-5,2) cm, çoğunluğu T1-2 (%93.4), tamamı nod pozitiftir. Klinik olarak NAKT uygulanmış hastaların 19'u (%43,2'si) evre 2; 25'i (%56,8'i) evre 3'dür. Tümör grade i genellikle 2 (%64.4) olup hastaların %85'inde ki67 %20'nin üzerindedir. Hastaların tamamında neoadjuvant kemoterapi ile birlikte anti-Her2 tedavi uygulanmıştı, %26,7'sinde trastuzumab, %73,3 hastada trastuzumab+pertuzumab verilmiştir. Hastaların tamamına yakını antrasiklin ve taksan almıştı. Hasta ve tümör özellikleri tablo 8 ve 9'da özetlenmiştir.

Tablo 8. Hastaların demografik ve klinik özellikleri

Değişkenler	n	%
T evre		
T1-2	42	93,4
T3	2	4,4
T4	1	2,2
N evre		
N0	0	0,0
N1-2	37	82,2
N3	8	17,8
Evre		
2A	3	2,4
2B	16	36,3
3A	15	34,1
3B	1	6,8
3C	9	20,4
CERB B2		
+2	14	31,1
+3	31	68,9
Tümör GRADE		
2	29	64,4
3	16	35,6

Menapoz durumu		
Yok	19	43,2
Var	25	56,8
NAKT türü		
AC-H/P/Docetaxel	14	31,1
AC-wPakli/H	7	15,6
AC-wPakli/H/P	15	33,3
AC-Docetaxel/H	5	11,1
TCHP	4	8,9
Primer tümör laterizasyonu		
Sağ	18	40,0
sol	27	60,0
Primer tümör lokalizasyonu		
ÜDK	19	42,2
ADK	5	11,1
AİK	8	17,8
ÜİK	13	28,9
Primer tümör ki 67 %		
<%20	6	15,0
≥%20	34	85,0
AR düzeyi		
Negative<%10	15	33,3
Pozitif 10-70%	10	22,2
Yüksek pozitif ≥%70	20	44,4

Tümörü infiltre eden Treg ve Thelper lenfositlerin ortalama (∓SS) değerleri, gradienti, relative yoğunluk (abundance) oranları tablo 9'da verilmiştir. Ortalama intratümöral Thelper 26,23±44,11, intratümöral Treg 2,50±4,37 idi.

Tablo 9. Hastaların demografik ve hücresel özellikleri

Değişkenler	**n:55**
Yaş, median (min-max)	50 (28-74)
Tümör boyutu, median (min-max)	28,00 (10,00-52,00) mm
Primer tümör %ki 67 median (min-max)	35,00 (1,00-90,00)
Ortalama PT lenfosit (±SS)	
Ortalama Th PT	27,31±47,68
Ortalama FOXP3+T hücresi PT	1,79±3,83
Ortalama Treg PT	1,97±3,41
Ortalama IT lenfosit (±SS)	
Ortalama Th IT	26,23±44,11
Ortalama FOXP3+T hücresi IT	1,32±1,73
Ortalama Treg IT	2,50±4,37
Gradient	
ThIT/PT	1,12±1,03
Treg IT/PT	1,54±1,80

FOXP3+T hücresi IT/PT	1,09±0,68
Relative abundance	
IT Treg/ Th	0,18±0,26
PT Treg/ Th	0,17±0,36

Lenfosit hücre gradienti farklı bölgelerdeki hücrelerin sayılarının oranı: Relative abundance (yoğunluğu) aynı bölgede tanımlanmış TREG'lerin tüm Th lenfositlere oranı olarak hesaplanmıştır.

NAKT ile patolojik tam yanıt veren ve vermeyen hastaların demografik, klinik, ve patolojik özelliklerine göre karşılaştırılmasında, pCR olan ve olmayan hastalar; yaş, menapozal durum, klinik evre açısından anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Tablo 10). Patolojik tam yanıt veren ve vermeyen gruplar arasında uygulanan neoadjuvan kemoterapi ve anti-Her2 tedaviler benzer izlendi. Ki67 proliferasyon indeksinin 50 ve üzerinde olan hastalarda pCR oranının istatistiksel olarak pCR olmayanlara göre daha yüksek olduğu saptandı (%51.9 vs %7.7; p=0,007). pCR ve non pCR grupları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.051). AR düzeyi kendi içerisinde pozitiflik ve yüksek pozitiflik olarak karşılaştırıldığında, yüksek pozitif olan grubun pCR oranı yüksektir (p=0,026) (Tablo 10).

Tablo 10. Patolojik tam yanıta ulaşma durumuna göre demografik, klinik ve patolojik özellikler

	pCR (n:34)	**Non pCR (n:11)**	**p**
Age			
≤50	18 (52,9)	7 (63,6)	0,729
>50	16 (47,1)	4 (36,4)	
T evre			
T1-2	31 (91,2)	11 (100)	
T3	2 (5,9)	0 (0)	1,000
T4	1 (2,9)	0 (0)	
N evre			
N1-2	29 (85,3)	8 (72,7)	0,382
N3	5 (14,7)	3 (27,3)	
EVRE GRUP			
EVRE2	15 (45,5)	4 (36,4)	0,731
EVRE 3	18 (54,5)	7 (63,6)	
CERB B2			
+2	11 (32,4)	3 (27,3)	1,000
+3	23 (67,6)	8 (72,7)	
Menapoz durumu			
Yok	14 (42,4)	5 (45,5)	1,000

Var	19 (57,6)	6 (54,5)	
Tip 2 Dm			
Yok	32 (94,1)	9 (81,8)	0,247
Var	2 (5,9)	2 (18,2)	
Tumor size			
≤3	19 (55,9)	8 (72,7)	0,482
>3	15 (44,1)	3 (27,3)	
Primer tümör laterizasyonu			
Sağ	13 (38,2)	5 (45,5)	0,732
sol	21 (61,8)	6 (54,5)	
Primer tümör lokalizasyonu			
ÜDK	15 (44,1)	4 (36,4)	0,883
ADK	3 (8,8)	2 (18,2)	
AİK	6 (17,6)	2 (18,2)	
ÜİK	10 (29,4)	3 (27,3)	
Primer tümör ki 67 %			
<%20	3 (10)	3 (30)	0,153
≥%20	27 (90)	7 (70)	
Primer tümör yüksek ki 67 %			
<%50	13 (48,1)	12 (92,3)	**0,007**
≥%50	14 (51,9)	1 (7,7)	
AR düzeyi			
Negatif<%10	11 (32,4)	4 (36,4)	
Pozitif 10-70%	5 (14,7)	5 (45,5)	0,051
Yüksek pozitif≥%70	18 (52,9)	2 (18,2)	
AR düzeyi			0.234
Negatif<%10	11 (68,8)	4 (44,4)	
Pozitif 10-70%	5 (31,3)	5 (55,6)	1,000
AR düzeyi			
Negative<%10	11 (37,9)	4 (66,7)	0.367
Yüksek positive≥%70	18 (62,1)	2 (33,3)	
AR düzeyi			
Pozitif 10-70%	5 (21,7)	5 (71,4)	**0.026**
Yüksek pozitif≥%70	18 (78,3)	2 (28,6)	

Fisher's Ecact test, p<0,05 İstatistiksel olarak anlamlı

4.2. Patolojik Evreye Göre T Hücre İnfiltrasyon Özellikleri

Lokal ileri hastalıkta (Evre 3) hastalıkta NAKT sonrası intratümöral ve peritümöral Thelper infiltrasyonu erken evreye (evre 1-2) ye göre farklılık göstermemiştir (sırasıyla p=0,187 ve p=0,116). Treg infiltrasyonunda da NAKT sonrası evreler arasında farklılık gösterilememiştir (PT p=0,975, IT p=0,288, tablo 11)

Tablo 11. Hastalık evresine göre NAKT sonrası lenfosit infiltrasyon oranları

Oranlar	Evre 1-2 (n:19)	Evre 3 (n:25)	p
Th lenfosit (IT)			
Düşük (≤8,00)	12 (70,6)	12 (50,0)	0,187
Yüksek (>8,00)	5 (29,4)	12 (50,0)	
Th lenfosit (PT)			
Düşük (≤9,33)	12 (70,6)	11 (45,8)	0,116
Yüksek (>9,33)	5 (29,4)	13 (54,2)	
TREG (IT)			
Düşük (≤0,33)	12 (70,6)	13 (54,2)	0,288
Yüksek (>0,33)	5 (29,4)	11 (45,8)	
TREG (PT)			
Düşük (≤0,33)	10 (58,8)	14 (58,3)	0,975
Yüksek (>0,33)	7 (41,2)	10 (41,7)	

Pearson ki-kare test

4.3. Patolojik Tam Yanıt Durumuna Göre T Hücre İnfiltrasyon Özellikleri

NAKT sonrası pCR'a ulaşan hastalarda intratümöral ve peritümöral Thelper oranı pCR'a ulaşamayan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü (Tablo 12).

Tablo 12. Patolojik tam yanıt durumuna göre tümör lenfosit infiltrasyon oranları

Oranlar	pCR (n:34) Median Inter quantile range (IQR)	Non pCR (n:11) Median Inter quantile range(IQR)	p
Periferik kan lenfosit/monosit oranı	4,05 (1,43)	3,50 (2,35)	0,200
Th (BX)	42,33 (60,25)	60,83 (39,58)	0,425
Th (IT)	1,00 (10,25)	53,33 (102,50)	**<0,001**
Th (PT)	1,50 (12,75)	29,16 (54,17)	**<0,001**
FOXP3+T hücresi (BX)	6,16 (7,42)	7,16 (13,50)	0,506
FOXP3+T hücresi (IT)	0,33 (0,58)	2,00 (2,58)	**0,011**
FOXP3+Thücresi (PT)	0,33 (1,0)	1,33 (1,50)	**0,002**
Treg (BX)	5,33 (4,67)	6,16 (8,33)	0,451
Treg (IT)	0,33 (0,58)	4,50 (11,25)	**0,001**

Treg (PT)	0,33 (0,67)	2,83 (6,50)	**0,002**

Mann-Whitney U test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

Intratümöral ve peritümöral Th ve Treg hücre infiltrasyon sayılarının median değerleri cutt off alındığında median ve medianın altındaki sayılar düşük infiltrasyon; cut off un üst değerleri yüksek infiltrasyon olarak gruplandırılarak patolojik tam yanıtı predikte edecek hücresel değişkenler ve cut off ları tablo 13'te gösterilmiştir. Patolojik tam yanıt veren hastalarda intratümöral ve peritümöral azalmış Th ve Treg infiltrasyonları izlenmiştir (tablo 13). Ancak pCR'a ulaşan hastaların Th ve Treg gradientleri ve intratümöral ve peritümöral alanda Treg relative abundance değerleri benzer bulunmuştur (p>0,05).

Tablo 13. Patolojik tam yanıta ulaşma durumuna göre tümörü infiltre eden hücresel değişkenler

	pCR (n:34)	**Non pCR (n:11)**	**p**
Th IT			
≤8.0	23 (71,9)	1 (10)	**0,001**
>8.0	9 (28,1)	9 (90)	
ThPT			
≤9.33	22 (68,8)	1 (10)	**0,002**
>9.33	10 (31,3)	9 (90)	
TREG IT			
≤0.33	24 (75)	2 (20)	**0,003**
>0.33	8 (25)	8 (80)	
TREG PT			
≤0.33	23 (71,9)	2 (20)	**0,008**
>0.33	9 (28,1)	8 (80)	
FOXP3 IT			
≤0.66	24 (75)	1 (10)	**<0,001**
>0.66	8 (25)	9 (90)	
FOXP3 PT			
≤0.33	23 (71,9)	2 (20)	**0,008**
>0.33	9 (28,1)	8 (80)	
Th IT/PT			
≤0.88	12 (52,2)	4 (44,4)	1,000
>0.88	11 (47,8)	5 (55,6)	
TREG IT/PT			
≤1.00	10 (45,5)	6 (85,7)	0,093
>1.00	12 (54,5)	1 (14,3)	
TREG/Th (IT)			

≤0.07	9 (40,9)	5 (62,5)	0,417
>0.07	13 (59,1)	3 (37,5)	
TREG/Th (PT)			
≤0.06	11 (47,8)	6 (66,7)	0,444
>0.06	12 (52,2)	3 (33,3)	

Fisher's Ecact test, p<0,05 İstatistiksel olarak anlamlı

NAKT'ın etkisi değerlendirildiğinde NAKT öncesi biyopsi ile NAKT sonrası cerrahi intratümöral alan hücresel infiltrasyon karşılaştırıldığında pCR olan grup içinde NAKT sonrası Th ve Treg'lerin azaldığı görülmüştür. Th ve Treg'teki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. pCR olmayan grupta da NAKT sonrası intratümöral alanda Th ve Treg'lerin azaldığı gözlemlenmiştir. Th ve Treg'teki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001) (tablo 14) (tablo 15).

Tablo 14. pCR grubunda T hücre karşılaştırması

Oranlar	**BX Median Inter quantile range (IQR)**	**IT Median Inter quantile range (IQR)**	**p**
Th	42,33 (60,25)	1,00 (10,25)	**<0,001**
FOXP3+ T hücresi	6,16 (7,42)	0,33 (0,58)	**<0,001**
Treg	5,33 (4,67)	0,33 (0,58)	**<0,001**

Mann-Whitney U test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 15. non pCR grubunda T hücre karşılaştırması

Oranlar	**BX Median Inter quantile range (IQR)**	**IT Median Inter quantile range (IQR)**	**p**
Th	60,83 (39,58)	53,33 (102,50)	**<0,001**
FOXP3+T hücres,	7,16 (13,50)	2,00 (2,58)	**<0,001**
Treg	6,16 (8,33)	4,50 (11,25)	**<0,001**

Mann-Whitney U test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

. (p<0,001) (tablo 18) (tablo 19).

İntratümöral Th ile İT Treg ler arasında tüm popülasyonda pozitif kolerasyon izlenirken (r=0,717; p<0,001) benzer pozitif ilişki PT alanda Th ve Treg lerde de izlenmiştir (r=0,696; p<0,001). Peritümöral ve İT alanların karşılaştırmalı hücre infiltrasyon ilişkisi tablo 16'da verilmiştir. Hücresel gradientte (İT/PT) Th gradienti

Treg gradienti ile ilişkisiz izlendi (r=0,247; p=0,166) NAKT öncesi biyopsiden ve NAKT sonrası IT dokudan çalışılan Th ve Treg değişimleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (Tablo 16).

Tablo 16. İntratümöral ve peritümöral T lenfositlerin korelasyon analizleri

		Thelper BX	Thelper İT	TREG BX	TREG İT	Thelper PT	TREG PT
Thelper BX	r	1					
	p						
Thelper İT	r	0,164	1				
	p	0,249					
TREG BX	r	0,204	0,153	1			
	p	0,152	0,285				
TREG İT	r	0,154	,717**	0,015	1		
	p	0,282	**<0,001**	0,917			
Thelper PT	r	0,219	,918**	0,137	,684**	1	
	p	0,123	**<0,001**	0,339	**<0,001**		
TREG PT	r	0,235	,689**	0,074	,909**	,696**	1
	p	0,097	**<0,001**	0,603	**<0,001**	**<0,001**	

Spearman korelasyon testi, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

4.4. Menopoz Durumuna Göre T Hücre İnfiltrasyon Özellikleri

Tümör Treg ve Th infiltrasyonları menopoz durumundan etkilenmemiştir(p>0,05, tablo 17).

Tablo 17. Menopoz durumlarına göre T hücre infiltrasyon karşılaştırması

Oranlar	Yok (n:19) Median Inter quantile range (IQR)	Var (n:25) Median Inter quantile range(IQR)	p
Th (BX)	50,83 (50,58)	65,50 (74,25)	0,789
Th (IT)	22,50 (27,50)	11,16 (80,58)	0,146
Th (PT)	23,66 (19,17)	23,33 (89,08)	0,263
TREG (BX)	4,00 (2,67)	5,16 (10,83)	0,363
TREG (IT)	2,00 (4,92)	1,00 (4,42)	0,473
TREG (PT)	1,33 (3,75)	1,33 (4,25)	0,762
Th Gradient	1,13 (1,27)	0,90 (0,67)	0,090
TREG Gradient	1,16 (0,54)	1,00 (0,78)	0,189
IT TREG Relative aboundance	0,10 (0,22)	0,16 (0,80)	0,428

PT TREG Relative aboundance	0,08 (0,26)	0,10 (0,18)	0,916

Mann-Whitney U test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

4.5. Çok Değişkenli Analizler:

Çok değişkenli analizde tedavi sonucunu etkileyebilecek patolojik ve hücresel faktörler araştırıldı. Ki67'nin %50'nin altında olması, İT TREG infiltrasyonunun 0.33'ün üzerinde olması pCR gelişmemesi için bağımsız belirleyici faktörler olarak saptandı (p değerlerin sırasıyla 0,040 ve 0,008, tablo 18).

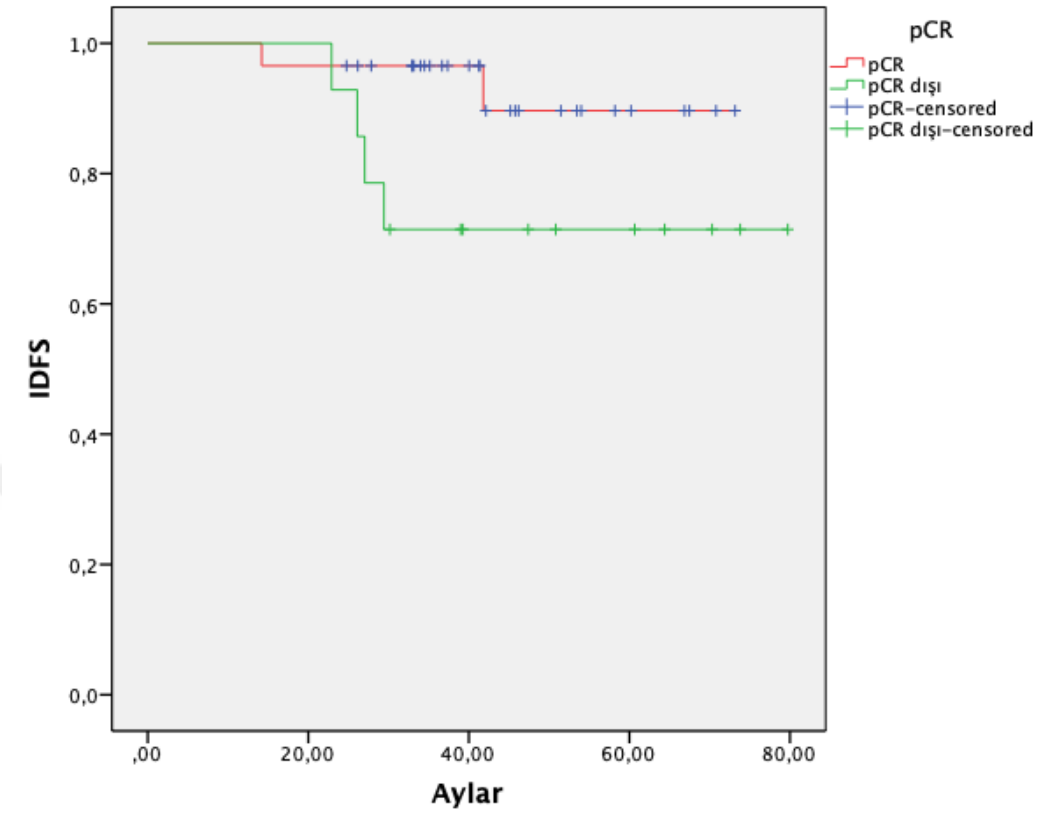
Tablo 18. Patolojik tam yanıta ulaşamama riskini belirleyen faktörler

Risk Faktörü	**RR(%95 GA)★**	**p-değeri**
Yaş grubu >50 vs ≤50	1.28(0.17-9.73)	0.80
Dual Her2 blokajı (var vs yok)	2.07(0.29-14.37)	0.46
Ki67 <%50 vs ≥%50	12.17(1.12-131.68)	**0.04**
Thelper >8 vs ≤8	2.96(0.40-21.91)	0.28
Treg >0.33 vs ≤0.33	10.85(1.84-63.79)	**0.008**

★RR: relatif risk(%95 güven aralığı), **p<0,05 İstatistiksel olarak anlamlı**

4.6. Sağkalım Analizleri

Çalışma popülasyonumuzda sadece 2 ölüm (kanser ilişkisiz) ve 6 hastalık nüksü (pCR grubunda 2 ve non pCR grubunda 4 nüks) geliştiği için gruplara göre median OS ve IDFS hesaplanamamıştır. 24 aylık IDFS pCR'a ulaşan grupta %90, pCR olmayan grupta %71 olarak bulundu (log rank p=0.072) (Şekil 3).



Şekil 3. Patolojik tam yanıt durumuna göre IDFS

4.7. Tedavi Toksisitesi

NAKT farklı türlerine göre hematolojik ve karaciğer toksisite oranları benzer bulunmuştur (p>0.05) (tablo 19).

Tablo 19. Neoadjuvan tedavi şemalarına göre hematolojik ve karaciğer toksisite oranları

Değişkenler	AC-H/P/Docetaxel	AC-wPakli/H	AC-wPakli/H/P	AC-Docetaxel/H	TCHP	p
Nötropeni, n (%)						
Yok	11 (78,6)	6 (85,7)	10 (66,7)	5 (100)	3 (75)	0,700
Var	3 (21,4)	1 (14,3)	5 (33,3)	0 (0)	1 (25)	
Fen, n (%)						
Yok	14 (100)	7 (100)	14 (93,3)	5 (100)	4 (100)	1,000
Var	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	

Trombosiyopeni, n (%)						
Yok	14 (100)	7 (100)	13 (86,7)	4 (80)	3 (75)	0,254
Var	0 (0)	0 (0)	2 (13,3)	1 (20)	1 (25)	
Anemi, n (%)						
Yok	4 (28,6)	4 (57,1)	1 (6,7)	1 (20)	1 (25)	0,111
Var	10 (71,4)	3 (42,9)	14 (93,3)	4 (80)	3 (75)	
KC toksisitesi, n (%)						
Yok	13 (92,9)	7 (100)	13 (86,7)	5 (100)	4 (100)	1,000
Var	1 (7,1)	0 (0)	2 (13,3)	0 (0)	0 (0)	

Fisher's Exact test

5. TARTIŞMA

Tümör bağışıklığında immun düzenleyici mekanizmalar önemli rol almaktadır (114). Kanserli hastaların büyük bir kısmında immun-fonksiyon bozukluğu vardır (114). Malign hücrelerin immünolojik toleransına yol açan tümör immunitesinin bozulması, malignitelerin gelişim ve ilerlemesine katkıda sağlamaktadır (114). Meme kanseride dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kanser mikroçevresinde yapılan çalışmaların önemli bir kısmını Treg hücrelerinin sıklığı, fonksiyonu ve dağılımına yönelik araştırmalar oluşturmaktadır (115).

Tablo 20. Literatürde meme kanseri dışındaki epitelyal tümörler ve Treg ilişkili yapılmış çalışmalar

Kanser Türü	Yıl	Hasta Sayısı	Materyal/method	Evre	Sağkalım Etkisi
Küçük hc dışı ac ca (hu ve ark) [116]	2017	36	Periferik kan /flow	I-IV	Sağlıklı bireylere göre yüksek
Pankreas ca (tomohisa ve ark.) [117]	2008	100	Periferik kan/flow	I-III	Yüksek treg düşük sağkalım
Hcc (zhou ve ark.) [118]	2016-2017	136	Periferik kan /flow, rezeksiyon/ıhc	---	İleri evre yüksek treg yoğunluğu
Kolon (correale ve ark.) [119]	2015	57	Rezeksiyon/ihc	IV	Yüksek treg iyi prognoz (FOXP3)
Mide (kai ve ark.) [120]	2016	70	Periferik kan/flow	I-IV	İleri evre yüksek treg yoğunluğu
Rcc (hao ve ark.) [121]	2010	36	Periferik kan/flow, dokuda(vaskülarite bakılmış)	I-IV	Yüksek treg ileri evre ve anjiogenez artışı
Özofagus (kono ve ark.) [122]	2000	42	Periferik kan/flow	I-IV	Yüksek treg düşük sağkalım
Serviks (hou ve ark.) [118]	2012	46	Doku/ihc	I-II	İleri evre yüksek treg yoğunluğu

Tablo 21. Literatürde meme kanseri ve TREG ile ilgili yapılmış çalışmalar

Meme Kanseri Alt Grubu	Yıl	Hasta Sayısı	Materyal/Method	Evre	Sağkalım Etkisi
TNBC (deng ve ark.) [123]	2013-2014	68	Periferik kan/flow	I-IIIA	Adjuvan tedavi sonrası Treg düşüşü
Metastatik meme kanseri(alt grup ayrımı yok) (yingzi ve ark) [124]	2012	12	Periferik kan/flow	IV	1.Sıra standart tedaviye ek düşük doz siklofosfomid sonrası Treg te düşüş
Meme kanseri tüm alt grupları var (fould ve ark.) [125]	2018	90	Periferik kan/flow	III-IV	NAKT sonrası Treg'te değişiklik saptanmamış
TNBC (miyashita ve ark.) [126]	2009-2012	88	Doku/ihc	I-III	Treg ile pCR arasında ilişki saptamamışlar
TNBC (liu ve ark.) [127]	2008	1270	Doku/ihc	III	Yüksek Treg düşük OS ve düşük PFS
Tüm meme ca alt grupları (sahar ve ark.) [128]	1987-1998	1902	Doku/ihc	I-IV	Yüksek Treg düşük OS
Tüm meme ca alt grupları (oda ve ark.) [129]	2003-2010	180	Doku/ihc	II-III	Tanı anında yüksek Treg, rezeksiyondaki düşük Treg yüksek pCR
Tüm meme ca alt grupları (ladoire ve ark.) [130]	2004-2005	56	Doku/ihc	I-IV	Tanı ve rezeksiyonda düşük Treg yüksek pCR
Metastatik triple neg meme ca (stenstrom ve ark.) [131]	2002-2007	304	Doku/ihc	III-IV	Yüksek treg düşük sağkalım
Meme (ER-,PR+,HER2+) (Bates ve ark.) [132]	2004	283	Rezeksiyon/ihc	DCIS-I-II	Yüksek FOXP3 iyi prognoz

Meme kanseri dışında intraepitelyal tümörler ve Treg'lerle ilgili küçük hücre dışı akciğer kanseri (116), pankreas kanseri (117), hepatosellüler karsinom (118), mide kanseri (120), renal hücreli karsinom (121), özofagus karsinomu (122) ve serviks

karsinomu (118) ile ilgili çalışmalar flow değerlendirmesi ve/veya immunohistokimyasal yöntemlerle yapılmıştır. Çalışmaların sonucunda yüksek Treg yoğunluğu/infiltrasyonu düşük sağkalım, ileri evre ve anjiogenez artışı ile ilişkili bulunmuştur. Fakat kolon kanseri ile ilgili flow incelemesi ve immunohistokimyasal yöntemle yapılmış bir çalışmada yüksek Treg infiltrasyonunun iyi prognoz, uzun OS ve uzun PFS ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışma bugüne kadar litaratürde yapılmış olan birçok çalışma ile zıtlık göstermektedir. (Tablo 17)

Hu ve ark. küçük hücre dışı akciğer kanserli, erken ve ileri evre 36 hastanın periferik kanlarının flow ile değerlendirilmesi sonucunda, Treg sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulmuşlardır (p=0,004) (116). Erken evre hastalara göre ileri evre hastalarda Treg daha yüksek bulunmuştur ($p< 0,005$). Bizim çalışmamızda evre3 hastalıkta NAKT sonrası intratümöral ve peritümöral Thelper ve Treg infiltrasyon oranları benzer bulunmuştur.

Tomohisa ve ark. pankreas duktal adenokarsinom tanılı 100 hastanın periferik kanının flow ile değerlendirilmesi sonucunda Treg yüzdesi kontrol grubu ve tanı anında inoperabl olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla; p=0,048, p=0,04) (117). Operabl olan hastalar 2 gruba ayrılmış diğerine göre yüksek evreli olan (IIB) ve düşük evreli (I ve IIA) olanlar olarak yüksek evreli olan hastaların Treg yoğunluğu, düşük evreli olanlara göre daha yüksek bulunmuştur (p=0,029) (117). Rezeksiyon yapılan hastalar içerisinde 12. ayda tekrar flow ile değerlendrime sonucunda nüks eden grubun Treg yoğunluğu istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p=0,015)(117). Benzer bir çalışma serviks kanserinde yapılmış olup, Hou ve ark. 46 serviks kanseri tanılı hastanın operasyon materyalinin immunhistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesi sonrasında ileri evre hastalığa sahip hastaların rezeksiyon materyalinde yüksek FOXP3+Th infiltrasyonu saptamışlardır ($p< 0,05$) (118). Çalışmamızda takip süresinin kısalığı ve yeterli sayıda nüks olmadığı için median IDFS'e ulaşılamamış ve çok değişkenli analiz yapılamamıştır.

Zhou ve ark. 136, hepatosellüler karsinom (HCC) tanılı hastanın periferik kan flow ve doku immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi ile hem periferik kanda hem de dokuda Th, CD25+T lenfosit ve Treg lenfositleri değerlendirmişlerdir ve yüksek dereceli HCC tanılı hastaların periferik kanlarında daha yüksek Treg lenfosit

saptamışlardır (p<0,01) (133). Aynı çalışmada intratümöral alandaki FOXP3+T lenfosit infiltrasyonu, peritümöral alandakinden fazla bulunmuştur (p=0,0001) (133). Bizim çalışmamızda patolojik tam yanıt sağlanamayan hastalarda NAKT sonrası cerrahi materyalde hem peritümöral hem de intratümöral Thelper ve Treg infiltrasyon oranları patolojik CR olanlara göre anlamlı olarak daha yüksek izlenmiştir. NAKT öncesi Th ve Treg infiltrasyon durumu patolojik tam yanıt üzerine etkili bulunmamıştır.

Correale ve ark. Metastatik kolon kanserli 57 hastanın doku örneklerinin immunhistokimyasal yöntemle değerlendirmesi sonucunda tanı anında yüksek Treg oranın uzun OS (p=0,0005) ve uzun PFS (p=0,0009) ile ilişkili bulmuşlardır (119). Çalışmamızda takip süresinin kısalığı ve yeterli sayıda nüks ve ölüm olmadığı için median IDFS ve OS'e ulaşılamamış ve çok değişkenli analiz yapılamamıştır.

Hao ve ark. Renal hücreli karsinom (RCC)lu, nefrektomi yapılan 36 hastanın dahil olduğu çalışmada intratümöral Treg infiltrasyonu ile patolojik evre (p<0,05) ve nükleer derece (p<0,01) arasında anlamlı pozitif ilişkili bulmuşlardır (121). Fakat bizim çalışmamızda intratümöral Treg infiltrasyonu non pCR grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0,011).

Meme kanseri ve Treg'lerle ilgili flow/immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak yapılmış olan çalışmalarda NAKT ve adjuvan tedaviler sonrasında Treg infiltrasyonunda düşüş izlenip ileri evre ile artmış Treg ilişkisi, artmış Treg infiltrasyonu ile düşük OS ve PFS sonuçları bildirilmiştir. Bizim çalışmamız gibi TNBC'de rezeksiyon materyalinden pCR çalışılan çalışmada pCR olasılığı azalmış Treg infiltrasyonu ile ilişkili bulunmuştur (tablo 18).

Deng ve ark. Evre I-III A, triple negatif meme kanserli (TNBC) hastalardan adjuvan kemoterapi sonrası, periferik kandaki Treg'lerin tedavi öncesine göre düştüğünü tanımlamışlardır (p=0,001) (123). Yingzi ve ark. metastatik meme kanserli 12 hastadan ilk sıra tedavi (antrasiklin ve taksan) sonrasında idame siklofosfamid boyunca tedavi boyunca periferik Treg takibi yapıp kürler arttıkça ve idame devam ettikçe devam eden Treg düşülerini tanımlamışlardır (124). Fould ve ark. evre III-IV meme kanserli, 90 hastanın dahil edildiği bir çalışmada ER'den bağımsız, hastaların periferik kanlarının flow ile değerlendirilmesi sonucunda sağlıklı dönerlere göre Treg sayısında artış izlenmiştir (125). NAKT alan hastalarda, NAKT sonrası Treg'lerde

değişiklik saptanmamıştır (125). Miyashita ve ark. 88 triple negatif meme kanserli (TNBC) hastada NAKT sonrası doku örneklerinin immunhistokimyasal incelenmesi sonucunda Treg lerin yoğunluğuna göre pCR oranlarında anlamlı farklılık bulmamışlardır (126). Bizim çalışmamızda tedavi öncesi biyopsilerde Treg ve Th infiltrasyonları pCR a ulaşan hastalarda non pCR grubuna göre benzer izlenirken; neadjuvan tedavi sonrasında değerlendirilen cerrahi materyaldeki intratümöral ve peritümöral alandaki Treg ve Th infiltrasyonları non pCR gruba göre pCR grubunda çok daha düşük izlendi. Fakat NAKT'ın etkisi değerlendirildiğinde NAKT öncesi biyopsi ile NAKT sonrası cerrahi intratümöral alan hücresel infiltrasyon karşılaştırıldığında pCR olan grup içinde NAKT sonrası Th ve Treg'lerin azaldığı görülmüştür. Th ve Treg'teki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. pCR olmayan grupta da NAKT sonrası intratümöral alanda Th ve Treg'lerin azaldığı gözlemlenmiştir. Th ve Treg'teki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Liu ve ark. 1270 meme kanserli, tedavi almayan hastanın rezeksiyon materyalinin immunhistokimyasal yöntemler ile inceleyerek intratümöral alandaki yüksek Treg lenfosit oranının düşük OS (p=0,0001) ve düşük PFS (p=0,0001) ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (127). Bizim çalışmamızda ise 2 exitus ve 6 nüks hastamız olması nedeniyle OS ve IDFS hesaplanamamıştır.

Oda ve ark. evre II-III meme kanserli 180 hastanın dahil edildiği bir çalışmada hastaların biyopsi ve NAKT sonrası rezeksiyon materyalini immunhistokimyasal yöntemle değerlendirmişlerdir (129). Tüm hastalar standart paklitaksel ardından 5-flourosil/epirubisin/siklofosfomid (FEC) uygulanmıştır (129). Biopside yüksek Treg hücre yoğunluğu pCR ile ilişkili bulunmuştur (p=0,002) (129). Ladoire ve ark. 56 evre I-IV meme kanserli hastanın doku örneklerinin immunhistokimyasal yöntemlerle ile incelenmesi sonrasında, biyopside yüksek Treg varlığının düşük pCR ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (p=0,019). Aynı hastalarda NAKT sonrası rezeksiyon materyalinde Treg infiltrasyonunda azalmayı tanımlayıp ve bu azalmanın NAKT' tan bağımsız olduğu bildirmişlerdir. (130). Bizim çalışmamızda pCR grubunda nonPCR grubuna göre Treg infiltrasyonunda NAKT öncesi biyopsilerde farklılık izlenmezken NAKT sonrası cerrahi materyallerde pCR grubunda Treg infiltrasyonunun non pCR grubuna göre anlamlı olarak çok daha düşük olduğu izlendi (IT p=0,0001; PT

p=0,002). Çalışmamızda hem pCR grupta hem de non pCR grupta NAKT öncesi Th ve Treg infiltrasyonu NAKT sonrasında intratümöral alanda sayısal olarak azalmış olduğu izlenmiştir bu azalma hem pCR hem de non pCR grupta anlamlı bulunmuştur.

Stenstrom ve ark. lokal ileri ve metastatik meme kanseri tanılı 304 kadın hastanın biyopsi doku örneklerinin immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi sonrasında, yüksek Treg infiltrasyonu bulunan hastaların meme kanserine bağlı ölüm oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir (p=0,008) (131). Yine aynı çalışmada lenf nodu metastazında Treg'lerin negatif prognostik faktörlerle korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır fakat Treg infiltrasyonu ile uzak metastazlarla ilişkili klinikopatolojik özellikler arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (131). Bizim çalışmamızda hastaların tamamında en az bir lenf nodu tutulumu olması nedeniyle lenf nodu metastazı ile Treg ilişkisine bakılamamıştır.

Miyashita ve ark. nın yaptığı TNBC daha önce tartışılan çalışmanın ek analizlerinde premenopozal ve genç hastalarda Treg infiltrasyonunun daha düşük olduğu bildirilmiştir. (p=0,002) (134). Fakat bizim çalışmamızda menopoz durumuna göre Treg ve Thücre infiltrasyonunda fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak; literatürde çeşitli tümör tiplerinde T hücre infiltrasyonları gerek periferik kanda gerek patoloji spesmenlerinde bakılmış ve evre ve tedavi yanıtı ile ilişkileri araştırılmıştır. Ancak literatürde neoadjuvan tedavi uygulanmış Her2+HR- lokal ileri meme kanserine özgü bir T hücre kinetiklerinin incelendiği bir çalışma yoktur. Çalışmamız bu hasta grubunda yapılan ilk çalışmadır. Ayrıca patolojik tam yanıta ulaşan ve ulaşamayan hastaların klinik evrelerinin benzer olması, aldıkları neoadjuvan tedavide antrasiklin, taksan ve anti-Her2 tedavi rejimlerinin benzer olması pCR üzerinde etkili olabilecek patolojik ve hücresel özellikleri net olarak belirlememizi sağlamıştır. Özellikle ki67 proliferasyon indeksinin %50'nin altında olması ve yüksek intratümöral Treg infiltrasyonu neoadjuvan tedavi sonuçlarını olumsuz etkilemekte, 10-12 kat pCR'a ulaşamama riskini artırmaktadır. Çalışmamızda takip süresi boyunca yeterli sayıda olay görülmediği için median IDFS ve OS'e ulaşılamamıştır. Ancak literatür ile uyumlu olarak pCR'a ulaşan hastaların IDFS'leri ulaşamayanlara göre daha uzundur.

Neoadjuvan tedavi ile immün mikroçevredeki değişikler; klinik çalışmalardaki lokal ileri evre Her2+HR- hastalıkta immün kontrol nokta inhibitörlerinin üçlü negatif

hastalar kadar başarılı olmamasının altında yatan nedenlerden biri olabileceğini düşündürmektedir. Neoadjuvan immün tedavi etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda, tümörü infiltre eden T hücre kinetiklerinin incelenmesi bu tedavilerin başarılı olacağı hastaların belirlenmesini sağlayabilir.

6. SONUÇLAR

1. Tümör mikroçevresi, tümörün biyolojik davranışını etkileyen hücresel ve moleküler faktörler içerir. Tümörü infiltre eden immun hücreler bu mikroçevrenin esas oyuncularıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla mikroçevrede etkili farklı immun hücrelerin bir kısmının iyi prognozla ilişkili olup bir kısmının ise immun gözetimi engellediği, anjiogenezi ve invazyon yeteneğini arttırdığı göstermiştir. Tümörü infiltre eden immun hücrelerin klinikopatolojik öneminin yanı sıra son dönem immunoterapilerin etkinliği ve sağ kalım farkları araştırılmaya başlanmıştır. Doğal ve edinsel immun yanıtın karakteristik farklı hücreleri ile infiltre olan aynı tip tümörlerde farklı prognozlar gözlenmesi, tümör infiltre eden immun hücrelerin sistematik analizinin potansiyel önemini arttırmıştır. Treg'ler tümör immünitesini baskılar. Treg hücreleri, kanser hastalarında sıklıkla kötü prognoz ile ilişkilidir ve tümör dokularında fazla miktarda bulunur. Patolojik tam yanıt veren hastalarda intratümöral ve peritümöral azalmış Th ve Treg infiltrasyonları izlenmiştir. Th gradient ve Treg gradientlerin patolojik tam yanıt üzerine etkisi izlenmemiştir. İntratümöral ve peritümöral alanda Treg relative abundance'nin yüksek olması patolojik tam yanıtı predikte etmediği izlenmiştir

2. Lokal ileri ve metastatik hastalıkta bugüne kadar Treg'lerle ilgili yapılmış olan çalışmaların büyük bir kısmını periferik kandan çalışılan flow sitometri yöntemi oluşturmaktadır. NAKT sonrası veya öncesi flow sitometrik yöntemle Treg karşılaştırmış ya da metastatik hastalıkta bir sıra tedavi almış ya da hiç tedavi almamış, özel bir tedavi sonrası ve öncesi kontrol grubu ile karşılaştırılarak Treg'ler yorumlanmıştır. Çalışmamızda, Treg infiltrasyonun HER2 pozitif meme kanserinde kötü prognozun belirteci olarak gösterilmiştir.

3. Evre ile Th ve Treg hücre infiltasyonu arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

4. Neoadjuvan kemoterapi ile hücresel infiltrasyonlar hem pCR hem de non pCR grupta biyopsi ile karşılaştırıldığında azalma görülmüştür.

5. Çalışmamızda ki67 proliferasyon indeksinin %50'nin altında olması ve yüksek intratümöral Treg infiltrasyonu neoadjuvan tedavi sonuçlarını olumsuz etkilemekte, 10-12 kat pCR'a ulaşamama riskini artırmaktadır.

6. Çalışmamızda takip süresi boyunca yeterli sayıda olay görülmediği için median IDFS ve OS'e ulaşılamamıştır. pCR'a ulaşan hastaları IDFS'leri ulaşamayanlara göre daha uzundur.

7. Verilerimiz, kemoterapinin tetiklediği immünolojik etkilerin, antitümör tedavilerin bir parçası olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKÇA

1. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. CA Cancer J Clin. 2017;67(2):93-9.
2. Chavez-MacGregor M, Mittendorf EA, Clarke CA, Lichtensztajn DY, Hunt KK, Giordano SH. Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. Oncologist. 2017;22(11):1292-300.
3. Zhang J, Han S, Zhang B, Zhang Y. Cancer immunology and cancer immunodiagnosis. J Immunol Res. 2014;2014:725691.
4. Luznik Z, Anchouche S, Dana R, Yin J. Regulatory T Cells in Angiogenesis. J Immunol. 2020;205(10):2557-65.
5. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. Br J Hosp Med (Lond). 2022;83(2):1-7.
6. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). Cancers (Basel). 2022;14(10).
7. DeSantis CE, Miller KD, Dale W, Mohile SG, Cohen HJ, Leach CR, et al. Cancer statistics for adults aged 85 years and older, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(6):452-67.
8. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Eheman C, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. J Natl Cancer Inst. 2011;103(9):714-36.
9. Bellanger M, Zeinomar N, Tehranifar P, Terry MB. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? J Glob Oncol. 2018;4:1-16.
10. de Gelder R, Heijnsdijk EA, Fracheboud J, Draisma G, de Koning HJ. The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy. Int J Cancer. 2015;137(1):165-72.
11. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast Cancer Statistics, 2022. CA Cancer J Clin. 2022;72(6):524-41.
12. Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. Am J Hum Genet. 1995;57(6):1457-62.
13. Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV, Jr., Albanes D, Ballard-Barbash R, Adams KF, et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. Arch Intern Med. 2007;167(19):2091-102.
14. Premenopausal Breast Cancer Collaborative G, Schoemaker MJ, Nichols HB, Wright LB, Brook MN, Jones ME, et al. Association of Body Mass Index and Age With Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women. JAMA Oncol. 2018;4(11):e181771.
15. Key TJ, Davey GK, Appleby PN. Health benefits of a vegetarian diet. Proc Nutr Soc. 1999;58(2):271-5.
16. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. Am J Epidemiol. 2000;152(6):514-27.
17. Sieri S, Krogh V, Bolelli G, Abagnato CA, Grioni S, Pala V, et al. Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(1):169-76.
18. Qu X, Zhang X, Qin A, Liu G, Zhai Z, Hao Y, et al. Bone mineral density and risk of breast cancer in postmenopausal women. Breast Cancer Res Treat. 2013;138(1):261-71.
19. Dorgan JF, Stanczyk FZ, Kahle LL, Brinton LA. Prospective case-control study of premenopausal serum estradiol and testosterone levels and breast cancer risk. Breast Cancer Res. 2010;12(6):R98.
20. Endogenous H, Breast Cancer Collaborative G, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. Lancet Oncol. 2010;11(6):530-42.
21. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet. 2001;358(9291):1389-99.

22. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. Lancet Oncol. 2012;13(11):1141-51.
23. Nichols HB, Schoemaker MJ, Cai J, Xu J, Wright LB, Brook MN, et al. Breast Cancer Risk After Recent Childbirth: A Pooled Analysis of 15 Prospective Studies. Ann Intern Med. 2019;170(1):22-30.
24. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. Am J Epidemiol. 1994;139(8):819-35.
25. Nichols HB, Berrington de Gonzalez A, Lacey JV, Jr., Rosenberg PS, Anderson WF. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. J Clin Oncol. 2011;29(12):1564-9.
26. Dyrstad SW, Yan Y, Fowler AM, Colditz GA. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2015;149(3):569-75.
27. Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2015;154(2):213-24.
28. Travis RC, Balkwill A, Fensom GK, Appleby PN, Reeves GK, Wang XS, et al. Night Shift Work and Breast Cancer Incidence: Three Prospective Studies and Meta-analysis of Published Studies. J Natl Cancer Inst. 2016;108(12).
29. Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, Hudson MM, Meadows AT, Neglia JP, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. Ann Intern Med. 2010;152(7):444-55; W144-54.
30. Aranda-Gutierrez A, Diaz-Perez HM. Histology, Mammary Glands. StatPearls. Treasure Island (FL) relationships with ineligible companies. Disclosure: Hector Diaz-Perez declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2023.
31. Hartmann LC, Degnim AC, Santen RJ, Dupont WD, Ghosh K. Atypical hyperplasia of the breast--risk assessment and management options. N Engl J Med. 2015;372(1):78-89.
32. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Reis-Filho JS, Lee AH, Ellis IO. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. Am J Surg Pathol. 2008;32(4):513-23.
33. Krishnamurthy S, Sneige N. Molecular and biologic markers of premalignant lesions of human breast. Adv Anat Pathol. 2002;9(3):185-97.
34. Stosiek P. [Differential atypical ductal hyperplasia/DCIS/invasive carcinoma diagnosis and significance of micrometastases]. Zentralbl Chir. 1998;123 Suppl 5:13.
35. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. Histopathology. 2020;77(2):181-5.
36. Tsang WY, Chan JK. Endocrine ductal carcinoma in situ (E-DCIS) of the breast: a form of low-grade DCIS with distinctive clinicopathologic and biologic characteristics. Am J Surg Pathol. 1996;20(8):921-43.
37. Holland R, Hendriks JH. Microcalcifications associated with ductal carcinoma in situ: mammographic-pathologic correlation. Semin Diagn Pathol. 1994;11(3):181-92.
38. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM, Anderson SJ, Harlow SP, et al. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2011;364(5):412-21.
39. Ahmad A. Breast Cancer Statistics: Recent Trends. Adv Exp Med Biol. 2019;1152:1-7.
40. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.
41. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(1):55-62.
42. Wang AX, Qi XY. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. IUBMB Life. 2013;65(9):748-58.
43. Rauen KA. The RASopathies. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2013;14:355-69.
44. Knight T, Irving JA. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. Front Oncol. 2014;4:160.
45. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets. 2012;16(1):103-19.
46. Cseh B, Doma E, Baccarini M. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. FEBS Lett. 2014;588(15):2398-406.

47. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. Mol Cancer Ther. 2011;10(3):385-94.
48. Bandyopadhyay S, Bluth MH, Ali-Fehmi R. Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling 2018. Clin Lab Med. 2018;38(2):401-20.
49. Vyberg M, Nielsen S, Roge R, Sheppard B, Ranger-Moore J, Walk E, et al. Immunohistochemical expression of HER2 in breast cancer: socioeconomic impact of inaccurate tests. BMC Health Serv Res. 2015;15:352.
50. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018;36(20):2105-22.
51. Balla A, Weaver DL. Pathologic Evaluation of Lymph Nodes in Breast Cancer: Contemporary Approaches and Clinical Implications. Surg Pathol Clin. 2022;15(1):15-27.
52. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2008;107(3):309-30.
53. Conti A, Duggento A, Indovina I, Guerrisi M, Toschi N. Radiomics in breast cancer classification and prediction. Semin Cancer Biol. 2021;72:238-50.
54. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. Ann Surg Oncol. 2018;25(7):1783-5.
55. Fisher B, Slack NH, Bross ID. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. Cancer. 1969;24(5):1071-80.
56. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67(1):7-30.
57. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 1996;14(8):2197-205.
58. Swenerton KD, Legha SS, Smith T, Hortobagyi GN, Gehan EA, Yap HY, et al. Prognostic factors in metastatic breast cancer treated with combination chemotherapy. Cancer Res. 1979;39(5):1552-62.
59. Clark GM, Sledge GW, Jr., Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. J Clin Oncol. 1987;5(1):55-61.
60. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. Br J Cancer. 2005;93(9):1046-52.
61. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. J Clin Oncol. 2008;26(18):3006-14.
62. Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N, et al. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2009;101(10):729-35.
63. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. J Natl Cancer Inst. 2021;113(7):808-19.
64. Li X, Wang M, Wang M, Yu X, Guo J, Sun T, et al. Predictive and Prognostic Roles of Pathological Indicators for Patients with Breast Cancer on Neoadjuvant Chemotherapy. J Breast Cancer. 2019;22(4):497-521.
65. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. Br J Cancer. 2007;96(10):1504-13.
66. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2007;99(2):167-70.
67. Aebi S, Karlsson P, Wapnir IL. Locally advanced breast cancer. Breast. 2022;62 Suppl 1(Suppl 1):S58-S62.
68. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LA, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. J Natl Cancer Inst. 2014;106(5).

69. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol. 1999;17(2):460-9.
70. Department of Error. Lancet. 2019;393(10175):986.
71. Qi Y, Wu H, Liu C, Zheng D, Yan C, Hu W, et al. Downstream Neighbor of Son Overexpression is Associated With Breast Cancer Progression and a Poor Prognosis. J Breast Cancer. 2022;25(4):327-43.
72. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. Clin Cancer Res. 2007;13(8):2329-34.
73. Dowling GP, Keelan S, Toomey S, Daly GR, Hennessy BT, Hill ADK. Review of the status of neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. Front Oncol. 2023;13:1066007.
74. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. Lancet Oncol. 2014;15(6):640-7.
75. van Ramshorst MS, van Werkhoven E, Mandjes IAM, Schot M, Wesseling J, Vrancken Peeters M, et al. Trastuzumab in combination with weekly paclitaxel and carboplatin as neo-adjuvant treatment for HER2-positive breast cancer: The TRAIN-study. Eur J Cancer. 2017;74:47-54.
76. Spring L, Niemierko A, Haddad S, Yuen M, Comander A, Reynolds K, et al. Effectiveness and tolerability of neoadjuvant pertuzumab-containing regimens for HER2-positive localized breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2018;172(3):733-40.
77. Kim IH, Lee JE, Youn HJ, Song BJ, Chae BJ. Cardioprotective Effect of Dexrazoxane in Patients with HER2-Positive Breast Cancer Who Receive Anthracycline Based Adjuvant Chemotherapy Followed by Trastuzumab. J Breast Cancer. 2017;20(1):82-90.
78. Ding W, Li Z, Wang C, Dai J, Ruan G, Tu C. Anthracycline versus nonanthracycline adjuvant therapy for early breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2018;97(42):e12908.
79. Masood S. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers. Womens Health (Lond). 2016;12(5):480-91.
80. van Ramshorst MS, van der Voort A, van Werkhoven ED, Mandjes IA, Kemper I, Dezentje VO, et al. Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2018;19(12):1630-40.
81. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2012;13(1):25-32.
82. Yang F, Yang Y, Qiu Y, Tang L, Xie L, Guan X. Long Non-Coding RNAs as Regulators for Targeting Breast Cancer Stem Cells and Tumor Immune Microenvironment: Biological Properties and Therapeutic Potential. Cancers (Basel). 2024;16(2).
83. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. Mol Cancer. 2019;18(1):155.
84. de la Cruz-Merino L, Chiesa M, Caballero R, Rojo F, Palazon N, Carrasco FH, et al. Breast Cancer Immunology and Immunotherapy: Current Status and Future Perspectives. Int Rev Cell Mol Biol. 2017;331:1-53.
85. Dalgleish AG, O'Byrne KJ. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. Adv Cancer Res. 2002;84:231-76.
86. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. Nat Rev Immunol. 2020;20(11):651-68.
87. Schatten S, Granstein RD, Drebin JA, Greene MI. Suppressor T cells and the immune response to tumors. Crit Rev Immunol. 1984;4(4):335-79.
88. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer. 2012;12(4):298-306.
89. Dutta S, Ganguly A, Chatterjee K, Spada S, Mukherjee S. Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors. Biology (Basel). 2023;12(2).

90. Johansson-Percival A, He B, Ganss R. Immunomodulation of Tumor Vessels: It Takes Two to Tango. Trends Immunol. 2018;39(10):801-14.
91. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. Genes Dev. 2018;32(19-20):1267-84.
92. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? Cancer Sci. 2019;110(7):2080-9.
93. Ma P, Beatty PL, McKolanis J, Brand R, Schoen RE, Finn OJ. Circulating Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) That Accumulate in Premalignancy Share Phenotypic and Functional Characteristics With MDSC in Cancer. Front Immunol. 2019;10:1401.
94. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. Immunology. 2013;138(2):105-15.
95. Iglesias-Escudero M, Arias-Gonzalez N, Martinez-Caceres E. Regulatory cells and the effect of cancer immunotherapy. Mol Cancer. 2023;22(1):26.
96. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. Front Immunol. 2020;11:583084.
97. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. Immunity. 2019;51(1):27-41.
98. Whiteside TL. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Role in Solid Tumor Progression. Exp Suppl. 2022;113:89-106.
99. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. Trends Cancer. 2016;2(12):747-57.
100. Downs-Canner SM, Meier J, Vincent BG, Serody JS. B Cell Function in the Tumor Microenvironment. Annu Rev Immunol. 2022;40:169-93.
101. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nat Rev Cancer. 2006;6(1):24-37.
102. Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. Nat Rev Immunol. 2004;4(3):190-8.
103. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003;299(5609):1057-61.
104. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. J Exp Med. 2011;208(3):469-78.
105. Tauriello DV, Calon A, Lonardo E, Batlle E. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. Mol Oncol. 2017;11(1):97-119.
106. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. Nat Med. 2009;15(8):893-900.
107. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. Br J Cancer. 2011;105(1):93-103.
108. Yoshioka T, Miyamoto M, Cho Y, Ishikawa K, Tsuchikawa T, Kadoya M, et al. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2008;98(7):1258-63.
109. Kondelkova K, Vokurkova D, Krejsek J, Borska L, Fiala Z, Ctirad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. Acta Medica (Hradec Kralove). 2010;53(2):73-7.
110. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. Nature. 2011;475(7355):226-30.
111. Gianchecchi E, Fierabracci A. Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression. Front Immunol. 2018;9:2374.
112. Xu M, Wang Y, Xia R, Wei Y, Wei X. Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. Cell Prolif. 2021;54(10):e13115.
113. Zhang Z, Guo J, Jia R. Treg plasticity and human diseases. Inflamm Res. 2023;72(12):2181-97.
114. Munhoz RR, Postow MA. Recent advances in understanding antitumor immunity. F1000Res. 2016;5:2545.

115. Henriques B, Mendes F, Martins D. Immunotherapy in Breast Cancer: When, How, and What Challenges? Biomedicines. 2021;9(11).
116. Hu X, Gu Y, Zhao S, Hua S, Jiang Y. Elevated Circulating CD4(+)CD25(-)Foxp3(+) Regulatory T Cells in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer. Cancer Biother Radiopharm. 2019;34(5):325-33.
117. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, et al. Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. Pancreas. 2012;41(3):409-15.
118. Hou F, Li Z, Ma D, Zhang W, Zhang Y, Zhang T, et al. Distribution of Th17 cells and Foxp3-expressing T cells in tumor-infiltrating lymphocytes in patients with uterine cervical cancer. Clin Chim Acta. 2012;413(23-24):1848-54.
119. Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, Remondo C, Migali C, Ginanneschi C, et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. J Immunother. 2010;33(4):435-41.
120. Ma K, Li X, Lv J, Liu Z, Zhang L, Cong H, et al. Correlations between CD4(+) FoxP3(+) Treg and expression of FoxM1 and Ki-67 in gastric cancer patients. Asia Pac J Clin Oncol. 2021;17(2):e63-e9.
121. Ning H, Shao QQ, Ding KJ, Gao DX, Lu QL, Cao QW, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells are positively correlated with angiogenic status in renal cell carcinoma. Chin Med J (Engl). 2012;125(12):2120-5.
122. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(9):1064-71.
123. Deng Y, Ma J, Tang D, Zhang Q. Dynamic biomarkers indicate the immunological benefits provided by Ganoderma spore powder in post-operative breast and lung cancer patients. Clin Transl Oncol. 2021;23(7):1481-90.
124. Ge Y, Domschke C, Stoiber N, Schott S, Heil J, Rom J, et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. Cancer Immunol Immunother. 2012;61(3):353-62.
125. Foulds GA, Vadakekolathu J, Abdel-Fatah TMA, Nagarajan D, Reeder S, Johnson C, et al. Immune-Phenotyping and Transcriptomic Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Breast Cancer: Identification of a 3 Gene Signature Which Predicts Relapse of Triple Negative Breast Cancer. Front Immunol. 2018;9:2028.
126. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Chan M, Hirakawa H, Suzuki A, et al. Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 2014;148(3):525-34.
127. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. Breast Cancer Res Treat. 2011;130(2):645-55.
128. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AH, Ellis IO, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2011;127(1):99-108.
129. Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M, et al. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2012;136(1):107-16.
130. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. Clin Cancer Res. 2008;14(8):2413-20.
131. Stenstrom J, Hedenfalk I, Hagerling C. Regulatory T lymphocyte infiltration in metastatic breast cancer-an independent prognostic factor that changes with tumor progression. Breast Cancer Res. 2021;23(1):27.
132. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J Clin Oncol. 2006;24(34):5373-80.
133. Zhou L, Wang J, Lyu SC, Pan LC, Shi XJ, Du GS, et al. PD-L1(+)NEUT, Foxp3(+)Treg, and NLR as New Prognostic Marker with Low Survival Benefits Value in Hepatocellular Carcinoma. Technol Cancer Res Treat. 2021;20:15330338211045820.

134. Liang Y, Lu W, Zhang X, Lu B. Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. Diagn Pathol. 2018;13(1):93.