



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HER2-POZİTİF MEME KANSERİNDE
PD-L1 EKSPRESYONU VE CD8-POZİTİF T
HÜCRE İNFİLTRASYON ORANININ
NEOADJUVAN TEDAVİ SONRASI
PATOLOJİK TAM YANITLA İLİŞKİSİ**

KENAN ÇETİN

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. ÜLKAN KILIÇ**

**MOLEKÜLER ONKOLOJİ ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2023**

İTHAF

“Bu tezi doktora yaptığım esnada kanserden kaybettiğim canım babam Ahmet Çetin’e ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda bilgisi ve tecrübesi ile destek, akademik başarıları ile bana örnek olan değerli tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Ülkan Kılıç'a,

Ülkemizde bir ilki gerçekleştirerek Moleküler Onkoloji doktora programını açan ve benim bu alanda doktora yapmama vesile olan anabilim dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Mustafa Duman ile Prof. Dr. Erdal Polat hocalarıma,

Çalışmamdaki doku örneklerini temin etmeme ve sonuçları değerlendirmeme yardımcı olan Sn. Prof. Dr. Nagehan Özdemir Barışık ve Sn. Uzm. Dr. Şermin Köktene,

2017 yılında açılan doktora programımızın ilk öğrencisi olmanın verdiği gurur ile doktora sürecinde derslerimize giren tüm hocalarımıza, bu süreci keyifli hale getiren dönem arkadaşı meslektaşlarıma ve tez süresince bana çok fazla yardımı dokunan Sn. Bahar Sarıkamış'a,

Dualarını ve desteklerini esirgemeyen annem ve babama,

Doktora sürecinde onlarla geçireceğim zamandan feragat etsem de beni her daim destekleyen ve hoşgörülü davranan eşim Doç. Dr. Nagihan İmer Çetin ve biricik kızım Nida Çetin'e,

Gönülden teşekkür ederim.

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2022/033

Dr. Kenan ÇETİN

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MEME KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ	3
2.2. MEME KANSERİ SUBTİPLERİ	3
2.2.1. Histopatolojik Subtipler.....	3
2.2.1.1. İnfiltratif duktal karsinom:.....	3
2.2.1.2. İnfiltratif lobüler karsinom:	4
2.2.1.3. Mikst duktal/lobüler karsinom:.....	5
2.2.2. Moleküler Subtipler	5
2.2.2.1. Luminal subtipler:.....	5
2.2.2.2. HER2 zengin subtip:.....	5
2.2.2.3. Triple negatif subtipler:	6
2.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİ.....	6
2.3.1. Cerrahi Tedavi	6
2.3.2. Radyoterapi	6
2.3.3. Kemoterapi.....	7
2.3.4. Hormon Tedavisi	7
2.3.5. Hedeflenmiş Tedaviler.....	7
2.3.5.1. Trastuzumab (Herceptin):	7
2.3.5.2. Pertuzumab (Perjeta):	7
2.3.5.3. Ado-Trastuzumab Emtansine (Kadcyla):	7
2.3.6. İmmünoterapi.....	8
2.4. TÜMÖR VE İMMÜNİTE	8
2.4.1. Tümör ve İmmün Düzenlenme	10
2.4.2. İmmün Kontrol Noktaları	11
2.4.3. CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL)	12

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. ÇALIŞMA KOHORTU.....	13
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER.....	14
3.2.1. TİL'lerin immünohistokimyasal değerlendirilmesi.....	14
3.2.2. PD-L1'in immünohistokimyasal boyama ve değerlendirmesi.....	15
3.2.3. CD8-Pozitifliğinin immünohistokimyasal boyama ve değerlendirmesi.....	19
3.3. İSTATİSTİK.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. ÇALIŞMA KOHORTU.....	22
4.1.1. Kohortun neoadjuvan tedavi öncesi demografik ve klinikopatolojik özellikleri.....	22
4.1.2. Kohortun neoadjuvan tedavi öncesi TIL, PDL-1 ve CD8 ekspresyon durumu.....	24
4.1.3. Kohortun neoadjuvan tedavisi, uygulanan cerrahi prosedür ve patolojik yanıt durumu.....	25
4.2. KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİN NEOADJUVAN TEDAVİYE YANIT İLE İLİŞKİSİ.....	27
4.2.1. Klinikopatolojik parametrelerin yanıt ile ilişkisi.....	27
4.2.2. Klinikopatolojik parametrelerin pCR ile ilişkisi.....	28
4.3. KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİN PD-L1 EKSPRESYONU İLE İLİŞKİSİ..	29
5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR.....	36
EK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Çalışma kohortunun demografik ve klinikopatolojik özellikleri.....	23
Tablo 4.2: Kohortun neoadjuvan tedavi öncesi TIL, PDL-1 ve CD8 ekspresyon durumu	24
Tablo 4.3: Kohortun neoadjuvan tedavisi, uygulanan cerrahi prosedür ve patolojik yanıt durumu	26
Tablo 4.4: Klinikopatolojik parametrelerin neoadjuvant tedaviye yanıt ile ilişkisi.....	27
Tablo 4.5: Klinikopatolojik parametrelerin neoadjuvant tedaviye patolojik tam yanıt ile ilişkisi.....	28
Tablo 4.6: Klinikopatolojik parametrelerin neo adjuvant tedaviye patolojik tam yanıt ile ilişkilerinin uni varyans ve multivaryans analizleri.....	29
Tablo 4.7: Klinikopatolojik parametrelerin PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisi.....	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İmmün sistemin tümör antijenlerine yanıtı	8
Şekil 2.2: Antijen sunan hücre ve T lenfosit yüzeyinde immün yanıtın aktivasyonu ya da inhibisyonunun belirlenmesinde rol alan reseptörler.....	10
Şekil 2.3: İmmün-Gözetim Modeli	11
Şekil 2.4: CTLA-4 ve PD-L1 etki mekanizmaları.....	12
Şekil 3.1: H&E ile boyalı meme kanseri tru-cut (core) biyopsi kesitleri(X40)	15
Şekil 3.2: Meme kanseri dokusunda tümör hücrelerinde PD-L1 immün boyama görüntüsü (X40).....	16
Şekil 3.3: Meme kanseri stromasında tümörü infiltre eden lenfositlerin PD-L1 immün boyama görüntüsü (X40).	17
Şekil 3.4: Meme kanseri dokusunda hem tümör hücrelerinde hem de stromadaki lenfositlerde PD-L1 immün boyama görüntüsü (X40).....	18
Şekil 3.5: Meme kanseri stromasında tümörü infiltre eden CD8 lenfositlerin immün boyama görüntüsü (X40).	20

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	: Doksorubisin + Siklofosfamid tedavisi
AD	: Aksiller diseksiyon
ADCC	: Antikor bağımlı hücresel sitotoksiste
APC	: Antigen presenting cell- Antijen sunan hücre
AR	: Androjen reseptörü
ATM	: Ataksi Telenjektazi Mutated
BBA	: Büyük büyütme alanı
BRCA	: Breast cancer susceptibility
CAP	: College of American Pathologists
CDH1	: Catherin 1
CHEK2	: Checkpoint kinaz 2
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
CTLA-4	: Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4
DCIS	: İn situ duktal karsinom
ER	: Estrogen Receptor -Östrojen reseptörü
HER2	: Human epidermal growth factor receptor 2
H&E	: Hematoksilen-Eozin
IFN-γ	: İnterferon gamma
IHC	: İmmünohistokimya
KT	: Kemoterapi
LCIS	: İn situ lobüler kanser
IL	: İnterlökin
MDCS	: Myeloid kökenli süpressör hücreler
MHC	: Majör histocompatibility complex
NK	: Natural killer cell – doğal öldürücü hücre
PALB2	: BRCA2 Ortağı ve Yerini Belirleyicisi
pCR	: Tam patolojik yanıt
PD-1	: Programlanmış hücre ölümü-1
PD-L1	: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1

PR	: Progesteron reseptörü
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
T	: Docketaksel tedavisi
TCR	: T hücre reseptörü
TDM-1	: Trastuzumab-Emtansine
Th	: Yardımcı T hücresi
Thf	: Foliküler yardımcı T hücresi
TGF-β	: Transforming growth factor-β
TİL	: Tümör İnfiltratif Lenfositler
Treg	: Regülatuar T hücre
SISH	: Silver in-situ hibridizasyon
SLNB	: Sentinel lenf nodu biyopsisi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ypN	: Neoadjuvan sonrası aksillanın durumu

HER2-POZİTİF MEME KANSERİNDE PD-L1 EKSPRESYONU VE CD8-POZİTİF T HÜCRE İNFİLTRASYON ORANININ NEOADJUVAN TEDAVİ SONRASI PATOLOJİK TAM YANITLA İLİŞKİSİ

ÖZET

Amaç: Neoadjuvan sonrası patolojik tam yanıt (pCR), HER2-pozitif meme kanserli hastalarda, nüks riskinin düşük olduğu ve sağ kalım avantajı sağlandığını öngören en önemli prognostik göstergedir. Bu nedenle, pCR oranlarını arttırmak ve pCR elde edilemeyen hastalarda rekürrens riskini azaltacak yeni tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Çalışmamızın amacı HER2+ meme kanserlerinde neoadjuvan tedaviye yanıtı öngören klinikopatolojik parametreleri araştırmak ve bağışıklık sisteminin rolünü daha iyi anlamak için tümörü infiltre eden lenfositlerin (TIL), CD8+ T lenfositlerin ve PD-L1 ekspresyonunun rolünü irdelemektir.

Gereç ve Yöntem: Retrospektif çalışmamız, HER2 (+) meme kanseri tanısı alan ve neoadjuvan tedavi sonrası cerrahi uygulanan, parafin blokları immünohistokimyasal çalışmalar ile PD-L1 ekspresyonu ve CD8+ TIL sayısı değerlendirilmeye uygun 85 hasta ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: 43 (%50,6) hastada memede pCR saptandı ve yüksek Ki67 indeksi, orta-yüksek TIL infiltrasyonu, PDL-1 pozitifliği, yüksek CD8 hücre sayısı (≥ 25), ypN-negatifliği pCR ile ilişkili bulundu (sırası ile, p:0,05, p: 0,007, p: 0,01, p:0,001, p:0,001). Çoklu regresyon analizinde ypN(-) [OR (%95CI): 9,7(2,62-35,95), p:0,001] ve yüksek CD8 hücre infiltrasyonu [OR (%95CI): 4,8(1,01-22,43), p:0,049] memede pCR için bağımsız öngörücüler olarak belirlendi.

Sonuç: CD8+ T lenfositlerinin önceden belirlenmesi ve hastalarda CD8+ yanıtını arttırıcı stratejiler geliştirilmesi pCR'yi elde etmede yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca HER2+ meme kanserli hastalarda neoadjuvan tedavi sonrası yapılacak sentinel lenf nodu biyopsisiyle ypN0 saptanması meme cerrahına memedeki primer tümörde olası pCR için yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: CD8, HER2+ meme kanseri, Neoadjuvan tedavi, Öngörücüler, Patolojik tam yanıt, PD-L1

THE ASSOCIATION OF PD-L1 EXPRESSION AND CD8-POSITIVE T CELL INFILTRATION RATE WITH THE PATHOLOGICAL COMPLETE RESPONSE AFTER NEOADJUVANT TREATMENT IN HER2-POSITIVE BREAST CANCER

ABSTRACT

Aim: Achieving a pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients is the most significant prognostic indicator suggesting a low risk of recurrence and a survival advantage. Therefore, efforts are continuously being made to increase pCR rates and develop new treatment strategies that will reduce the risk of recurrence in patients who cannot achieve pCR. The aim of our study is to investigate the clinicopathological parameters that predict response to neoadjuvant therapy in HER2+ breast cancers and to examine the role of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), CD8+ T lymphocytes and PD-L1 expression in order to better understand the role of the immune system.

Materials and Methods: Our retrospective study involved 85 patients with HER2-positive breast cancer who underwent surgery following neoadjuvant therapy and whose paraffin blocks were suitable for immunohistochemical studies.

Results: In the pCR group (n:43; 50.6%), high Ki67 index, medium-high TIL infiltration, PD-L1 positivity, high CD8 cell count (≥ 25), and ypN-negativity were significantly higher than in the non-pCR group (p: 0.05, 0.007, 0.01, 0.001, 0.001, respectively). Multiple regression analysis identified ypN(-) [OR(95% CI): 9.7(2.62-35.95), p: 0.001] and high CD8 cell infiltration [OR(95% CI): 4.8(1.01-22.43), p: 0.049] as independent predictors for pCR in the breast.

Conclusion: Pre-identification of CD8+ cells, a subset of TILs, and the development of strategies to enhance CD8+ response could be beneficial in achieving pCR. Additionally, determining ypN0 with Sentinel Lymph Node Biopsy after neoadjuvant treatment in HER2+ breast cancer patients can guide the breast surgeon for potential pCR in the breast.

Key Words: CD8, HER+ breast cancer, Neoadjuvant treatment, Pathological complete response, PD-L1, Predictors

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Global olarak, meme kanseri her yıl iki milyondan fazla vaka ile en sık teşhis edilen malignitedir (1). Aynı zamanda dünya genelinde kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Meme kanseri farklı tümör biyolojileri ve davranışları sergileyen farklı subtiplerden oluşan heterojen bir hastalık grubudur. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'u insan epidermal büyüme faktör reseptör-2'yi (HER2) aşırı eksprese ederler (2). HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanserleri kemoterapi ile birlikte verilen hedefe yönelik (anti-HER2 ajanlar) neoadjuvan tedaviler ile patolojik tam yanıt (pCR) elde etme oranları %46-66 arasında değişmektedir (3,4). Neoadjuvan kemoterapiye yanıtın HER2-pozitif meme kanserli hastalarda prognostik önemi vardır. Neoadjuvan sonrası pCR nüks riskinin düşük olduğu ve sağ kalım avantajı sağlandığını öngören en önemli prognostik göstergedir (5). Bu nedenle, sürekli olarak, pCR oranlarını arttırmak ve pCR elde edilemeyen hastalarda rekürrens riskini azaltacak yeni tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. pCR oranını artırmak için trastuzumab + kemoterapiye 2020 yılında pertuzumab eklendi. Yine de hala neoadjuvan tedavi ile progresyon gösteren ve prognozu kötü olan %25'lik bir hasta grubu vardır (6). Bu nedenle, bu tedaviden kimlerin fayda göreceğini tahmin etmek için doğru ve güvenilir bir biyobelirteç bulmaya acil ihtiyaç vardır.

Neoadjuvan HER2-hedefe yönelik tedaviler ile pCR elde edilemeyen hastaların adjuvan tedavisinde ise trastuzumab - emtansine (TDM-1) yeni molekülü ile sadece trastuzumab adjuvan tedavisine kıyasla %11'lik bir 3 yıllık hastalıksız sağ kalım avantajı elde edildi (7).

HER2-pozitif meme kanserinin tedavisinde pCR, önemli prognostik bir belirteç olması dışında cerrahi sonrası adjuvan tedaviyi belirlemesi açısından da değeri giderek artmıştır. Bu nedenle pCR'yi elde etmede tümörü infiltre eden lenfositlerin (TIL) ve immün yanıtın oynadığı rolü anlamak klinik açıdan önemlidir.

Tümör mikro çevresinde bulunan immün hücreler tümörü infiltre eden lenfositler (TIL) olarak adlandırılırlar. Bu lenfositler diğer birçok kanser türünde olduğu gibi HER2-pozitif meme kanserinde de immünite aracılı tümör-konak etkileşimi ve antikor bağımlı hücrel sitotoksikite (ADCC) aracılığı ile anti-tümöral

etki gösterdikleri düşünülmektedir (8,9). Başlangıçta yüksek TIL değerlerine sahip hastaların neoadjuvan tedavide bir anti-HER2 monoklonal antikör olan trastuzumab yanıtlarının iyi olduğunu bildiren çalışmalar vardır (10-12). Ancak başka bir çalışmada yüksek TİL'in tedaviye yanıtı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (13). Sonuç olarak HER2-pozitif meme kanseri hastalarında TİL'in neoadjuvan trastuzumab + kemoterapi üzerindeki etkileri hala açıklığa kavuşturulmamıştır.

Programlanmış ölüm-ligandı 1 (PD-L1) çeşitli tümör hücrelerinde ve immün hücrelerde bulunan, tümör immün supresyonuna aracılık eden ve tümör hücresi immün kaçıışı ile bağlantılı olan bir B7 immün molekül transmembran proteindir. Araştırmalar trastuzumab'ın HER2-pozitif meme kanserinde CD8+ T hücrelerinde ve kanser hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermektedir (14,15). Trastuzumab HER2 inhibisyonu yolu ile PD-L1'in kanser hücreleri üzerindeki etkilerini azaltabileceği bildirildi (14). Ayrıca, PANACEA çalışması, trastuzumab'ın tümör aracılı immün supresyonu tersine çevirebileceği ve lokal anti-tümörojenik immün etkisini aktive edebileceği hipotezini de önerdi (16).

Bu çalışmanın amacı HER2+ meme kanserlerinde neoadjuvan tedaviye yanıtı öngören klinikopatolojik parametreleri araştırmak ve bağışıklık sisteminin rolünü daha iyi anlamak için TİL'in, CD8+ T lenfositlerin ve PD-L1 ekspresyonunun rolünü irdelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Meme kanseri düşük ve orta gelirli ülkeler de dahil olmak üzere dünya genelinde en sık tanı alan kanser türüdür (1). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konmuş ve yine aynı yıl 685 000 kadın meme kanserine bağlı hayatını kaybetmiştir. Bu global sorun kadınlarda ileri yaşlarda artan bir sıklıkta ortaya çıksa da ergenlik sonrası herhangi bir yaşta görülebilmektedir. İnsidansının en yüksek olduğu bölgeler Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda, Batı ve Kuzey Avrupa iken en düşük Asya ve Sahra Altı Afrika'dır (17). Bu heterojenite muhtemelen sanayileşmenin bir sonucu olarak toplumsal farklılıklar ile ilgilidir.

Meme kanseri ölüm oranları 1970'lerden beri azalmaktadır (18). Mortalitedeki bu azalma, meme kanserinde gelişen tarama yöntemleri ve adjuvan tedaviler ile açıklanmaktadır (19,20). Mamografi ile meme kanseri taramasına katılan ve meme kanseri tespit edilen 40 ile 69 yaş arası kadınlarda katılmayanlara göre tanı sonrası 10 yıllık meme kanserine bağlı ölüm oranı %60, 20 yıllık ise %47 daha düşük bulunmuştur (21).

2.2. MEME KANSERİ SUBTİPLERİ

2.2.1. Histopatolojik Subtipler

Mikroskopik görünüm ve biyolojik davranış bakımından farklılıklar gösteren çeşitli histolojik meme kanseri türleri vardır (22). Epitelyal meme karsinomunun en yaygın histolojik tipleri aşağıda açıklanmıştır.

2.2.1.1. İnfiltratif duktal karsinom: İnfiltratif duktal karsinomlar, invaziv lezyonların yüzde 70 ila 80'ini oluşturan en yaygın invaziv meme kanseri türüdür.

İnfiltratif duktal karsinomlar, yapısal ve sitolojik özelliklerin bir kombinasyonuna dayalı olarak üç dereceye ayrılır ve genellikle üç parametreye (tübülüslerin oranı, nükleer özellikler ve 10 büyük büyütme alanında saptanan mitoz

sayısı) dayalı bir skorlama sistemi (Modifiye Bloom Richardson) kullanılarak değerlendirilir (23). Çoğu vakada değişen miktarda DCIS da eşlik eder. DCIS'ın yaygınlığı, meme koruyucu cerrahi ile tedavi edilecek hastalarda önemli bir prognostik faktördür (24). Çünkü cerrahide amaç hem intraduktal hem de invazif karsinomun tamamen çıkarılmasıdır. ER, PR, HER2 ekspresyon durumu ve evre gibi faktörler prognozu belirlerken bu grubun 10 yıllık sağ kalımı %35-50 civarındadır. Vakaların %70-80'inde ER ve/veya PR, %15'inde HER2 pozitifliği görülmektedir. Her üçünü de eksprese etmeyen (triple negatif) ve HER2 eksprese eden moleküler alt-tiplerin kötü prognozlu oldukları saptanmıştır (25).

2.2.1.2. İnfiltratif lobüler karsinom: İnfiltratif lobüler karsinomlar, invaziv lezyonların yaklaşık %5-10'unu oluşturan ikinci en yaygın meme kanseri türüdürler. Bu tümörler, mikroskopik olarak meme stromasını ve adipoz dokuyu ayrı ayrı ve tek sıra halinde infiltre eder, genellikle normal meme duktusları çevresinde hedef benzeri bir konfigürasyonda büyüyen ve sıklıkla fibröz bir yanıtı indüklemiş küçük hücreler ile karakterize edilirler. LCIS vakaların yaklaşık üçte ikisinde mevcut iken DCIS da infiltratif lobüler karsinoma eşlik edebilir.

Farklı histolojik görünüm ve mamografik özelliklerine ek olarak, infiltre lobüler ve duktal kanserler arasında belirgin prognostik ve biyolojik farklılıklar vardır: 1. İnfiltratif lobüler karsinomlar, infiltre duktal karsinomlardan daha yüksek bir bilateralite ve multisentrisite sıklığına sahiptir (26,27). 2. İnfiltratif lobüler karsinomlar daha ileri yaştaki kadınlarda ortaya çıkar ve daha büyük ve daha iyi diferansiye tümörlerdir (28). Kural olarak östrojen reseptörü (ER)-pozitiflerdir. 3. Eski seriler, invaziv lobüler ve invaziv duktal kanserler için benzer bir prognoz bildirirken, yeni seriler, sonuçların (en azından kısa vadede) lobüler kanserler için daha olumlu olabileceğini ve zamanla düzelebileceğini öne sürmektedir (29,30). Bununla birlikte, bazıları daha kötü prognoza sahip olan infiltre lobüler karsinomun varyantları da mevcuttur (26). 4. İnvazif lobüler kanserler invazif duktal kanserlerden daha geç metastaz yapma eğilimindedirler. Periton, meninksler ve gastrointestinal sistem gibi olağan dışı yerlere yayılırlar (31).

Kadherin (CDH1) genindeki mutasyonlar ile invaziv lobüler meme kanserleri arasında bir ilişki vardır. CDH1 geninde germline mutasyonları taşıyan herediter diffüz mide kanserli ailelerdeki kadınların yüzde 20 ila 54'ünde lobüler meme

kanserlerinin meydana geldiği gözlemlenmiştir. CDH1'e ek olarak ATM, BRCA2, CHEK2 ve PALB2 patojenik varyantlarında da artmış invazif lobüler kanser riski ile ilişkili olduğu bildirilirken BRC1 patojenik varyantlarında ilişkili saptanamamıştır (32). Ayrıca invazif lobüler kanserlerin yarısından fazlası fosfatidilinositol 3-kinaz yolunun üç anahtar geninden biri olan PIK3CA, PTEN ve AKT1'de değişiklikler içerir (33) ve sporadik lobüler meme kanserlerinin yaklaşık %50'si E-kadherin mutasyonları taşır (34).

2.2.1.3. Mikst duktal/lobüler karsinom: Hem duktal hem de lobüler özellikler içeren mikst bir histolojik görünüme sahiptirler. Bunlar invaziv meme kanserlerinin %7'sini oluşturur.

Diğer histolojik meme kanseri türleri arasında metaplastik, müsinöz, tübüler, medüller ve papiller karsinomlar bulunur. Birlikte, invaziv kanserlerin %5'inden azını oluştururlar.

2.2.2. Moleküler Subtipler

Gen ekspresyon profillerine dayalı olarak, aşağıdaki moleküler alt tipler tanımlanmıştır.

2.2.2.1. Luminal subtipler: Luminal subtipler luminal A ve B olarak karakterize edilirler. Meme kanserinin en yaygın alt tipleridir ve östrojen (ER) pozitif meme kanserlerinin çoğunluğunu oluştururlar. "Luminal" adı, bu tümörler ile memenin lümen epiteli arasındaki gen ekspresyonundaki benzerlikten türemiştir. Tipik olarak sitokeratin 8 ve 18'i eksprese ederler. Luminal A alt tipi östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif olan, HER2 negatif ve düşük proliferasyon hızına sahip tümörleri içerir. Luminal A tümörleri genellikle daha yavaş büyüme eğilimindedir ve daha iyi prognoza sahiptir. Luminal B tümörleri de ER ve/veya PR pozitifdir, ancak Luminal A tümörlerine göre daha yüksek proliferasyon hızına sahiptir. Ayrıca, bazı Luminal B tümörleri HER2 pozitif olabilir. Luminal B tümörleri genellikle daha agresif bir seyir gösterebilir.

2.2.2.2. HER2 zengin subtip: Bu alt tip, HER2 geninin aşırı ifadesi veya amplifikasyonu nedeniyle HER2 pozitif olan tümörleri içerir. Bu tümörler hızlı büyüme eğiliminde olabilir ve özel hedefli tedavilere yanıt verebilirler.

2.2.2.3. Triple negatif subtipler: Bu alt grup Basal-Like ve Non-Basal-Like diye ikiye ayrılır. Triple negatif tümörler, ER, PR ve HER2'nin hiçbirini ifade etmez. Bu tür tümörlerin bazıları "bazal benzeri" özelliklere sahiptir ve genellikle agresif bir seyir izlerler. Diğer bazal benzeri olmayan triple negatif tümörler, bazal benzeri özellikler göstermeyebilir ancak hala ER, PR ve HER2 negatiftir. Bu tür tümörler moleküler olarak daha heterojen olabilir.

2.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİ

Meme kanseri tedavisi, hastanın tümörünün özellikleri, evresi ve moleküler alt tipi dikkate alınarak özelleştirilmiş bir yaklaşım gerektirir. Tedaviler genellikle çeşitli yöntemlerin kombinasyonunu içerir. Bunlar arasında cerrahi müdahale, radyoterapi, hormonal terapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler bulunmaktadır. Tümörün türü, boyutu, evresi, hormon reseptörlerinin ve HER2 ifadesinin varlığı, hastanın yaşının yanı sıra in-situ karsinomun varlığı, lenf nodu ve uzak metastaz durumu gibi faktörlere bağlı olarak, tedavi planı ve yöntemleri kişiye özgü şekillerde belirlenir.

2.3.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavide terapötik etki için tümörlü dokunun tamamının çıkarılması gerekir. Lumpektomi (kısmi meme çıkarılması) veya mastektomi (tüm meme çıkarılması) gibi yöntemler kullanılabilir. Meme kanseri cerrahisinde aynı taraf aksiller lenf nodları da mutlaka değerlendirilmeli, metastatik olanlar eksize edilmelidir. Mastektomi sonrası, meme rekonstrüksiyonu ile meme görünümünün geri kazanılması mümkündür. Bu, implant veya doku transferi gibi yöntemlerle yapılabilir.

Sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB), meme kanseri hastalarında lenf nodu metastazının belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir cerrahi prosedürdür. SLNB, kanserin lenf nodlarına yayılma durumunu daha az invaziv bir yöntemle değerlendirmeyi sağlar.

2.3.2. Radyoterapi

Radyoterapi, yüksek enerjili ışınlar kullanarak kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlar. Cerrahi sonrası veya kemoterapiyle birlikte kullanılabilir.

2.3.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerini yok etmek veya büyümelerini engellemek için ilaçların kullanılmasını içerir. Sistemik olarak vücuda verilir ve tüm vücuttaki kanser hücrelerini hedefler. Meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi rejimleri, hastanın genel sağlık durumuna, tümörünün özelliklerine, evresine ve moleküler alt tipine göre değişebilir. En yaygın kullanılan kemoterapi rejimleri; Doksorubisin ve Siklofosfamid (AC), Doketaksi ve Siklofosfamid (TC), Doketaksi, Doksorubisin ve Siklofosfamid (TAC), Siklofosfamid, Metotreksat ve 5-Fluorourasil (CMF), taxanlar (Paclitaxel veya Doketaksi) ve Capecitabine'dir.

2.3.4. Hormon Tedavisi

Hormon tedavisi, östrojen veya progesteron reseptörleri pozitif tümörlere sahip hastalarda kullanılır. Hormon reseptör pozitif tümörler, hormonların büyümeyi uyarabileceği anlamına gelir. Hormon tedavisi, hormon üretimini engelleyerek veya hormon reseptörlerini bloke ederek çalışır. En sık kullanılan ajanlar selektif östrojen reseptör blokörleri ve aromataz inhibitörleridir.

2.3.5. Hedeflenmiş Tedaviler

Kanser hücrelerini doğrudan hedef alarak normal hücrelere daha az zarar verirler. En sık kullanılanlar HER2 pozitif tümörlere yönelik olanlardır:

2.3.5.1. Trastuzumab (Herceptin): HER2 reseptörüne bağlanarak kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engellemeye çalışır. Bunu HER2 reseptörlerine bağlanarak; 1. HER2 reseptör dimerizasyonunu engeller, 2. HER2 reseptör degradasyonunu artırır, 3. Antikor bağımlı hücrel sitotoksiteye aracılık ederek yapar. Genellikle diğer tedavi yöntemleriyle kombinasyon halinde kullanılır.

2.3.5.2. Pertuzumab (Perjeta): Pertuzumab, HER2 pozitif meme kanseri tedavisinde trastuzumab ile kullanılan bir başka hedefe yönelik ilaçtır. Bu kombinasyon, HER2 reseptörlerinin HER3 reseptörleri ile heterodimer oluşturmalarını engeller.

2.3.5.3. Ado-Trastuzumab Emtansine (Kadcyla): Bu ilaç, trastuzumab ve sitotoksik bir ajan olan emtansine'nin kombinasyonudur. Trastuzumab, kanser

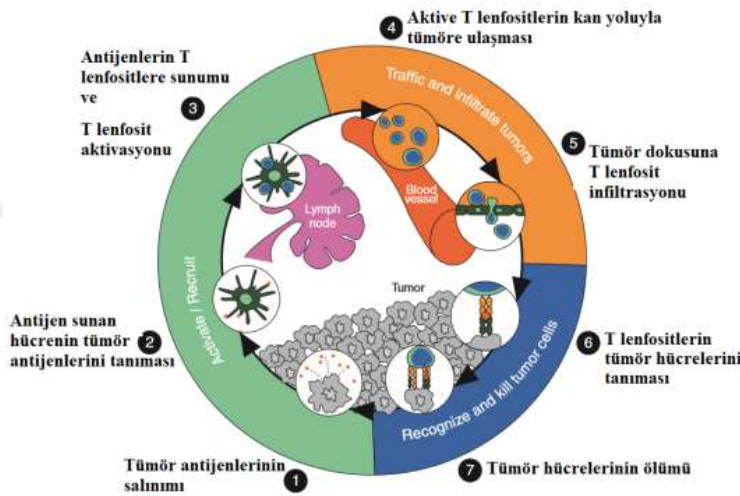
hücrelerine bağlanarak sitotoksik ajanın hedefe taşınmasını sağlar, böylece kanser hücrelerine daha spesifik olarak etki eder.

2.3.6. İmmünoterapi

PD-L1 veya PD-1 gibi immün hücreleri baskılayan sinyal yollarını hedefleyen ilaçlar, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı daha etkili olmasını sağlarlar. Triple negatif ve HER2 pozitif alt tiplerde PD-L1 ifadesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu hasta grupları immünoterapiye adaydırlar. Son zamanlarda anti-PD-1 (pembrolizumab) ve anti-PD-L1'in (atezolizumab) triple negatif meme kanseri tedavisi için FDA onayı almıştır (35).

2.4. TÜMÖR VE İMMÜNİTE

Kanser, tümör hücrelerinin büyümesinin onkojenik sürücülerini aktive eden mutasyonlarla başlatıldığı genetik bir hastalıktır. Bu süreç, tümörlerin çoğalmasını destekleyen veya baskılayan genlerin genetik veya genetik olmayan aktivasyonu veya inaktivasyonu ile birleşir. Birçok kanserde onkogeneze, mutasyon birikimiyle birlikte görülür; bu, kanser hücrelerinin genetik çeşitlilik derecesini artırarak evrimsel uygunluklarını hızlandırarak kanser hücre topluluklarına seçici bir avantaj sağlayabilir. Ancak bu çeşitlilik bir maliyete sahiptir: Kanser hücresi, normal bir hücreden ne kadar çok uzaklaşırsa, bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak tanınma olasılığı o kadar artar (36).



Şekil 2.1: İmmün sistemin tümör antijenlerine yanıtı (37).

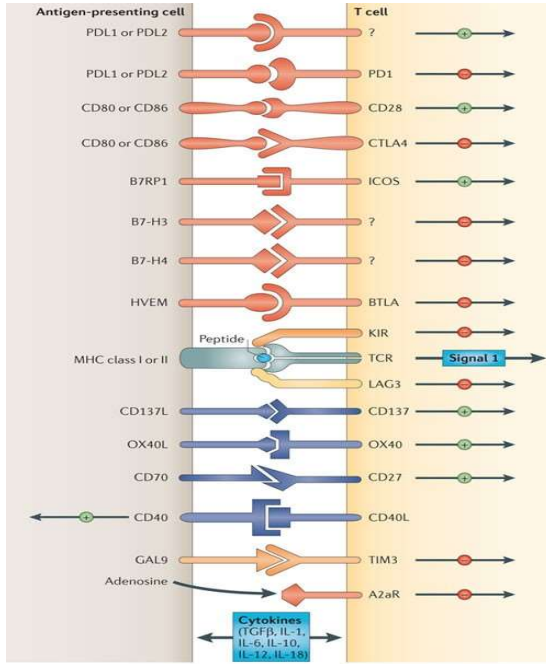
Tümör, insan vücudundaki bir hücreden türemiş olsa da genetik mutasyonlar sonucu farklı antijenler ürettiği için bağışıklık tepkisine yol açar. Tüm çekirdekli hücreler gibi, "majör histocompatibility complex" (MHC) -I moleküllerini de üretirler. Bu reseptörü tanıyan CD8⁺ sitotoksik T lenfositler (CTL), anti-tümöral yanıtın ana rolünü üstlenirler (36).

Tümörün immün sistem tarafından tanınması bir dizi adımı içerir (Şekil 2.5). Tümör kaynaklı antijenler öncelikle dentritik hücreler, makrofajlar gibi antijen sunan hücreler (APC) tarafından tanınır, işlenir ve daha sonra lenf nodlarına taşınır. APC, hem MHC-I hem de MHC-II ile olgunlaşmamış CD8⁺ T hücreleri ve CD4⁺ yardımcı T (T helper- Th) hücrelerine antijen sunar. APC'deki MHC ve T hücre yüzeyindeki T hücre reseptörünün (T cell receptor- TCR) etkileşimi ilk sinyali oluşturur; ancak antijenin tanınması için ikinci bir sinyale ihtiyaç vardır. Bu ikinci sinyal, B7-CD28 etkileşimiyle sağlanır. TCR ve ikinci sinyal yoluyla T lenfositler aktive olur (Şekil 2.6). Eğer immünolojik bir yanıt gerekiyorsa, interlökin (IL) -2'nin etkisiyle çoğalmaya başlarlar. Artan aktive lenfositler, hedeflenen antijeni tanır ve başlıca rolü olan CD8⁺ CTL'ler (sitotoksik T lenfositler) hedef hücreleri doğrudan perforin, granzim gibi enzimler aracılığıyla etkiler. CD4⁺ T lenfositleri de sitokinler aracılığıyla CD8⁺ CTL'lerin aktivasyonunu destekler (38,39).

Sadece CD8⁺ CTL yanıtı, anti-tümöral etkiye yetersiz kalır. Bunun yanı sıra, doğal öldürücü hücreler (NK) normal hücreler tarafından ifade edilmeyen molekülleri tanıma yeteneğine sahiptir; ayrıca MHC-I molekülünün kaybolması durumunda devreye girerek anti-tümöral etki gösterir (38).

CD4⁺ T lenfositler iki farklı şekilde etki eder. Regülatör T (Treg) ve Th2 lenfositleri, immün yanıtın baskılanmasında görev alırken, Th1 lenfositleri anti-tümöral yanıtı güçlendirmeye yardımcı olur. Th17 lenfositlerinin etkileri henüz tam olarak anlaşılmamıştır; fakat tümör türüne ve organa bağlı olarak yanıtın değişebileceği gözlemlenmiştir. T-foliküler yardımcı (Tfh) lenfositlerinin varlığı da olumlu klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (40).

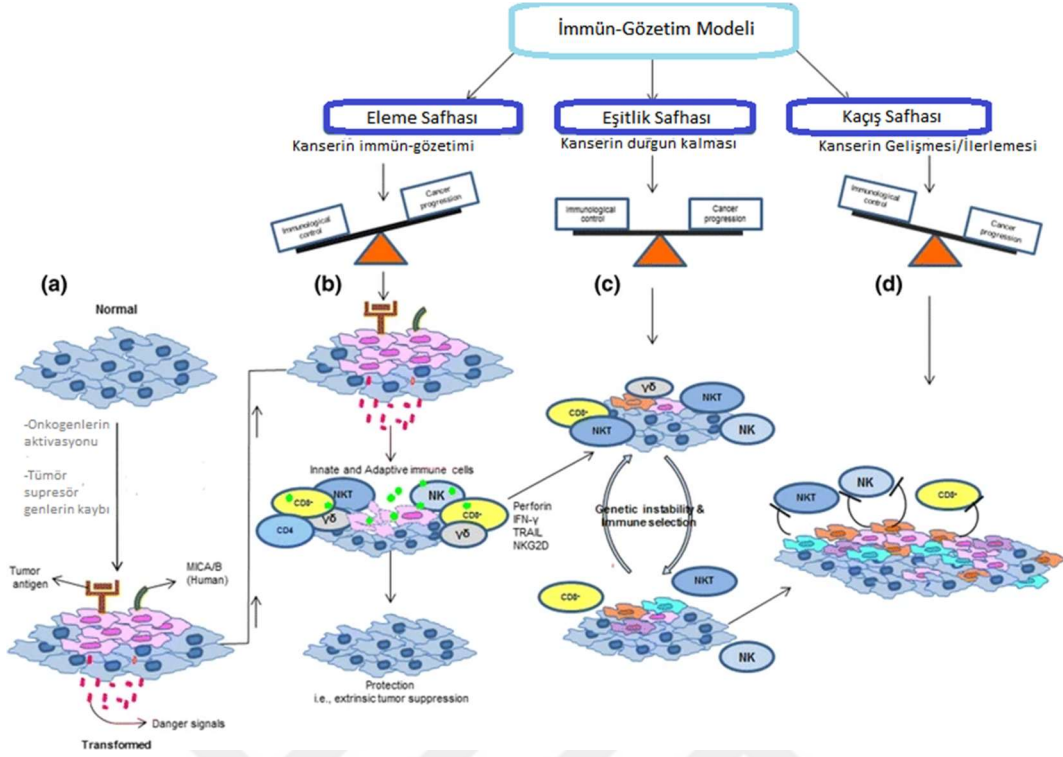
B lenfositleri, antikorlar aracılığıyla kompleman yolu veya antikor bağımlı mekanizmalar yoluyla sitotoksositeyi harekete geçirir. Myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC), T lenfosit fonksiyonlarını azaltır. Bu hücreler, T lenfosit ve NK hücrelerini baskılar ve immün yanıtı bastıran Treg lenfositlerinin etkisini artırır (41).



Şekil 2.2: Antijen sunan hücre ve T lenfosit yüzeyinde immün yanıtın aktivasyonu ya da inhibisyonunun belirlenmesinde rol alan reseptörler (42).

2.4.1. Tümör ve İmmün Düzenlenme

Tümör-immünite etkileşimi arasındaki "immün düzenlenme" süreci, zaman zaman immünite lehine, zaman zaman da tümör lehine sonuçlanabilen bir yarış ifade eder. Bu süreç, tümörün gelişip gelişmeyeceğini belirlemede etkilidir (43). Mutasyona uğramış onkogenler veya tümör baskılayıcı genler gibi içsel faktörler ile kronik inflamasyon, viral enfeksiyonlar ve kanserojenler gibi dışsal faktörler, normal hücrenin kanser hücresine dönüşmesine neden olur. İlk etapta immün hücreler bir süre boyunca tümörü baskı altında tutabilir ve hatta ortadan kaldırabilir; bu başlangıç aşaması (elimination) gelişmekte olan tümörü ortadan kaldırabilir ve konakçıyı tümör oluşumundan koruyabilir. Tümör ve immün sistem hücreleri arasındaki yarışın ikinci aşamasında, immünojenitesi azaltılmış ve immün saldırıya karşı artan bir hayatta kalma kapasitesine sahip tümör varyantları oluşarak yarışa denge getirilir (equilibrium). Bu varyantlar sonunda çeşitli mekanizmalarla immün sistemden kaçabilir, kontrolsüz bir şekilde yayılabilir ve kaçış aşamasında klinik olarak tespit edilebilir hale gelebilir (escape) (Şekil 2.7) (44).

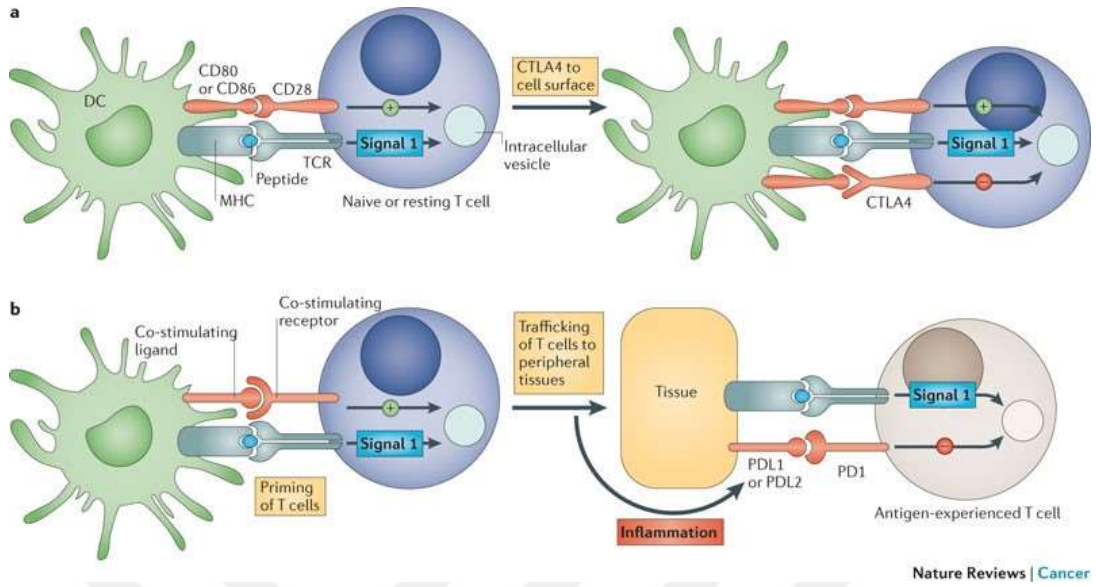


Şekil 2.3: İmmün-Gözetim Modeli. Eğer kanserojen faktörler immün-gözetime baskın gelirse prognoz kötüleşir; eğer immün-gözetim baskın gelirse kanser elimine edilir (45).

2.4.2. İmmün Kontrol Noktaları

Uzun süreli immün yanıtların varlığında, immünolojik tepkiyi kontrol eden mekanizmalara da ihtiyaç vardır. İmmünsüpresif etkiye sahip hücrelerin etkilerini gözlemleyebilmek için hücre içi sinyal iletiminin engellenmesi gereklidir. Bu noktada özellikle önemli olan ve üzerine en çok odaklanılan moleküller, CTLA-4 ve PD-1 yollarıdır (Şekil 2.8). Bu moleküller, ikinci sinyal iletim yolunda yer alan ve immün yanıtı baskılayan inhibitör moleküller olarak görev yaparlar. PD-1, vücutta CTLA-4'e kıyasla daha yaygın bir şekilde üretilir (42).

Tümör hücreleri, CTLA-4 ve PD-L1 dışında immüniteden kaçma mekanizmaları da geliştirmişlerdir. İmmün hücrelerin tümörle ilk temasını durdurmak amacıyla, immüniteyi tetikleyen antijenlerin veya MHC-I moleküllerinin ifadesini engelleyebilirler. Ayrıca, TGF- β , IL-10 gibi immün yanıtı baskılayan sitokinleri üretebilir veya CD8⁺ CTL aktivasyonunu ve olgunlaşmasını engelleyen sitokinleri salgılayabilirler. Ayrıca, immüniteyi baskılayan Treg lenfositlerini uyarabilirler. Apoptoz sırasında etkili olan Fas-Fas ligand etkileşimini de engelleyebilirler (46).



Şekil 2.4: CTLA-4 ve PD-L1 etki mekanizmaları (42).

2.4.3. CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL)

Biriken kanıtlar, CTL'nin virüslere ve kansere karşı bağışıklıkta temel bir rol oynadığını göstermektedir. CD8+hücrelerinin antijen reseptörü (TCR), profesyonel APC olarak adlandırılan dentritik hücrenin (DC) yüzeyinde sunulan MHC-I'le bağlı peptit antijenini tanır ve bir aktivasyon sinyali olarak görev yapar. Bununla birlikte, yalnızca TCR aracılığıyla uyarılma, naif ve bellek CD8+ T hücrelerinin optimal aktivasyonunu sürdürmekte yetersiz kalır. Bu nedenle, uygun aktivasyon sinyalinin (T hücresinin yüzeyindeki CD28- APC'nin yüzeyindeki CD80/CD86) genellikle tam aktivasyonları için temel olduğu kabul edilir. Bu uygun aktivasyon sinyalinin iletilmesi, naif CD8+ T hücrelerinin efektif CD8+ T hücreleri (CTL) ve bellek CD8+ T hücrelerine doğru çoğalmasına ve eş zamanlı farklılaşmasına yol açar. Aktivasyonun ardından CTL, hedef hücrelerde doğrudan sitolitik aktiviteyi aracılık eden IFN- γ gibi sitokinler ve diğer efektif moleküller (perforin ve granzim-B) üretir. Bu hücreler böylece kanserin immün-eliminasyonunda önemli bir şekilde rol alırlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA KOHORTU

Tek merkezli retrospektif çalışmamızda, Ocak 2017- Ocak 2020 tarihleri arasında SBÜ Kartal Dr. Lütü Kırdar Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezinde HER2 (+) meme kanseri tanısı alan ve neoadjuvan tedavi sonrası cerrahi uygulanan hastalar dahil edildi. Tanıları yukarıda belirtilen merkezde core biyopsi ile konulmuş ve neoadjuvan tedavi sonrası yine aynı merkezde opere edilen tüm HER 2(+) invaziv duktal histopatolojik alt tipe sahip meme kanserli hastalar dahil edildi. HER2 durumu, HER2 immünohistokimyasal (IHC) ve/veya HER2 silver in-situ hibridizasyon (SISH) ile belirlendi. HER2 IHC ve HER2 SISH sonuçları uzman meme patoloğları tarafından yorumlandı. Çalışma kohortuna alınması planlanan hastaların (n:98) patoloji dosya numaraları ve parafin blok numaraları patoloji kliniği arşivinden tek tek tüm hastaların parafin blokları kontrol edilerek parafin bloğu eksik olan ya da immünohistokimyasal çalışmalara uygun olmayan hasta bloklarını elendi. On üç hastanın parafin bloğuna ulaşamadı ya da kullanıma uygun olmadığı kanaatine varıldı. Bu inceleme sonucunda çalışmaya dahil edilebilecek ve immünohistokimyasal çalışmalar ile PD-L1 ekspresyonu ve CD8+ TIL sayısı değerlendirilecek hasta sayısı 85 olarak belirlendi.

Tanıları core (tru-cut) biyopsi ile histopatolojik olarak konulan hastaların evrelemesi için fizik muayene, meme ve aksiller ultrasonografi, mamografi, ± meme MR ve PET-CT'den yararlanılmıştır. Fizik muayene ve görüntülemesinde aksiller lenf nodu metastazı kuşkusu durumunda kuşku lenf noduna ultrasonografi eşliğinde İİAB ile metastaz durumu değerlendirilmiştir. Kliniğimizde memedeki tümörü >2cm ve/veya aksiller histopatolojik olarak kanıtlanmış metastazı ve genel sağlık durumu uygun olan tüm hastalar neoadjuvan tedaviye adaydırlar.

Tüm hastalar neoadjuvan olarak HER2-hedefe yönelik (trastuzumab ± pertuzumab) tedavi ve kemoterapi almıştır. Kemoterapi rejimi olarak hastalar platin veya bir antrasiklin ile birlikte taksan içeren bir rejimle tedavi edilmiştir. Neoadjuvan tedavi öncesi ilk tanı esnasındaki yaş, tümör boyutu, lenf düğümünün durumu, hormon reseptör durumu (östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği tümör hücrelerinin

nükleusunda ≥ 1 boyanma olarak kabul edildi), Ki-67 proliferasyon indeksi (hastalar Ki67 indekslerine göre iki gruba kategorize edildi; düşük: ≤ 30 , yüksek: >30), histolojik grade, nükleer grade, multifokalite, multisentrisite ve verilen neoadjuvan tedavi (trastuzumab, pertuzumab ile olan ve olmadan) gibi klinikopatolojik değişkenler hasta kartlarından retrospektif olarak değerlendirildi. Neoadjuvan tedaviye patolojik tam yanıt (pCR) College of American Pathologists (CAP)'e göre (CAP skoru 3), noninvaziv meme kanseri (ypT0) olarak tanımlandı. Rezidüel aksiller metastaz ve memede noninvaziv kanserler pCR belirlenirken dikkate alınmadı. Ayrıca hastalar neoadjuvan tedaviye yanıtızsız (CAP skor 1) ve yanıtlı (CAP skor 2 ve 3) olarak da kategorize edildi.

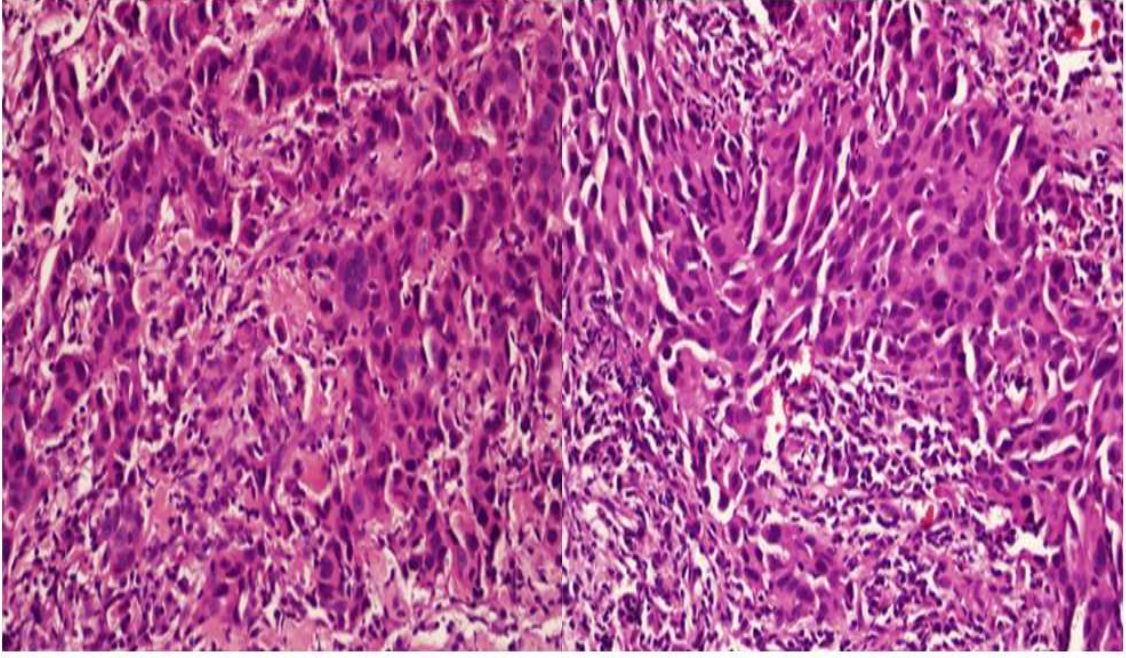
Çalışmanın etik kurul onayı SBÜ Kartal Dr. Lütfi Kırdar Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi etik kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 514/188/9).

3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER

İmmünohistokimyasal çalışmalar hastaların neoadjuvan tedavi öncesi hastalığın histopatolojik tanısı için memedeki tümöre uygulanan core biyopsi spesmenleri üzerinden yapıldı. PD-L1 ve CD8 için immünohistokimyasal uygulamalar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı laboratuvarında yapıldı. Değerlendirmeler klinik kriterlere ve reaksiyonlara kör olan meme patolojisinde uzmanlaşmış iki araştırmacı tarafından yapıldı.

3.2.1. TİL'lerin immünohistokimyasal değerlendirilmesi

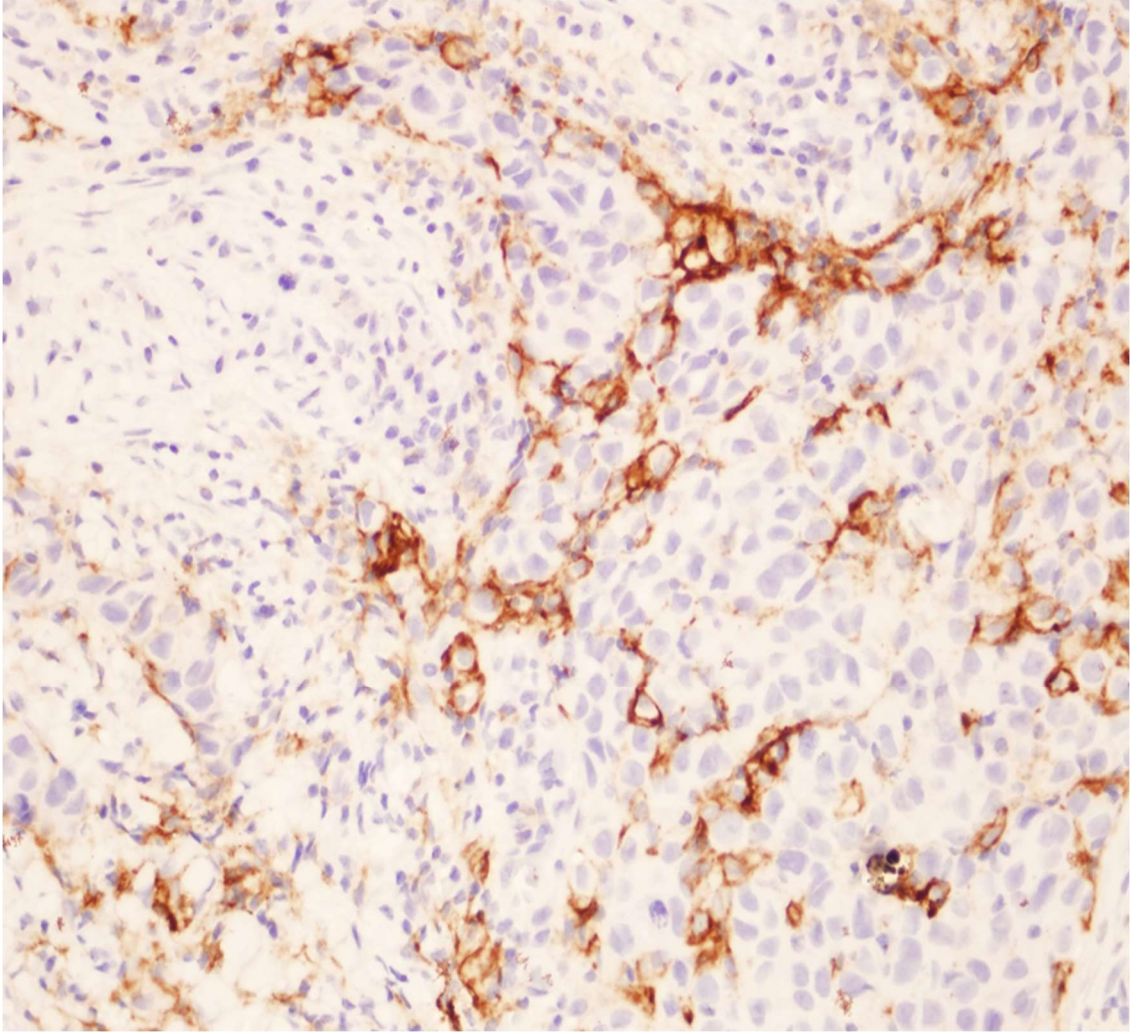
Tümörü infiltre eden lenfositlerin histopatolojik değerlendirilmesinde 85 hastanın tru-cut biyopsi spesmenlerinin Hematoksilen-Eozin boyamaları (H&E) boyamaları kullanıldı (Şekil 3.1). Lenfositleri ve plazma hücrelerini içeren tüm monoklonal hücreler değerlendirmeye katılırken, granülositler ve diğer polimorfonükleer lökositler dışlandı. TİL tümörün stromasında %10'un altında ise 1+ (düşük TİL oranı), %10-40 arasında ise 2+ (orta TİL oranı), %40'ın üzerinde ise 3+ (yüksek TİL oranı) olarak kategorize edildi. Yüksek TİL oranına sahip hasta sayısı az olduğu için (n:10) orta ve yüksek TİL oranına sahi hastalar birlikte değerlendirildi. İstatistiksel karşılaştırmalar düşük TİL oranına sahip hastalar ile yapıldı.



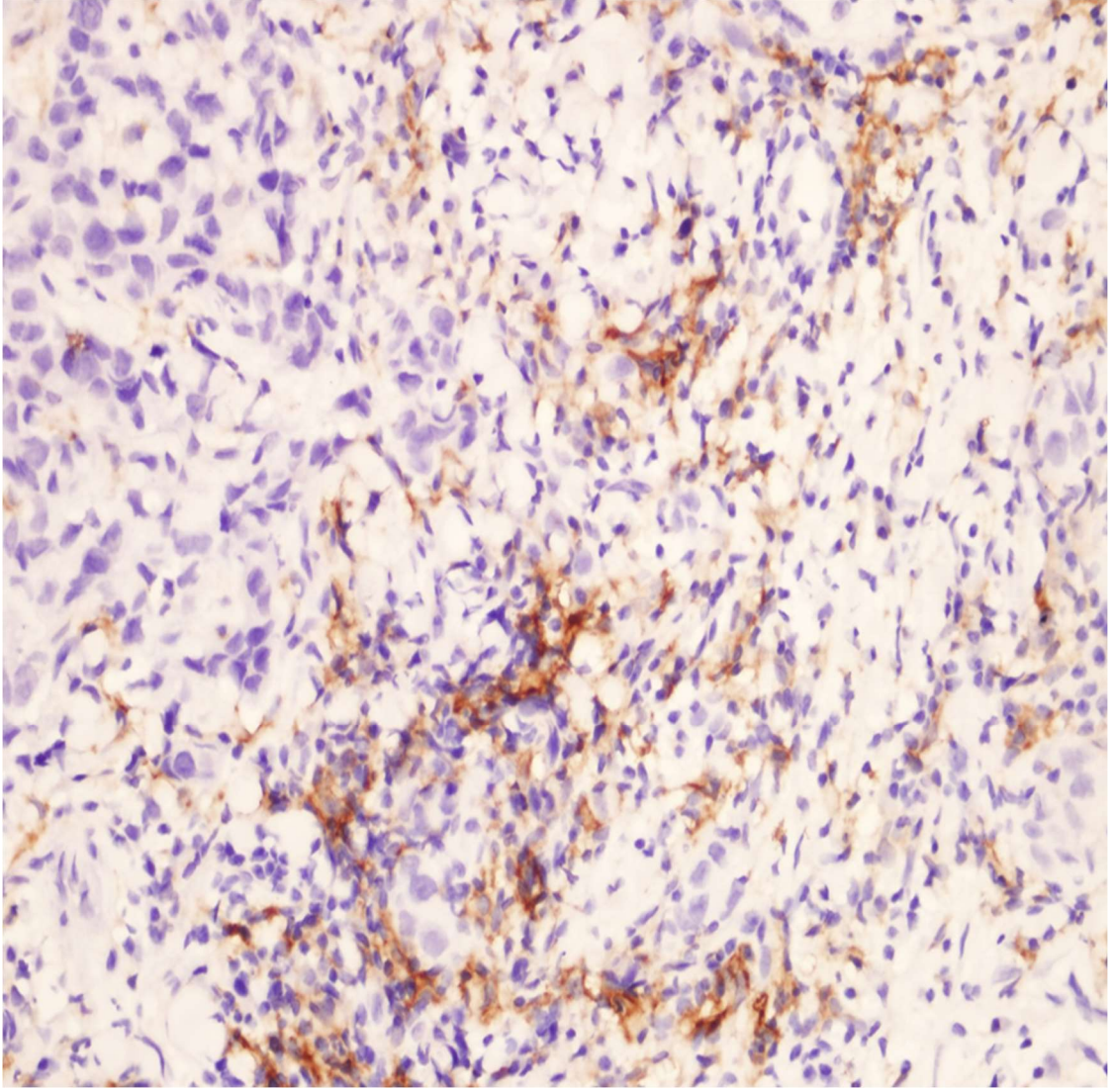
Şekil 3.1: H&E ile boyalı meme kanseri tru-cut (core) biyopsi kesitleri(X40). İri nükleuslu meme kanser hücreleri, tümör stromasında daha küçük nükleuslu lenfositler.

3.2.2. PD-L1'in immünohistokimyasal boyama ve değerlendirilmesi

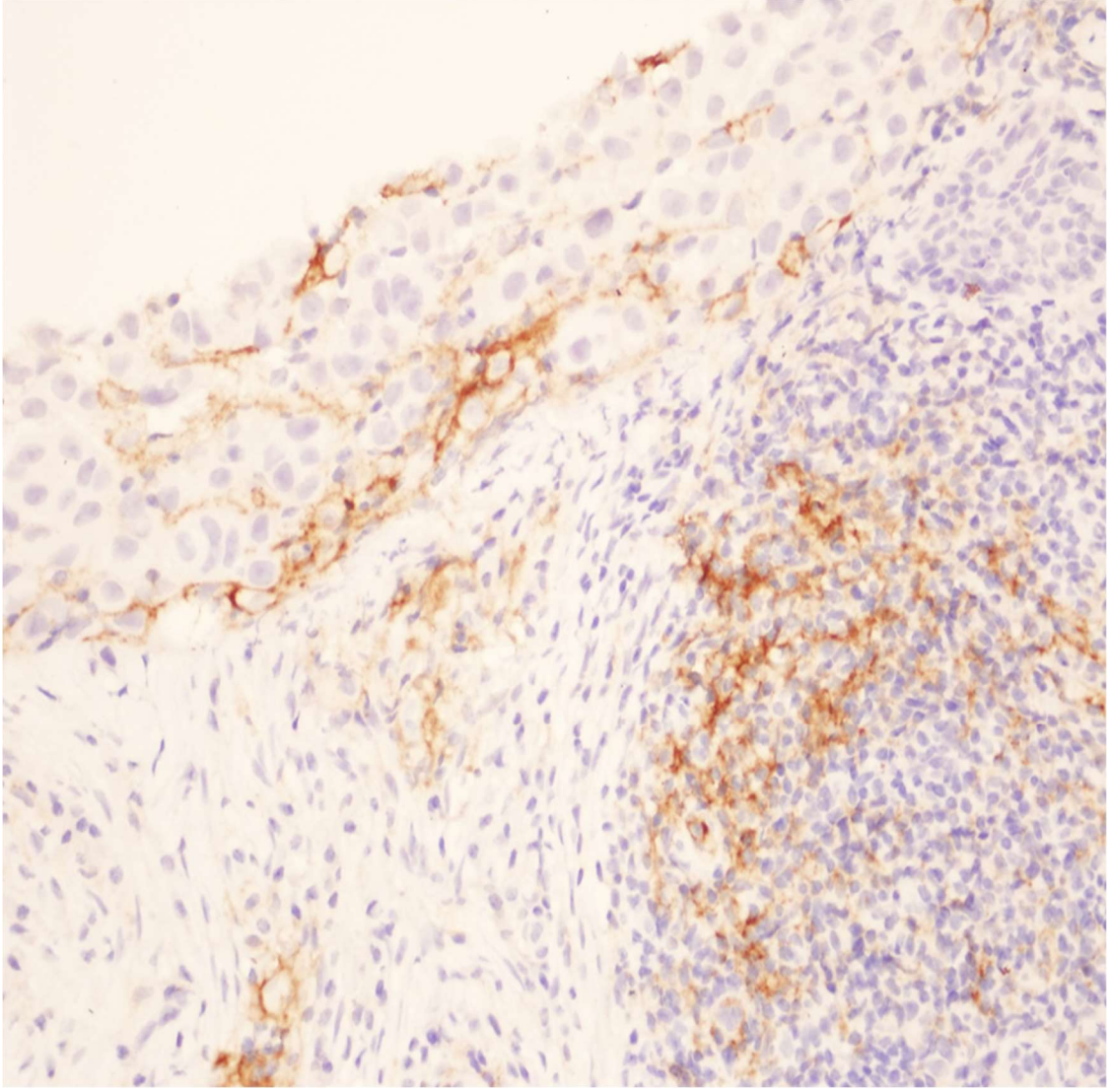
LEICA Biosystems, Newcastle upon Tyne – UK firmasından tedarik edilen; PA0832 PD-L1 (73-10) RTU antikoru ile 90 dakika Antikor inkübasyonu uygulandı, Antijen Retrieval yöntemi için LEICA/ Bond Epitope Retrieval 2 RTU (EDTA) ile 30 dakika ER2 Standart protokolü uygulandı. Sekonder görüntüleme için LEICA Biosystems, Newcastle upon Tyne – UK tedarik edilen LEICA/ Bond Polymer Refine Detection DAB Kit ile Standart IHC Protokolü uygulandı, tüm işlemler LEICA BOND-III Automated IHC Stainer cihazı üzerinde yapıldı. Meme kanser hücrelerinde ya da tümör stromasındaki immün hücrelerde sitoplazmik ve/veya membran boyama oranı $\geq 1\%$ olanlar PD-L1-pozitif olarak sınıflandırıldı (Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4).



Şekil 3.2: Meme kanseri dokusunda tümör hücrelerinde PD-L1 immün boyama görüntüsü (X40).



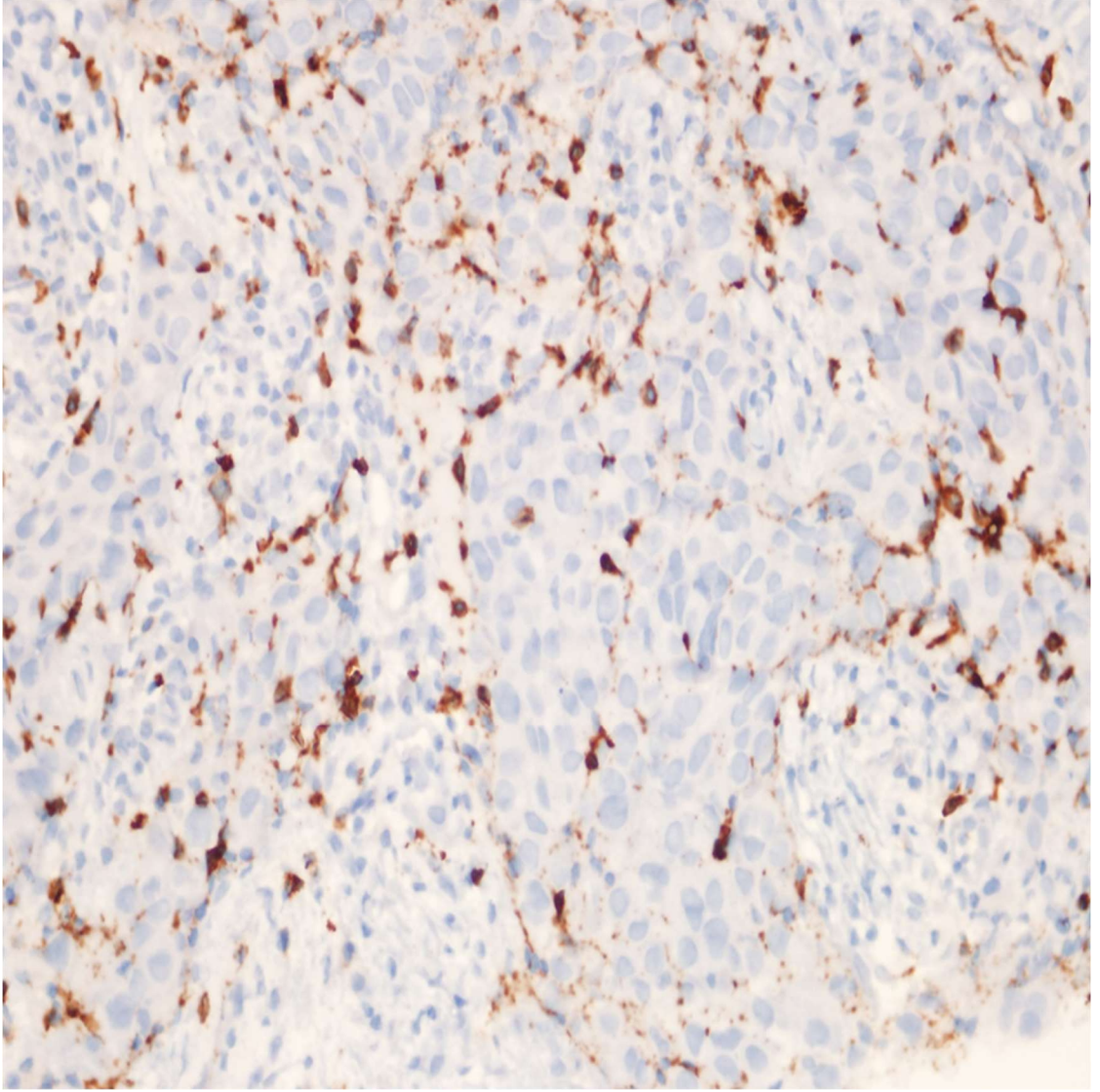
Şekil 3.3: Meme kanseri stromasında tümörü infiltre eden lenfositlerin PD-L1 immün boyama görüntüsü (X40).



Şekil 3.4: Meme kanseri dokusunda hem tümör hücrelerinde hem de stromadaki lenfositlerde PD-L1 immün boyama görüntüsü (X40).

3.2.3. CD8-Pozitifliğinin immünohistokimyasal boyama ve değerlendirmesi

DAKO, Santa Clara, CA – USA firmasından tedarik edilen; IR623 CD8 (C8/144B) RTU antikoruna ile 120 dakika Antikor inkübasyonu uygulandı, Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile CC1 60 dakika Standart protokolü uygulandı. Sekonder görüntüleme için ROCHE/ UltraView Universal DAB Detection Kit ile Standart UltraView IHC Protokolü uygulandı, tüm işlemler ROCHE/Ventana BenchMark XT IHC Stainer cihazı üzerinde yapıldı, ROCHE/Ventana, Tucson AZ – USA. CD8+ T hücreleri, tümör içinde ve çevresindeki alanda sayıldı (Şekil 3.5). 10 büyük büyütme alanında (BBA) pozitif boyanan hücrelerin ortalama mutlak sayısına göre; <25 olan hastalar düşük CD8-pozitifliği, ≥ 25 olanlar yüksek CD8-pozitifliği olarak kategorize edildi.



Şekil 3.5: Meme kanseri stromasında tümörü infiltre eden CD8 lenfositlerin immün boyama görüntüsü (X40).

3.3. İSTATİSTİK

Çalışmadaki tüm klinikopatolojik veriler kategorize edilerek sayı ve yüzde olarak sunuldu. Neoadjuvan tedaviye hem yanıt/yanıtsızlık hem de pCR / pCR-yok ile PD-L1 ekspresyonu, CD8+ T hücre infiltrasyonu, TIL oranları ve hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişkileri değerlendirmek için ki-kare ve Fisher's Exact testi kullanıldı. pCR ile büyük ölçüde ilişkili olan değişkenleri belirlemek için tek değişkenli ve çok değişkenli lojistik regresyon analizleri uygulandı. Tüm analizler için SPSS versiyon 24 kullanıldı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD). Bir $p \leq 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA KOHORTU

Çalışmaya neoadjuvan tedavi almış ve ardından cerrahi uygulanmış 85 HER2-pozitif meme kanserli hasta dahil edilmiştir.

4.1.1. Kohortun neoadjuvan tedavi öncesi demografik ve klinikopatolojik özellikleri

Hastaların tümü kadın olup yaş ortalamaları $49,5 \pm 11,2$ yıldır (ortanca:50; aralık: 27-82). Tanı sırasında hastaların %52,9'u (n:45) 50 yaş ve üzeriydi ve 39'u (%45,9) menopozal dönemdeydi. Kırk ikisinde (%49,4) tümör sağ memede, 42 (%49,4)'sinde sol memede ve birinde (%1,2) bilateral idi. Tanı esnasında ortalama tümör çapı 27 mm (aralık: 9-92mm) olup 60'ında (%70,6) 2cm'den büyüktü ve 78'inin (%91,8) klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı vardı. Tanı/evreleme esnasındaki konvansiyonel görüntülemelerde (mamografi, meme USG, MRI ve PET-CT) 51 (%51) hastanın tümörü tek odaklı, 21 (%24,7) hastanınki multifokal ve 13 (%15,3) hastanınki multisentrik olarak raporlanmıştı. Çalışma kohortunda histolojik ve nükleer grade bir olan hiç hasta yok iken yarıdan fazlasının grade 2 idi (sırası ile %58,8 ve %52,9) (Tablo 4.1).

Hastaların hormon reseptör durumları, Ki67 indeksleri ve moleküler subtipler değerlendirildiğinde; 49'unun (%57,6) ER, 30'unun (%35,3) PR eksprese ettiği, 59'unun (%69,4) Ki67 ekspresyonunun yüksek (>30) olduğu ve ekspresyonlar doğrultusunda 49 (%57,6) hastanın HER2 eksprese eden Luminal B grupta iken kalan 36 (%42,4) hastanın HER2 zengin grupta olduğu saptandı (Tablo 4.1).

Dokuz hastanın (%10,6) HER2 immünohistokimyasal boyama skoru 2 iken, 76 (%89,4) hastanın IHC skoru 3 idi. IHC skoru 2 olan hastaların HER2 pozitifliği SISH ile doğrulandı. HER2 pozitifliği SISH ile doğrulanan toplam hasta sayısı ise 11 (%12,9) idi.

Tablo 4.1: Çalışma kohortunun demografik ve klinikopatolojik özellikleri.

Özellikler	N (%)
Yaş	
<50 / ≥50	40 (47,1) / 45 (52,9)
Menopozal durum	
Menopozal / değil	39 (45,9) / 46 (54,1)
Taraf	
Sağ/Sol	42 (49,4) / 42 (49,4)
Bilateral	1 (1,2)
cT (cm)	
≤2 / >2	25 (29,4) / 60 (70,6)
cN*	
Negatif/ Pozitif	7 (8,2) / 78 (91,8)
Tümörün yaygınlığı	
Tek odak	51 (60)
Multifokal / Multisentrik	21 (24,7) / 13(15,3)
Nükleer grade	
Grade 2/3	45 (52,9) / 40 (47,1)
Histolojik grade	
Grade 2/3	50 (58,8) / 35 (41,2)
ER durumu	
Pozitif / Negatif	49 (57,6) / 36 (42,4)
PR durumu	
Pozitif / Negatif	30 (35,3) / 55 (64,7)
Ki-67 indeksi	
≤30 (düşük)	26 (30,6)
>30 (yüksek)	59 (69,4)
Subtip	
HER2-pozitif Luminal B	49 (57,6)
HER2 zengin	36 (42,4)

cT: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak tümör boyutu, cN: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak aksillanın durumu, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, HER2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2.

4.1.2. Kohortun neoadjuvan tedavi öncesi TIL, PDL-1 ve CD8 ekspresyon durumu

Tümörü infiltre eden lenfositler açısından değerlendirildiğinde; 44 (51,8) hastada TİL bir pozitif, 31 (%36,5) hastada iki pozitif ve 10 (%11,8) hastada üç pozitif idi. Hastaların 36'sında (%42,4) PD-L1 ekspresyonu saptanırken; bu ekspresyonun 28 (32,9) hastada tümör stroma hücrelerinde, 32 (%37,6) hastada ise tümörü infiltre eden hücrelerde olduğu görüldü. 29 (%34,1) hastada TİL içinde CD8(+) hücre sayısı yüksek (≥ 25) bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Kohortun neoadjuvan tedavi öncesi TIL, PDL-1 ve CD8 ekspresyon durumu

Özellikler	N (%)
TİL	
+	44 (51,8)
++	31 (36,5)
+++	10 (11,8)
PD-L1	
Pozitif	36 (42,4)
Stroma pozitifliği	28 (32,9)
TİL pozitifliği	32 (37,6)
Negatif	49 (57,6)
CD8(+) T lenfositler	
Düşük (<25)	56 (65,9)
Yüksek (≥ 25)	29 (34,1)

TİL: Tümörü infiltre eden lenfositler, PD-L1: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1.

4.1.3. Kohortun neoadjuvan tedavisi, uygulanan cerrahi prosedür ve patolojik yanıt durumu

Hastalarımızın 61 (%71,8)'i neoadjuvan tedavi olarak Trastuzumab + KT [4AC (Doksorubisin ve Siklofosfamid); n: 58 / 4AC + 4T (Doketaksel); n:3], 24(%28,2)'ü Trastuzumab + Pertuzumab + KT [4AC + (4-6) T; n: 17 / 4AC; n: 4 / (5-7)T; n: 3] almıştı.

Neoadjuvan sonrası 42 (%49,4) hastaya meme koruyucu cerrahi uygulanırken kalan 43 (%50,6) hastaya mastektomi uygulandı. Aksillaya uygulanan prosedürler ise; 68 (%80) hastaya sadece sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB), 5 (%5,9) hastaya doğrudan aksiller diseksiyon (AD), 12 (%14,1) hastaya ise SLNB sonrası AD şeklinde idi.

Operasyon sonrası piyes patolojileri değerlendirildiğinde; 70 (%82,4) hastanın neoadjuvan tedaviden fayda gördüğü (CAP skor 2 ve 3), kalan 15 (%17,6) hastanın yanıtsız olduğu görüldü (CAP skor 1). Çalışma grubumuzda 43 (%50,6) hastada neoadjuvan tedaviye tam patolojik yanıt saptadık (CAP skor 3).

Hastalar aksiller lenf nodu tutulumu açısından değerlendirildiğinde; 61 (%71,8) hastanın neoadjuvan sonrası SLNB negatif olarak raporlandı (ypN0) ve aksillaya ek girişime ihtiyaç duyulmadı (Tablo 4.3). Neoadjuvan sonrası SLNB pozitif olarak raporlanan hastaların (n: 19) 7'sine aksiller diseksiyon yapılmadı ancak bu hastalar ile doğrudan aksiller diseksiyon yapılan hastalar (n: 5) ypN(+) (n: 24) olarak değerlendirildi.

Tablo 4.3:Kohortun neoadjuvan tedavisi, uygulanan cerrahi prosedür ve patolojik yanıt durumu

Özellikler	N (%)
Neoadjuvan tedavi	
Trastuzumab + Kemoterapi	61 (71,8)
Trastuzumab + Pertuzumab + Kemoterapi	24 (28,2)
Cerrahi prosedür- meme	
MKC	42 (49,4)
Mastektomi	43 (50,6)
Cerrahi prosedür - aksilla	
SLNB	68 (80)
AD	5 (5,9)
SLNB takiben AD	12 (14,1)
Neoadjuvan tedavi yanıtı	
Yanıtız	15 (17,6)
Yanıt var	70 (82,4)
pCR	43 (50,6)
Neoadjuvan sonrası aksilla (ypN)	
Negatif	61 (71,8)
Pozitif	24 (28,2)

MKC: Meme koruyucu cerrahi, SLNB: Sentinel lenf nodu biyopsisi, AD: Aksiller diseksiyon, pCR: Patolojik tam yanıt

4.2. KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİN NEOADJUVAN TEDAVİYE YANIT İLE İLİŞKİSİ

4.2.1. Klinikopatolojik parametrelerin yanıt ile ilişkisi

Çalışma kohortumuzun neoadjuvan tedaviye yanıtı grubunda; yüksek TIL oranı, PDL-1 pozitifliği, yüksek CD8 hücre sayısı (≥ 25), ve ypN(-) yanıtı grubu göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırası ile, p: 0,02, p: 0,002, p:0,01, p:0,001). Hastaların yaşı ve tümörlerin diğer morfolojik özellikleri (tümör boyutu, aksiller tutulum, multifokalite/multisentrisite, histolojik ve nükleer grade, östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu) ile tedaviye yanıt arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptanmamıştır (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4: Klinikopatolojik parametrelerin neoadjuvan tedaviye yanıt ile ilişkisi.

Parametreler	Yanıtı (n:70)	Yanıtı (n:15)	P değeri
Yaş (≥ 50), n(%)	37 (52,9)	8 (53,3)	0,97
cT>2cm , n (%)	47 (67,1)	13 (86,7)	0,13
cN (+), n (%)	64 (91,4)	14 (93,3)	0,81
Tek odaklı tm, n (%)	41 (58,6)	10 (66,7)	0,56
Nükleer grade (3), n (%)	33 (47,1)	7 (46,7)	0,97
Histolojik grade (3), n(%)	28 (40)	7 (46,7)	0,63
ER (+), n (%)	40 (57,1)	9 (60)	0,84
PR (+), n (%)	25 (37,5)	5 (33,3)	0,86
Ki67 (>30), n (%)	50 (71,4)	9 (60)	0,38
Subtip (HER2 zengin), n (%)	30 (42,9)	6 (40)	0,84
TİL (orta-yüksek; ++, +++), n (%)	38 (54,3)	3 (20)	0,02
PD-L1 (+), n (%)	35 (50)	1 (6,7)	<0,01(0,002)
CD8 düşük (<25), n (%)	42 (60)	14 (93,3)	0,01
ypN (-)	56 (80)	5 (33,3)	<0,01(0,001)

cT: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak tümör boyutu, cN: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak aksillanın durumu, tm: tümör, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, HER2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, TİL: Tümörü infiltre eden lenfositler, PD-L1: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1, CD8: CD8-pozitif T lenfositler , ypN: Neoadjuvan tedavi sonrası aksillanın durumu.

4.2.2. Klinikopatolojik parametrelerin pCR ile ilişkisi

Çalışma kohortumuzun pCR grubunda; Ki67 yüksekliği (>30), TIL, PDL-1 pozitifliği, yüksek CD8 hücre sayısı (≥ 25), ve aksiller pCR oranları yanıtız gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırası ile, p: 0,05, p: 0,02, p: 0,002, p:0,01, p:0,001). Hastaların yaşı ve tümörlerin diğer morfolojik özellikleri (tümör boyutu, aksiller tutulum, multifokalite/multisentrisite, histolojik ve nükleer grade, östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu) ile pCR arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptanmamıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Klinikopatolojik parametrelerin neoadjuvan tedaviye patolojik tam yanıt ile ilişkisi.

Parametreler	pCR var (n:43)	pCR yok (n:42)	P değeri
Yaş (≥ 50), n (%)	20 (45,6)	25 (59,6)	0,23
cT >2 cm , n (%)	31 (72,1)	29 (69)	0,76
cN (+), n (%)	40 (93)	38 (90,5)	0,67
Tek odaklı tm, n (%)	25 (58,1)	26 (61,9)	0,72
Nükleer grade (3), n (%)	21 (48,8)	19 (45,2)	0,74
Histolojik grade (3), n (%)	19 (44,2)	16 (38,1)	0,57
ER (+), n (%)	26 (60,5)	23 (54,8)	0,60
PR (+), n (%)	12 (27,9)	18 (42,9)	0,15
Ki67 (>30), n (%)	34 (79,1)	25 (59,5)	0,05
Subtip (HER2 zengin), n (%)	17 (39,5)	19 (45,2)	0,60
TİL (orta-yüksek; ++, +++), n (%)	27 (62,8)	14 (33,3)	$<0,01$ (0,007)
PD-L1 (+), n (%)	24 (55,8)	12 (28,6)	0,01
CD 8 yüksek (≥ 25), n (%)	22 (51,2)	7 (16,7)	$<0,01$ (0,001)
ypN (-)	39 (92,7)	22 (52,4)	$<0,001$ (0,000)

cT: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak tümör boyutu, cN: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak aksillanın durumu, tm: tümör, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, HER2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, TİL: Tümörü infiltre eden lenfositler, PD-L1: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1, CD8: CD8-pozitif T lenfositler , ypN: Neoadjuvan tedavi sonrası aksillanın durumu.

Çok değişkenli analizde, diğer ortak değişkenler kontrol edildikten sonra, sadece ypN (-) ve yüksek CD8 oranı, pCR ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ilişki saptanmıştır (Tablo 4.6). Neoadjuvan tedavi sonrası aksillanın hastalıksız olması [ypN (-)] memede pCR olasılığını yaklaşık 10 kat arttırmaktadır [OR (%95CI): 9,7(2,62-35,95), p:0,001]. Ayrıca neoadjuvan tedavi öncesi tümör mikro-çevresinde yüksek CD8 hücre infiltrasyonu (≥ 25) düşük olan hastalara göre neoadjuvan tedavi sonrası memede pCR olasılığını yaklaşık 5 kat arttırmaktadır [OR (%95CI): 4,8(1,01-22,43), p:0,049].

Tablo 4.6: Klinikopatolojik parametrelerin neoadjuvan tedaviye patolojik tam yanıt ile ilişkilerinin univaryans ve multivaryans analizleri.

Parametreler	Univaryans Analiz			Multivaryans Analiz		
	OR	%95 CI	p-değeri	OR	%95 CI	p-değeri
Ki67, (>30) & (≤ 30)	2,57	0,99-6,70	0,054	2,28	0,73-7,09	0,156
TİL*	3,38	1,39-8,23	0,007	1,61	0,30-8,68	0,577
PD-L1, (+) & (-)	3,16	1,28-7,77	0,012	1,22	0,20-7,38	0,828
CD8(+) **	5,24	1,91-14,35	0,001	4,76	1,01-22,43	0,049
ypN, (-) & (+)	8,86	2,69-29,25	0,000	9,71	2,62-35,95	0,001

TİL: Tümör infiltratif lenfositler, PD-L1: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1, CD8: CD8-pozitif T lenfositler, ypN: Neoadjuvan tedavi sonrası aksillanın durumu. *TİL: orta-yüksek (++, +++) & düşük (+)**CD 8: yüksek (≥ 25) & düşük (< 25)

4.3. KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİN PD-L1 EKSPRESYONU İLE İLİŞKİSİ

Çalışma kohortumuzda PD-L1 eksprese eden hastaların ekspresyon saptanamayanlara göre yüksek histolojik grade (grade 3), orta -yüksek TİL ekspresyonu ve yüksek CD8+ T hücre sayısına sahip olduğunu bulduk (p değeri sırası ile 0,002, <0,001 ve <0,001) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Klinikopatolojik parametrelerin PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisi.

Parametreler	PD-L1-pozitif (n:36)	PD-L1-negatif (n:49)	p-değeri
Yaş (≥ 50), n (%)	17 (47,2)	28 (57,1)	0,39
cT >2 cm , n (%)	27 (75)	33(67,3)	0,48
cN (+), n (%)	34 (94,9)	44 (89,8)	0,69
Tek odaklı tm, n (%)	23 (63,9)	28 (57,1)	0,66
Nükleer grade (3), n (%)	21 (58,3)	19 (38,8)	0,08
Histolojik grade (3), n (%)	22(61,1)	13 (26,5)	0,002
ER (+), n (%)	19 (52,8)	30 (61,2)	0,51
PR (+), n (%)	11 (30,6)	19 (38,8)	0,50
Ki67 (>30), n (%)	27 (75)	32 (65,3)	0,48
Subtip (HER2 zengin), n (%)	17 (47,2)	19 (38,8)	0,51
TİL (orta-yüksek; ++, +++), n (%)	34 (94,4)	7 (14,3)	0,000
CD8 yüksek (≥ 25), n (%)	26 (72,2)	3 (6,1)	0,000
ypN (-)	28 (77,8)	33 (67,3)	0,34

cT: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak tümör boyutu, cN: Neoadjuvan tedavi öncesi klinik olarak aksillanın durumu, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, HER2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, TİL: Tümörü infiltre eden lenfositler, PD-L1: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1, CD8: CD8-pozitif T lenfositler, ypN: Neoadjuvan tedavi sonrası aksillanın durumu.

5. TARTIŞMA

Neoadjuvan sonrası pCR meme kanseri subtiplerinde nüks riskinin düşük olduğu ve sağ kalım avantajı sağlandığını öngören en önemli prognostik göstergedir (5). Bu nedenle günümüze kadar neoadjuvan tedavi sonrası pCR öngörücülerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Şimdiye kadar meme kanserinde HER2-ekspresyonu gibi birkaç klinikopatolojik faktör dışında doğru ve yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteç keşfedilmemiştir. HER2 onkogeni, PD-L1 ekspresyonunu, tümör mikro-çevresinde lenfosit infiltrasyonunu ve aktivasyonunu indükleyerek trastuzumab'ın terapötik etkisini etkileyebilir. Bu durum da TİL'in ve PD-L1'in trastuzumab etkinliği ile bağlantılı olduğunu düşündürür (13,47-49). Birkaç çalışma, TİL'in ve PD-L1'in HER2-pozitif meme kanseri hastalarında bu tür prediktif değerlere sahip olduğunu bildirmiş, ancak tartışmalar halen devam etmektedir (50-52).

Birçok HER2+ meme kanseri, neoadjuvan tedaviye mükemmel bir yanıt gösterse de literatürde yanıtı öngören klinik veya tümöre özgü faktörler hakkında çok az bilgi vardır. Bu çalışmada, HER2+ meme kanserlerinde neoadjuvan tedaviye vereceği yanıtta tümör immün mikro-çevresinin rolünü açıklığa kavuşturmayı amaçladık. TİL'in, PD-L1 ekspresyonunun, spesifik lenfosit CD8+ alt tipinin ve aksiller tam yanıtın (ypN0) memedeki primer tümörün hem neoadjuvan tedaviye yanıt vermesi hem de pCR elde edilmesi ile ilişkili olduğunu saptadık. Ki67 yüksekliğini (>30) ise sadece pCR ile ilişkili olarak bulduk. Ayrıca tümör mikro-çevresinde CD8+ yüksekliğini ve neoadjuvan sonrası aksilla negatifliğini (ypN0), pCR'nin bağımsız öngörücüsü olarak belirledik. Literatürde son dönemlerde HER2+ meme kanserlerinde neoadjuvan tedavi sonrası pCR'yi öngörmek için TİL, PD-L1 ekspresyonu ve CD8+ hücre sayısı ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda neoadjuvan tedaviye yanıtı olmayan hastalar ile yanıt alan hastalar karşılaştırılmamıştır. Bu bakımdan pCR'ye ilaveten kısmi yanıt gösteren hastaları da içine alarak yanıtı olmayan hastalar ile karşılaştıran ilk çalışmadır.

Yüksek Ki67 indeksinin HER2+ meme kanserli hastaların neoadjuvan tedaviye yanıtı ile anlamlı bir ilişki bildirilmiştir (53-55). Bu ilişki yalnızca HER2+ meme kanserinde değil, aynı zamanda diğer alt tiplerde de gösterilmiştir (56). Bu

durum yüksek Ki-67'ye sahip en hızlı çoğalan tümör hücreleri kemoterapiye duyarlıdır anlayışı ile örtüşmektedir. Bunlar yanıtın yararlı tahmin edicileridir ve hangi hastaların pCR'ye ulaşma olasılığının yüksek olduğunu, hangi hastaların rezidüel hastalık açısından daha yüksek risk altında olduğunu ve daha yoğun adjuvan tedaviye ihtiyaç duyup duymayacağını tahmin etmede yararlı bilgiler sağlayabilir.

Tümör mikro-çevresinde yüksek TİL oranlarının, yüksek riskli meme kanseri alt tiplerinde bile (triple-negatif) daha iyi prognoza sahip olduğunu göstermiştir (57-61). HER2+ meme kanserinde ise, triple-negatiflere göre yüksek TİL oranı nispeten daha nadir olduğu (%20'ye karşın %16) bildirilmektedir (62). HER2+ meme kanserini çalışan bir çalışmada cut-off değerini %50 olarak kabul edip yüksek TİL oranlarını %10 olarak bildirirken bir diğer çalışma bu değeri %40 olarak kabul edip %18 olarak bildirmiştir (54,55). Biz çalışmamızda cut-off değerini %40 olarak belirledik ve yüksek TİL oranımızı %12 olarak bulduk. Aksini iddia eden çalışmalar olsa da (54,63,64), Solinas ve ark.'nın literatürdeki 5 prospektif randomize çalışmayı dahil ettikleri meta-analizde başlangıçta yüksek TİL oranına (%60 cut-off değeri ile) sahip HER2+ meme kanserli hastalarda neoadjuvan tedavi sonrası artan pCR oranları ile ilişkiyi saptamışlardır (11). Çalışma kohortumuzun yüksek TİL'li hasta oranımız düşük olup orta ve yüksek TİL oranlı hastalar birlikte değerlendirildi. Orta ve yüksek TİL'li hastalar, düşük TİL oranlı hastalar ile karşılaştırıldığında; başlangıçta yüksek ve orta TİL oranına sahip olmanın pCR ile ilişkili olduğu bulundu. Diğer taraftan, hastalarda başlangıçta düşük TİL oranı (<%10), neoadjuvan tedaviye yanıtızsızlık ile ilişkiliydi. Çoklu regresyon analizinde ise orta ve yüksek TİL oranı ile pCR arasında ilişki saptanamadı.

PD-1 lenfosit yüzeyinde eksprese olurken, ligandı olan PD-L1 lenfositlerin yanı sıra kanser hücrelerinin yüzeyinde de eksprese olur (65). Bu iki protein T lenfositlerini etkisiz hale getiren bağışıklık kontrol noktası protein ailesine aittir. Tümör mikro çevresinde PD-1/PD-L1 ekspresyonu, sitotoksik T hücrelerinin (CD8) kanser hücrelerine karşı verdiği bağışıklık yanıtını bastırır ve tümör hücrelerinin anti-tümör bağışıklığına direncini temsil eder. Bu mekanizmanın keşfi ile çeşitli kanser türlerinin tedavisi için PD-1/PD-L1 inhibitörleri geliştirilmiştir (66). Solid tümörler arasında olan üçlü negatif meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunun klinik önemi yaygın olarak

araştırılmış ve bu hasta grubunda PD-L1 inhibitörleri ile immün hedefleme tedavileri kullanıma girmeye başlamıştır. Ancak HER2+ meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunun rolü belirsizliğini korumaktadır. Kurozumi ve ark.'nın 126 HER2+ hastayı içeren kohortlarında; hastaların %17,5'inde, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu (clone SP142; 1:50; Spring Bioscience, USA) gösterdiler (55). PD-L1 pozitifliği, yüksek derecede TIL ve yüksek CD8+ hücre infiltrasyonu ile anlamlı bir korelasyon gösteriyordu. Ayrıca pCR oranlarını, TİL'ler ve PD-L1 pozitifliği ile ilişkili buldular. Lokal ileri HER2+ meme kanserli 216 hastalık başka bir kohort çalışmasında Kurozumi ve ark.'na benzer sonuçlar bildirildi (67). Kohortlarındaki %18 oranında PD-L1 (clone SP263, rabbit, Ventana) ekspresyonu, yüksek TIL düzeyleri ve pCR oranları ile ilişkiliydi. Diğer taraftan Zhao ve ark. farklı bir PD-L1 antikoru kullanarak (clone E1L3N, 1:200, Cell Signaling, Beverly, CA) %9,2'lik düşük bir boyanma oranı ile pCR arasında anlamlı bir korelasyon saptayamamışlardır (54). Biz çalışmamızda 73-10 klonunu kullanarak tümör stromasında literatürde bildirilenden daha yüksek oranda PD-L1 ekspresyonu saptadık (%42,4). Bugüne kadar yayınlanan çalışmalarda kullanılan farklı PD-L1 antikolarının, PD-L1'lerin farklı epitoplarını tanıması ve farklı boyanma oranları göstermesi oldukça muhtemeldir. Ayrıca, Yosikawa ve ark., üçlü-negatif meme kanserlerinde hastaların PD-L1 immünohistokimyasal profillerini 73-10, SP142 ve E1L3N klonlarını kullanarak analiz etmişler, 73-10 klonunun immün hücreler ve tümör hücrelerinde daha yüksek pozitiflik oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir (68). Biz çalışmamızda; univaryans analizde PD-L1 pozitifliğini pCR ile ilişkili bulduk ancak multivaryans analizde anlamlı bir ilişki gösteremedik. Bu da kohortumuzda PD-L1 ekspresyonunun HER2 + meme kanserlerinde pCR için bağımsız bir öngörücü olmadığı sonucuna varmamıza neden olmuştur. Kurozumi ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu olarak PD-L1 ekspresyonu HER2+ meme kanserlerinde yüksek histolojik grade, TİL ve CD8+ T hücre sayısı ile ilişkili bulduk (55).

Bildiğimiz kadarı ile HER2+ meme kanserli hastaların tümör stromasında CD8+ T hücre oranını neoadjuvan tedavi sonrası pCR ile ilişkisini araştıran çalışma sayısı oldukça azdır. Kurozumi ve ark. neoadjuvan tedavi almış 126 HER2+ meme kanseri kohortlarında bir BBA'da >25 CD8+ hücre sayısını "yüksek CD8+ TIL ekspresyonu" olarak kabul etmişler ve yüksek CD8+'lığı ile pCR arasında pozitif bir korelasyon bildirmişlerdir (55). Zhao ve ark. 67 hastanın CD8 immünohistokimyasal boyamasını gerçekleştirdikleri çalışmalarında ise 10 BBA'deki CD8+ hücrelerin sayısını

karşılaştırmışlar ve anlamlı bir ilişki saptamamışlardır (54). Biz çalışmamızda 10 BBA'deki ortalama CD8+ hücre sayısını hesaplayıp; ≥ 25 CD8+ hücre sayısına sahip hastaları “yüksek CD8+ TİL ekspresyonu grubu” olarak belirledik. Hem univaryans analizde hem de multivaryans analizde yüksek CD8+ TİL varlığını pCR için bağımsız belirleyici olarak saptadık.

Neoadjuvan tedavi öncesi kohortumuzun büyük bir kısmı (78/85, %91,8) cN-pozitif. Neoadjuvan sonrası 80 hastaya SLNB uygulandı ve ypN-pozitif hasta oranımız %28,2 (24/85) olarak belirlendi. Çalışmamızda hem univaryans analizde hem de multivaryans analizde neoadjuvan tedavi sonrası ypN0'ın memede pCR'nin bağımsız öngörücüsü olduğunu belirledik [OR (%95CI): 9,7(2,62-35,95), p:0,001]. HER2+ meme kanserli hastaların neoadjuvan tedavi sonrası aksillanın yeniden evrelendirilmesi için yapılacak olan SLNB'de aksillanın ypN0 olması memedeki primer lezyonun pCR 'si için cerraha fikir verebilir. Bu da cerrahi onkolojik açıdan temiz cerrahi sınır elde etmek için geniş cerrahi rezeksiyon gereksinimlerinden uzaklaştırabilir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı göreceli olarak az sayıda hasta ile yapılmış olmasıdır. Düşük örneklem büyüklüğü nedeni ile HER2+ moleküler alt tiplerinin (HR-/+ HER2+) istatistiksel karşılaştırmaları yapılamadı. Ayrıca hastalarımız farklı neoadjuvan KT rejimleri almıştır. Tek hedefli (Trastuzumab) + KT alan hastalarımız çoğunlukta olsa da (%71,8) çift hedefli (Trastuzumab + Pertuzumab) + KT alan hasta sayımız da kohortumuzun neoadjuvan tedavi homojenitesini bozmuştur. Sonuçlarımızı doğrulamak için çok merkezli, homojen meme kanseri alt tipleri ile homojen neoadjuvan tedaviler alan daha büyük hasta volümlü prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bulgularımız CD8+ T hücrelerinin ve neoadjuvan tedavi sonrası ypN0 'ın memedeki primer tümörde pCR'nin güçlü ve bağımsız öngörücüleri olduğunu gösterdik. Bu bağlamda, TİL'ler içinde bir alt tip olan CD8+ T lenfositlerinin neoadjuvan tedaviye pCR'yi öngörmeye önceden belirlenmesi ve hastalarda CD8+ yanıtını arttırıcı stratejiler geliştirmek pCR'yi elde etmede yararlı olacak gibi görünmektedir. Ayrıca HER2+ meme kanserli hastalarda neoadjuvan tedavi sonrası yapılacak olan SLNB ile ypN0 saptanması meme cerrahına memedeki primer tümörde olası pCR için yol gösterici olabilir. Diğer taraftan, HER2+ meme kanserlerinde 73-10 PD-L1 antikorunu kullanarak yaklaşık %42 oranında PD-L1 pozitifliği saptadık. Ancak PD-L1 pozitifliğinin bu hastaların neoadjuvan tedavisinde pCR için bağımsız ve güçlü bir öngörücü değildi. Tümör mikro-çevresindeki PD-L1 ekspresyonunun yüksek histolojik grade, TİL ve CD8+ T hücre infiltrasyonu ile ilişkili olduğunu bulduk. Sonuçlarımızı onaylayacak yüksek hasta volümlü, aynı neoadjuvan tedaviler uygulanmış çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data. Available at: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> (Accessed on November 24, 2022).
2. Slamon D, Pegram M (2001) Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol* 28:13–19.
3. Schneeweiss, A., Chia, S., Hickish, T., Harvey, V., Eniu, A., Hegg, R., et al. (2013). Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(9), 2278–2284.
4. Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Roman, L., Tseng, L. M., Liu, M. C., et al. (2012). 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. *The Lancet. Oncology*, 13(1), 25–32.
5. Symmans, W. F., Wei, C., Gould, R., Yu, X., Zhang, Y., Liu, M., et al. (2017). Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(10), 1049–1060.
6. Shang, M., Chi, Y., Zhang, J., Chang, J., Yang, H., Yin, S., et al. (2022). The Therapeutic Effectiveness of Neoadjuvant Trastuzumab Plus Chemotherapy for HER2-Positive Breast Cancer Can Be Predicted by Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression. *Frontiers in oncology*, 11, 706606.
7. von Minckwitz, G., Huang, C. S., Mano, M. S., Loibl, S., Mamounas, E. P., Untch, M., et al. (2019). Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *The New England journal of medicine*, 380(7), 617–628.
8. Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B. M., Komor, et al. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(1), 105–113.
9. De Angelis, C., Nagi, C., Hoyt, C. C., Liu, L., Roman, K., Wang, C., et al. (2020). Evaluation of the Predictive Role of Tumor Immune Infiltrate in Patients with HER2-Positive Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Anti-HER2 Therapy without Chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(3), 738–745.
10. Ingold Heppner, B., Untch, M., Denkert, C., Pfitzner, B. M., Lederer, B., Schmitt, W., et al. (2016). Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(23), 5747–5754.
11. Solinas, C., Ceppi, M., Lambertini, M., Scartozzi, M., Buisseret, L., Garaud, S., et al. (2017). Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib or their combination: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer treatment reviews*, 57, 8–15.
12. Bianchini, G., & Gianni, L. (2014). The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *The Lancet. Oncology*, 15(2), e58–e68.
13. Perez, E. A., Ballman, K. V., Tenner, K. S., Thompson, E. A., Badve, S. S., Bailey, H., et al. (2016). Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA oncology*, 2(1), 56–64.
14. Chaganty, B. K. R., Qiu, S., Gest, A., Lu, Y., Ivan, C., Calin, G. A., Weiner, L. M., et al. (2018). Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN γ secretion. *Cancer letters*, 430, 47–56.
15. Savas, P., Caramia, F., Teo, Z. L., & Loi, S. (2014). Oncogene addiction and immunity: clinical implications of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancers overexpressing the HER2/neu oncogene. *Current opinion in oncology*, 26(6), 562–567.
16. Loi, S., Giobbie-Hurder, A., Gombos, A., Bachelot, T., Hui, R., Curigliano, G., et al. (2019). Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *The Lancet. Oncology*, 20(3), 371–382.

17. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
18. Kohler, B. A., Sherman, R. L., Howlander, N., Jemal, A., Ryerson, A. B., Henry, K. A., et al. (2015). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(6), djv048.
19. Munoz, D., Near, A. M., van Ravesteyn, N. T., Lee, S. J., Schechter, C. B., Alagoz, O., et al. (2014). Effects of screening and systemic adjuvant therapy on ER-specific US breast cancer mortality. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(11), dju289.
20. de Gelder, R., Heijnsdijk, E. A., Fracheboud, J., Draisma, G., & de Koning, H. J. (2015). The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy. *International journal of cancer*, 137(1), 165–172.
21. Tabár, L., Dean, P. B., Chen, T. H., Yen, A. M., Chen, S. L., Fann, J. C., et al. (2019). The incidence of fatal breast cancer measures the increased effectiveness of therapy in women participating in mammography screening. *Cancer*, 125(4), 515–523.
22. Sinn, H. P., & Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 8(2), 149–154.
23. Elston, C. W., & Ellis, I. O. (2002). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 41(3A), 154–161.
24. Abner, A. L., Connolly, J. L., Recht, A., Bornstein, B., Nixon, A., Hetelekidis, S., et al. (2000). The relation between the presence and extent of lobular carcinoma in situ and the risk of local recurrence for patients with infiltrating carcinoma of the breast treated with conservative surgery and radiation therapy. *Cancer*, 88(5), 1072–1077.
25. Hicks, G.D. and L.C. Susan, (2016). *Diagnostic Pathology: Breast*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier.
26. Orvieto, E., Maiorano, E., Bottiglieri, L., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Galimberti, V., et al. (2008). Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*, 113(7), 1511–1520.
27. Winchester, D. J., Chang, H. R., Graves, T. A., Menck, H. R., Bland, K. I., & Winchester, D. P. (1998). A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *Journal of the American College of Surgeons*, 186(4), 416–422.
28. Pestalozzi, B. C., Zahrieh, D., Mallon, E., Gusterson, B. A., Price, K. N., Gelber, R. D., et al. (2008). Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(18), 3006–3014.
29. Li, C. I., Moe, R. E., & Daling, J. R. (2003). Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. *Archives of internal medicine*, 163(18), 2149–2153.
30. Cristofanilli, M., Gonzalez-Angulo, A., Sneige, N., Kau, S. W., Broglio, K., Theriault, R. L., et al. (2005). Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(1), 41–48.
31. Ferlicot, S., Vincent-Salomon, A., Médioni, J., Genin, P., Rosty, C., Sigal-Zafrani, B., et al. (2004). Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 40(3), 336–341.
32. Yadav, S., Hu, C., Nathanson, K. L., Weitzel, J. N., Goldgar, D. E., Kraft, P., et al. (2021). Germline Pathogenic Variants in Cancer Predisposition Genes Among Women With Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(35), 3918–3926.
33. Desmedt, C., Zoppoli, G., Gundem, G., Pruneri, G., Larsimont, D., Fornili, M., et al. (2016). Genomic Characterization of Primary Invasive Lobular Breast Cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(16), 1872–1881.
34. Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Strumane, K., de Leeuw, W. J., Nollet, F., van Roy, F., et al. (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*, 13(9), 1919–1925.
35. Kumar, S., Chatterjee, M., Ghosh, P., Ganguly, K. K., Basu, M., & Ghosh, M. K. (2022). Targeting PD-1/PD-L1 in cancer immunotherapy: An effective strategy for treatment of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. *Genes & diseases*, 10(4), 1318–1350.

36. Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330.
37. Nathan, M. R., & Schmid, P. (2018). The emerging world of breast cancer immunotherapy. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 37, 200–206.
38. Janeway, C.A.(2005). *Immunobiology: The Immune system in Health and Disease*. 6th ed. USA: Garland Science.
39. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., et al. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271.
40. Shi, W., Dong, L., Sun, Q., Ding, H., Meng, J., & Dai, G. (2018). Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8⁺ T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. *Experimental cell research*, 372(1), 35–42.
41. Nam, S., Lee, A., Lim, J., & Lim, J. S. (2019). Analysis of the Expression and Regulation of PD-1 Protein on the Surface of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs). *Biomolecules & therapeutics*, 27(1), 63–70.
42. Pardoll D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264.
43. Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14.
44. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*, 27, 16–25.
45. Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S., & Ramakrishna, S. (2013). Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, 62(9), 823–834.
46. Sound, M. (2017). *IASLC Atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer*. North Fort Myers, FL: Editorial Rx Press.
47. Su, S., Zhao, J., Xing, Y., Zhang, X., Liu, J., Ouyang, Q., et al. (2018). Immune Checkpoint Inhibition Overcomes ADCC-Induced Immunosuppression by Macrophages. *Cell*, 175(2), 442–457.e23.
48. Li, Y., Opyrchal, M., Yao, S., Peng, X., Yan, L., Jabbour, H., et al. (2018). The role of programmed death ligand-1 and tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer overexpressing HER2 gene. *Breast cancer research and treatment*, 170(2), 293–302.
49. Triulzi, T., Forte, L., Regondi, V., Di Modica, M., Ghirelli, C., Carcangiu, M. L., et al. (2018). HER2 signaling regulates the tumor immune microenvironment and trastuzumab efficacy. *Oncoimmunology*, 8(1), e1512942.
50. Ochi, T., Bianchini, G., Ando, M., Nozaki, F., Kobayashi, D., Criscitiello, C., et al. (2019). Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 118, 41–48.
51. Force, J., Howie, L. J., Abbott, S. E., Bentley, R., Marcom, P. K., Kimmick, G., et al. (2018). Early Stage HER2-Positive Breast Cancers Not Achieving a pCR From Neoadjuvant Trastuzumab- or Pertuzumab-Based Regimens Have an Immunosuppressive Phenotype. *Clinical breast cancer*, 18(5), 410–417.
52. Hou, Y., Nitta, H., Wei, L., Banks, P. M., Parwani, A. V., & Li, Z. (2018). Evaluation of Immune Reaction and PD-L1 Expression Using Multiplex Immunohistochemistry in HER2-Positive Breast Cancer: The Association With Response to Anti-HER2 Neoadjuvant Therapy. *Clinical breast cancer*, 18(2), e237–e244.
53. Meisel, J. L., Zhao, J., Suo, A., Zhang, C., Wei, Z., Taylor, C., et al. (2020). Clinicopathologic Factors Associated With Response to Neoadjuvant Anti-HER2-Directed Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, 20(1), 19–24.
54. Zhao, J., Meisel, J., Guo, Y., Nahta, R., Hsieh, K. L., Peng, L., et al. (2020). Evaluation of PD-L1, tumor-infiltrating lymphocytes, and CD8⁺ and FOXP3⁺ immune cells in HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant therapies. *Breast cancer research and treatment*, 183(3), 599–606.
55. Kurozumi, S., Inoue, K., Matsumoto, H., Fujii, T., Horiguchi, J., Oyama, T., et al. (2019). Clinicopathological values of PD-L1 expression in HER2-positive breast cancer. *Scientific reports*, 9(1), 16662.
56. Sánchez-Muñoz, A., Plata-Fernández, Y. M., Fernández, M., Jaén-Morago, A., Fernández-Navarro, M., de la Torre-Cabrera, C., et al. (2013). The role of immunohistochemistry in breast cancer patients

treated with neoadjuvant chemotherapy: an old tool with an enduring prognostic value. *Clinical breast cancer*, 13(2), 146–152.

57. Afghahi, A., Purington, N., Han, S. S., Desai, M., Pierson, E., Mathur, M. B., et al. (2018). Higher Absolute Lymphocyte Counts Predict Lower Mortality from Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(12), 2851–2858.

58. Adams, S., Gray, R. J., Demaria, S., Goldstein, L., Perez, E. A., Shulman, L. N., et al. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(27), 2959–2966.

59. Loi, S., Drubay, D., Adams, S., Pruneri, G., Francis, P. A., Lacroix-Triki, M., et al. (2019). Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(7), 559–569.

60. Krishnamurti, U., Wetherilt, C. S., Yang, J., Peng, L., & Li, X. (2017). Tumor-infiltrating lymphocytes are significantly associated with better overall survival and disease-free survival in triple-negative but not estrogen receptor-positive breast cancers. *Human pathology*, 64, 7–12.

61. Li, X. B., Krishnamurti, U., Bhattarai, S., Klimov, S., Reid, M. D., O'Regan, R., et al. (2016). Biomarkers Predicting Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *American journal of clinical pathology*, 145(6), 871–878.

62. Stanton, S. E., & Disis, M. L. (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 4, 59.

63. Nuciforo, P., Pascual, T., Cortés, J., Llombart-Cussac, A., Fasani, R., Paré, L., et al. (2018). A predictive model of pathologic response based on tumor cellularity and tumor-infiltrating lymphocytes (CelTIL) in HER2-positive breast cancer treated with chemo-free dual HER2 blockade. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(1), 170–177.

64. Llombart-Cussac, A., Cortés, J., Paré, L., Galván, P., Bermejo, B., Martínez, N., et al. (2017). HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 18(4), 545–554.

65. Kurozumi, S., Fujii, T., Matsumoto, H., Inoue, K., Kurosumi, M., Horiguchi, J., et al. (2017). Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer. *Medical molecular morphology*, 50(4), 185–194.

66. Shen, X., & Zhao, B. (2018). Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 362, k3529.

67. Hou, Y., Nitta, H., Wei, L., Banks, P. M., Lustberg, M., Wesolowski, R., et al. (2018). PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer. *The breast journal*, 24(6), 911–919.

68. Yoshikawa, K., Ishida, M., Yanai, H., Tsuta, K., Sekimoto, M., & Sugie, T. (2021). Immunohistochemical comparison of three programmed death-ligand 1 (PD-L1) assays in triple-negative breast cancer. *PloS one*, 16(9), e0257860.

