



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ/TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇLÜ NEGATİF MEME KARSİNOMLARINDA ROR1
EKSPRESYON DÜZEYİ VE EGFR MUTASYONUNUN
PROGNOSTİK FAKTÖRLER İLE İLİŞKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Merve ÖZ

CERRAHİ TIP BİLİMLERİ/TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nusret AKPOLAT**

MALATYA-2023



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ/TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇLÜ NEGATİF MEME KARSİNOMLARINDA ROR1
EKSPRESYON DÜZEYİ VE EGFR MUTASYONUNUN
PROGNOSTİK FAKTÖRLER İLE İLİŞKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. Merve ÖZ
ORCID ID: 0009-0006-5254-0131**

CERRAHİ TIP BİLİMLERİ/TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nusret AKPOLAT**

“Bu tez İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (BAP) TTU-2022-2927 kodlu proje tarafından desteklenmiştir.

MALATYA-2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme ile İlgili Genel Bilgiler	3
2.1.1. Meme Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Meme Anatomisi	3
2.1.3. Meme Histolojisi	5
2.2. Meme Kanseri	7
2.2.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	7
2.2.2. Etiyoloji	8
2.2.3. Klinik Özellikler ve Görüntüleme	9
2.2.4. Yerleşim Yeri ve Makroskopik Özellikler	10
2.2.5. Histolojik Sınıflama.....	11
2.2.6. Meme Kanserlerinin Evrelemesi ve Histolojik Derecelendirme	11
2.2.7. Gen Ekspresyon Analizine Göre Alt Tipler	13
2.2.8. Prognostik Faktörler	14
2.2.9. Stromal Yanıt Paternleri ve Tümör İnfiltrat Lenfositler.....	16
2.2.10. Neoadjuvan Tedavi Sonrası Morfolojik Değişiklikler	16
2.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri	17
2.3.1. Üçlü Negatif Meme Kanserlerinin Histolojik Alt Tipleri	18
2.3.2. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplendirme	20
2.4. ROR1 ve CAR-T Hücreleri.....	20
2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü.....	23
2.6. Üçlü Negatif Meme Kanserlerinde EGFR, CK5/6 ve CD117 İmmünohistokimya Profili	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26

3.1. Olgu Seçimi ve Klinikopatolojik Verilerin Elde Edilmesi	26
3.2. ROR1 Ekspresyon Düzeyi Hesaplama İşlemleri ve Analizi.....	26
Moleküler Analiz.....	26
3.3. EGFR Gen Mutasyonu Analizi	31
3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme	33
3.4. İmmünohistokimya Değerlendirme Prosedürü	34
3.5. İstatiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1 Klinikopatolojik Veriler	36
4.2. Genel Verilerin Değerlendirilmesi.....	37
4.3. ROR1 Gen Ekspresyonu RT-PCR Verileri.....	39
4.4. ROR1 Gen Ekspresyonu ve İmmünohistokimya İlişkisi	40
4.4. EGFR Mutasyon Analizi.....	42
4.5 ROR1 Ekspresyon Seviyesinin Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	43
4.6. EGFR İmmünohistokimyasının Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	48
4.7. CK5/6 İmmünohistokimyasının Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	51
4.8. CD117 İmmünohistokimyasının Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	54
4.9. İmmünohistokimyasal Parametrelerin Birbiri ile İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	58
4.10. TIL Oranlarının Değerlendirilmesi	59
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	74
EK-1. Etik Kurul Kararı.....	74

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bana bilgi ve tecrübelerini aktaran tez danışmanım Prof. Dr. Nusret Akpolat'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca emekleri için Prof. Dr. Neşe Karadağ Soylu'ya, Prof. Dr. Emine Şamdancı'ya, Prof. Dr. Hasan Gökçe'ye, Doç. Dr. Saadet Alan'a, Doç. Dr. Zehra Bozdağ'a, Dr. Öğr. Ü. Ayşenur Akatlı'ya, Dr. Öğr. Ü. Serhat Toprak'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen ve tecrübelerini paylaştan Uzm. Biyolog Mustafa Hüz'e teşekkür ederim.

Çalışmama zaman ayırması ve katkılarından dolayı Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet Koç'a,

Çalışmamın istatistiksel analizini gerçekleştirmemde büyük yardımı olan Dr. Öğr. Ü. Ahmet Kadir Arslan'a,

Çalışma boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen öncelikle Sibel Ayhan ve Elif Ağaç'a ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarı teknikerlerine, sekreterlerine ve tüm çalışanlarına,

Uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarım Şeyma Erkek, Meryem Uludağ, Özlem Dalda, Cansel Nagehan Şahin, Şeymanur Çıtlak, Dilara Gerçek, Asena Çevik'e ve Uzm. Dr. Yasin Dalda'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan beni büyüten, yetiştiren anneme, babama ve kardeşlerime; beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan hayat arkadaşım Bekir Öz'e; onu yetiştiren kıymetli ailesine ve hayatıma anlam katan motivasyon kaynağım canım oğlum İbrahim Deniz Öz'e teşekkür ederim.

Dr. Merve ÖZ

ÖZET

Üçlü Negatif Meme Kanserlerinde ROR1 Ekspresyon Düzeyi ve EGFR Mutasyonunun Prognostik Faktörler ile İlişkisi

Amaç: Tedavi kararlarını desteklemek için moleküler analiz yapmak giderek önem kazanmaktadır. Bu çalışmanın amacı üçlü negatif meme kanserlerinde ROR1 ekspresyon düzeyi ve EGFR mutasyonlarının sıklığı, kliniğe ve tedaviye yön verecek olan prognostik faktörler ile ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 2015-2021 yılları arasında radikal mastektomi ve lumpektomi uygulanmış; Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji laboratuvarında değerlendirilmiş; ER, PR, HER2 immünohistokimyasal olarak negatif yorumlanmış 20 adet ÜNMK olguları alınmıştır. 20 olguda RT-PCR ile ROR1 ekspresyon düzeyi ve EGFR gen mutasyonu araştırılmıştır. Ayrıca tüm olgular EGFR, CK5/6 ve CD117 immünohistokimya boyaları ile değerlendirilmiştir. Tüm sonuçlar belirlenen prognostik parametreler ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda RT-PCR ile ROR1 ekspresyonunu kontrol gruba kıyasla test grubunda istatistiksel anlamlı artışı tespit edildi ($p<0,001$). Kat değişimleri hesaplandığında cut-off ve medyan değere göre sırasıyla olguların %15 ve %25'inde ROR1 aşırı ekspresyonu bulundu. RT-PCR ile EGFR gen mutasyonu hiçbir vakada saptanmadı. İmmünohistokimyasal analizde EGFR ile %80, CK5/6 ile %45 ve CD117 ile %35 oranında pozitiflik tespit edildi. ROR1 ekspresyonu, EGFR, CK5/6 ve CD117 immünohistokimya boyanma sonuçları prognostik faktörler ile karşılaştırıldığında hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi.

Sonuçlar: ROR1 ekspresyon oranları ÜNMK hasta gruplarında yüksek bulundu. ROR1, ÜNMK hastalarında yeni tedavi rejimi olan immünoterapi için potansiyel terapötik hedef molekül olabilir. ÜNMK'lerinde belirlenen moleküler alt tiplendirmeyi daha ulaşılabilir immünohistokimyasal belirteçlerle desteklemek araştırmacılar için yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Üçlü negatif meme kanseri, ROR1, EGFR, immünohistokimya

ABSTRACT

Association of ROR1 Expression Level and EGFR Mutation with Prognostic Factors in Triple Negative Breast Cancers

Material and method: Radical mastectomy and lumpectomy were performed in the study between 2015-2021; evaluated in Turgut Özal Medical Center Medical Pathology Department; twenty ÜNMK cases that were interpreted as negative by ER, PR, cerb.B2 immunohistochemically were taken. ROR1 expression level and EGFR gene mutation were investigated by RT-PCR in 20 cases. In addition, all cases were evaluated with EGFR, CK5/6 and CD117 immunohistochemistry stains. All results were compared with the determined prognostic parameters.

Result: In our study, a statistically significant increase in ROR1 expression was found in the test group compared to the control group by RT-PCR ($p<0.001$). When fold changes were calculated, ROR1 overexpression was found in 15% and 25% of the cases, respectively, according to the cut-off and median value. EGFR gene mutation was not detected in any case by RT-PCR. In the immunohistochemical analysis, 80% positivity was detected with EGFR, 45% with CK5/6 and 35% with CD117. When ROR1 expression, EGFR, CK5/6 and CD117 immunohistochemistry staining results were compared with prognostic factors, no statistically significant results were obtained in any of them.

Conclusion: ROR1 expression rates were high in UNMK patient groups. ROR1 may be a potential therapeutic target molecule for immunotherapy, a new treatment regimen in patients with UNMK. It may be useful for researchers to supplement the molecular subsampling determined in UNMKs with more accessible immunohistochemical markers.

Keywords: Triple negative breast cancer, ROR1, EGFR, immunohistochemistry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(HER2)	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
BLBC	: Bazal Benzeri Meme Kanseri
CAR	: Kimerik Antijen Reseptörü
CD117 (c-kit)	: Mast Hücre Büyüme Faktörü, Kök Hücre Faktörü Reseptörü
CK5/6	: Sitokeratin 5/6
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Östrojen Reseptörü
FFPE	: Formalin ile Fiske ve Parafine Gömülü Dokular
GLOBOCAN	: Küresel Kanser İnsidansı, Mortalitesi ve Prevalansı
İHK	: İmmünohistokimya
PR	: Progesteron Reseptörü
ROR1	: Reseptör Tirozin Kinaz Benzeri Yetim Reseptör1
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TDLU	: Terminal-Duktal Lobuler Ünite
TIL	: Tümör İnfiltrat Lenfosit
ÜNMK	: Üçlü Negatif Meme Kanseri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Memenin normal embriyolojik gelişimi	4
Şekil 2.2. Meme anatomisi	4
Şekil 2.3. Terminal duktal lobüler ünitenin şematik gösterimi	5
Şekil 2.4. A-B) Laktiferöz sinüs ve terminal duktal lobüler ünitenin histolojik görünümü	6
Şekil 2.5. A) Miyoeitel ve luminal tabaka, HE x10; B) İnterlobüler ve intralobüler stromanın histolojik görünümü	7
Şekil 2.6. 2020 GLOBOCAN verilerine göre dünya genelinde kadınlarda vaka ve ölüm sayısı oranları.....	8
Şekil 2.7. Yeni tanı almış meme tümörü vakasının mamografik görünümü	10
Şekil 2.8. Sağ memenin topografik anatomisi	10
Şekil 2.9. PubMed'e göre 1992 ile 2019 arasında ROR1 ve ROR2 ile ilgili yayın sayısı	21
Şekil 2.10. ROR1'in şematik etki alanı yapısı	22
Şekil 2.11. Kimerik antijen reseptörü (CAR) yapısının şeması ve tümör hücrelerine karşı tasarlanmış T hücresi fonksiyonu	23
Şekil 2.12. EGFR'nin temsili ve hücresel süreçler üzerindeki biyolojik etkisi.....	24
Şekil 3.1. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon ölçüm değerlerinin görünümü ...	28
Şekil 4.1. A) Özel tipi olmayan invaziv meme karsinomu (İDC), HE x10; B) Metaplastik tip meme karsinomu.....	38
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait ACTB ve ROR1'in amplifikasyon eğrileri.....	39
Şekil 4.3. Test grubuna ait ACTB ve ROR1'in amplifikasyon eğrileri	39
Şekil 4.4. EGFR immünohistokimyasının boyanma dağılımı	48
Şekil 4.5. EGFR immünohistokimya değerlendirilmesi.....	48
Şekil 4.6. CK5/6 immünohistokimyasının boyanma dağılımı	51
Şekil 4.7. CK5/6 immünohistokimya değerlendirilmesi	52
Şekil 4.8. CD117 immünohistokimyasının boyanma dağılımı.....	55
Şekil 4.9. CD117 immünohistokimya değerlendirilmesi	55
Şekil 4.10. A) TIL oranı <%10, HE x1; B)TIL oranı 10-50, HE x2.5; C) TIL oranı >%50, HE x2.5.....	59

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Modifiye Bloom Richardson derecelendirme yöntemi.....	12
Tablo 2.2. DSÖ 2019 epitelyal meme tümörlerinin histolojik sınıflandırılması.....	12
Tablo 2.3. Meme karsinomlarının gen ekspresyon analizine göre sınıflandırılması	14
Tablo 2.4. Moleküler sınıflandırma için belirlenen immünohistokimya belirteçleri	14
Tablo 2.5. Üçlü Negatif Meme Kanserlerinde Moleküler Alt Tiplendirme	20
Tablo 3.1. RT-PCR’da kullanılan primer ve prob dizileri	26
Tablo 3.2. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon ölçüm değerleri	28
Tablo 3.3. Reaction Buffer ve RNA karışım oranı	29
Tablo 3.4. cDNA termal cyclus döngü ve süreleri	29
Tablo 3.5. Primer ve Probların sulandırma oranları.....	29
Tablo 3.6. Primer ve probdan çalışma miks (PM miks) hazırlama oranları	30
Tablo 3.7. RT-PCR çalışması için master miks reaktif miktarları	30
Tablo 3.8. RT-PCR protokolü.....	31
Tablo 3.9. Primer antikor dilüsyon oranları ve üretim bilgileri	33
Tablo 3.10. CD117, CK5/6 ve EGFR için immünohistokimyasal semi-kantitatif skorlama sistemi.....	34
Tablo 4.1. Klinikopatolojik değişkenlere göre tanımlayıcı istatistikler	36
Tablo 4.2. Tümör boyutu ve yaş ortalamaları	36
Tablo 4.3. Yaş ile tümör evresi ilişkisi	37
Tablo 4.4. Yaş ile tümör derecesi ilişkisi.....	37
Tablo 4.5. Tümör tipi ile tümör infiltrat lenfosit oranı (TİLO) ilişkisi	37
Tablo 4.6. Tümör derecesi ve lenfovasküler invazyon durumu ilişkisi	38
Tablo 4.7. ROR1 ekspresyon seviyesinin Livak methoduna göre değerlendirilmesi	40
Tablo 4.8. Kontrol ve test grubundaki ekspresyon değeri farkı	40
Tablo 4.9. ROR1 aşırı ekspresyonu ve EGFR ekspresyonu ilişkisi ($r=1$)	41
Tablo 4.10. ROR1 aşırı ekspresyonu ve EGFR ekspresyonu ilişkisi ($n=0,4$).....	41
Tablo 4.11. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CK5/6 ilişkisi ($r=1$)	41
Tablo 4.12. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CK5/6 ilişkisi ($n=0,4$)	42
Tablo 4.13. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CD117 ilişkisi ($r=1$)	42
Tablo 4.14. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CD117 ilişkisi ($n=0,4$)	42

Tablo 4.15. ROR1 aşırı ekspresyonu ve tümör derecesi ilişkisi ($r=1$)	43
Tablo 4.16. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi ilişkisi ($r=1$)	43
Tablo 4.17. ROR1 aşırı ekspresyonu ile cerrahi sınır durumu ilişkisi ($r=1$).....	44
Tablo 4.18. ROR1 aşırı ekspresyonu ile LVİ ilişkisi ($r=1$).....	44
Tablo 4.19. ROR1 aşırı ekspresyonu ile yaş ilişkisi ($r=1$)	44
Tablo 4.20. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör tipi ilişkisi ($r=1$).....	45
Tablo 4.21. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör infiltrate lenfosit oranı (TİLO) ilişkisi ($r=1$)	45
Tablo 4.22. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi oranı ilişkisi ($n=0,4$)	46
Tablo 4.23. ROR1 aşırı ekspresyonu ile cerrahi sınır durumu ilişkisi ($n=0,4$)	46
Tablo 4.24. ROR1 aşırı ekspresyonu ile LVİ ilişkisi ($n=0,4$)	46
Tablo 4.25. ROR1 aşırı ekspresyonu ile yaş ilişkisi ($n=0,4$)	47
Tablo 4.26. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör tipi ilişkisi ($n=0,4$).....	47
Tablo 4.27. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör derecesi ilişkisi ($n=0,4$)	47
Tablo 4.28. EGFR immünohistokimyası ile evre ilişkisi	49
Tablo 4.29. EGFR immünohistokimyası ile cerrahi durum ilişkisi	49
Tablo 4.30. EGFR immünohistokimyası ile LVİ ilişkisi	50
Tablo 4.31. EGFR immünohistokimyası ile yaş ilişkisi	50
Tablo 4.32. EGFR immünohistokimyası ile tümör tipi ilişkisi.....	50
Tablo 4.33. EGFR immünohistokimyası ile tümör derecesi ilişkisi	51
Tablo 4.34. CK5/6 immünohistokimyası ile tümör evre ilişkisi.....	52
Tablo 4.35. CK5/6 immünohistokimyası ile cerrahi durum ilişkisi.....	53
Tablo 4.36. CK5/6 immünohistokimyası ile LVİ ilişkisi.....	53
Tablo 4.37. CK5/6 immünohistokimyası ile yaş ilişkisi	53
Tablo 4.38. CK5/6 immünohistokimyası ile tümör tipi ilişkisi	54
Tablo 4.39. CK5/6 immünohistokimyası ile tümör derecesi ilişkisi.....	54
Tablo 4.40. CD117 immünohistokimyası ile tümör evresi ilişkisi	56
Tablo 4.41. CD117 immünohistokimyası ile cerrahi durum ilişkisi.....	56
Tablo 4.42. CD117 immünohistokimyası ile LVİ ilişkisi.....	56
Tablo 4.43. CD117 immünohistokimyası ile yaş ilişkisi	57
Tablo 4.44. CD117 immünohistokimyası ile tümör tipi ilişkisi.....	57
Tablo 4.45. CD117 immünohistokimyası ile tümör derecesi ilişkisi.....	57
Tablo 4.46. EGFR ile CK5/6 boyanma ilişkisi	58
Tablo 4.47. EGFR ile CD117 boyanma ilişkisi	58

Tablo 4.48. CK5/6 ile CD117 boyanma ilişkisi.....	58
Tablo 4.49. ROR1 aşırı ekspresyonu ile TIL oranı ilişkisi (n=0,4)	59
Tablo 4.50. EGFR immünohistokimyası ile tümör infiltrate lenfosit oranı ilişkisi	60
Tablo 4.51. CK5/6 immünohistokimyası ile TIL oranı ilişkisi.....	60
Tablo 4.52. CD117 immünohistokimyası ile TIL oranı ilişkisi	61

1. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kadınlarda kanserden ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer alır. Küresel kanser istatistik verilerine göre 2020’de tüm dünyada 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası bildirilmiş olup; 684.996 kadının meme kanseri nedeniyle öldüğü tespit edilmiştir. Bu rakam kadınlar arasındaki kanser ölümlerinin % 6.9’unu oluşturmaktadır (1) . Ülkemizde ise kanser tanısı konulan her 4 kadından 1’inin meme kanseri olduğu bildirilmiştir (2).

Meme kanserleri klinik, histopatolojik ve moleküler alt tiplere ayrılabilen heterojen bir hastalıktır. 2013 St. Gallen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı gen ekspresyon profiline göre 5 alt tip tanımladı. Buna göre meme kanserleri Luminal A, Luminal B, Human epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) overekspresyonu, bazal benzeri (BLBC) ve diğer özel alt tipler şeklinde gruplandı (3).

Üçlü negatif meme kanserleri (ÜNMK) hormon reseptör ekspresyonu ve HER2 gen amplifikasyonu olmayan bir meme tümörü alt tipidir. Gen ekspresyon profillemesi analizi genellikle ÜNMK’ni bazal benzeri meme kanserinin (BLBC) alt tipi olarak sınıflandırır. ÜNMK ve BLBC gen ekspresyon profillerinin yaklaşık %56’sı örtüşmektedir (4).

Üçlü negatif meme kanserleri tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %15’ini oluşturur. Üçlü negatif meme kanserlerinin agresif doğası göz önüne alındığında prognozu belirlemek ve optimal tedaviyi sağlamak çok önemlidir. Bu hastalar endokrin tedavi ve HER2 bazlı tedaviden fayda görmezler. Hedefe yönelik tedavisi yoktur. Üçlü negatif meme kanseri için etkili olan ek sistemik tedavi biçimlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu sebeple ÜNMK’lerinde immünoterapi seçeneği hastalara umut verici bir tedavi seçeneğidir (5,6)

İmmünoterapi olarak adlandırılan yöntem bağışıklık sisteminin kanser hücreleri ile savaşmasını sağlayan bir tedavi türüdür. Kimerik antijen reseptörü-T (CAR-T) hücre tedavisi umut verici yeni bir T hücresi immünoterapisidir. CAR yapısı hücre dışı antijen tanıma alanı ve alıcıyı hücre yüzeyine bağlayan transmembran bölgesinden oluşur. CAR’lar monoklonal antikorların tümör tanıma yeteneklerini ve onları T hücreleriyle birleştirmek için tasarlanmıştır. CAR’lar viral ve viral olmayan vektörler kullanılarak T

hücrelerine verilir. T hücrelerinde eksprese edildikten sonra CAR-T hücreleri artık sitotoksik görev yapan canlı ilaçlar haline gelirler. CAR-T hücreleri için ilk seçenekler tümör spesifik antijenler ve tümöre özgü antijenlerdir (6).

ROR1, tip I yetim reseptör tirozin kinaz benzeri bir yüzey proteinidir. ROR1, embriyogenez sırasında akciğer, kalp, iskelet ve merkezi sinir sistemi gibi birçok doku tarafından eksprese edilir, embriyonik ve fetal gelişimde kritik bir rol oynar. ROR1, olası bir onkogen olarak karakterize edilmiştir. ÜNМК ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde eksprese edilir. ROR1'in yetişkin dokularda çok düşük seviyelerde eksprese olduğu düşünülürken; yeni yapılan çalışmalarda paratiroid bezi, pankreas adacıkları, özofagus bölgeleri, mide ve duodenum gibi normal dokularda eksprese edildiğini göstermiştir. ROR1, CAR hücreleri için çekici bir hedeftir (6).

EGFR (HER1), kromozom 7p12 üzerinde bulunan bir gen tarafından kodlanan 170 kDa'lık bir glikoproteindir. HER tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve bir dizi epitelyal tümörde yaygın olarak eksprese edilir. ÜNМК hastalarının yaklaşık %45-70'i, daha kötü prognozla ilişkili olan EGFR aşırı ekspresyonu sergiler. Yapılan çalışmalarda EGFR gen ekspresyonu ÜNМК ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (7). Literatürde ÜNМК'lerinde EGFR gen mutasyonunun varlığını belirleyen tek bir çalışma bulunmaktadır (7,8). Sonuçlar arasındaki değişkenlikler hastaların etnik kökenleri ve arka plan özelliklerindeki farklılıklara dayandırılmaktadır.

Moleküler patoloji günlük diagnostik patolojinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir ve tedavi kararlarının desteklemesi için kullanılır. Yeni biyobelirteçler klinisyenlere tedavi yanıtının öngörülmesinde gereklidir. Klinikte özellikle bu tür yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Literatürde üçlü negatif meme kanserlerinde ROR1 ekspresyon düzeyinin belirlendiği ve ırklara göre değişkenlik gösterdiği savunulan EGFR mutasyonunun araştırıldığı yeterli çalışma yoktur.

Bu çalışmadaki amacımız üçlü negatif meme kanseri vakalarında ROR1 ekspresyonu ve EGFR mutasyonunu belirlemek, potansiyel terapötik hedefler olarak rollerini tanımlamaya yardımcı olmak, yeni bir tedavi rejimi olan immünoterapi yöntemine katkıda bulunmak, literatürdeki tartışmalı sonuçlara katkı sağlamaktır. Ayrıca ROR1 ekspresyon düzeyi ve EGFR mutasyonunun hedeflediğimiz prognostik faktörler ile ilişkisini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme ile İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. Meme Embriyolojisi

Meme bezinin gelişimi gebeliğin 5. haftasında başlar. Fetüsün ventral yüzündeki ektodermal kalınlaşmalar belirginleşip; aksilladan inguinal bölgeye kadar uzanır. Bu kalınlaşmalar süt çizgileri olarak da adlandırılır. Fetüs gelişmeye devam ettikçe pektoral bölgedeki küçük bir alan hariç çoğu regrese olur. Eğer bu gerileme olmazsa postnatal hayatta ektopik meme dokusu veya aksesuar meme başına sebep olur.

Meme gelişiminin erken evreleri seks steroid hormonlarından bağımsızdır. Gelişmekte olan meme dokusu gebeliğin 15. haftasından sonra geçici olarak testesterona duyarlı hale gelip; testosteronun etkisiyle göğüs duvarındaki epitel sap etrafında yoğunlaşarak meme tomurcuğunu oluşturur. Daha sonra mezenkim içinde solid epitelyal kordonlar oluşmaya başlar; bu kordonlar meme bezinin lob ve segmentlerini oluşturur.

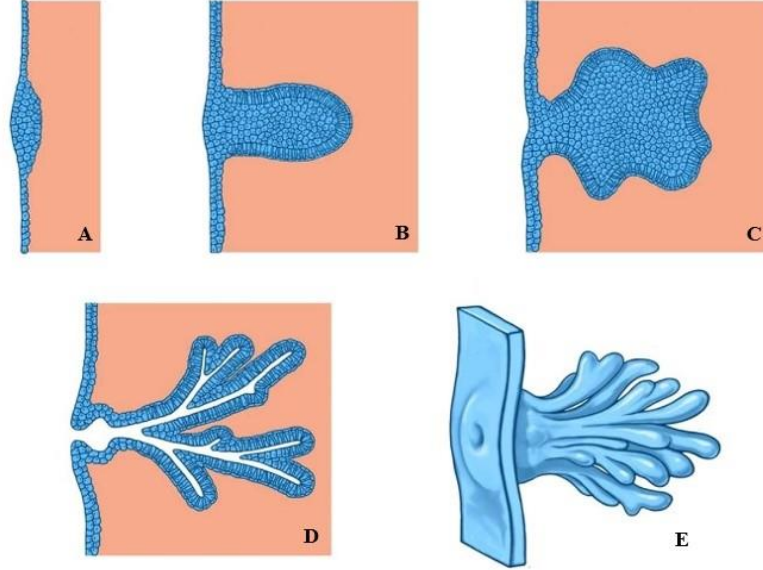
Gelişen epitelyal kordonlar fetal papiller dermisin belli bölümleri tarafından sarılır ve vaskülarize bağ doku oluşur. Kollajenden zengin olan retiküler dermis ise memeyi cilde bağlayan Cooper ligamanını oluşturur.

Gebeliğin 20. ve 32. haftaları arasında mezenkimin bir bölümü yağa dönüşür. Gebeliğin son 8 haftasında ise epitelyal kordonlar kanalize olup lobuloalveoler yapıları oluşturur. Gebeliğin son birkaç haftasında fetal meme bezi maternal ve plasental steroid hormonlara duyarlıdır. Bunun sonucunda asiner ünitelerdeki epitelyal hücreler salgı aktivitesi gösterirler. Hayatın ilk ayında maternal ve plasental seks steroid hormonları ve prolaktin serum seviyeleri azaldıkça, salgı aktivitesi sona erer ve bez gerileyip inaktif hale gelir. Puberteye kadar ise, bazı temel alveolar diferansiyasyon göstermeden birkaç dallanma içeren laktiferöz kanallardan oluşur (9).

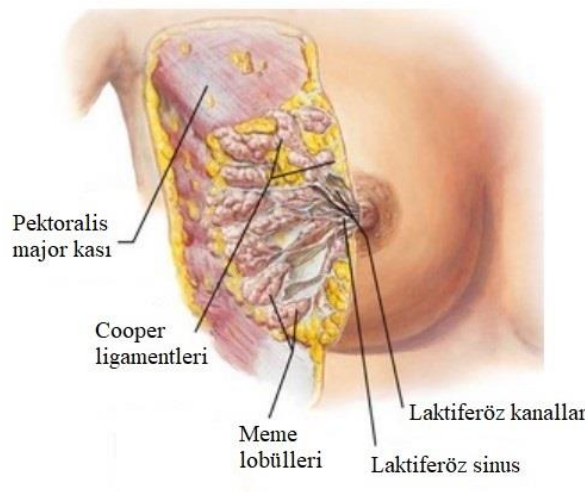
2.1.2. Meme Anatomisi

Meme pektoralis majör kasının önünde göğüs duvarında yer alır. Vertikal ekseninde 2-6. kotlar arasında bulunur; horizontal ekseninde ise sternum kenarından orta aksiller çizgiye uzanır. Meme dokusu aksillaya doğru uzanım gösterir ki bu Spence

kuyruğu olarak adlandırılır. Meme lateralde serratus anterior kası, inferiorde eksternal oblik kas ve superiorde rektus kası kılıfı arasında bulunur. Yoğun fibröz doku demetlerinden oluşan Cooper ligamentleri deriden pektoral fasyaya uzanır. Bu bağların parankimal lezyonlar tarafından distorsiyonu veya kasılması, deride çekilmelere veya meme ucu retraksiyonu ile kendini gösterebilir (portakal kabuğu görüntüsü) (10).



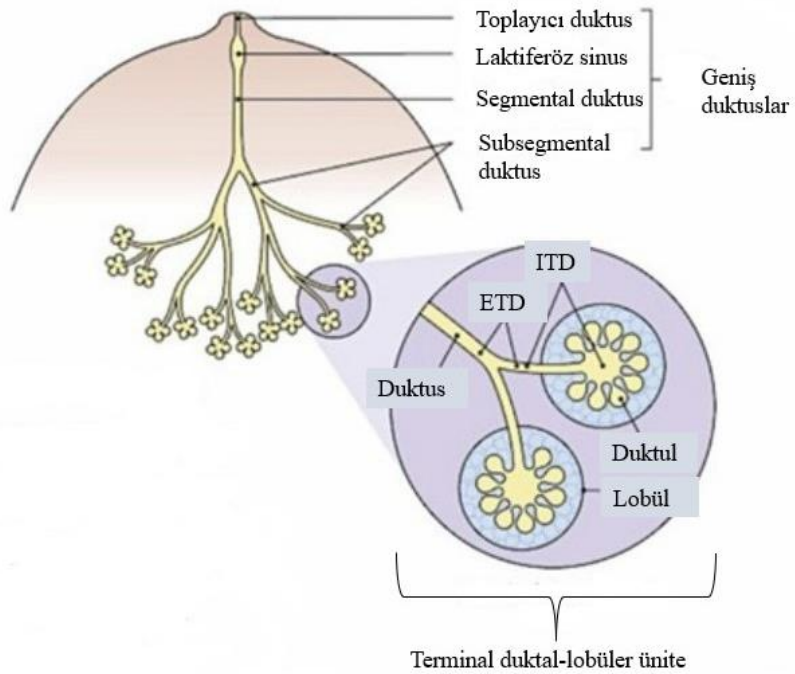
Şekil 2.1. Memenin normal embriyolojik gelişimi A: Gebeliğin 5. haftasında görülen meme tomurcuğu. B: 5. gebelik haftasından sonra meme tomurcuğunun göğüs içine doğru büyümesi C: Gebeliğin 5-12. haftalarında ikincil tomurcuğun oluşumu D: Gebeliğin 12. haftasında meme lobüllerinin oluşumu E: Gebeliğin 12. haftasından sonra meme lobüllerinin büyümesi (11).



Şekil 2.2. Meme anatomisi (12)

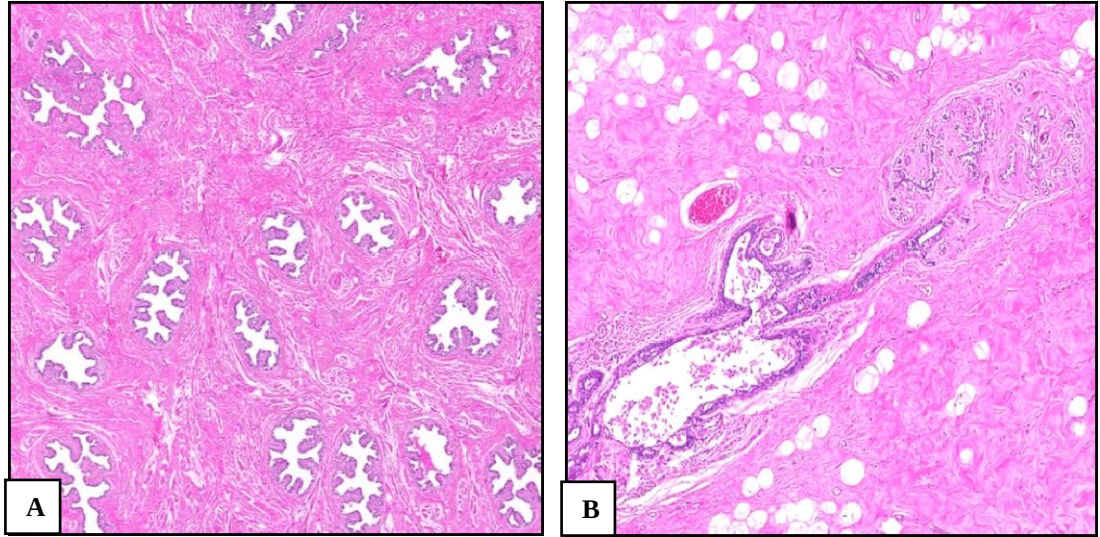
2.1.3. Meme Histolojisi

Erişkin bir kadın memesi terminal-duktal lobüler ünite (TDLU) ve büyük duktal sistem adı verilen iki yapıdan meydana gelir. TDLU terminal duktus ve lobülden oluşur. Memenin yapısal ve fonksiyonel birimini temsil eder. TDLU segmental duktusa bağlanan subsegmental duktusa açılır. Segmental duktuslar meme başının altında fuziform şekilde dilatasyon gösteren laktiferöz sinüslere bağlanırlar. TDLU elastik liflerin olmadığı, miksoid görünümde hormona duyarlı özel bir bağ dokusundan meydana gelir. Büyük duktuslar ise iyi gelişmiş elastik tabakaya sahiptir; daha az miktarda stroma bulundurur (13).



Şekil 2.3. Terminal duktal lobüler ünitenin şematik gösterimi (13)

Duktal-lobular sistem özelleşmiş iki tabakalı hücre ile döşelidir. Bunlar sekretuar ve absorptif fonksiyonlu iç epitelyal tabaka (luminal) ve dış miyoepitelyal (bazal) tabakadır. Bu çift epitel tabakalanması benign/malign lezyonların ayırımında önemlidir. Histomorfolojik ve immünohistokimyasal olarak farklı özelliklere sahiptirler.

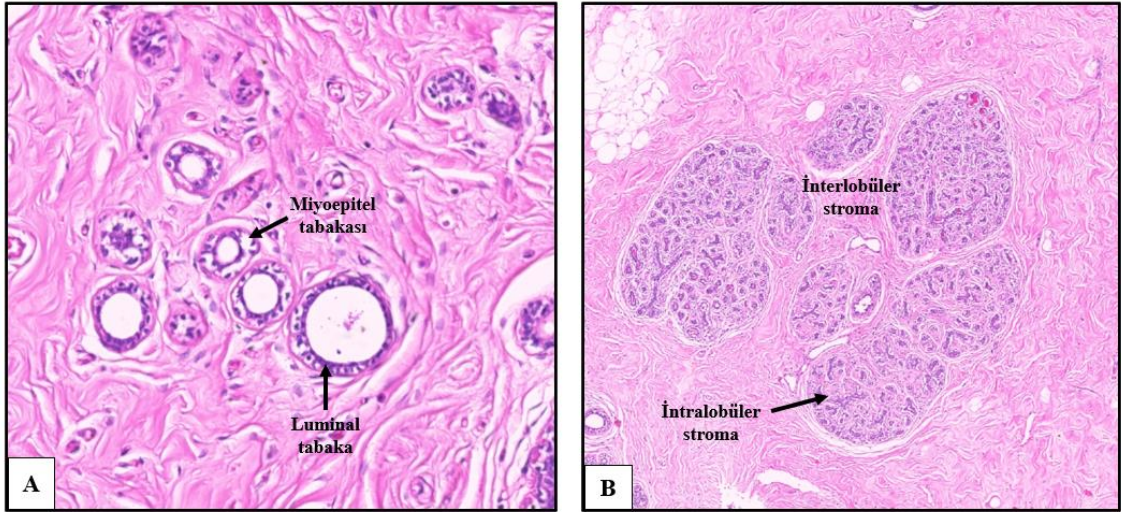


Şekil 2.4. A-B) Laktiferöz sinüs ve terminal duktal lobüler ünitenin histolojik görünümü, HE x5

Luminal hücreler kübik-kolumnar şekillidir, tipik eosinofilik sitoplazmalı; uniform oval nükleuslara sahiptirler. Sitokeratin 7,8,18 ve 19 dahil düşük molekül ağırlıklı sitokeratinleri eksprese ederler. Miyoeitel hücrelerin ise geniş berrak sitoplazması yassılaştırmış nükleusları vardır. S100 protein, aktin, kalponin, p63 ve CD10 ile pozitif boyanırlar. Ayrıca luminal ve miyoeitel hücrelerin yokluğunda öncü hücreler olarak da adlandırılan duktal-lobuler sistem boyunca düzensiz dağılmış üçüncü bir hücre tipi bulunur. Bu hücreler sitokeratin 5 ve 14 eksprese ederler (10).

Meme duktusları ve lobülleri yaş ve bireysel farklılıklara göre değişkenlik gösteren fibröz doku ve yağ dokudan oluşan stromaya gömülüdür. Lobüller lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ve mast hücreleriyle beraber gevşek fibrovasküler intralobüler stroma ile çevrilidir. İntralobüler stroma yoğun daha kollajenize hücreden fakir interlobüler stroma tarafından çevrelenir (10).

Meme başı-areola kompleksi pigmentasyon artışı gösteren çok sayıda duyusal sinir sonlanması içeren deri alanıdır. Meme başı merkezde yerleşmiştir ve tepesi 15-20 ağızdan oluşur. Keratinize çok katlı skuamöz epitel ile örtülüdür (10).



Şekil 2.5. A) Miyoeitel ve luminal tabaka, HE x10; B) İnterlobüler ve intralobüler stromanın histolojik görünümü, HE x5

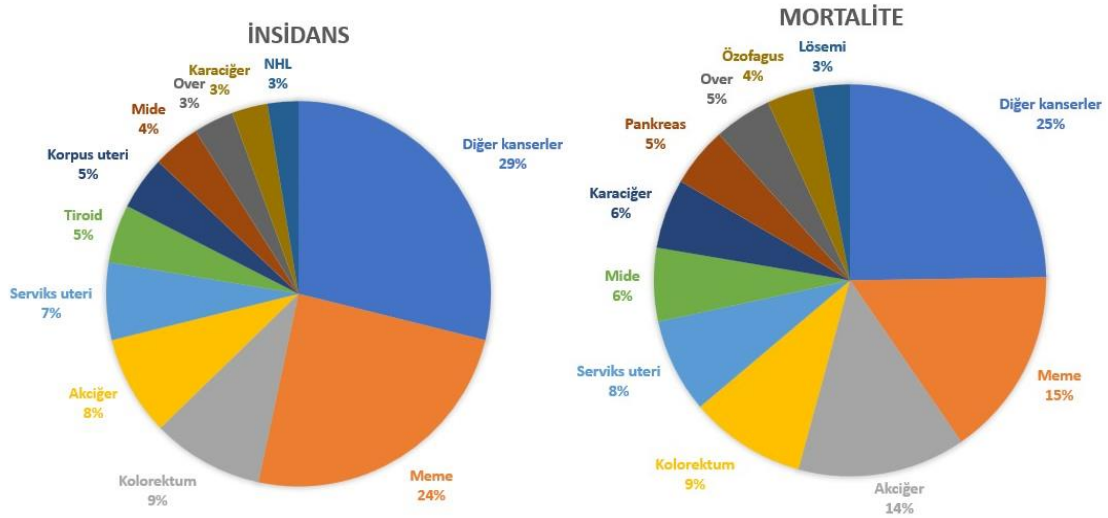
2.2. Meme Kanseri

2.2.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Meme kanseri dünya çapında en yaygın malign tümördür ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebidir. Çoğu epitelyal tümörde olduğu gibi meme kanseri insidansı yaşla birlikte artar (13).

Dünya genelinde ülkeler arasında meme kanseri görülme sıklığı 10 kata kadar farklılık göstermektedir. Avusturalya, Avrupa ve Kuzey Amerika gibi yüksek riskli bölgelerde kadınların %6'sının 75 yaşından önce invaziv meme karsinomu tanısı aldığı bildirilmiştir. Sahra altı Afrika, güney ve doğu Asya gibi daha az gelişmiş ülkelere kıyasla meme kanseri görülme sıklığı üçte biri oranındadır (13,14). Küresel Kanser İnsidansı, Mortalitesi ve Prevalansı (GLOBOCAN) verilerine göre 2020 yılında tüm dünyada 2,3 milyon; ülkemizde ise 24.275 yeni tanı meme kanseri vakası tespit edilmiştir. Bu da tanı koyulan her 8 kanserden 1'inin meme kanseri olduğunu gösterir (15).

Meme karsinomlarının mortalite oranları 1930'lardan 1990'ların başına kadar çok az değişmiştir. Bununla birlikte 1990'lardan sonra nüfus taraması, adjuvan hormonal tedavi ve kemoterapinin etkisi, erken tanı yöntemleri ile özellikle dünyanın bazı bölgelerinde (Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya) meme karsinomunun mortalite hızına düşüş yaşanmaktadır (13,14).



Şekil 2.6. 2020 GLOBOCAN verilerine göre dünya genelinde kadınlarda vaka ve ölüm sayısı oranları (16)

2.2.2. Etiyoloji

Meme karsinomunun gelişimi için çeşitli risk faktörleri belirlenmiş olmakla birlikte bu faktörlerin çoğunda genetik olarak duyarlı zeminde güçlü ve/veya uzun süreli östrojen uyarımı ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (13).

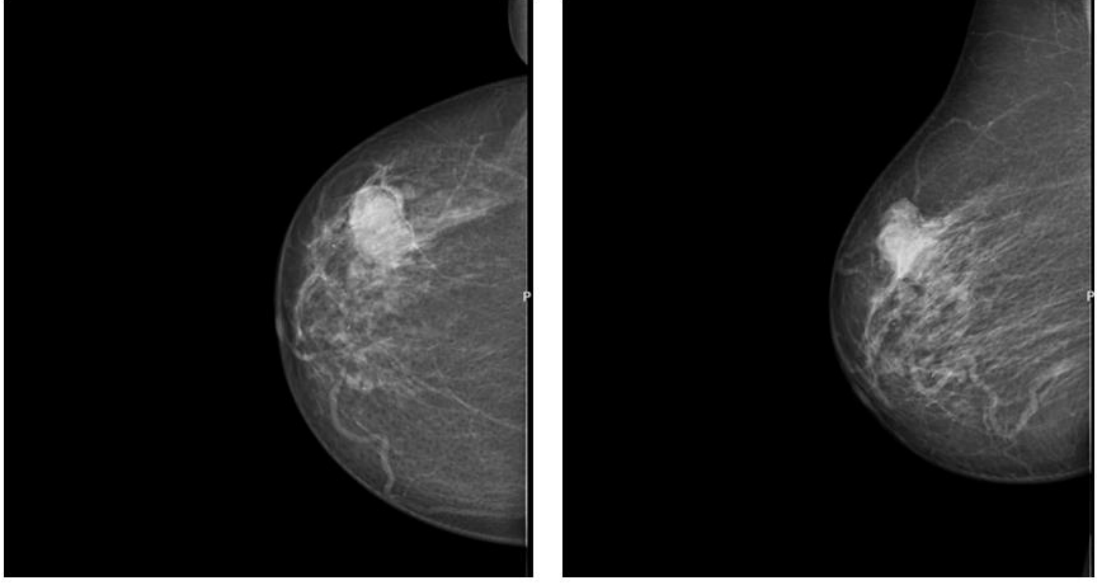
- Yaş: Meme kanseri insidansı yaşla beraber artar. 2016 yılında Amerika’da yapılan bir çalışmada yaklaşık %99.3’ü 40 yaş üzeri kadınlarda bildirilmiştir. Bu nedenle 40 yaş ve üzeri kadınlarda mamografi taraması yaptırmak gerekir.
- Aile öyküsü: Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık 1/4’ü aile öyküsü ile ilişkilidir. Annesi, kız kardeşi veya birinci derece akrabasında meme kanseri olan kadınlar, genel popülasyona göre 2 veya 3 kat fazla riske sahiptir. Meme kanserine kalıtsal yatkınlıkta BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları suçlanmaktadır.
- Menstrüel ya da reproduktif öykü: Erken menarş, geç menopoz, ilk doğum yaşının ileri olması ve nulliparite gibi üreme faktörleri risk artışı ile koreledir. Menopozda her 1 yıllık gecikme meme kanseri riskini %3 oranında artırır. Her 1 yıllık menarş gecikmesi veya her ek doğum meme kanseri riskini sırasıyla %5 veya %10 oranında azaltır.

- Östrojenler: Hem endojen hem egzojen östrojenler meme kanseri riski ile ilişkilidir. Endojen östrojen premenopozal kadınlarda genellikle overler tarafından üretilir. 35 yaşından önce ooferektomi yapılan kadınlarda meme kanseri riski 1/3 oranında azalmıştır. Egzojen östrojenin ana kaynakları oral kontraseptifler ve hormon replasman tedavisidir (HRT). 10 yıldan fazla oral kontraseptif kullanan kadınlarda meme kanserinde çok az bir risk artışı bildirilmiştir. HRT kullanımı meme kanseri riskini artırır. İngiltere’de bununla ilgili yapılan bir çalışmada HRT kullanan kadınlarda kullanmayanlara göre 1.66 oranında bir risk artışı bildirilmiştir.
- Yaşam tarzı: Aşırı alkol tüketimi, diyetle çok yağ alımı meme kanseri riskini artırır. Modern batı diyeti çok fazla yağ içerir ve aşırı yağ alımı, meme kanseri hastalarında mortalite ve kötü prognoz ile ilişkilidir (13,17,18).

2.2.3. Klinik Özellikler ve Görüntüleme

Meme hastalıklarının saptanmasında palpasyon, klinik değerlendirmede hekim ve hastanın kendi tarafından uygulanabilir, vazgeçilmez pratik bir yöntemdir. Bununla beraber mamografide saptanan tümörlerin yaklaşık %60’ı palpasyon ile tespit edilebilir. Ayrıca cilt retraksiyonu, meme başının içe çökmesi, meme başı akıntısı vb. bulgular da klinik olarak saptanabilir (13,14).

40 yaş ve üzeri kadınlarda klinik olarak tespit edilen kitlenin görüntülenmesi için tercih edilen ilk yöntem mamografidir. 30 yaşından küçük kadınlarda meme kitlesinin görüntülenmesinde tercih edilecek ilk yöntem ise meme ultrason olmalıdır. 30-40 yaş arası kadınlarda ultrasonografi ve mamografi tanı yöntemi olarak kullanılmalıdır (19).

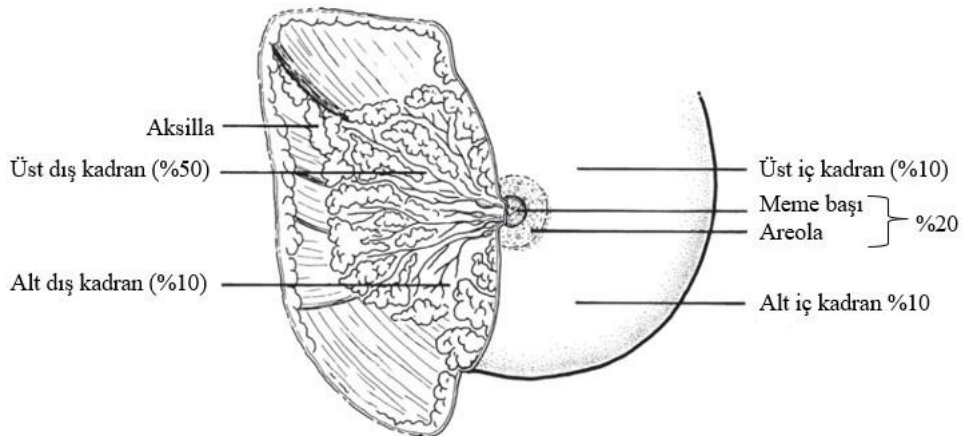


Şekil 2.7. Yeni tanı almış meme tümörü vakasının mamografik görünümü

Amerikan Kanser Derneği 45-54 yaş arası kadınların yılda bir kez mamografi taramasından geçmesini önermektedir. 55 yaş ve üzeri kadınların ise 2 yılda bir düzenli taramaya geçmesi vurgulanmaktadır (20).

2.2.4. Yerleşim Yeri ve Makroskopik Özellikler

Meme kanserlerinin %90'ı tek odaklıdır. Üst dış kadran daha sık olmakla birlikte memenin herhangi bir kadranında yerleşebilir. Meme kanseri hastalarının %2'sinde kontralateral bir tümör ortaya çıkar.



Şekil 2.8. Sağ memenin topografik anatomisi (21)

İnvaziv meme karsinomları sınırları düzensiz, yıldızsı şekilde genellikle nodüler konfigürasyonda solid kitlelerdir. Palpasyonla ele gelirler. Neoadjuvan tedavi gören vakalarda tümör yumuşak kıvama gelip palpe edilemeyebilir veya fibröz bir skarın içinde olabilir. Tümörün belirlenemediği durumlarda haritalandırılarak örnekleme yapılmalıdır. Deri ülserasyonu, meme başı değişiklikleri, ciltteki lezyonlar da evreleme için önemlidir; deri ve meme başı lezyonu varsa mutlaka raporda belirtilmelidir (14).

2.2.5. Histolojik Sınıflama

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 histolojik sınıflandırmasına göre meme tümörleri; epitelyal tümörler, fibroepitelyal tümörler ve hamartomlar, meme başı tümörleri, mezenkimal tümörler, hematolenfoid tümörler ve erkek meme tümörleri olmak üzere alt gruplarda incelenir. Ayrıca 2014 DSÖ histolojik sınıflandırmasında yer almayan bireysel hastalarda tanıda öneme sahip genetik hastalıklar için memenin genetik tümör sendromları alt grubu 2019 DSÖ histolojik sınıflandırmasında gruba dahil edilmiştir. Yine 2014 DSÖ sınıflandırmasında ayrı bir alt tip olarak yer alan memenin klasik medüller karsinomu teşhisi zor olduğundan 2019 DSÖ sınıflandırmasında invaziv duktal karsinom grubuna dahil edildi. İnvaziv meme karsinomları epitelyal tümörler grubunda yer almaktadır. Ayrıca epitelyal tümörler grubunun içinde benign proliferatif ve prekürsör lezyonlar, papiller lezyonlar ve benign epitelyal proliferasyonlar ve prekürsör lezyonlar, adenozis ve sklerozan lezyonlar ve adenomlar da yer almaktadır. Memenin epitelyal tümörlerinin histolojik sınıflandırılması Tablo 2.2’de gösterilmiştir (14).

2.2.6. Meme Kanserlerinin Evrelemesi ve Histolojik Derecelendirme

Meme karsinomu; tubul oluşumu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısına göre derecelendirilir. Bu derecelendirme yapılırken ilk olarak 1928’de Patey ve Scarff tarafından belirlenen, daha sonra Elston ve Ellis tarafından modifiye edilen ‘Scarff-Bloom-Richardson derecelendirme sistemine Elston-Ellis modifikasyonu-Nottingham Histolojik Skorlama Sistemi’ (Modifiye Bloom Richardson) sistemi esas olarak alınır (22). Modifiye Bloom Richardson sistemine göre toplam skor belirlenip tümör derecelendirmesi yapılır. Buna göre toplam skor 3-5 ise derece 1, 6-7 ise derece 2, 8-9 ise derece 3 olarak belirlenir.

Tablo 2.1. Modifiye Bloom Richardson derecelendirme yöntemi

	Özellik	Skor
Tubul ve gland formasyonu	Tümörün >%75'i	1
	Tümörün %10-75'i	2
	Tümörün <%10'u	3
Nükleer pleomorfizm	Küçük, düzenli, uniform hücreler	1
	Orta derecede pleomorfizm	2
	Belirgin pleomorfizm ve nukleolus	3
Mitoz (x40'lık büyütmede 10 BBA'da)*	0-3	1
	4-7	2
	8 ve üzeri	3

*Mikroskoptaki milimetrik alan çapına göre değişkenlik göstermektedir.

Tablo 2.2. DSÖ 2019 epitelyal meme tümörlerinin histolojik sınıflandırılması

İnvaziv Meme Karsinomu
Özel tipi olmayan İnvaziv Meme Karsinomu (İnvaziv Duktal Karsinom)
Mikroinvaziv Karsinom
İnvaziv Lobüler Karsinom
Tübüler Karsinom
Kribriform Karsinom
Müsinöz Karsinom
Müsinöz Kistadenokarsinom
İnvaziv Mikropapiller Karsinom
Apokrin Diferansiasyonu Olan Karsinom
Metaplastik Karsinom
Nadir ve Tükürük Bezi Tipi Tümörler
Asinik Hücreli Karsinom
Adenoid Kistik Karsinom
Sekretuar Karsinom
Mukoepidermoid Karsinom
Polimorföz Adenokarsinom
Ters Polarizasyon Gösteren Tall Cell Karsinom
Nöroendokrin Neoplazmlar
Nöroendokrin Tümör
Nöroendokrin Karsinom
Epitelyal-Myoepitelyal Tümörler
Pleomorfik Adenom
Adenomyoepitelyoma
Malign Adenomyoepitelyoma
Papiller Neoplazmlar
Enkapsüle Papiller Karsinom
Solid Papiller Karsinom (in situ-invaziv)
İnvaziv Papiller Karsinom

2.2.7. Gen Ekspresyon Analizine Göre Alt Tipler

2013 St. Gallen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı, meme kanseri moleküler alt tiplerinin yeni bir tanımını yayınladı ve gen ekspresyon analizlerine göre 5 intrinsik alt tipe ayırdı: Luminal A, Luminal B, Human epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) overekspresyonu, bazal benzeri (BLBC) ve diğer özel alt tipler. Bu panelin çok genli moleküler tahlil, doğru ve tekrarlanabilir prognostik bilgi ve neoadjuvan kemoterapiye yanıt tahmini sağladığı belirlendi (3). Fakat günlük uygulamada ekonomik ve işlevsel nedenlerle birçok araştırmacı immünohistokimya temelli moleküler sınıflandırmayı kullanmaktadır (23).

Luminal A; %30-40 oranıyla en sık görülen moleküler alt tiptir. Bu gruptaki tümörler ER ve PR pozitif, HER2 negatif tümörlerdir. Düşük Ki-67 proliferasyon indeksine sahiptir (24). Bu tümörler iyi diferansiyedir, ileri yaşta görülür ve daha iyi prognoza sahiptir (25). Morfolojik olarak çoğu özel bir tipi olmayan iyi diferansiye karsinomlar, tübüler karsinomlar, klasik lobüler karsinomlar, müsinöz karsinomlar ve nöroendokrin karsinomlardır (23).

Luminal B; %20-30 oranında görülür. ER, PR, HER2 pozitif tümörlerdir. Ki-67 proliferasyon indeksi daha yüksektir. Bu tümörler daha az diferansiyedir. Luminal B kanserleri, ER pozitif olmasına rağmen, hormon tedavisine dirençlidir ve hormona duyarlı lüminal A kanserlerinden farklı bir moleküler fenotipe sahiptir (23,26).

HER2 over ekspresyonu gösteren tümörler; %12-20 oranında görülür. Moleküler olarak heterojen bir grubu temsil eder. Bu gruptaki tümörler HER2 pozitif; ER ve PR negatiftir. Yüksek Ki-67 proliferasyon indeksine sahiptir. HER2 over ekspresyonu lenf nodu pozitif hastalarda artış nüks ve mortalite ile ilişkiliyken; lenf nodu negatif hastalarda etki değişkendir (27). Morfolojik olarak çoğu özel bir tipi olmayan invaziv duktal karsinom, bazı apokrin karsinomlar ve pleomorfik invaziv lobüler karsinomlardır (23).

Bazal benzeri; tüm meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. ER, PR ve HER2 negatif tümörlerdir. Kötü prognoz ilişkilidir ve daha genç yaşta ortaya çıkar. Bu tümörler genellikle yüksek derecelidir, yüksek nükleer atipiyeye sahiptir. Ki-67 proliferasyon indeksi yüksektir. Morfolojik olarak çoğu medüller ve metaplastik tiptir (28).

Tablo 2.3. Meme karsinomlarının gen ekspresyon analizine göre sınıflandırılması (3)

Sınıflandırma	İmmün Profil	Özellikler	Hücre Hatları
Luminal A	ER+, PR+, HER2-	Ki67 düşük, endokrin yanıt kemoterapiye yanıt verir	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER+, PR+, HER2-/+	Ki67 yüksek, genellikle endokrin yanıt, kemotepi için değişken, Her2+ transtuzumab için duyarlı	BT474, ZR-75
HER2 over ekspresyonu	ER-, PR-, HER2+	Ki67 yüksek, transtuzumab duyarlı, kemoterapi duyarlı	MDA-MB-453, SKBR3
Bazal benzeri	ER-, PR-, HER2-	Ki67 yüksek, endokrin yanıt vermez, genellikle kemoterapiye cevap verir	MDA-MB-468, SUM110

Tablo 2.4. Moleküler sınıflandırma için belirlenen immünohistokimya belirteçleri (21)

Moleküler subtipler	ER	PR	HER2	Ki-67	CK5/6	EGFR	p53
Luminal A	Pozitif	Pozitif	Negatif	Düşük	Negatif	Negatif	Pozitif
Luminal B	Pozitif	Negatif	Negatif	Yüksek	Negatif	Negatif	Pozitif
HER2 over ekspresyonu	Negatif	Negatif	Pozitif	Yüksek	Negatif	Negatif	Pozitif
Bazal benzeri	Negatif	Negatif	Negatif	Yüksek	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Normal meme kanseri	Pozitif	Negatif	Negatif	Düşük	Negatif	Negatif	Pozitif

2.2.8. Prognostik Faktörler

Prognostik faktörler 1999 yılında yayınlanan College of American Pathologists konsensus beyanına göre kategorilere ayrılmıştır:

Kategori 1, prognostik önemi olduğu ve klinik hasta yönetiminde yararlı olduğu kanıtlanmış faktörler;

Kategori II, biyolojik ve klinik olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmış, ancak istatistiksel olarak çalışmalarda doğrulanmaya devam eden faktörler.

Kategori III, prognostik değerlerini göstermek için yeterince incelenmemiş diğer tüm faktörler olarak gruplandırılmıştır (29).

Kategori 1:

- a) *Tümör boyutu:* Tümör boyutu, tutulan aksiller lenf nodlarının sayısı ile ilişkilidir ve aynı zamanda bağımsız bir prognostik faktördür. <1 cm tümörleri olan hastaların 5 yıllık sağ kalımı %99'a yakinken, bu oran 1 cm ile 3 cm arasındaki tümörler için %89 ve 3 cm ile 5 cm arasındaki tümörler için %86'dır.
- b) *Aksiller lenf nodu:* 4 veya daha fazla aksiller lenf nodu tutulumu olan hastalar, 4'ten az aksiller lenf nodu tutulumu olan hastalara göre daha kötü prognoza sahiptir.
- c) *Histolojik derece:* Derece belirlenirken genellikle Modifiye Bloom Richardson gradeleme sistemi kullanılır. Skor 3 olan hastalar skor 1 olan hastalara göre rekürrens riski daha fazladır.
- d) *Histolojik tip*
- e) *Mitoz*
- f) *Hormon reseptör durumu*

Kategori 2:

- a) *Her2*
- b) *P53*
- c) *Lenfatik ve vasküler invazyon*
- d) *Hasta yaşı:* Tanı sırasında 50 yaş üzeri kadınlar daha iyi prognoza sahiptir.
- e) *Hücre proliferasyonu*
- f) *DNA analizi*

Kategori 3:

- a) *DNA ploidi analizi*
- b) *Tümör anjiogenezi*
- c) *Epidermal büyüme faktörü reseptörü*

d) *Bcl-2, Katepsin D* (27,29)

Dünya Sağlık Örgütü'nün Meme Tümörleri 5. baskısında belirlediği standart klinokopatolojik prognostik faktörler ise *hasta yaşı, hastalık evresi, tümör derecesi, tümör tipi, cerrahi sınır durumu ve lenfovasküler invazyon durumudur* (14).

2.2.9. Stromal Yanıt Paternleri ve Tümör İnfiltrat Lenfositler

İnvaziv meme kansinomlarında hücrel fibroblastik proliferasyon, yetersiz bağ doku, belirgin hyalinizasyon gibi değişken şekilde stromal bileşen bulunabilir. Periduktal ve perivenöz alanda elastoz odakları görülebilir. Tümör içinde 1 milimetreden büyük abartılı tümör stroma oluşumu alanı olarak tanımlanan fibrotik odaklar gösteren vakalar daha agresif davranış sergilemektedir (14).

Tümör içinde ve stromasındaki immün infiltratlar tümör infiltrat lenfosit (TIL) olarak tanımlanır. TIL'ler tümör hücrelerine karşı konakçının bağışıklık tepkisini yansıtmakta olup; iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. Özellikle üçlü negatif meme kansinomlarında ve HER2 pozitif meme kansinomlarında yüksek TIL oranları neoadjuvan tedaviye daha iyi yanıt sağlamaktadır; sitotoksik tedavilere ve immünoterapiye yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir (14). 16. St. Gallen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı'ndaki uzman görüşü üçlü negatif meme kanserindeki TIL oranlarının prognostik bir faktör olarak rutin bildirilmesini onaylamıştır (30). Dünya Sağlık Örgütü 5. baskısında, üçlü negatif meme kanserleri ve HER2 pozitif meme kanserleri vakalarında tümör stromasındaki lenfositik infiltrasyonunu ifade eden histopatolojik TIL miktarlarının raporda belirtilmesini istemiştir.

TIL oranı hesaplanırken invaziv tümör sınırları içinde değerlendirilmeli; sınırın dışı ve duktal karsinoma in situ alanları dahil edilmemelidir. Tüm mononükleer hücreler (lenfositler ve plazma hücreleri) puanlanmalı fakat polimorfonükleer lökositler puanlamanın dışında tutulmalıdır. Klinik olarak TIL eşik değeri belirlenmemiş olsa da %50-60'dan yüksek TIL oranları değerli kabul edilir (31).

2.2.10. Neoadjuvan Tedavi Sonrası Morfolojik Değişiklikler

Neoadjuvan tedaviye yanıtı değerlendirmek için kalan tümör veya tümör yatağını belirlemek; lenf nodlarının tedaviye yanıtını bildirmek son derece önemlidir. Neoadjuvan tedaviye tam yanıtta gevşek vaskularize fibroelastik bağ doku, kronik inflamatuvar hücreler ve makrojlar tümör yatağını temsil ediyor olabilir. Küçük atipik

hücrelerin varlığında mutlaka immünohistokimya ile bu hücrelerin tümör hücresi olup olmadığı doğrulanmalıdır.

Normal meme epiteli yapıları ise neoadjuvan tedaviden sonra atipikleşir. Radyasyon stromasının yoğun ve hiposellüler olmasına sebep olabilir. Radyasyon fibroblastları görülebilir. Kanal ve lobüllerin epitel hücreleri hafif düzensiz ve hiperkromatik çekirdeklere sahip olabilir. Bu değişiklikler invaziv tümör odağından uzakta olabilir (14).

2.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri

Üçlü negatif meme kanserleri östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu, HER2 gen amplifikasyonu olmayan agresif davranış sergileyen meme karsinomu alt tipidir. Tüm meme karsinomlarının %15' ini oluşturur (32). Diğer alt tiplere göre daha erken nüks ve uzak metastaz oranına sahiptirler (33).

Meme karsinomları histomorfolojik olarak 18 alt gruba ayrılır. Meme karsinomlarının yaklaşık %50-60' ı başka türlü sınıflandırılmayan invaziv duktal karsinom (IDC-NOS) olarak tanımlanır. IDC-NOS diğer 17 alt tipten biri olarak kategorize edilecek morfolojik özellikler göstermeyen tiptir. Meme karsinomlarını histolojik olarak alt tiplere ayırmak; prognozu belirleme ve tedavi seçeneklerini belirlemek için yetersiz kalmıştır. Bu sebeple meme karsinomlarını karakterize etmek için moleküler özellikleri kullanılarak yeni bir sınıflama yapılmıştır. Bu sınıflamaya göre 5 moleküler alt tip belirlenmiştir (lüminal A, luminal B, bazal benzeri, HER2 pozitif ve normal benzeri meme kanseri) (34).

Üçlü negatif meme kanserleri ve bazal benzeri meme kanseri büyük oranda örtüşme göstermesine rağmen biyolojik olarak sinonim değildir. Üçlü negatif meme kanseri vakası olup bazal benzeri olmayan %10-30 oranında vaka bulunmaktadır. Bazal benzeri moleküler alt tip grubuna dahil olup hormon reseptör ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonu gösteren %20-30 oranında vaka mevcuttur (35).

Üçlü negatif meme kanserleri histolojik olarak çeşitli morfolojilere sahiptir. Genellikle yüksek dereceli, sınırları zorlayan, geniş coğrafik nekroz alanları içeren invaziv meme karsinomlarıdır. Mitoz oranları %80'in üzerindedir. Yüksek nükleus/sitoplazma oranına sahiptir. Lezyonlar büyük merkezi skar alanına sahiptir. Duktal karsinoma in situ alanlar diğer hormon reseptörü pozitif tümörlere göre daha

nadir rastlanır. Germline BRCA1 mutasyonları gösteren kanserler genellikle üçlü negatif meme kanseri morfolojine sahiptir.

Üçlü negatif meme kanseri hastaları endokrin tedavi (antiöstrojen) ve hedefe yönelik tedaviden (trastuzumab) fayda görmezler. Baskın sistemik tedavi kemoterapi olmasına rağmen yanıtlar kısa ömürlüdür. Bu nedenle yeni tedavi rejimlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

İmmünoterapi kanser gibi birçok hastalıkta kişinin bağışıklık sistemini kullanarak tedavi etme biçimidir. İmmünoterapi solid tümörlerde sağkalımı uzatmıştır ve üçlü negatif meme kanserlerinde umut vaad etmektedir. Üçlü negatif meme kanserleri daha fazla tümör infiltrate lenfosit (TIL) sahip olmaları ve immün kontrol noktası inhibitörlerinden (ICI) daha fazla yarar görmeleri sebebiyle daha fazla immünojenik olduğu kanıtlanmış ve immünoterapiden daha fazla yarar göreceği düşünülmüştür (5,6).

2.3.1. Üçlü Negatif Meme Kanserlerinin Histolojik Alt Tipleri

Üçlü negatif meme karsinomları histolojik olarak düşük dereceli ve yüksek dereceli lezyonlar olarak sınıflandırılabilir. Üçlü negatif meme karsinomlarının çoğu yüksek dereceli sınırları zorlayan lezyonlardır; belirgin nükleer pleomorfizm, çok sayıda mitoz, coğrafik nekroz alanları ve stromal lenfositik yanıtı sahiptir. Düşük dereceli lezyonlar nadirdir; metastaz daha az oranda rastlanır (36).

Yüksek dereceli tümörler invaziv duktal karsinomlar ve metaplastik karsinomlardır. Düşük dereceli tümörler grubunda ise olağan dışı morfolojik tipler olan tükürük bezi benzeri tümörler ve ters polarizasyon gösteren tall cell karsinom yer alır.

İnvaziv duktal karsinomlar yüksek mitoz ve nükleus/ sitoplazma oranına sahip geniş coğrafik nekroz alanları bulunduran ve daha büyük tümör çapına sahip olan yüksek dereceli tümörlerdir. Diğer tiplere kıyasla daha genç yaşta görülürler, agresif seyirlidirler ve sıklıkla BRCA1-2 mutasyonu ile ilişkilidirler. Yüksek TIL oranına sahiptir (14).

Metaplastik karsinomlar yüksek dereceli tümör gurubunda yer alan diğer histolojik alt tiptir. Metaplastik karsinomların %90'ı üçlü negatiftir. İnvaziv duktal karsinoma göre tümör boyutları daha büyüktür ve lenf nodu tutulumu nadirdir. Prognozları daha kötüdür. Daha ileri evrede prezente olur. Ki-67 ve P53 ekspresyon

düzeyleri genellikle yüksektir. Radyolojik ve makroskobik olarak iyi sınırlı lezyonlardır. Eşlik eden in situ komponent genellikle olmaz. Eğer bir tümöre yaygın in situ karsinom eşlik ediyorsa metaplastik karsinom tanısından vazgeçilmelidir. TIL oranı daha az olmasına rağmen PDL1 ekspresyon seviyeleri yüksektir. Yaşam beklentisi daha kısadır (37). Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında düşük dereceli adenoskuamöz karsinom, fibromatozis benzeri metaplastik karsinom, içsi hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, heterelog mezenkimal diferansiasyon gösteren metaplastik karsinom ve mikst metaplastik karsinom olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır. Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom ve fibromatozis benzeri metaplastik karsinom metaplastik karsinomlara dahil olmasına rağmen daha iyi prognoza sahiptir (14).

Tükürük bezi benzeri tümörler arasında sekretuar karsinom, mukoepidermoid karsinom, adenoid kistik karsinom ve asinik hücreli karsinom yer almaktadır. Sekretuar karsinomlar eski adıyla junevil meme karsinomlarıdır. İlk olarak çocuklarda tanımlanmasına rağmen görülme yaşı 3-87'dir. Düşük dereceli nükleer atipi ve mitoz vardır. Mikrokistik, balpeteği, solid, tubuler ve papiller büyüme paternine sahiptir. ETV6-NTRK3 füzyonu oldukça spesifiktir. Adenoid kistik karsinomlar ortalama 60'lı yaşlarda görülür ve görülme sıklığı %0.1'dir. Epiteyal- myoepiteyal hücreler, klasik tubuler ve kribriform yapılara sahiptir. Nekroz ve mitoz sık rastlanmaz. Asinik hücreli karsinom mikroglandüler proliferasyondan solid yapılara kadar çok farklı yapısal paternler gösterir. Neoplastik hücreler geniş eosinofilik sitoplazmaya sahiptir; değişen oranda nükleer atipi ve mitoz içerirler (38).

Ters polarizasyon gösteren *tall cell karsinom* diğer bir düşük dereceli alt tiptir. Yüksek silindirik hücrelerden oluşan solid-solid papiller patern gösteren invaziv meme karsinomlarıdır. Yaklaşık %84 oranında IDHpArg172 hotspot mutasyonuna rastlanır. Nukleuslar bazaldan çok apikalde yerleşir. Prognozu oldukça iyidir (39).

Üçlü negatif meme kanserlerinin agresif biyolojik davranışından ötürü neredeyse tüm hastalara adjuvan sistemik kemoterapi önerilmektedir. Son yıllarda tanımlanan olumlu prognozla ilişkili düşük dereceli histolojik alt tiplerin bilinmesi üçlü negatif meme kanserli hastaların agresif sistemik tedavisine genelleştirilmiş yaklaşımdan kaçınmak için önemlidir (38).

2.3.2. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplendirme

Üçlü negatif meme kanserleri oldukça heterojen bir alt gruptur. 2011 yılında Lehmann ve ark. (40) gen ekspresyon analizine göre bazal-benzeri 1, bazal benzeri 2, immünmodülatör, mezenkimal, mezenkimal kök-benzeri ve luminal androjen olmak üzere 6 farklı alt tipi tanımlamıştır. 2015 yılında ise Burstein ve ark. (41) DNA ekspresyonuna dayalı luminal-AR, mezenkimal, bazal benzeri immün suprese ve bazal benzeri immün modüle olmak üzere 4 farklı subtipi incelemeyi önermiştir. 2016 yılında Liu ve ark. (42) hem mRNA'ların hem de lncRNA'ların ekspresyon profillerini entegre eden yeni bir sınıflama geliştirmiştir. Bu sınıflandırma immünmodülatör (IM), lüminal androjen reseptör (LAR), mezenkimal benzeri (MES), bazal benzeri ve immün baskılanmış (BLIS) gruplarını içermektedir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada Patoloji Akademisi (USCAP) 2022 yılında bazal benzeri 1, bazal benzeri 2, mezenkimal ve lüminal androjen reseptör olmak üzere 4 ana grupta konsensus sağlamıştır. Bu gruplar yaş, derece, hastalık progresyonu, histopatolojik özellikler ve neoadjuvan tedaviye yanıt açısından farklılık göstermektedir. Bununla birlikte tüm bu çalışmalara rağmen üçlü negatif meme karsinomları için klinik olarak doğrulanmış moleküler alt tiplendirme mevcut değildir.

Tablo 2.5. Üçlü Negatif Meme Kanserlerinde Moleküler Alt Tiplendirme

Moleküler Alt tip		Özellik
BL1	Bazal like 1	Yüksek nükleer derece
		En iyi klinik sonuç
BL2	Bazal like 2	Yüksek büyüme faktörü sinyali
M	Mezenkimal	TIL'den fakir
		Kemik ve akciğere artmış metastaz
LAR	Luminal androjen reseptör	Androjen reseptör ekspresyonu
		Artmış bölgesel lenf nodu metastazı

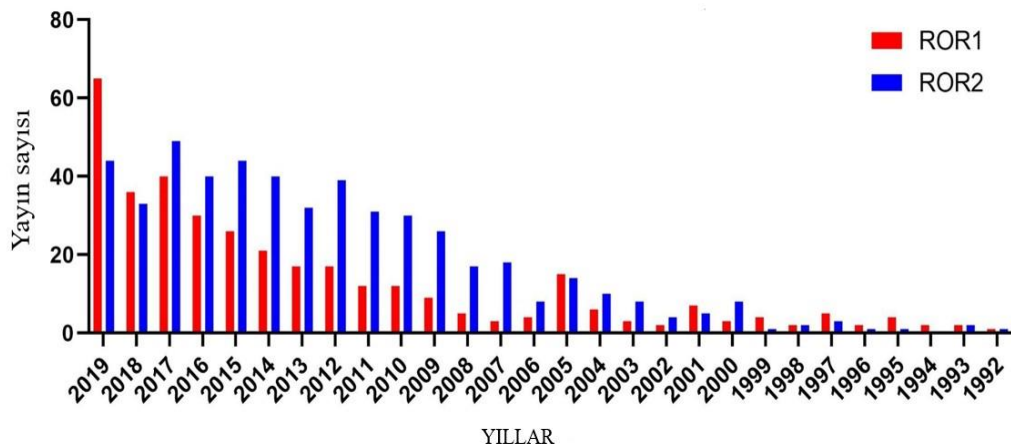
2.4. ROR1 ve CAR-T Hücreleri

Reseptör tirozin kinazlar (RTK), normal hücrel süreçlerin anahtar düzenleyicisidir ve kanser basamaklarının ilerlemesinde kilit rol oynar. Bu ailenin birçok üyesi vardır. Reseptör kinaz benzeri yetim reseptör ailesi (ROR), ilk olarak

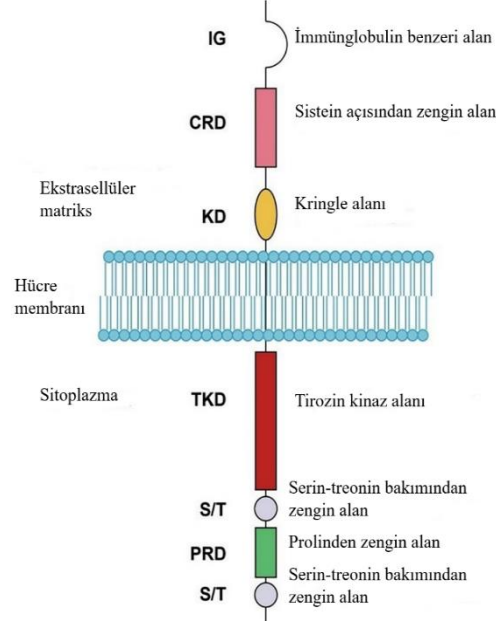
1992’de tanımlanmıştır. ROR1 ve ROR2 olmak üzere iki alt üye bulundurulur. ROR ailesi üyeleri ligandları uzun zamandır tanımlanmadığı için bu aileye yetim reseptör adı verilmiştir. ROR ailesinin Wnt ailesi sinyal molekülleri için reseptör olduğu ve Wnt-5a’nın birincil ligandı olduğu kanıtlanmıştır.

ROR2, son zamanlarda ROR1’den daha fazla incelenmiştir. ROR2 mutasyonunun Robinow sendromu ve tip B1 bradidaktili ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. ROR1 için henüz mutasyon bulunmamasına rağmen birçok hastalıkta ve kanser türünde anormal ekspresyon paterni sergilemiştir. Artan ekspresyon paterni ROR1’i özellikle malignitelerde terapötik hedef haline getirmiş ve son yıllarda çalışmalara ilgi kaynağı olmuştur (Şekil 2.9).

ROR1 bir transmembran reseptörüdür. Hücre dışı bir bölüm, transmembran segmenti ve sitoplazmik bölge içerir. Hücre dışı bölüm immünglobulin benzeri alan (IG), sistein açısından zengin alan (CRD), kringle alanından (KD) oluşmaktadır. Sistein açısından zengin alan Wnt5a ligandına bağlanarak Wnt sinyalini modüle eder. Wnt-5a aktivasyonu, cAMP yanıt element bağlayıcı (CREB) protein aktivasyonuna ilerler ve kanser hücrelerinin büyümesini ve göçünü artırır (43). Sitoplazmik bölge, bir tirozin kinaz alanı, iki serin/treonin bakımından zengin alan ve bir prolin bakımından zengin alan (PRD) içerir. Prolinden zengin alan hücre göçü ve çoğalma sinyallerinin aktivasyonundan sorumludur. Serin/treonin açısından zengin alan ise apoptoza karşı dirence sebep olur (Şekil 2.10).



Şekil 2.9. PubMed'e göre 1992 ile 2019 arasında ROR1 ve ROR2 ile ilgili yayın sayısı (42).



Şekil 2.10. ROR1'in şematik etki alanı yapısı (42).

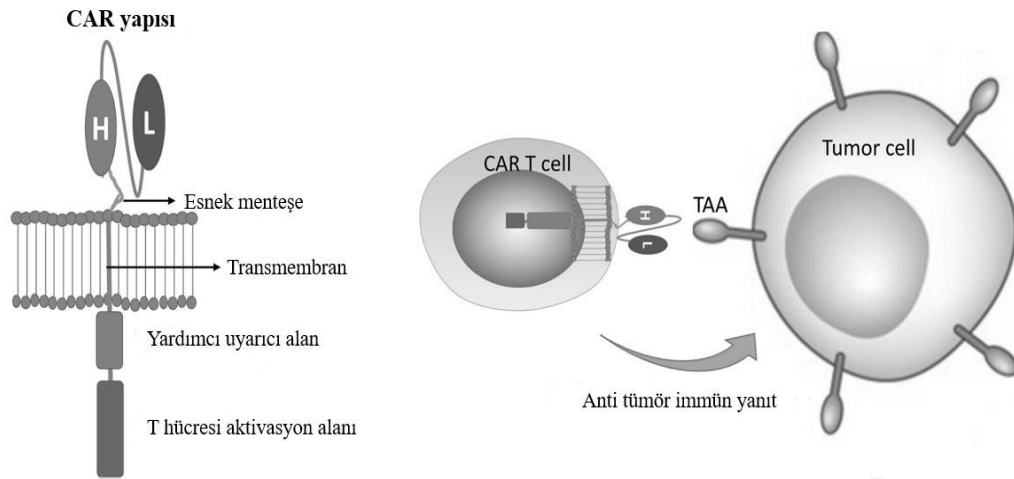
ROR1 erken embriyonik gelişim sırasında yüksek oranda eksprese edilir, ancak yetişkin dokularda çok düşük seviyelerde eksprese edilir. Birçok çalışma ROR1'in malign hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiğini kanıtlamıştır. Artan gen ekspresyonu özellikle kronik lenfositik lösemi ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca mantle hücreli lenfoma ve akut lenfoblastik lösemide de anormal şekilde eksprese edildiği kanıtlanmıştır. ROR1'in anormal ekspresyonu birçok solid organ tümörlerinde de bulunmuştur (6,44). Zhang ve ark. (45) meme karsinomu vakalarında normal meme dokusuna göre yüksek düzeyde ROR1 eksprese edildiğini savundular.

Vücudun kendi bağışıklık sisteminin kullanımı göz önüne alındığında, immünoterapi olarak adlandırılan tedavi; kanseri tedavi etmek için geleneksel tedavilerden daha etkili bir tedavi vaat etmektedir. Bir tür immünoterapi olan kimerik antijen reseptörü-T (CAR-T) hücre tedavisi, kanser tedavisinde umut verici yeni bir T hücresi immünoterapisidir. CAR-T hücresi, ağırlıklı olarak; akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), lenfoma, multipl miyeloma dahil olmak üzere hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılmıştır. CAR-T hücresi; melanom, meme kanseri ve sarkom gibi tümörlerin tedavisinde ise büyük umut ışığıdır.

CAR-T; bir antijen tanıma parçası ve T hücresi sinyalleşme alanlarından oluşan bir füzyon proteindir. CAR'lar, monoklonal antikorların (mAb) tümör tanıma yeteneklerini, T hücrelerinin antitümör ve çoğalma yetenekleriyle birleştirmek için

kullanılmaktadır. CAR'lar, sentetik DNA transpozon sistemleri veya mRNA geçici transfeksiyon gibi genleri entegre etmek için viral vektörler (lentivirüs veya retrovirüs) veya viral olmayan vektörler kullanılarak T hücrelerine verilir. T hücrelerinde eksprese edildikten sonra, CAR T hücreleri, MHC sunumundan bağımsız olarak antijene özgü tanıma, aktivasyon, proliferasyon ve sitotoksik fonksiyona sahip “canlı ilaçlar” haline gelir (Şekil 2.11).

Etkili CAR terapötikleri geliştirmenin ilk adımı, uygun hücre yüzeyi antijenlerinin seçilmesidir. İdeal CAR hedefleri, kanser patobiyolojisine katkıda bulunan tümör spesifik antijenlerdir (TSA). Çoğu tümörde eksprese edilen tümör ilişkili antijenler (TAA'lar), sağlıklı dokularda da değişen seviyelerde eksprese edilir. Bu nedenle, TAA'ları hedef alan T hücreleri, tümör dışı toksisiteler olarak adlandırılan ciddi normal organ hasarına ve hatta ölüme neden olabilir. Bu sebeple başarılı CAR T hücre tedavileri geliştirmek için hedef antijen seçimi çok önemlidir.



Şekil 2.11. Kimerik antijen reseptörü (CAR) yapısının şeması ve tümör hücrelerine karşı tasarlanmış T hücresi fonksiyonu (6).

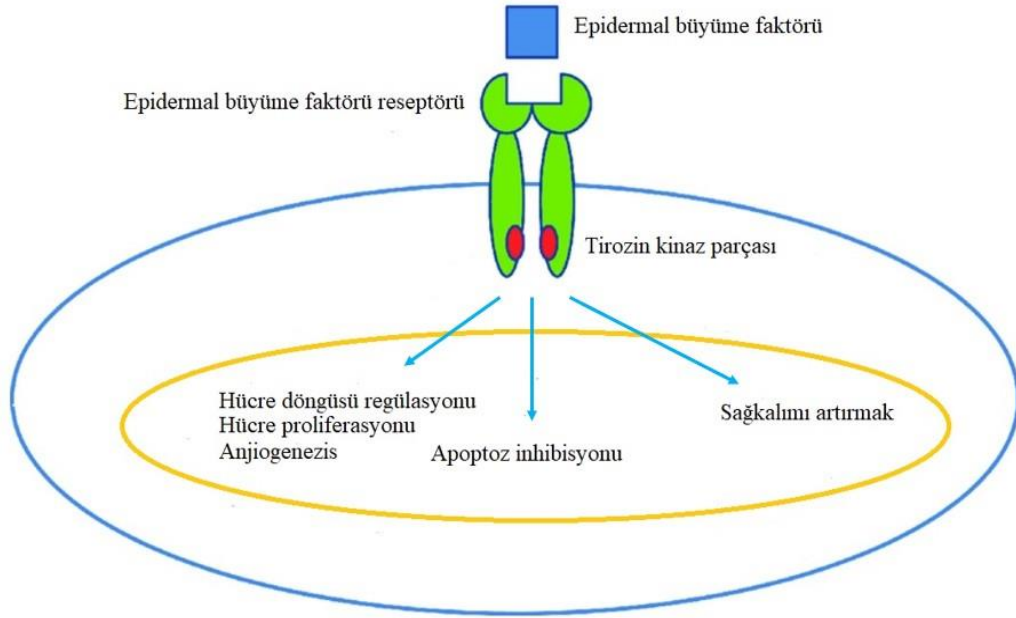
ROR1, CAR hücreleri için çekici bir hedeftir. Erken embriyogenez yalnızca embriyonik dokuda bulunur; genellikle yetişkin dokuda bulunmaz. Bu da proteini kanser tedavisi için etkili bir ilaç haline getirir. ROR1 CAR-T hücrelerinin etkileşimi, üçlü negatif meme kanseri tedavisinde umut vaad etmektedir (6,46).

2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ErbB trozin kinaz ailesine ait kromozom 7p12a üzerinde bulunan bir gen tarafından kodlanan 170 kDa'lık bir

transmembran proteinidir. Bu proteinler EGF ailesinin peptit büyüme faktörleri ile bağlanarak aktive olurlar (47).

EGFR; hücre proliferasyonu, aktivasyonu, göçü ve apoptozu gibi önemli süreçlere aracılık eden bir glikoproteindir. Bu reseptörlerin anormal ekspresyonu malign transformasyonla sonuçlanır. EGFR mutasyonları, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve baş ve boyun kanserleri gibi kanserlerde saptandı. EGFR proteini üçlü negatif meme kanserlerinin %30-52'sinde eksprese edilir. Buna rağmen üçlü negatif meme kanserlerinde EGFR mutasyonunun anlamlı bulunduğu az sayıda çalışma vardır. Kötü prognozla ilişkili olan bazal benzeri meme kanserlerinin %60'ında EGFR protein ekspresyonu yüksek bulundu (8,48).



Şekil 2.12. EGFR'nin temsili ve hücresel süreçler üzerindeki biyolojik etkisi (47).

Liu ve ark. (49) DNA dizileri ve lentiviral vektörleri kullanarak EGFR'ye özgü uyarılmış CAR-T hücrelerini prelinik olarak geliştirdi. EGFR'ye özgü CAR-T hücrelerinin antitümör ve sitotoksik etkileri üçlü negatif meme kanseri hastalarından türetilmiş ksenografta invitro olarak test edildi. Yüksek EGFR eksprese eden üçlü negatif meme kanseri hastalarında hücre lizisinin tetiklendiği ve tümör hücrelerinin büyümesinin inhibe edildiği bulundu. Bu sonuçlar, EGFR'ye özgü CAR-T hücrelerinin, yüksek EGFR eksprese eden üçlü negatif meme kanseri hastalarında önemli bir antikanser hedefi olarak geliştirileceğini düşündürmektedir.

2.6. Üçlü Negatif Meme Kanserlerinde EGFR, CK5/6 ve CD117 İmmünohistokimya Profili

Üçlü negatif meme kanserleri diğer tiplerden daha agresif gidişli ve daha kötü prognoza sahiptir. Bu sebeple risk sınıflandırması için biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bazal benzeri meme kanseri, üçlü negatif meme kanserlerinin bir alt grubudur. Bazal belirteçler (CK5/6, CK14, CK17) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü ile yüksek ekspresyon gösterirler (50).

CK5/6 üçlü negatif meme kanserlerinin tanınması için önemli bir belirteçtir. Yapılan çalışmalara göre prognozu belirleyen önemli bir belirteçtir ve prognozu etkileyen bağımsız bir faktör olarak kabul edilmektedir. CK5/6 pozitif olan vakalarda prognoz daha kötüdür. EGFR meme kanserinde seçici tedaviler en kayda değer belirteçlerden biridir ve EGFR ekspresyon seviyesi veya mutasyon durumu giderek daha fazla kullanılmaktadır. EGFR'nin yüksek ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir. CD117 hücre yüzeyinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörüdür (51). CD117 ekspresyon kaybının meme kanserlerinde yüksek derece ve metastaz ile ilişkili olduğu sonuçlar bulunmaktadır (52). Farklı çalışmalarda CD117 ekspresyonu yüksek riskli meme kanserinde bağımsız bir negatif prediktif değer olarak sunuldu (53).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi ve Klinikopatolojik Verilerin Elde Edilmesi

Çalışmaya İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2016-2021 yılları arasında invaziv meme karsinomu tanısı alan 20 vaka dahil edildi. Çalışmaya dâhil ettiğimiz meme karsinomu tanısı alan ve bu nedenle opere edilen hastaların demografik bilgileri, tümör özellikleri ve prognostik faktörleri hastane bilgi sistemi aracılığıyla elde edildi.

3.2. ROR1 Ekspresyon Düzeyi Hesaplama İşlemleri ve Analizi

Moleküler Analiz

Üçlü negatif meme kanseri olgusu ve tümör dışı komşu normal meme dokusunda, mRNA temelinde ROR-1 gen ifade düzeyi araştırması, TaqMan problemleri kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile gen ifadesinin nicel analizi yapıldı. Test ve kontrol gurubuna ait olgularda ROR-1 hedef gen olarak belirlenirken, kontrol (housekeeping) gen olarak İnsan Beta-actin (H-ACTB) seçildi. Hedef gen, kontrol gen ve prob için belirlenen oligo nükleotit sentezi TIB MOLBIOL (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH Eresburgstraße 22-23 12103, Berlin) laboratuvarında sentezlendi.

Tablo 3.1. RT-PCR'da kullanılan primer ve prob dizileri

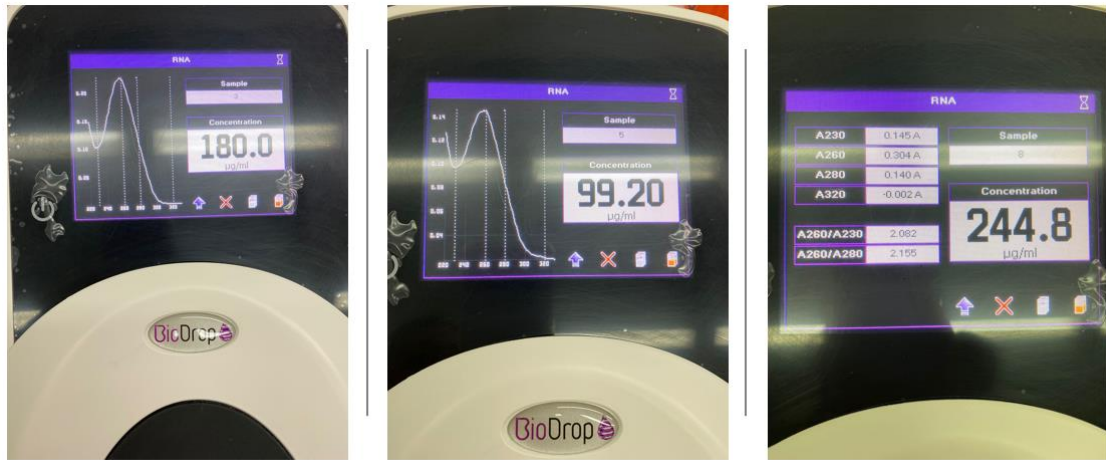
Adı	Dizilim
Hu-ROR-1_F	CACTgCAAgtTCCAggATACTCAgA
Hu-ROR-1_R	ggTgCggTTgCCAATAAATC
Hu-ACTB_F	TgAgCgCggCTACAgCTT
Hu-ACTB_R	TCCTTAATgTCACgCACgATTT
Hu-ROR-1_Pro	6FAM-TgTCAGCCATACAgAgggATTgCA--BBQ
Hu-ACTB_Pro	6FAM-ACCACCACggCCgAgCgg--BBQ

Gen ifade analizi için seçili kontrol ve test dokularından rotary mikrotom kullanılarak (Leica RM 2255-Leica Biosystems, United States) parafin bloktan 10 µ 1,5 ml ependorf tüplere kesitler alındı. RNA izolasyonu High Pure FFPE RNA Isolation

Kit (Roche: 06650775001) kullanılarak aşağıda yer alan işlem basamakları uygulanarak tamamlandı. Tüm test ve kontrol olgularının yer aldığı ependorf tüplere 800 µl ksilen eklendi ve 30 saniye vortekslenerek parafin doku kesitlerinden arındırıldı. Devamında tüplere 400 µl absölü ethanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Tüpler 16000 x g 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. İkinci kez tüplere 1000 µl ethanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Maksimum hızda 16000 x g 2 dakika santrifüjlendikten sonra dikkatlice pelete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet 10 dakika 55 ° C’de kurutuldu. Kurutma işleminden sonra tüplere 100 µl Tissue Lysis Buffer, 16 µl %10 SDS ve 40 µl Proteinase K miksi eklendi, vortekslendi ve 85° C’de düzenli aralıklarla çalkalanarak 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sıcaklığı 55° C’ye düşürülen örneklerle 80 µl Proteinase K eklendi ve 55° C’de 30 dakika inkübe edilmesinin ardından 325 µl RNA Binding Buffer ve 325 µl etanol eklenerek tüpler vortekslendi. Hazırlanan collection tüplere Filtreli Tüpler kondu ve her örneğin lizat karışımı filtreli tüplere aktarıldı. Collection tüp-filtreli tüp 6000 g’ de 30 saniye santrifüj edildi. Filtreli tüp yeni collection tüplere konarak aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı. Maksimum hızda (16000 g) 2 dakika santrifüj edildi. 100 µl DNase miksi eklenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edildi, 500 µl wash buffer I eklenerek 6000 x g’ de 30 saniye santrifüj edildi. 500 µl wash buffer II eklendi ve 6000 x g’ de 30 saniye santrifüj edildi. 500 µl wash buffer II eklendi ve 6000 x g’ de 30 saniye santrifüj edildi. Maksimum hızda (16000 g) 2 dakika santrifüj edilerek filtre kurutuldu. Filtreli tüp etiketlenen yeni 1,5 ml ependorf tüplere alındı. Ependorf tüp içine yerleştirilen filtreli tüplere 1 dakika oda ısısında beklemek üzere 50 µl RNA elution buffer eklendi ve ardından 6000 g’ de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen elüsyon ölçümleri yapıldı ve cDNA sentez işlemine geçildi. RNA konsantrasyon ölçümü spektrofotometrik yöntemle yapıldı. RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümleriyle belirlendi. İzole edilen RNA’ların saflığı 260 nm ve 280 nm’deki absorbans oranı kontrol edildi, ideal saflık değeri için RNA’nın A260/ A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olmasına dikkat edildi.

Tablo 3.2. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon ölçüm değerleri

Test grubu	Örnek	ng/ μ l	260/230	260/280	Kontrol grubu	ng/ μ l	260/230	260/280
	1	167	1,8	1,9		736	1,9	2
	2	210	1,6	1,8		402	1,9	1,8
	3	235	1,5	1,9		97	1,5	2
	4	443	2	2,1		452	1,8	1,9
	5	99	1,6	2		832	1,8	2
	6	252	1,7	2,1		265	1,6	1,9
	7	295	2,2	2,1		152	1,8	2
	8	244	2	2,1		99	2	2
	9	213	2,3	2,1		252	1	1,9
	10	282	2,1	2,1		364	1,9	2
	11	208	1	1,9		281	1,9	2,1
	12	68	2,1	2,2		490	1,6	1,8
	13	265	1,7	2		275	1,6	1,9
	14	44	1,2	2		237	2	2
	15	41	1	1,9		265	1,6	1,9
	16	150	1,2	1,8		140	1,9	2
	17	392	2	2		98	2	2,1
	18	436	1,7	2		305	1,6	1,9
	19	436	1,6	1,9		244	1	1,9
	20	180	1,9	2		69	1,9	2

**Şekil 3.1.** RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon ölçüm değerlerinin görünümü

cDNA sentezi için Evoscript Universal cDNA Synthesis Kit kullanıldı (Roche Diagnostics; Mannheim Germany, Cat. No. 07 912 374 001). RNA, dSU ve Reaction bufferla hazırlanan karışım buza yerleştirilerek 5 dakika inkübe edildi. Karışım üzerine 2 μ l enzyme mix eklendi ve yumuşak bir şekilde pipetaj yapıldı.

Tablo 3.3. Reaction Buffer ve RNA karışım oranı

RNA örneği	10 µl (2,5 microgram)
Su	4 µl
Reaction Buffer, 5X Cons (vial2)	4 µl
Toplam	18 µl

Toplam hacim 20 µl olan karışımın yer aldığı tüpler thermal cycler'a yerleştirildi. Kurulmuş programa uygun olarak thermal cycler çalıştırıldı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. cDNA termal cycler döngü ve süreleri

42°C 'de	15 dk
85°C'de	5 dk
65°C'de	15 dk
4°C'de	bekleme

cDNA sentezi ile elde edilen 20 µl cDNA hacmine 80 µl DNase/RNase su eklenerek vortekslendi. Elde edilen örnekler ile RT-PCR çalışmasına geçildi.

Sentezlenen ve liyofilize halde gelen primerler ve probe'lara nmollerine göre önceden su eklenerek çalışma gününe hazır edildi. Bu şekilde -20°C'de saklanan primer ve probalar çalışılabilir hale geldi.

Tablo 3.5. Primer ve Probların sulandırma oranları

Reaktif	nmol	Final konsantrasyon	Su miktarı
Hu_ROR1_F	Primer 15 nmol	20 pmol/ µl	750 µl
Hu_ROR1_R	Primer 15 nmol	20 pmol/ µl	750 µl
Hu_ROR1_Pr	Probe 3 nmol	20 pmol/ µl	150 µl
Hu_ACTB_F	Primer 15 nmol	20 pmol/ µl	750 µl
Hu_ACTB_R	Primer 15 nmol	20 pmol/ µl	750 µl
Hu_ACTB_Pr	Probe 3 nmol	20 pmol/ µl	150 µl

Sulandırılan reaktiflerden RT-PCR çalışması için primer miks hazırlandı.

Tablo 3.6. Primer ve probdan çalışma miks (PM miks) hazırlama oranları

Gen ismi	Primer ve Prob	Miktar	Toplam
ROR1 PM miks	ROR1-F	100 µl	250 µl
	ROR1-R	100 µl	
	ROR1_Prob	50 µl	
ACTB PM miks	ACTB -F	100 µl	250 µl
	ACTB -R	100 µl	
	ACTB_Prob	50 µl	

cDNA sentezi ile elde edilen örnekler ve master mix ile Real Time miks hazırlandı. Master miks olarak LightCycler 480 Probes Master kit, v11 (Roche Diagnostics, Mannheim Germany, Katolog No: 04707494001) kullanıldı. Master miksler her gen için ve her olgu iki tekrar çalışılacak şekilde hesapladı. Miks vortekslendi ve spin edildi.

Tablo 3.7. RT-PCR çalışması için master miks reaktif miktarları

Tek reaksiyon	Bileşenler	80 Reaksiyon (ROR-1 /ACTB için ayrı)
10,0 µl	Probe master mix	800,0 µl
1,0 µl	ROR1 PM miks veya ACTV PM miks	80,0 µl
4,0 µl	PCR grade Water Sybr green	320,0 µl

Buzla soğutulan ortamda Roche AD-Plate (96 kuyucuk) reaksiyon sayısı kadar kuyucuğa ROR-1 gen master miks ve ACTB master miks 15,0 µl dağıtıldı. Kuyucuklara 5 µl cDNA örneği eklenerek final reaksiyon 20 µl olarak ayarlandı. Hazırlanan strip 2000 rpm’ de 15 saniye soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Önceden hazırlanan protokol ve seçilen deteksiyon format monocolor Hydroliz Probe/UPL olduğu halde Ad-plate RT-PCR cihazına, (Cobas LightCycler 480 Sistem ve analizler - Roche Diagnostics) yüklenerek çalıştırıldı.

Tablo 3.8. RT-PCR protokolü

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			Cooling
Analiz modu	Yok	Kuantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	45			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:10:00	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20
Acquisition Mode	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

Örnek isimleri ve gen isimleri cihaz software'ine girildikten sonra referans gen ACTB seçilerek relatif kantitasyon yapılabilmek için Δ/Δ Ct metodu (Livak yöntemi) kullanıldı (54). $\Delta\Delta$ Ct hesaplaması yapılarak hedef genin kontrol gene oranı yorumlandı. Ct değeri belirli bir numunenin PCR ürünü (güçlendirilmiş DNA) tarafından üretilen flüoresanın arka plan gürültüsünden ayırt edilebildiği döngü sayısını belirtir. Hem hedef grupta hem de kontrol grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans mRNA için Real-Time PCR sonucunda Ct değerleri elde edildi. Teknik tekrarlı çalışmalarda Ct değerlerinin ortalaması hesaplandı. Test grubunda hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak test grubu Δ Ct değerleri elde edildi. Kontrol grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak kontrol grup Δ Ct değerleri elde edildi. Her bir örnek için test grubu Δ Ct değerlerinden kontrol grubundaki Δ Ct değeri çıkarılarak $\Delta\Delta$ Ct değerleri elde edildi. $\Delta\Delta$ Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapıldı.

3.3. EGFR Gen Mutasyonu Analizi

Parafine gömülü bloklardan 4 μ kesitler alınarak rutin hematoxilen-eosin boyama protokolü ile boyandı ve değerlendirilerek tümör alanları belirlendi. Kontrol ve test gruplarına ait örneklerin işaretli bölgelerinden 5 μ kalınlığında kesitler alınarak 1.5 ml steril eppendorfa alındı. Kesitleri parafinden arındırmak için eppendorfa 500 μ l ksilen eklendi ve 10 sn vorteksenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından eppendorfa 500 μ l absolut etanol eklendi. 10 sn vorteksenerek 5 dakika ksilen alkol karışımında tutuldu. Süre sonunda 16.000 g' de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant pipetle dikkatlice çekilerek atıldı. Pellete 1000 μ l absolut etanol eklendi ve tekrar 10 sn

vortekslendi. 16.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada pipet kullanılarak sıvının tamamı uzaklaştırıldı.

Eppendorfların kapakları açılarak 20 dakika 56⁰ C'de bekletilip tamamen kurutuldu. Pellete 180 µl DNA TLB (Tissue Lysis Buffer) eklendi. 70 mikrometre oda sıcaklığına getirilmiş PK (protein kinaz) eklendi. Pellet/ DNA TLB- PK karışımı 30 saniye vortekslendi. EGFR için negatif kontrol tüpü hazırlandı.

Negatif kontrol tüpü, kontrol ve test gruplarına ait örnek tüpleri 56°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi. Ardından 10 sn vortekslendi. Aynı işlem 90°C'de tekrarlandı. Tüpler ısıtıcıdan alındı ve oda sıcaklığına düşmeleri beklendi. Her tüpe 200 µl DNA PBB (DNA Binding Buffer) eklendi ve pipetle 3 kez al bırak yapılarak karıştırıldı ve devamında oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüplerdeki lizata 100 µl izopropanol eklendi ve pipetle üç kez al bırak yapılarak karıştırıldı. Tüm lizat collection tube içerisindeki filtreli tüpe aktarıldı. 8,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Her tüpe 500 µl Wash Buffer I collection tube içerisindeki filtreli tüpe ilave edildi, ardından 8000x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından 500 µl Wash Buffer II collection tube içerisindeki filtreli tüpe aktararak 8.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüp yeni collection tube içerisine yerleştirildi ve membranı kurutmak için, 16.000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüp önceden kontrol ve test grubu numaraları ile etiketlenen eppendorfa yerleştirildi. Filtreli tüp içine membrana dokunmadan dikkatlice 100 µl DNA EB (DNA Elution Buffer) ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. DNA'yı eppendorf tüp içerisinde elde etmek için 8.000x g' de 1 dakika santrifüj edildi. DNA miktarı tayini spektrofotometre cihazı (BioDrop DUO plus, England) ile yapıldı. Ölçümlerde 1 µl DNA kullanıldı ve elde edilen sonuçların ortalaması alındı. PCR amplifikasyon ve deteksiyon prosedürlerine geçildi.

Spektrofotometre Cihazıyla üç tekrar ölçüm sonucunda elde edilen miktarların ortalaması alınıp ve her bir örnek için başlangıç konsantrasyonu 2 ng/µl olacak şekilde steril eppendorflara dilüsyonlar hazırlandı. EGFR mutasyon analizi için cobas EGFR Mutation Test v2 testi kullanıldı (Roche Diagnostics, Mannheim Germany, Parti No: 07248563190). Mutant kontrol, negatif kontrol ve test grubu olgularının her biri için 75 µL master miks (3 reaksiyon) hazırlandı. Hazırlık aşamasında her reaktif ve DNA önce vortekslendi, sonra spin yapıldı. Çalışmada, 96'lık plate'e üç reaktiften oluşan master miks 25'er µl olarak dağıtıldı. Mutant kontrol, negatif kontrol ve test olgularına ait dilüe edilmiş DNA 25 µl reaktiflerin bulunduğu kuyucuklara dağıtıldı. Daha sonra plate

Cobas z 480 analizler cihazına (Roche Diagnostics 05200881001) yerleştirilerek RT-PCR çalışması başlatıldı. Çalışma protokolü, lisanslı otomatik sonuç algoritması içeren Cobas 4800 software ile otomatik olarak yüklendi. Yine Cobas 4800 software'in otomatik analiziyle sonuçlar çıktı olarak alındı.

3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal inceleme için EGFR (Thermo Fisher Scientific, Meridian Road Rockford, USA), CK5/6 (Dako Omnis Agilent Technologies, Singapore) ve CD117 (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, United States) primer antikorlar kullanıldı. Primer antikor dilüsyon oranları ve üretim bilgileri tablo halinde sunuldu (Tablo 3.9). İmmünohistokimya için çalışılacak parafin bloklardan 4-6 mikron kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Bir saat 62°C'de etüvlendi. İmmünohistokimya boyalı preparatlar tam otomatik immünohistokimya cihazında (Dako Omnis–Agilent, Santa Clara, CA, United States) çalışıldı.

Tablo 3.9. Primer antikor dilüsyon oranları ve üretim bilgileri

Primer antikor	Klon No	Dilüsyon oranı	Üretim bilgisi
EGFR	1403D	1/50	Thermo Fisher Scientific, Meridian Road Rockford, USA
CK5/6	D5/16 B4	Kullanıma hazır	Dako Omnis Agilent Technologies, Singapore
CD117	A4502	1/500	Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA

CK5/6, EGFR, CD117 (c-kit) için işlem basamakları aynı şekilde yürütüldü. İHK boyama işlemi öncesinde kesitler 60°C etüvde bir saat inkübe edildi ve tam otomatik İHC cihazına boyama için yüklendi. Deparafinizasyon adımı Clearify Celaring Agent (American MasterTech) kullanılarak gerçekleştirildi. Antijen geri kazanımı için EnV FLEX TRS, High pH (Agilent Technologies, Santa Clara, United States, Katalog no: K800421-2) solüsyonu kullanıldı ve 97°C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. CK5/6 (kullanıma hazır formda), CD117 (dilüsyon oranı 1/500) primer antikorların inkübasyon süresi 25 dakika, EGFR (Dilüsyon oranı 1/50) antikor inkübasyon süresi 30 dakikaya olarak uygulandı. Görüntüleme kiti olarak EnVision FLEX System (Agilent, Dako, Santa Clara United States) kullanıldı ve kit kullanım kılavuzunda yer alan standart süreler uygulandı. Boyama sinyal gücünü artırmak için CK5/6 ve CD117 primer

antikorlarında EnV FLEX+Rabbit LINKER (Agilent, Dako, Santa Clara United States, Parti No: K800921-2) solüsyonu 10 dakika inkübasyon süresiyle kullanıldı. EGFR için EnV FLEX+Mouse LINKER (Agilent, Dako, Santa Clara United States, Parti No: K802121-2) ve EnV FLEX+Rabbit LINKER verilen sırayla birlikte kullanıldı ve yine 10 dakika inkübasyon süresi uygulandı. EnV FLEX/HRP ile 20 dakika inkübasyon yapıldı. EnV FLEX Substrate Working Solution kullanılarak 5 dakika substrat kromojen ile inkübasyon yapıldı. Üç antikorun gösterilmesinde de diaminobenzidin kromojen kullanıldı. Diaminobenzidin kromojen inkübasyonu standart sürede yapıldı. Zıt boyama, hücre çekirdeğini hematoksilinle 10 dakika süreyle boyanarak yapıldı. Karşıt boyama işlemi için hematoksilin ile 10 dakika inkübasyon yapıldı. Distile suda 10 kez 2 dakika boyunca yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama tamponunda 10 kez 2 dakika bekletildi. Kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.4. İmmünohistokimya Değerlendirme Prosedürü

İmmünohistokimyasal olarak boyanan preparatlar bir uzman patolog (NA) ve bir araştırma görevlisi (MÖ) tarafından ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Tümör hücrelerindeki CD117 ve CK5/6 için sitoplazmik, EGFR için membranöz boyamalar esas alındı.

Dış kontrolde CD117 için Cajal'ın intertisyel hücrelerdeki, CK5/6 için prostat bazal hücrelerdeki ve EGFR için plesantal trofoblastik hücrelerdeki boyanma varlığı pozitif kabul edildi. Tümör hücrelerindeki boyanma yaygınlığı 0 (negatif), 1+ (zayıf pozitif) ve 2+ (pozitif) şeklinde semi-kantitatif olarak skorlandı (55).

Tablo 3.10. CD117, CK5/6 ve EGFR için immünohistokimyasal semi-kantitatif skorlama sistemi

Skor	Boyanma yaygınlığı	Sonuç
0	Boyanma yok (<%10)	Negatif
1+	Tümör hücrelerinde %10-20 oranında boyanma	Zayıf pozitif
2+	Tümör hücrelerinde >%20'den fazla boyanma	Pozitif

3.5. İstatiksel Analiz

Çalışmada kullanılan değişkenler sayı (yüzde) ve ortanca (min-maks.) şeklinde özetlenmiştir. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile

incelenmiştir. Bağımlı gruplar (Kontrol-Test) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunup bulunmadığı Wilcoxon testi ile incelenmiştir. Değişken kategorileri arasındaki ilişki Pearson ki-kare testi ile incelenmiştir. Bağımlı değişken kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığı iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi ile incelenmiştir. Analizlerde $p \leq 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. Analizler IBM SPSS Statistics paket programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Klinikopatolojik Veriler

Çalışmaya dahil ettiğimiz 20 olgunun yaş aralığı 28-92 yaş arasında, tamamı kadın, tümör büyüklüğü 0,8-9,2 cm arasında değişen hasta popülasyonundan oluşmaktadır. 20 olgunun 17'si invaziv duktal karsinom morfolojisindeyken; 3'ü metaplastik karsinom morfolojisindedir.

Çalışmaya dahil ettiğimiz 20 olgunun 17'sinin tümör derecesi III; 3'ünün tümör derecesi II'dir. Olguların 15'inde lenfovasküler invazyon görüldü; 5'inde lenfovasküler invazyon saptanmadı. 18 olgunun cerrahi sınırında tümör hücresi görüldü. Olguların 6'sının tümör evresi III; 13'ünün tümör evresi II ve 1'inin tümör evresi I'dir. Elde edilen bilgiler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de özetlendi.

Tablo 4.1. Klinikopatolojik değişkenlere göre tanımlayıcı istatistikler

Değişken	Kategori	N	%
Tümör histolojik tipi	IDC	17	85
	Metaplastik	3	15
Tümör derecesi	Derece II	3	15
	Derece III	17	85
Vasküler invazyon	Var	15	75
	Yok	5	25
Cerrahi sınır durumu	Tümör negatif	18	90
	Tümör pozitif	2	10
Tümör evresi	Evre I	1	5
	Evre II	13	65
	Evre III	6	30

Tablo 4.2. Tümör boyutu ve yaş ortalamaları

Değişken	Sayı	Art. Ort.± std. Sapma	Ortanca (min-max)
Yaş (yıl)	20	54,65 ± 14,7	56,5 (28-92)
Tümör boyutu (cm)	20	4,2 ± 2,3	3,9 (0,8-9,9)

4.2. Genel Verilerin Değerlendirilmesi

Dünya Sağlık Örgütü'nün meme kanseri için tanımladığı, evre, yaş, lenfovasküler invazyon, tümör tipi, histolojik derece ve cerrahi sınır durumunu gibi prognostik faktör birbiri ile karşılaştırıldı. Aynı zamanda prognostik faktörler içerisinde yer almayan fakat üçlü negatif meme kanserleri tedavi protokolünü belirleme önemli yere sahip Tümör infiltrate lenfosit (TIL) oranları parametreler arasında eklendi. Yaş ile tümör evresi ve tümör derecesi ilişkisi; tümör derecesi ile lenfovasküler invazyon durumu; tümör tipi ile tümör infiltrate lenfosit oranları karşılaştırıldı. Parametrelerin birbiri ile ilişkisi saptanmadı ($p > 0,05$).

Tablo 4.3. Yaş ile tümör evresi ilişkisi

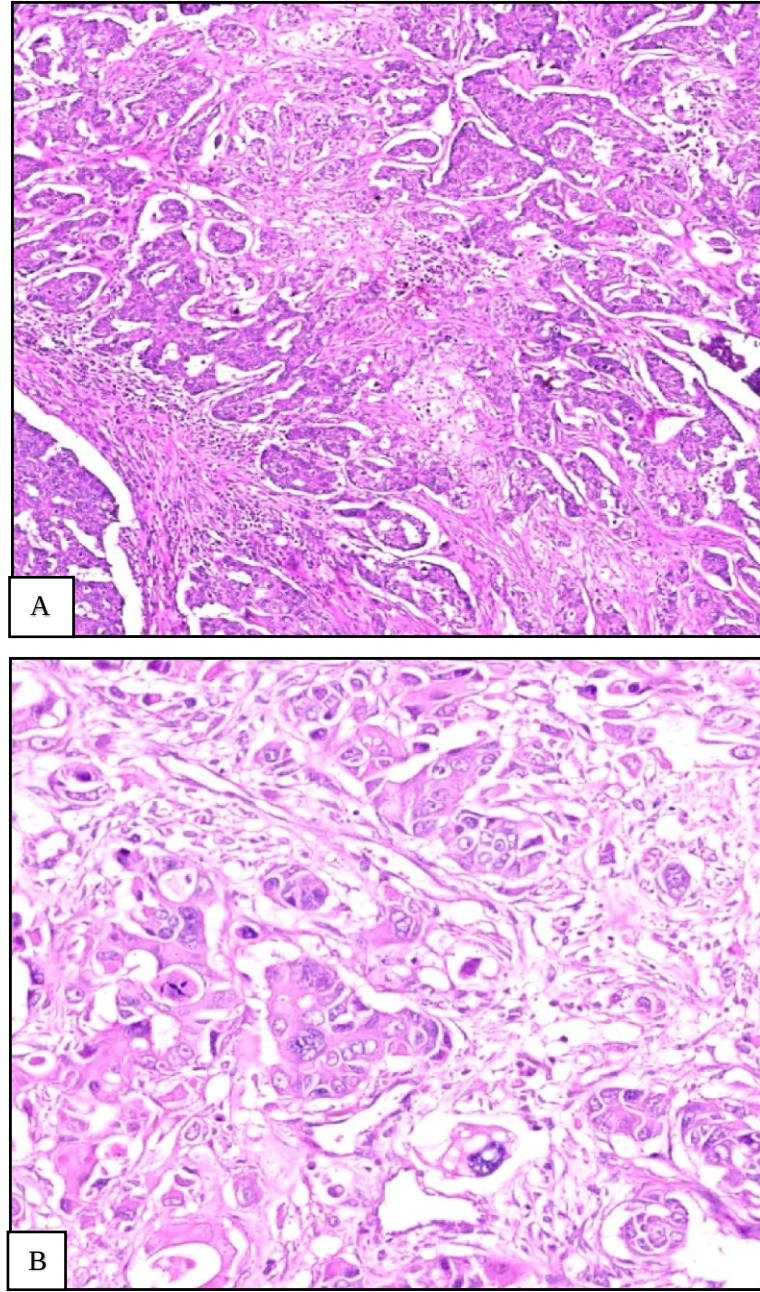
		Tümör Evresi			Toplam	<i>p</i>
		I (%)	II (%)	III (%)		
Yaş	>50	0 (0)	8 (67,7)	4 (33,3)	12 (100)	$p > 0,05$
	<50	1 (12,5)	5 (62,5)	2 (25)	8 (100)	
Toplam		1 (5)	13 (65)	6 (30)	20 (100)	

Tablo 4.4. Yaş ile tümör derecesi ilişkisi

		Tümör Derecesi		Toplam	<i>p</i>
		II (%)	III (%)		
Yaş	>50	2 (16,7)	10 (83,3)	12 (100)	$p > 0,05$
	<50	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100)	
Toplam		3 (15)	17 (85)	20 (100)	

Tablo 4.5. Tümör tipi ile tümör infiltrate lenfosit oranı (TİLO) ilişkisi

		TİLO			Toplam	<i>p</i>
		<%10 (%)	%10-50 (%)	>%50 (%)		
Tümör tipi	İDC	9 (52,9)	2 (11,8)	6 (35,3)	17 (100)	$p > 0,05$
	Metaplastik	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	3 (100)	
Toplam		10 (50)	3 (15)	7 (35)	20 (100)	



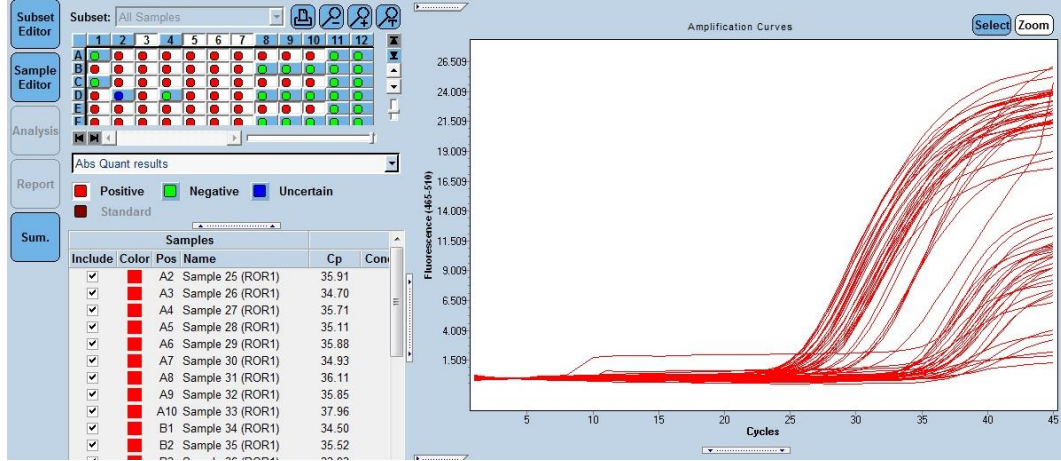
Şekil 4.1. A) Özel tipi olmayan invaziv meme karsinomu (İDC), HE x10; B) Metaplastik tip meme karsinomu, HE, x20

Tablo 4.6. Tümör derecesi ve lenfovasküler invazyon durumu ilişkisi

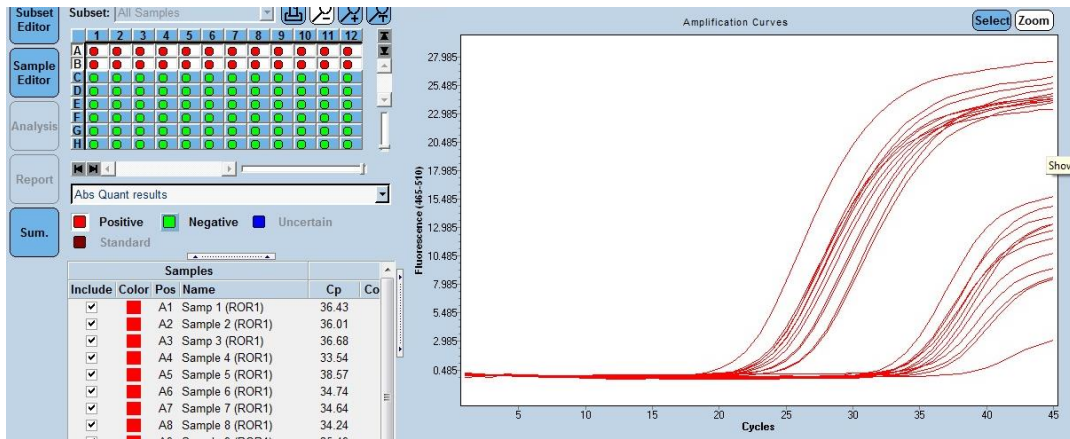
		LVİ durumu		Toplam	P
		Yok (%)	Var (%)		
Derece	II	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)	$p > 0,05$
	III	4 (23,5)	13 (76,5)	17 (100)	
Toplam		5 (25)	15 (75)	20 (100)	

4.3. ROR1 Gen Ekspresyonu RT-PCR Verileri

Olgulara ait örneklerden cDNA elde edilerek RT-PCR analizleri sonucu oluşan amplifikasyon eğrileri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait ACTB ve ROR1’in amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.3. Test grubuna ait ACTB ve ROR1’in amplifikasyon eğrileri

Kontrol ve test gurubuna ait ROR1 ekspresyon için ΔC_t ortalamaları arasında fark elde edildi. Test gurubundaki ROR1 ekspresyonunun kontrol grubundaki ROR1 ekspresyonuna göre anlamlı derecede artmış olduğu bulundu ($p < 0,001$).

Gerçek zamanlı veriler, her numune için hem kanser hem de normal dokulardaki eşik döngüsü dikkate alınarak analiz edildi. ROR1 aşırı ekspresyonu için cut off değeri (r) 1'e ayarlandı: $r > 1$ değerleri gösteren durumlar, ROR1 aşırı eksprese edilmiş olarak kabul edildi, $r \leq 1$ değerleri gösteren vakalar, normal ROR1 ifadesine sahip olarak kabul edildi. 1'i cut-off olarak belirlendi; çünkü literatürde ROR1 ifadesinin değerlendirilmesi için izlenecek standart bir değer bildirilmemiştir. Ek olarak bir genin ekspresyonu aynı

hastanın normal ve tümör dokuları arasında karşılaştırılabilir olduğunda Livak değeri hesaplamaları genellikle 1'e eşittir. Cut off değeri 1 olarak kabul edildiğinde 3 vakada (%15) ROR1 aşırı ekspresyonu gözlemlendi (56).

Schiavone ve ark. (56) yaptığı çalışmayı referans alarak kohortumuzu medyan değerine göre tekrar sınıflandırdık. Medyan değeri eşik değer olarak kabul edildiğinde (n=0,4) 5 vakada (%25) ROR1 aşırı ekspresyon gözlemlendi.

Tablo 4.7. ROR1 ekspresyon seviyesinin Livak methoduna göre değerlendirilmesi

ÖRNEK	ACTB	ROR1	ΔCt	ACBT	ROR1	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2-\Delta\Delta Ct$
	Ort. Ct	Ort. Ct		Ort. Ct	Ort. Ct			
1	27,72	34,27	6,56	25,68	36,43	10,75	4,20	0,1
2	29,10	37,48	8,38	24,19	36,01	11,82	1,65	0,3
3	29,82	36,47	6,65	26,75	36,68	9,93	3,28	0,1
4	25,43	37,46	12,04	24,10	35,34	11,25	-0,79	1,7
5	28,21	36,06	7,85	26,80	38,57	11,77	3,92	0,1
6	26,03	34,52	8,50	23,84	34,74	10,90	2,41	0,2
7	27,57	36,18	8,61	24,39	34,64	10,25	1,65	0,3
8	27,02	35,36	8,34	24,72	34,24	9,52	1,19	0,4
9	27,35	36,36	9,01	23,45	35,49	12,04	3,04	0,1
10	26,67	35,22	8,55	24,04	35,24	11,20	2,65	0,2
11	26,11	36,37	10,26	25,55	35,62	10,07	-0,19	1,1
12	28,22	35,63	7,41	25,71	36,48	10,78	3,37	0,1
13	29,59	37,57	7,98	24,21	36,06	11,85	3,87	0,1
14	26,65	34,68	8,03	25,57	36,02	10,45	2,42	0,2
15	26,30	35,52	9,22	26,78	36,70	9,92	0,7	0,6
16	26,07	33,94	7,87	25,54	37,45	11,91	4,04	0,1
17	29,73	36,93	7,21	24,05	35,47	11,43	4,22	0,1
18	26,50	34,78	8,29	24,07	35,29	11,23	2,94	0,1
19	25,43	37,46	12,04	26,85	38,54	11,69	-0,35	1,3
20	27,72	34,27	6,56	26,98	37,16	10,18	3,62	0,1

Tablo 4.8. Kontrol ve test gurubundaki ekspresyon değeri farkı

	Kontrol ΔCt	Test ΔCt	<i>p</i>
Değişim (Ortanca)min.-maks.))	8,32 (6,56-12,04)	11,05 (9,52-12,04)	<0,001

4.4. ROR1 Gen Ekspresyonu ve İmmünohistokimya İlişkisi

ROR1 için cut off değeri 1 (r=1) kabul edildiğinde; ROR1 aşırı ekspresyonu ve EGFR ekspresyon seviyesi ile anlamlı ilişki bulunmadı (p>0,05). ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın 2'sinde EGFR için pozitiflik gözlenirken 1'inde zayıf

pozitiflik izlendi. ROR1 için medyan değer belirlendiğinde (n=0,4) ROR1 aşırı ekspresyonu ve EGFR ekspresyon seviyesi ile anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$). ROR1 için aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 3'ünde EGFR için pozitiflik, 1'inde zayıf pozitiflik, 1'inde negatiflik izlendi.

Tablo 4.9. ROR1 aşırı ekspresyonu ve EGFR ekspresyonu ilişkisi ($r=1$)

		EGFR			Toplam	p
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
ROR1	<1	4 (23,5)	4 (23,5)	9 (52,9)	17 (100)	$p > 0,05$
	>1	0 (0)	1 (33,6)	2 (66,7)	3 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

Tablo 4.10. ROR1 aşırı ekspresyonu ve EGFR ekspresyonu ilişkisi (n=0,4)

		EGFR			Toplam	p
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
ROR1	<0,4	3 (20)	4 (26,7)	8 (53,3)	15 (100)	$p > 0,05$
	>0,4	1 (20)	1 (20)	3 (60)	5 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

ROR1 için cut off değer 1 ($r=1$) kabul edildiğinde; ROR1 aşırı ekspresyonu ile CK5/6 arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$). ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın 2'sinde CK5/6 için negatiflik gözlenirken 1'inde pozitiflik izlendi. ROR1 için medyan değer belirlendiğinde (n=0,4) ROR1 aşırı ekspresyonu ile CK5/6 arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$). ROR1 için aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 3'ünde CK5/6 için negatiflik, 2'sinde pozitiflik izlendi.

Tablo 4.11. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CK5/6 ilişkisi ($r=1$)

		CK5/6			Toplam	p
		0	1	2		
ROR1	<1	9 (52,9)	2 (11,8)	6 (35,3)	17 (100)	$p > 0,05$
	>1	2 (66,7)	0 (0)	1 (33,3)	3 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

Tablo 4.12. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CK5/6 ilişkisi (n=0,4)

		CK5/6			Toplam	p
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
ROR1	<0,4	8 (53,3)	2 (13,3)	5 (33,3)	15 (100)	p > 0,05
	>0,4	3 (60)	0 (0)	2 (40)	5 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

ROR1 için cut off değeri 1 (r=1) kabul edildiğinde; ROR1 aşırı ekspresyonu ile CD117 arasında anlamlı ilişki bulunmadı (p>0,05). ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın 3'ünde CD117 ile negatiflik izlendi. ROR1 için medyan değeri belirlendiğinde (n=0,4) ROR1 aşırı ekspresyonu ile CD117 arasında anlamlı ilişki bulunmadı (p>0,05). ROR1 için aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 3'ünde CD117 için negatiflik, 2'sinde pozitiflik izlendi.

Tablo 4.13. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CD117 ilişkisi (r=1)

		CD117			Toplam	p
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
ROR1	<1	10 (58,8)	1 (5,9)	6 (35,3)	17 (100)	p > 0,05
	>1	3 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

Tablo 4.14. ROR1 aşırı ekspresyonu ve CD117 ilişkisi (n=0,4)

		CD117			Toplam	p
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
ROR1	<0,4	10 (66,7)	1 (6,7)	4 (26,7)	15 (100)	p>0,05
	>0,4	3 (60)	0 (0)	2 (40)	5 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

4.4. EGFR Mutasyon Analizi

20 meme kanseri olgusunda PCR ile EGFR gen mutasyonu çalışılmış olup hiçbirinde mutasyon tespit edilmedi.

4.5 ROR1 Ekspresyon Seviyesinin Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

- ROR1 için cut off değeri ($r=1$) kabul edildiğinde;

ROR1 aşırı ekspresyon saptanan 3 vakanın 2'sinin tümör derecesi II; 1'inin tümör derecesi III'tür. ROR1 ekspresyon düzeyi normal saptanan 17 vakanın 16'sının tümör derecesi III iken; 1'inin tümör derecesi II'dir. ROR1 aşırı ekspresyonu ve tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$).

Tablo 4.15. ROR1 aşırı ekspresyonu ve tümör derecesi ilişkisi ($r=1$)

		Tümör derecesi		Toplam	p
		II (%)	III (%)		
ROR1	<1	1 (5,9)	16 (94,1)	17 (100)	$p<0,05$
	>1	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)	
Toplam		3 (15)	17 (85)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın tamamı evre II'dir. ROR1 ekspresyon seviyesi normal saptanan 17 vakanın 6'sı evre III; 10'u evre II; 1'i evre I'dir. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.16. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi ilişkisi ($r=1$)

		Tümör evresi			Toplam	p
		I (%)	II (%)	III (%)		
ROR1	<1	1 (5,9)	10 (58,8)	6 (35,3)	17 (100)	$p>0,05$
	>1	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3 (100)	
Toplam		1 (5)	13 (65)	6 (30)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın tamamında cerrahi sınır intakt olup; ekspresyon seviyesi normal saptanan 17 vakanın 2'sinde cerrahi sınır pozitifliği mevcuttur. ROR1 aşırı ekspresyonu ile cerrahi sınır durumu arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.17. ROR1 aşırı ekspresyonu ile cerrahi sınır durumu ilişkisi (r=1)

		Cerrahi sınır		Toplam	p
		Negatif (%)	Pozitif (%)		
ROR1	<1	15 (88,2)	2 (11,8)	17 (100)	p>0,05
	>1	3 (100)	0 (0)	3 (100)	
Toplam		18 (90)	2 (10)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın 2'sinde LVİ izlenirken; 1'inde LVİ görülmedi. ROR1 ekspresyon seviyesi normal saptanan 17 vakanın 13'ünde LVİ izlenirken; 4'ünde LVİ görülmedi. ROR1 aşırı ekspresyonu ile LVİ arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.18. ROR1 aşırı ekspresyonu ile LVİ ilişkisi (r=1)

		LVİ		Toplam	p
		Yok (%)	Var (%)		
ROR1	<1	4 (23,5)	13 (76,5)	17 (100)	p>0,05
	>1	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)	
Toplam		5 (25)	15 (75)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın tamamı 50 yaş üzerinde olup; ekspresyon seviyesi normal saptanan 17 vakanın 9'u 50 yaş üzerinde, 8'i 50 yaş ve altındadır. ROR1 aşırı ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.19. ROR1 aşırı ekspresyonu ile yaş ilişkisi (r=1)

		Yaş		Toplam	p
		>50 (%)	<50 (%)		
ROR1	<1	9 (52,9)	8 (47,1)	17 (100)	p>0,05
	>1	3 (100)	0 (0)	3 (100)	
Toplam		12 (60)	8 (40)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın 2'si IDC, 1'i metaplastik karsinomdu. Ekspresyon seviyesi normal saptanan 17 olgunun 15'i IDC, 2'si metaplastik

karsinomdu. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör tipi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.20. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör tipi ilişkisi ($r=1$)

		Tümör tipi		Toplam	<i>p</i>
		İDC (%)	Metaplastik (%)		
ROR1	<1	15 (88,2)	2 (11,8)	17 (100)	$p>0,05$
	>1	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)	
Toplam		17 (85)	3 (15)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın TIL oranı 1'inde %10-50 arasında; 2'sinde > %50 oranında saptandı. Ekspresyon düzeyi normal saptanan 17 olgunun 10'unda TIL oranı < %10'ken; 2'sinde %10-50; 5'inde >%50 oranında saptandı. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör infiltrate lenfosit oranları arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.21. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör infiltrate lenfosit oranı (TILO) ilişkisi ($r=1$)

		TILO			Toplam	<i>p</i>
		<%10 (%)	%10-50 (%)	>%50 (%)		
ROR1	<1	10 (58,8)	2 (11,8)	5 (29,4)	17 (100)	$p>0,05$
	>1	0 (0)	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)	
Toplam		10 (50)	3 (15)	7 (35)	20 (100)	

- ROR1 için medyan değer ($n=0,4$) kabul edildiğinde;

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 3'ü evre II; 2'si evre III'dür. ROR1 ekspresyon seviyesi normal saptanan 15 vakanın 4'ü evre III; 10'u evre II; 1'i evre I'dir. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.22. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi oranı ilişkisi (n=0,4)

		Tümör evresi			Toplam	<i>p</i>
		I (%)	II (%)	III (%)		
ROR1	<0,4	1 (6,7)	10 (66,7)	4 (26,7)	15 (100)	<i>p</i> >0,05
	>0,4	0 (0)	3 (60)	2 (40)	5 (100)	
Toplam		1 (5)	13 (65)	6 (30)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın tamamında cerrahi sınır intakt olup; ekspresyon seviyesi normal saptanan 15 vakanın 2'sinde cerrahi sınır pozitifliği mevcuttur. ROR1 aşırı ekspresyonu ile cerrahi sınır durumu arasında anlamlı ilişki bulunmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.23. ROR1 aşırı ekspresyonu ile cerrahi sınır durumu ilişkisi (n=0,4)

		Cerrahi sınır		Toplam	<i>p</i>
		Negatif (%)	Pozitif (%)		
ROR1	<0,4	13 (86,7)	2 (13,3)	15 (100)	<i>p</i> >0,05
	>0,4	5 (100)	0 (0)	5 (100)	
Toplam		18 (90)	2 (10)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 4'ünde LVİ izlenirken; 1'inde LVİ görülmedi. ROR1 ekspresyon seviyesi normal saptanan 15 vakanın 11'inde LVİ izlenirken; 4'ünde LVİ görülmedi. ROR1 aşırı ekspresyonu ile LVİ arasında anlamlı ilişki bulunmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.24. ROR1 aşırı ekspresyonu ile LVİ ilişkisi (n=0,4)

		LVİ		Toplam	<i>p</i>
		Yok (%)	Var (%)		
ROR1	<0,4	4 (26,7)	11 (73,3)	15 (100)	<i>p</i> >0,05
	>0,4	1 (20)	4 (80)	5 (100)	
Toplam		5 (25)	15 (75)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 4'ü 50 yaş üzerinde, 1'i 50 yaş ve altındadır. Ekspresyon seviyesi normal saptanan 15 vakanın 8'i 50 yaş üzerinde, 7'si 50

yaş ve altındadır. ROR1 aşırı ekspresyonu ile yaş arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.25. ROR1 aşırı ekspresyonu ile yaş ilişkisi (n=0,4)

		Yaş		Toplam	p
		>50 (%)	<50 (%)		
ROR1	<0,4	8 (53,3)	7 (46,7)	15 (100)	$p>0,05$
	>0,4	4 (80)	1 (20)	5 (100)	
Toplam		12 (60)	8 (40)	20 (100)	

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 4'ü IDC, 1'i metaplastik karsinomdu. Ekspresyon seviyesi normal saptanan 15 olgunun 13'ü IDC, 2'si metaplastik karsinomdu. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör tipi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.26. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör tipi ilişkisi (n=0,4)

		Tümör tipi		Toplam	P
		IDC (%)	Metaplastik (%)		
ROR1	<0,4	13 (86,7)	2 (13,3)	15 (100)	$p>0,05$
	>0,4	4 (80)	1 (20)	5 (100)	
Toplam		17 (85)	3 (15)	20 (100)	

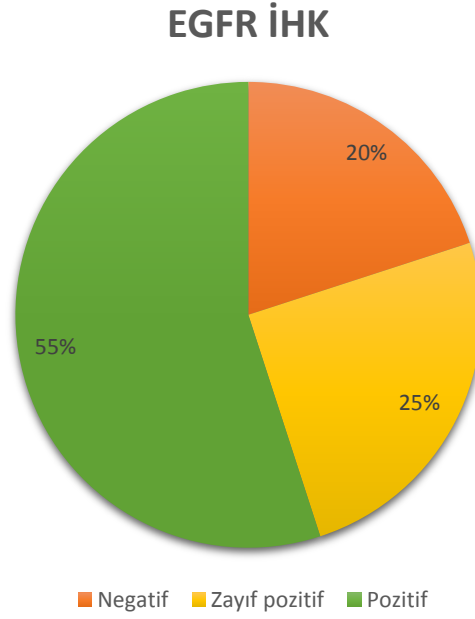
ROR1 aşırı ekspresyon saptanan 5 vakanın 2'sinin tümör derecesi II; 3'ünün tümör derecesi III'tür. ROR1 ekspresyon düzeyi normal saptanan 15 vakanın 14'ünün tümör derecesi III iken; 1'inin tümör derecesi II'dir. ROR1 aşırı ekspresyonu ve tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.27. ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör derecesi ilişkisi (n=0,4)

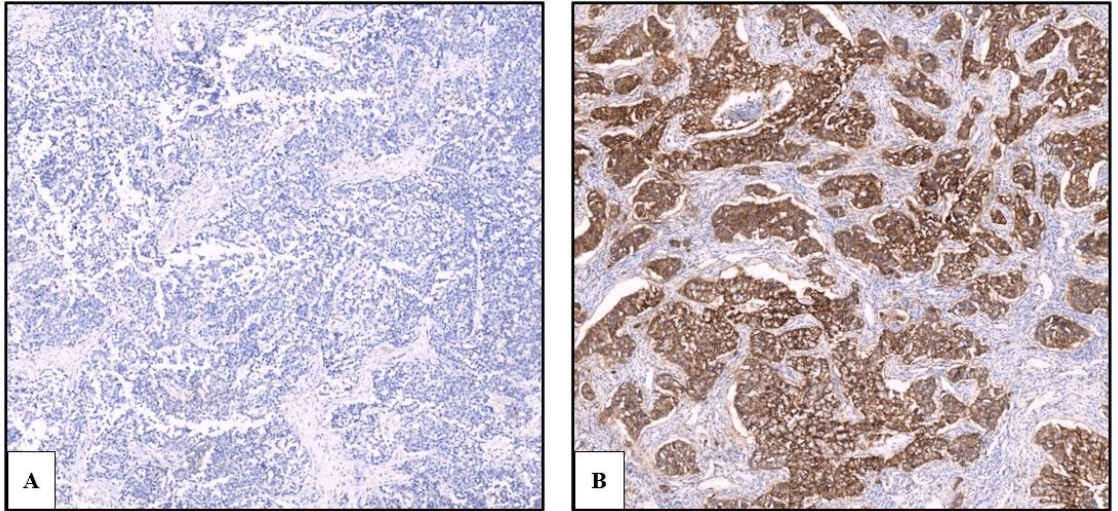
		Tümör derecesi		Toplam	p
		II (%)	III (%)		
ROR1	<0,4	1 (6,7)	14 (93,3)	15 (100)	$p>0,05$
	>0,4	2 (40)	3 (60)	5 (100)	
Toplam		3 (15)	17 (85)	20 (100)	

4.6. EGFR İmmünohistokimyasının Prognostik Faktörler ile İlişisinin Değerlendirilmesi

EGFR immünohistokimyası değerlendirilmesi membranöz boyanmanın yaygınlığı esas alınarak yapıldı. 20 olgunun 4'ü negatif, 5'i 1+ (zayıf boyanma), 11'i 2+ (pozitif)olarak yorumlandı. Olguların %20'sinde negatiflik saptanırken; %80'inde EGFR pozitifdir.



Şekil 4.4. EGFR immünohistokimyasının boyanma dağılımı



Şekil 4.5. EGFR immünohistokimya değerlendirilmesi A) Negatif (İHK x2,5) B) Pozitif membranöz boyanma (İHK, x2,5)

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 4'ü evre III, 6'sı olgu evre II, 1'i ise evre I'di. Zayıf pozitiflik saptanan 5 olgunun tamamı evre II'yken; negatiflik saptanan 4 olgunun 2'si evre II, diğer 2'si evre III'tür. EGFR ile tümör evresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.28. EGFR immünohistokimyası ile evre ilişkisi

		EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Evre	I	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	$p>0,05$
	II	3 (23,1)	4 (30,8)	6 (46,2)	13 (100)	
	III	2 (33,3)	0 (0)	4 (66,7)	6 (100)	
Toplam		5 (25)	4 (20)	11 (55)	20 (100)	

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 10'unda cerrahi sınır intakt olup; 1'inde cerrahi sınır için pozitiflik saptandı. Zayıf pozitiflik saptanan 5 olgunun 1'inde cerrahi sınır pozitifken; 4'ünde cerrahi sınır intaktır. Negatiflik saptanan 4 olgunun tamamında cerrahi sınır intakt izlendi. EGFR ile cerrahi sınır durumu arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.29. EGFR immünohistokimyası ile cerrahi durum ilişkisi

		EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Cerrahi sınır	Negatif	4 (22,2)	4 (22,2)	10 (55,6)	18 (100)	$p>0,05$
	Pozitif	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 8'inde LVİ izlenirken, 3'ünde LVİ izlenmedi. Zayıf pozitiflik saptanan 5 olgunun tamamında LVİ mevcuttu. Negatiflik saptanan 4 olgunun 2'sinde LVİ izlenirken; 2'sinde LVİ izlenmedi. EGFR ile LVİ arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.30. EGFR immünohistokimyası ile LVİ ilişkisi

		EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
LVİ	Yok	2 (40)	0 (0)	3 (60)	5 (100)	<i>p</i> >0,05
	Var	2 (13,3)	5 (33,3)	8 (53,3)	15 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 7'si 50 yaşın üzerindeyken; 4'ü 50 yaş ve altındaydı. Zayıf pozitiflik saptanan 5 olgunun 4'ü 50 yaşın üzerindeyken; 1'i 50 yaş ve altındaydı. Negatiflik saptanan 4 olgunun 3'ü 50 yaş ve altındayken; 1'i 50 yaşın üzerindeydi. EGFR ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.31. EGFR immünohistokimyası ile yaş ilişkisi

		EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Yaş	>50	1 (8,3)	4 (33,3)	7 (58,3)	12 (100)	<i>p</i> >0,05
	<50	3 (37,5)	1 (12,5)	4 (50)	8 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 8'i IDC tipindeyken; 3'ü metaplastik karsinomdu. Zayıf pozitiflik saptanan 5 olgu ve negatiflik saptanan 4 olgunun tamamı IDC morfolojindeydi. EGFR ile tümör tipi arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.32. EGFR immünohistokimyası ile tümör tipi ilişkisi

		EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Tümör tipi	IDC	4 (23,5)	5 (29,4)	8 (47,1)	17 (100)	<i>p</i> >0,05
	Metaplastik	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 10'unda tümör derecesi III; 1'inde tümör derecesi II'ydi. Zayıf pozitiflik saptanan 5 olgunun 4'ünde tümör derece III; 1'inde tümör derecesi II'ydi. Negatiflik saptanan 4 olgunun 3'ünde tümör derecesi III;

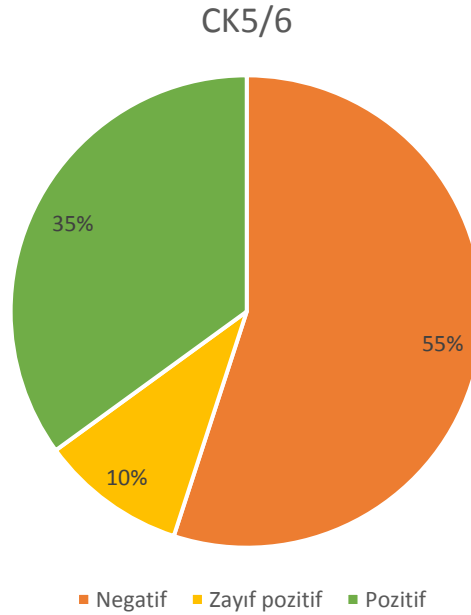
1'inde tümör derecesi II'ydi. EGFR ile tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.33. EGFR immünohistokimyası ile tümör derecesi ilişkisi

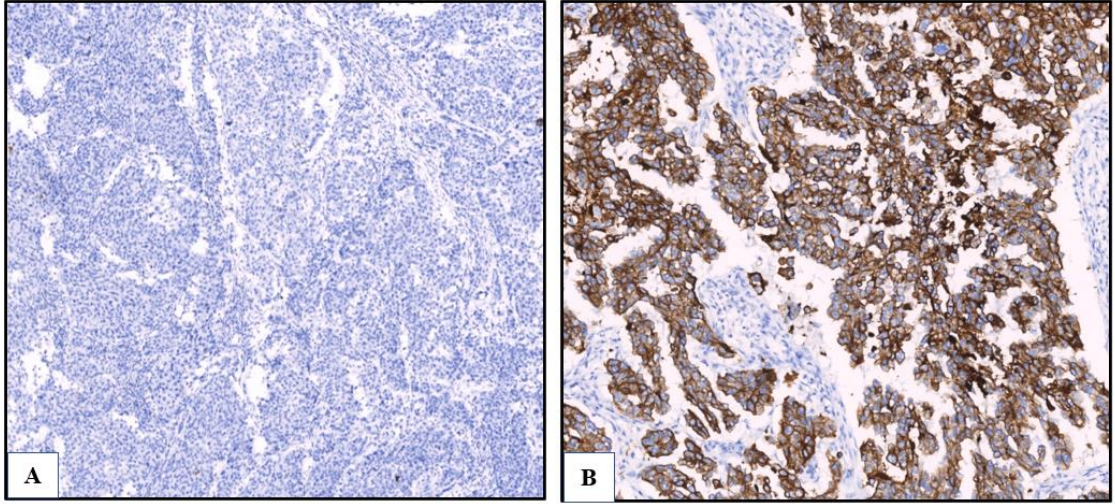
		EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Tümör derecesi	II	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	3 (100)	$p>0,05$
	III	3 (17,6)	4 (23,5)	10 (58,8)	17 (100)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)	

4.7. CK5/6 İmmünohistokimyasının Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

CK5/6 immünohistokimyası değerlendirilmesi sitoplazmik boyanmanın yaygınlığı esas alınarak yapıldı. 20 olgunun 11'i negatif, 2'si 1+ (zayıf boyanma), 7'si 2+ (pozitif) olarak yorumlandı. Olguların %55'inde negatiflik saptanırken; %45'inde CK5/6 pozitifdir



Şekil 4.6. CK5/6 immünohistokimyasının boyanma dağılımı



Şekil 4.7. CK5/6 immünohistokimya değerlendirilmesi A) Negatif (İHK. x2,5) B) Pozitif sitoplazmik boyanma (İHK, x2,5)

CK5/6 için pozitiflik saptanan 7 olgunun 5'i evre II, 2'si evre III'dü. Zayıf pozitiflik saptanan 2 olgu evre II'ydi. Negatiflik saptanan 11 olgunun 1'i evre I; 6'sı evre II; 4'ü evre III'tü. CK5/6 ile tümör evresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.34. CK5/6 immünohistokimyası ile tümör evre ilişkisi

		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Evre	I	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	$p>0,05$
	II	6 (46,2)	2 (15,4)	5 (38,5)	13 (100)	
	III	4 (66,7)	0 (0)	2 (33,3)	6 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

CK5/6 için pozitiflik ve zayıf pozitiflik saptanan 9 olgunun tamamında cerrahi sınır intak olup; negatiflik saptanan 11 olgunun 2'sinde cerrahi sınır pozitiftir. CK5/6 ile cerrahi sınır durumu arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.35. CK5/6 immünohistokimyası ile cerrahi durum ilişkisi

		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Cerrahi sınır	Negatif	9 (50)	2 (11,1)	7 (38,9)	18 (100)	<i>p</i> >0,05
	Pozitif	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

CK5/6 için pozitiflik saptanan 7 olgunun 5'inde LVI izlenirken, 2'sinde LVI izlenmedi. Zayıf pozitiflik saptanan 2 olguda LVI mevcuttu. Negatiflik saptanan 11 olgunun 3'ünde LVI izlenmezken; 8'inde LVI izlendi. CK5/6 ile LVI arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.36. CK5/6 immünohistokimyası ile LVI ilişkisi

		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
LVI	Yok	3 (60)	0 (0)	2 (40)	5 (100)	<i>p</i> >0,05
	Var	8 (53,3)	2 (13,3)	5 (33,3)	15 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

CK5/6 için pozitiflik saptanan 7 olgunun 6'sı 50 yaşın üzerindeyken; 1'i 0 yaş ve altındaydı. Zayıf pozitiflik saptanan 2 olgunun 1'i 50 yaşın üzeri; diğeri 50 yaşın altındadır. Negatiflik saptanan 11 olgunun 5'i 50 yaşın üzeri; 6'sı 50 yaş ve altındadır. CK5/6 ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.37. CK5/6 immünohistokimyası ile yaş ilişkisi

		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Yaş	>50	5 (41,7)	1 (8,3)	6 (50)	12 (100)	<i>p</i> >0,05
	<50	6 (75)	1 (12,5)	1 (12,5)	8 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

CK5/6 için pozitiflik saptanan 7 olgunun 5'i IDC tipindeyken; 2'si metaplastik karsinomdu. Zayıf pozitiflik saptanan 2 olgunun 1'i IDC; diğeri metaplastik

karsinomdu. Negatiflik saptanan 11 olgunun tamamı IDC'ydi. CK5/6 ile tümör tipi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.38. CK5/6 immünohistokimyası ile tümör tipi ilişkisi

		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Tümör tipi	IDC	11 (64,7)	1 (5,9)	5 (29,4)	17 (100)	$p>0,05$
	Metaplastik	0 (0)	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

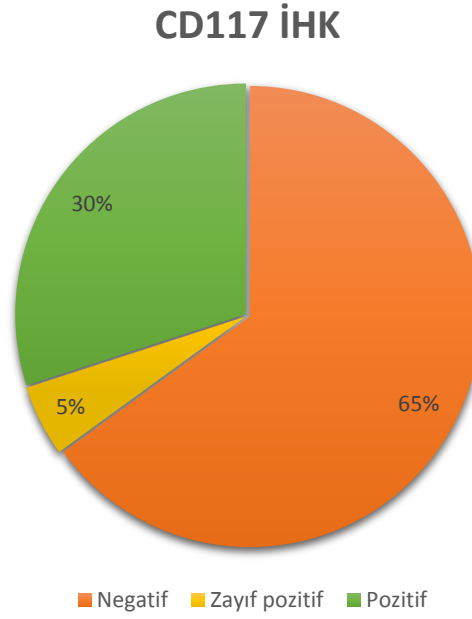
CK5/6 için pozitiflik saptanan 7 olgunun tamamı tümör derecesi III'tü. Zayıf pozitiflik saptanan 2 olgunun 1'inde tümör derecesi II; diğerinde tümör derecesi III'tü. Negatiflik saptanan 11 olgunun 2'sinde tümör derecesi II; 9'unda tümör derecesi III'tü. CK5/6 ile tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.39. CK5/6 immünohistokimyası ile tümör derecesi ilişkisi

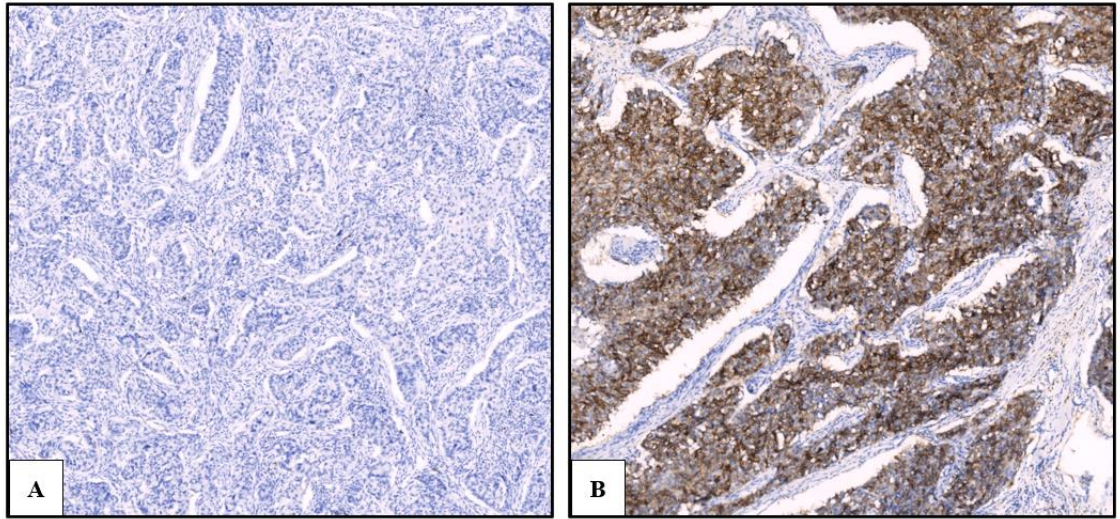
		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Tümör derecesi	IDC	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0)	3 (100)	$p>0,05$
	Metaplastik	9 (52,9)	1 (5,9)	7 (41,2)	17 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

4.8. CD117 İmmünohistokimyasının Prognostik Faktörler ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

CD117 immünohistokimyası değerlendirilmesi sitoplazmik boyanmanın yaygınlığı esas alınarak yapıldı. 20 olgunun 13'ü negatif, 1'i 1+ (zayıf boyanma), 6'sı 2+ (pozitif) olarak yorumlandı. Olguların %65'inde negatiflik saptanırken; %35'inde CD117 pozitifdir.



Şekil 4.8. CD117 immünohistokimyasının boyanma dağılımı



Şekil 4.9. CD117 immünohistokimya değerlendirilmesi A) Negatif (İHK, x2,5) B) Pozitif sitoplazmik boyanma (İHK, x2,5)

CD117 için pozitiflik saptanan 6 olgunun 2'si evre II, 4'ü evre III'dü. Zayıf pozitiflik saptanan 1 olgu evre II'ydi. Negatiflik saptanan 13 olgunun 1'i evre I; 10'u evre II; 2'si evre III'tü. CD117 ile tümör evresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.40. CD117 immünohistokimyası ile tümör evresi ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Evre	I	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	<i>p</i> >0,05
	II	10 (76,9)	1 (7,7)	2 (15,4)	13 (100)	
	III	2 (33,3)	0 (0)	4 (66,7)	6 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

CD117 için pozitiflik ve zayıf pozitiflik saptanan 7 olgunun tamamında cerrahi sınır intak olup; negatiflik saptanan 13 olgunun 2'sinde cerrahi sınır pozitiftir. CD117 ile cerrahi sınır durumu arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.41. CD117 immünohistokimyası ile cerrahi durum ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Cerrahi sınır	Negatif	11 (61,1)	1 (5,6)	6 (33,3)	18 (100)	<i>p</i> >0,05
	Pozitif	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

CD117 için pozitiflik saptanan 6 olgunun 4'ünde LVİ izlenirken, 2'sinde LVİ izlenmedi. Zayıf pozitiflik saptanan 1 olguda LVİ mevcuttu. Negatiflik saptanan 13 olgunun 3'ünde LVİ izlenmezken; 10'unda LVİ izlendi. CD117 ile LVİ arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.42. CD117 immünohistokimyası ile LVİ ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
LVİ	Yok	3 (60)	0 (0)	2 (40)	5 (100)	<i>p</i> >0,05
	Var	10 (66,7)	1 (6,7)	4 (26,7)	15 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

CD117 için pozitiflik saptanan 6 olgunun 2'si 50 yaşın üzerindeyken; 4'ü 50 yaş ve altındaydı. Zayıf pozitiflik saptanan 1 olgu 50 yaşın üzerindeydi. Negatiflik saptanan

13 olgunun 9'u 50 yaşın üzeri; 4'ü 50 yaş ve altındadır. CD117 ile yaş arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.43. CD117 immünohistokimyası ile yaş ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Yaş	>50	9 (75)	1 (8,3)	2 (16,7)	12 (100)	$p>0,05$
	<50	4 (50)	0 (0)	4 (50)	8 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

CD117 için pozitiflik saptanan 6 olgunun 5'i IDC tipindeyken; 1'i metaplastik karsinomdu. Zayıf pozitiflik saptanan 1 olgu IDC'du. Negatiflik saptanan 13 olgunun 11' IDC; 2'si metaplastik karsinomdu. CD117 ile tümör tipi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.44. CD117 immünohistokimyası ile tümör tipi ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Tümör tipi	IDC	11 (64,7)	1 (5,9)	5 (29,4)	17 (100)	$p>0,05$
	Metaplastik	2 (66,7)	0 (0)	1 (33,3)	3 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

CD117 için pozitiflik ve zayıf pozitiflik saptanan 7 olgunun tamamı tümör derecesi III'tü. Negatiflik saptanan 13 olgunun 3'ünde tümör derecesi II; 10'unda tümör derecesi III'tü. CD117 ile tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.45. CD117 immünohistokimyası ile tümör derecesi ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
Tümör derecesi	II	3 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	$p>0,05$
	III	10 (58,8)	1 (5,9)	6 (35,3)	17 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

4.9. İmmünohistokimyasal Parametrelerin Birbiri ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda 20 olgunun EGFR, CK5/6 ve CD117 immünohistokimya boyamaları değerlendirilmiş olup; boyanma yaygınlıkları arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.46. EGFR ile CK5/6 boyanma ilişkisi

		CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
EGFR	0	2 (50)	1 (25)	1 (25)	4 (100)	$p>0,05$
	1	4 (80)	0 (0)	1 (20)	5 (100)	
	2	5 (45,5)	1 (9,1)	5 (45,5)	11 (100)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)	

Tablo 4.47. EGFR ile CD117 boyanma ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
EGFR	0	2 (50)	0 (0)	2 (50)	4 (100)	$p>0,05$
	1	4 (80)	1 (20)	0 (0)	5 (100)	
	2	7 (63,6)	0 (0)	4 (36,4)	11 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

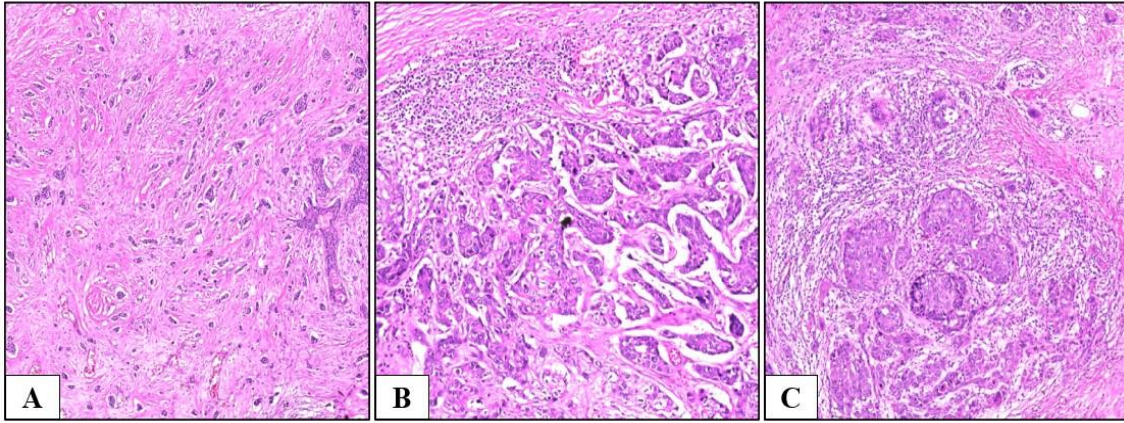
Tablo 4.48. CK5/6 ile CD117 boyanma ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
CK5/6	0	8 (72,7)	0 (0)	3 (27,3)	11 (100)	$p>0,05$
	1	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
	2	3 (42,9)	1 (14,3)	3 (42,9)	7 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

4.10. TIL Oranlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda 20 olgudan 7'sinde yüksek TIL oranı (>%50); 3'ünde orta derecede TIL oranı (%10-50); 10'unda ise düşük TIL oranı (<%10) saptandı.

ROR1 aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 4'ünde TIL oranı >%50; 1'inde %10-50 arasında saptandı. ROR1 ekspresyon düzeyi normal saptanan 15 vakanın 3'ünde TIL oranı >%50; 2'sinde %10-50; 10'unda <%10 olarak belirlendi. ROR1 aşırı ekspresyonu ve TIL oranı arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$).



Şekil 4.10. A) TIL oranı <%10, HE x1; B) TIL oranı 10-50, HE x2.5; C) TIL oranı >%50, HE x2.5

Tablo 4.49. ROR1 aşırı ekspresyonu ile TIL oranı ilişkisi (n=0,4)

		TIL			Toplam	p
		<%10 (%)	%10-50 (%)	>%50 (%)		
ROR1	<0,4	10 (66,7)	2 (13,3)	3 (20)	15 (100)	$p<0,05$
	>0,4	0 (0)	1 (20)	4 (80)	5 (100)	
Toplam		10 (50)	3 (15)	7 (35)	20 (100)	

EGFR için pozitiflik saptanan 11 olgunun 5'inde TIL oranı < %10'ken; 3'ünde %10-50 arasında; 3'ünde > %50 oranında saptandı. Zayıf pozitiflik izlenen 5 olgunun 2'sinde TIL oranı < %10'ken; 2'sinde > %50 oranında saptandı. Negatiflik izlenen 4 olgunun 3'ünde TIL oranı < %10'ken; 1'inde > %50 oranında saptandı. EGFR ile tümör infiltrate lenfosit oranları arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.50. EGFR immünohistokimyası ile tümör infiltrate lenfosit oranı ilişkisi

	EGFR İHK			Toplam	<i>p</i>
	0 (%)	1 (%)	2 (%)		
TILO	<%10	3 (30)	3 (20)	5 (50)	<i>p</i> >0,05
	%10-50	0 (0)	1 (25)	3 (75)	
	>%50	1 (14,3)	1 (42,9)	3 (42,9)	
Toplam		4 (20)	5 (25)	11 (55)	20 (100)

CK5/6 için pozitiflik saptanan 7 olgunun 3'ünde TIL < %10'ken; 1'ünde %10-50 arasında; 3'ünde > %50 oranında saptandı. Zayıf pozitiflik izlenen 2 olgunun 1'inde TIL oranı < %10'ken; 1'inde %10-50 oranında saptandı. Negatiflik izlenen 11 olgunun 6'sında TIL oranı < %10'ken; 1'inde %10-50 arasında; 4'ünde >%50 oranında saptandı. CK5/6 ile tümör infiltrate lenfosit oranları arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.51. CK5/6 immünohistokimyası ile TIL oranı ilişkisi

	CK5/6 İHK			Toplam	<i>p</i>
	0 (%)	1 (%)	2 (%)		
TILO	<%10	6 (60)	1 (10)	3 (30)	<i>p</i> >0,05
	%10-50	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	
	>%50	4(57,1)	0 (0)	3 (42,9)	
Toplam		11 (55)	2 (10)	7 (35)	20 (100)

CD117 için pozitiflik saptanan 6 olgunun 4'ünde TIL < %10'ken; 2'sinde > %50 oranında saptandı. Zayıf pozitiflik izlenen 1 olguda TIL oranı >%50 oranında saptandı. Negatiflik izlenen 13 olgunun 6'sında TIL oranı < %10'ken; 3'ünde %10-50 arasında; 4'ünde >%50 oranında saptandı. CD117 ile tümör infiltrate lenfosit oranları arasında anlamlı ilişki saptanmadı (*p*>0,05).

Tablo 4.52. CD117 immünohistokimyası ile TIL oranı ilişkisi

		CD117 İHK			Toplam	<i>p</i>
		0 (%)	1 (%)	2 (%)		
TILO	<%10	6 (60)	0 (0)	4 (40)	10 (100)	<i>p</i> >0,05
	%10-50	3 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	
	>%50	4 (57,1)	1 (14,3)	2 (28,6)	7 (100)	
Toplam		13 (65)	1 (5)	6 (30)	20 (100)	

5. TARTIŞMA

Üçlü negatif meme kanserleri alt tipleri arasında en kötü prognoza sahip olup; tüm meme kanserlerinin %15'ini oluşturmaktadır. Uygun tedavi yöntemlerinin bulunmaması bu tümörler için yeni tedavi arayışlarına sevk etmektedir. Son zamanlarda bulunan anti-programlanmış ölüm ligandı 1 (PDL-1) kontrol noktası blokajının kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılması, ÜNMK'li hastalarda sonuçların iyileşmesi sağlayarak ÜNMK'nin immünoterapiye karşı potansiyel duyarlılığı hakkında farkındalık oluşturmuştur. ROR1 çeşitli insan kanserlerinde tümör hücresi büyümesi ile ilişkili tirozin kinaz ailesi üyesi olan bir proteindir. ROR1 immünoterapi için tasarlanmış kimerik antijen reseptörü (CAR) için spesifik bir biyobelirteçtir (43,57).

Çalışmamızda 20 ÜNMK hastasında ROR1'in mRNA ekspresyonunu RT-PCR ile incelendi. Ne yazık ki literatürde ROR1 protein ekspresyonunun değerlendirilmek için standardize edilmiş bir prosedür yoktur. Bu yüzden RT-PCR ile ekspresyonunun değerlendirilmesinde tanımlanan cut off değeri ve Schiavone ve ark. (56) yaptığı çalışmayı referans alarak medyan değer belirlendi. Referans (cut-off) değeri 1 aldığımızda %15 ve median değer (n=0,4) alındığında ise %25 ROR1 aşırı ekspresyonu saptandı. Ayrıca ROR1'in nispi ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla test grubunda ortalama 1,3 kat daha fazla eksprese edildiğini bulundu (Tablo 4.8, $p<0.001$). Chien ve ark. (58) 210 hasta ile yaptığı çalışmada daha kısa hastalıksız sağkalım ile ilişkili güçlü ROR1 ekspresyonu (%22,4) gösterdi. Yine aynı çalışmada ROR1 ekspresyonu ile tümör boyutu ve pozitif lenf nodu tutulumu arasında anlamlı ilişki bulurken; hasta yaşı ve tümör derecesi arasında anlamlı ilişki saptamadı. Zhang ve ark. (45) 112 farklı invaziv meme kanserini inceledi ve ÜNMK olan 25 vakanın tamamı güçlü ROR1 ekspresyon seviyesi gösterdi. Yine aynı çalışmada ROR1 aşırı ifadesi ile daha kısa hastalıksız sağkalım arasında ilişki bulundu.

Çalışmamızda ROR1 için cut off ($r=1$) değer kullandığımızda aşırı ekspresyon gösteren 3 vakanın 2'sinin tümör derecesi II; normal ekspresyon gösteren 17 vakanın 16'sının tümör derecesi III'tür. Literatüre ters bulduğumuz ROR1 aşırı ekspresyonu ile olumlu prognostik parametrelerin anlamlı korelasyonu kohort sayımızın az olması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca formalinle fikse edilen ve parafine gömülen (FFPE) numunelerden yapılan moleküler analizler çalışmanın sonucunu etkileyebilir. FFPE doku örneklerinin elde edilmesi çok aşamalı bir süreçtir. Örnek çeşitliliği, örneği

saklama ve işleme süresi ile uygulama çeşitliliği, standardizasyonu güçleştiren faktörlerdir (59).

Çalışmamızda ROR1 için medyan değer (n=0,4) kullandığımızda aşırı ekspresyon gösteren 5 vakanın 4'ünde TIL oranı >%50; 1'inde %10-50 arasında saptandı. ROR1 ekspresyon düzeyi normal saptanan 15 vakanın 3'ünde TIL oranı >%50; 2'sinde %10-50; 10'unda <%10 olarak belirlendi. Literatürde TIL oranları ile ROR1 ekspresyon düzeyinin karşılaştırıldığı çalışma bulunmamaktadır.

ROR1 normal embriyonel gelişimde önemli bir onkofetal proteindir. Doğumdan sonra, ROR1 büyük ölçüde “down regüle” edilir ve yetişkin dokusunda ROR1 daha az bulunur. Buna rağmen adipöz doku, en yüksek ROR1 mRNA düzeyine sahip normal dokudur (60). Kontrol grubunda kullandığımız parafin bloklardan elde ettiğimiz tümör bitişliği normal parankim kesitlerinde her ne kadar adipöz dokuyu uzaklaştırmaya çalışsak da minimal adipöz doku kalmış olabilir. Adipöz dokunun tam anlamıyla uzaklaştırılamaması kontrol grubundaki gen ekspresyon seviyesi artışına; kontrol grup ve test grubu arasındaki ekspresyon farkının azalmasına neden olmuş olabilir. Çalışmamızda ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör evresi, cerrahi sınır durumu, LVI, yaş, tümör tipi arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmadı. Bu durum normal adipöz dokudaki ROR1 seviyesinin diğer normal dokulara göre daha fazla eksprese olması ile açıklanabilir. Ayrıca kohortumuzdaki asimetric hasta dağılımı istatistiksel sonuçları etkilemektedir.

Tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan EGFR (HER1), ÜNМК ilerlemesinde önemli role sahiptir. Çalışmamızda 20 ÜNМК hastasının hiçbirinde EGFR mutasyonu tespit edilmedi. Buna rağmen 20 hastanın 16'sında (%80) EGFR ekspresyonu saptandı. Hoadley ve ark. (61) EGFR ile ilişkili yaptığı bir gen ekspresyon profili çalışmasında EGFR'nin aşırı ekspresyonunun ÜNМК hastalarının %45-70'inde bulunduğunu ve daha kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösterdi. Heae ve ark. (48) 151 ÜNМК vakasını inceledi ve %64'ünde EGFR aşırı ekspresyonu saptarken; sadece 5'inde EGFR mutasyonu saptadı. Toyama ve ark. (62) 110 ÜNМК hastada EGFR mutasyonu incelemiş hiçbirinde mutasyon saptamadı. Teng ve ark. (8) 70 ÜNМК vakasını incelemiş ve %11,4'ünde EGFR mutasyonu bulunduğunu rapor etmektedir. Bu çalışma ÜNМК'lerinde EGFR mutasyon varlığını belgeleyen nadir çalışmalardan biridir. Çalışmamızda literatüre benzer sonuçlar elde edildi. Literatürdeki EGFR mutasyon

uyumsuzlukları farklı etnik kökenlere ve farklı meme kanseri gruplarında heterojen EGFR genomik kararsızlığına bağlanabilir.

Çalışmamızda EGFR immünohistokimyasal incelemesinde 20 olgunun 11'inde pozitiflik, 5'inde zayıf pozitiflik ve 4'ünde negatiflik izlendi. CK5/6 immünohistokimyasal incelemesinde 20 olgunun 7'sinde pozitiflik, 2'sinde zayıf pozitiflik ve 11'inde negatiflik saptandı. CD117 immünohistokimyasal incelemesinde 20 olgunun 6'sında pozitiflik, 1'inde zayıf pozitiflik ve 13'ünde negatiflik saptandı. Boyanmanın yaygınlığına göre sınıflandırdığımız tüm immünohistokimya grupları ile tümör evresi, cerrahi sınır durumu, yaş, LVİ, tümör tipi, histolojik derece, TIL oranları arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Constantinou ve ark. (51) 84 ÜNМК vakasında p53, p63, c-kit, Ki67, cMet, claudin7, CK5/6, CK17, AR, PTEN, EGFR, ALK, PDL-1 ve c-MYC ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkiyi araştırdı. EGFR ekspresyonu ile tümör derecesi, lenfovasküler invazyon ve pozitif lenf nodu sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. CK5/6 ekspresyonu LVİ izlenen hastalarda daha yüksek saptandı. CD117 ekspresyonu tümör derecesi yüksek hastalarda daha düşük bulundu.

Pillai ve ark. (63) 18 ÜNМК vakasında EGFR, CK5/6 ve CD117 ekspresyonunu inceledi. Vakalarının %61'i EGFR pozitif, %72'si CK5/6 pozitif ve %89'u CD117 pozitifdir. EGFR, CK5/6 ve CD117 ekspresyonu, ÜNМК ile güçlü bir şekilde ilişkili bulundu.

Adamo ve ark. (64) 99 ÜNМК vakasında androjen reseptörü, E-cadherin, ki-67 ve CK5/6 ekspresyonunun prognostik önemini araştırdı. CK5/6 tümörlerin %54,7'sinde eksprese edildi ve hastalıksız sağ kalım ile ilişkilendirildi.

Hashmi ve ark. (65) 150 ÜNМК vakasında CK5/6 ve CK8/18 ekspresyonunun klinikopatolojik önemini araştırdı. Olguların %8'inde CK5/6 ekspresyonu gözlemlendi; çeşitli klinikopatolojik parametrelerle yaş, LVİ, ki-67 indeksi, tümör tipi, lenf nodu tutulumu, tümör evresi, tümör derecesi, TIL oranı anlamlı ilişki saptanmadı.

Luo ve ark. (66) 58 ÜNМК ve 48 ÜNМК olmayan vakalarda CD117 ekspresyonu ve TP53 mutasyonlarının prognostik önemini araştırdı. CD117, ÜNМК vakalarının %48,3'ünde ve ÜNМК olmayan vakaların %29,2'sinde eksprese edildi. CD117 ekspresyonu ile vasküler invazyon, yüksek proliferasyon indeksi ve tümör nüksü arasında anlamlı ilişki bulundu. CD117 ekspresyonu ile tümör boyutu, tümör

derecesi, sinir invazyonu, lenf nodu metastazı ve *TP53* mutasyonu arasında bir ilişki tanımlanmadı.

Literatürde ÜNМК hastalarında yüksek EGFR ve CK5/6 seviyeleri izlenirken; CD117 ekspresyonu ile ilgili tartışmalı sonuçlar vardır. Bizim çalışmamızda EGFR %80, CK5/6 %45 ve CD117 %35 oranında eksprese edildi. Literatürü taradığımızda ÜNМК hastalarında CD117 ekspresyonu %1 ve %82 arasında değişkenlik göstermektedir. Bu durum CD117 ekspresyonunun farklı değerlendirme yöntemleri ile açıklanabilir ve bu konuyu açıklığa kavuşturmak için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

ÜNМК'lerinde tümör heterojenliği farklı klinik sonuçlara neden olabilir. Son yıllarda yapılan gen ekspresyon profiline dayalı moleküler karakterizasyonu belirlemek ÜNМК hastalarındaki tutarsız klinik sonuçları engelleyebilir. Ne yazık ki bu tahliller çok pahalıdır ve birçok merkezde hala erişilememektedir. ÜNМК'lerinde belirlenen moleküler alt tiplendirmeyi gerçek hayatta daha ulaşılır immünohistokimya ile desteklemek araştırmacılar için daha uygun olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- RT-PCR ile belirlenen ROR1 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla ÜNMK grubunda daha fazla bulundu.
- ROR1 aşırı ekspresyonu ile tümör derecesi arasında ters ilişki bulundu. Diğer prognostik parametreler ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.
- Vakaların %35'inde yüksek TIL oranı saptandı. Yüksek TIL oranı ile ROR1 aşırı ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki ($p<0,05$) bulundu.
- PCR ile EGFR gen mutasyonu vakaların hiçbirinde saptanmadı. Ancak İHK olarak %80 EGFR ekspresyon seviyesi bulundu.
- İHK CK5/6 ekspresyonu %45 olup literatür ile uyumlu bulundu.
- İHK CD117 ekspresyonu %35 bulundu. Literatürdeki sonuçları ise farklılık göstermektedir (%1-82).
- Prognostik parametreler ile EGFR, CK5/6 ve CD117 immünohistokimyası arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).
- Formaldehit ile fikse ve parafine gömülü dokular ile çalışmak yerine taze dokulardan yapılacak olan RNA izolasyonu daha sağlıklı sonuçlar verebilir.
- İmmünohistokimya değerlendirmesinde standardizasyon yapılması literatürdeki tartışmalı sonuçların önüne geçebilir.
- ROR1 ekspresyon seviyesi için daha geniş hasta grubu ve simetrik hasta dağılımıyla yapılacak çalışmalar özellikle ÜNMK hastalarında hedefe yönelik tedavilerin belirlenmesi için daha yol gösterici ve umut verici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Global Health Estimates [Internet]. [a.yer 13 Ağustos 2022]. Erişim adresi: <https://www.who.int/data/global-health-estimates>
2. 2017 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri [İnternet]. [a.yer 13 Ağustos 2022]. Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-i-istatistikleri.html>
3. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, vd. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 01 Eylül 2013;24(9):2206-23.
4. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res BCR*. 09 Haziran 2020;22(1):61.
5. Keenan TE, Tolaney SM. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. Nisan 2020;18(4):479-89.
6. Xie Y, Hu Y, Zhou N, Yao C, Wu L, Liu L, vd. CAR T-cell therapy for triple-negative breast cancer: Where we are. *Cancer Lett*. 28 Ekim 2020;491:121-31.
7. Nakajima H, Ishikawa Y, Furuya M, Sano T, Ohno Y, Horiguchi J, vd. Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 01 Ocak 2014;21(1):66-74.
8. Teng YHF, Tan WJ, Thike AA, Cheok PY, Tse GMK, Wong NS, vd. Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res*. 01 Nisan 2011;13(2):R35.
9. Mills SE. *Histology for pathologists*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer health - Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
10. Schnitt SJ, Collins LC. *Biopsy interpretation of the breast*. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 540 s. (Biopsy interpretation series).

11. Jesinger RA. Breast Anatomy for the Interventionalist. Tech Vasc Interv Radiol. 01 Mart 2014;17(1):3-9.
12. Netter FH. Netter atlas of human anatomy: classic regional approach. Eighth edition. Neumann PE, Tubbs RS, Brueckner JK, Gdowski MJ, Lyons VT, Ward PJ, vd., editörler. Philadelphia, PA: Elsevier; 2023.
13. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 2. 10. ed. St. Louis: Mosby; 2011. 1399 s.
14. Organisation mondiale de la santé, editör. Breast tumours. 5th ed. Geneva: OMS; (World health organization classification of tumours).
15. Cancer today [Internet]. [a.yer 20 Ağustos 2022]. Erişim adresi: <http://gco.iarc.fr/today/home>
16. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, vd. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
17. Açıkgöz A, Yıldız EA. Meme Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.
18. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, vd. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci. 01 Kasım 2017;13(11):1387-97.
19. Moy L, Heller SL, Bailey L, D'Orsi C, DiFlorio RM, Green ED, vd. ACR Appropriateness Criteria® Palpable Breast Masses. J Am Coll Radiol. 01 Mayıs 2017;14(5):S203-24.
20. Oeffinger KC, Fontham ETH, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YCT, vd. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update from the American Cancer Society. JAMA. 20 Ekim 2015;314(15):1599-614.
21. Allen DC, Cameron RI, editörler. Histopathology Specimens: Clinical, Pathological and Laboratory Aspects [Internet]. London: Springer London; 2013 [a.yer 01 Nisan 2023]. Erişim adresi: <https://link.springer.com/10.1007/978-0-85729-673-3>
22. WebPathology [İnternet]. [a.yer 21 Ağustos 2022]. Erişim adresi: <http://webpathology.com>

23. Tang P, Tse GM. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. Arch Pathol Lab Med. 01 Ağustos 2016;140(8):806-14.
24. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. The Oncologist. 01 Mayıs 2018;23(5):556-65.
25. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, vd. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. Breast Cancer Basic Clin Res. 20 Mayıs 2010;4:35-41.
26. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. Biol Targets Ther. 2012;6:289-97.
27. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. The Oncologist. 01 Kasım 2004;9(6):606-16.
28. Seal MD, Chia SK. What Is the Difference Between Triple-Negative and Basal Breast Cancers? Cancer J. Şubat 2010;16(1):12-6.
29. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, vd. Prognostic Factors in Breast Cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 01 Haziran 2000;124(7):966-78.
30. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E, Fineberg S, Shear J, Turner S, vd. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. NPJ Breast Cancer. 01 Aralık 2021;7:150.
31. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, vd. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol. Şubat 2015;26(2):259-71.
32. Borri F, Granaglia A. Pathology of triple negative breast cancer. Semin Cancer Biol. 01 Temmuz 2021;72:136-45.
33. He MY, Rancoule C, Rehailia-Blanchard A, Espenel S, Trone JC, Bernichon E, vd. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. Crit Rev Oncol Hematol. 01 Kasım 2018;131:96-101.

34. de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JPJ, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 01 Şubat 2011;137(2):183-92.
35. Alluri P, Newman LA. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives. *Surg Oncol Clin N Am*. Temmuz 2014;23(3):567-77.
36. Geyer FC, Pareja F, Weigelt B, Rakha E, Ellis IO, Schnitt SJ, vd. The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. *Am J Pathol*. 01 Ekim 2017;187(10):2139-51.
37. Corso G, Frassoni S, Girardi A, De Camilli E, Montagna E, Intra M, vd. Metaplastic breast cancer: Prognostic and therapeutic considerations. *J Surg Oncol*. 2021;123(1):61-70.
38. Cserni G, Quinn CM, Foschini MP, Bianchi S, Callagy G, Chmielik E, vd. Triple-Negative Breast Cancer Histological Subtypes with a Favourable Prognosis. *Cancers*. 14 Kasım 2021;13(22):5694.
39. Matute G, Barcenas L, Bautista C, Restrepo Ramirez CA, Llinas Quintero N. Tall Cell Carcinoma With Reversed Polarity of the Breast. *Cureus*. 13(8):e16814.
40. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, vd. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. Temmuz 2011;121(7):2750-67.
41. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, vd. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 01 Nisan 2015;21(7):1688-98.
42. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, Yu KD, Jin X, Hu X, vd. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2016;18:33.

43. Shirangi A, Mottaghitab F, Dinarvand S, Atyabi F. Theranostic silk sericin/SPION nanoparticles for targeted delivery of ROR1 siRNA: Synthesis, characterization, diagnosis and anticancer effect on triple-negative breast cancer. *Int J Biol Macromol.* 30 Kasım 2022;221:604-12.
44. Zhao Y, Zhang D, Guo Y, Lu B, Zhao ZJ, Xu X, vd. Tyrosine Kinase ROR1 as a Target for Anti-Cancer Therapies. *Front Oncol* [İnternet]. 2021 [a.yer 15 Eylül 2022];11. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.680834>
45. Zhang S, Chen L, Cui B, Chuang HY, Yu J, Wang-Rodriguez J, vd. ROR1 Is Expressed in Human Breast Cancer and Associated with Enhanced Tumor-Cell Growth. *PLoS ONE.* 05 Mart 2012;7(3):e31127.
46. Wallstabe L, Göttlich C, Nelke LC, Kühnemundt J, Schwarz T, Nerreter T, vd. ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight.* 19 Eylül 2019;4(18):126345.
47. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, vd. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 17 Ocak 2006;366(1):2-16.
48. Park HS, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, vd. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol.* Eylül 2014;27(9):1212-22.
49. Liu Y, Zhou Y, Huang KH, Li Y, Fang X, An L, vd. EGFR-specific CAR-T cells trigger cell lysis in EGFR-positive TNBC. *Aging.* 04 Aralık 2019;11(23):11054-72.
50. Wang Z, Liu L, Li Y, Song Z, Jing Y, Fan Z, vd. Analysis of CK5/6 and EGFR and Its Effect on Prognosis of Triple Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 20 Ocak 2021;10:575317.
51. CONSTANTINO C, PAPADOPOULOS S, KARYDA E, ALEXOPOULOS A, AGNANTI N, BATISTATOU A, vd. Expression and Clinical Significance of Claudin-7, PDL-1, PTEN, c-Kit, c-Met, c-Myc, ALK, CK5/6, CK17, p53, EGFR, Ki67, p63 in Triple-negative Breast Cancer– A Single Centre Prospective Observational Study. *In Vivo.* 03 Mart 2018;32(2):303-11.

52. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, vd. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 19 Haziran 2006;94(12):1874-8.
53. Diallo R, Ting E, Gluz O, Herr A, Schütt G, Geddert H, vd. C-kit expression in high-risk breast cancer subgroup treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2006;90:177-85.
54. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. Ağustos 2013;3(3):71-85.
55. Dogu GG, Ozkan M, Ozturk F, Dikilitas M, Er O, Ozturk A. Triple-negative breast cancer: immunohistochemical correlation with basaloid markers and prognostic value of survivin. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. Mart 2010;27(1):34-9.
56. Schiavone G, Epistolio S, Martin V, Molinari F, Barizzi J, Mazzucchelli L, vd. Functional and clinical significance of ROR1 in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 10 Kasım 2020;20(1):1085.
57. Stüber T, Monjezi R, Wallstabe L, Kühnemundt J, Nietzer SL, Dandekar G, vd. Inhibition of TGF- β -receptor signaling augments the antitumor function of ROR1-specific CAR T-cells against triple-negative breast cancer. *J Immunother Cancer*. 16 Nisan 2020;8(1):e000676.
58. Chien HP, Ueng SH, Chen SC, Chang YS, Lin YC, Lo YF, vd. Expression of ROR1 has prognostic significance in triple negative breast cancer. *Virchows Arch Int J Pathol*. Mayıs 2016;468(5):589-95.
59. Barcelos D, Franco MF, Leão SC. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. Aralık 2008;50:321-6.
60. Hudecek M, Schmitt TM, Baskar S, Lupo-Stanghellini MT, Nishida T, Yamamoto TN, vd. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 25 Kasım 2010;116(22):4532-41.

61. Hoadley KA, Weigman VJ, Fan C, Sawyer LR, He X, Troester MA, vd. EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. *BMC Genomics*. 31 Temmuz 2007;8:258.
62. Toyama T, Yamashita H, Kondo N, Okuda K, Takahashi S, Sasaki H, vd. Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer*. 25 Ekim 2008;8:309.
63. Kanapathy Pillai SK, Tay A, Nair S, Leong CO. Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women. *BMC Clin Pathol*. 26 Eylül 2012;12:18.
64. Adamo B, Ricciardi GRR, Ieni A, Franchina T, Fazzari C, Sanò MV, vd. The prognostic significance of combined androgen receptor, E-Cadherin, Ki67 and CK5/6 expression in patients with triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 16 Ağustos 2017;8(44):76974-86.
65. Hashmi AA, Naz S, Hashmi SK, Hussain ZF, Irfan M, Bakar SMA, vd. Cytokeratin 5/6 and cytokeratin 8/18 expression in triple negative breast cancers: clinicopathologic significance in South-Asian population. *BMC Res Notes*. 08 Haziran 2018;11:372.
66. Luo Y, Huang W, Zhang H, Liu G. Prognostic significance of CD117 expression and TP53 missense mutations in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. Mayıs 2018;15(5):6161-70.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Kararı