



T.C.

SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAYDARPAŞA NUMUNE

SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ PATOLOJİ KLİNİğİ

**“MEME KANSERİNDE HER2’NİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNİ
İLE TEDAVİ YANITI ARASINDAKİ İLİŞKİ”**

Dr. Melis Erdal Cesur

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2024



T.C.
SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE
SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİğİ

“MEME KANSERİNDE HER2’NİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNİ
İLE TEDAVİ YANITI ARASINDAKİ İLİŞKİ”

Dr. Melis Erdal Cesur

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fügen Aker

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi birikimi, tecrübesi, çalışkanlığı, özverisi ve akademik duruşuyla bana örnek olan, benden desteğini esirgemeyen, bana her zaman inanan ve bu sayede benim de kendime inanmamı sağlayan, öğrencisi olmaktan ömür boyu gurur duyacağım değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Fügen Vardar Aker'e,

İşe her gün keyifle gelmemi sağlayan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana her zaman destek olan hocalarım Doç. Dr. Nermin Koç ve Doç. Dr. Gülistan Gümrükçü'ye,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, eğitimim için emek harcayan, bildiklerini benimle paylaşan, bana öğreten uzmanlarım Dr. Makbule Çıkrıkçıoğlu, Dr. Aylin Gönültaş, Dr. Zühal Özcan, Dr. Zuhâl Kuş Silav, Dr. Meryem Doğan, Dr. Seda Mazmanoğlu Atılman'a,

Çalışma fırsatı bulamamış olsak da danıştığım konularda bana yardımcı olan, bilgilerini paylaşan, tanımaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Selvinaz Özkara ve Doç. Dr. Pembegül Güneş'e,

Birlikte asistan olduğumuz için kendimi şanslı saydığım, bana her zaman dürüst ve sevecen davranan canım arkadaşlarım Dr. Cansu Sönmez, Dr. Erhan Ekren, Dr. Berfin Ekin Yıldız, Dr. Yaşar Kaan Akgök, Dr. İbrahim Aloğlu, Dr. Seçil Kılar Kösemen, Dr. Beyza Betül Şenay, Dr. Erva Bengü Balaban ve Dr. Alptuğ Üngör'e,

Çalışma hayatım boyunca bana yardımcı olan ve bildiklerini bana öğreten tüm Patoloji Bölümü çalışanlarına,

Tez sürecimde gece-gündüz demeden benimle bilgilerini paylaşan ve bana yardımcı olan Dr. Berker Kaya'ya,

En zor anlarımda bana destek olan, ilham veren, birlikte gülüp ağladığım canım arkadaşlarım İrem Yapar, Sena Akyıldız ve Sıla Dağdelen Dizdarevic'e,

Eğitimim için her türlü çabayı ve desteği benden hiçbir zaman esirgememiş olan, bugünlere gelmeme vesile olan, kızları olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyduğum canım annem ve babam ile beni yalnız bırakmayan, en değerlim, küçük kardeşim Yağmur'a,

Sevgisini ve desteğini bana her zaman hissettiren, bana inanan, hayatıma mutluluk katan ve beni her zaman iyi yönde geliştiren en yakın arkadaşım ve sevgili eşim Egecan'a

Sonsuz teşekkürler.

Dr. Melis Erdal Cesur

İstanbul - 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. MEME EMBRYOLOJİSİ	2
2.2. MEME ANATOMİSİ	2
2.3. MEME HİSTOLOJİSİ	3
2.4. BENİGN MEME HASTALIKLARI	5
2.5. MEME KANSERİ	6
2.5.1. Lokalizasyon	6
2.5.2. Klinik ve Radyolojik Özellikler	6
2.5.3. Epidemiyoloji	7
2.5.4. Etiyoloji	7
2.5.5. Patogenez	8
2.5.6. Histopatoloji	9
2.5.7. Meme Kanseri Sınıflaması	9
2.5.8. Meme Kanseri Moleküler Sınıflaması	10
2.5.9. Prognostik Faktörler	12
2.5.10. Meme Kanseri Tedavisi	15
2.5.11. HER2-pozitif Meme Kanseri Tedavisi	17
2.6. HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (HER) 2 ...	17
2.6.1. HER2 - ER Sinyal Etkileşimi	19
2.6.2. HER2 Hedefli Tedaviler	20
2.6.3. HER2'nin İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	21
2.6.4. HER2'nin İn Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi	23
2.6.5. HER2 Heterojenitesi	25

3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ	29
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM	30
3.3. İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ	31
3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	32
3.5. ETİK KURUL	33
3.6. ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI	33
3.7. ÇALIŞMA İÇİN İZLENEN KILAVUZ	33
3.8. ÖZGÜNLÜK	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR	63
7. KAYNAKLAR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADC	: Antibody drug conjugate
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
AKT	: AK mouse transforming
ASCO/CAP	: American Society of Clinical Oncology–College of American Pathologists
ATM	: Ataxia telangiectasia mutated
BBA	: Büyük büyütme alanı
BRCA1/2	: Breast cancer gene 1/2
CDH1	: Cadherin-1
CEP17	: Centromere enumerator probe for chromosome 17
CHEK2	: Checkpoint kinaz 2
DCIS	: Duktal karsinoma in situ
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
ER	: Östrojen reseptörü
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
FDA	: US Food and Drug Administration
FEA	: Flat epithelial atypia
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
FOXO3a	: Forkhead box O3a
GLOBOCAN	: Global Cancer Observatory
GPA	: Gene protein assay
HE	: Hematoksilen eozin
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HR	: Hormon reseptörü
IGF1	: İnsulin-like growth factor 1
ISH	: İn situ hibridizasyon
İHK	: İmmünohistokimya
LCIS	: Lobüler karsinoma in situ
LMWCK	: Düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler

MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEK	: Mitogen-activated protein kinase
MMR	: Mismatch repair
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
PALB2	: Partner and localizer of BRCA2
PAM50	: Prediction Analysis of Microarray 50
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
pCR	: Patolojik komplet yanıt
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIK3CA	: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz alfa
PR	: Progesteron reseptörü
PTEN	: Fosfataz ve TENSin homolog “deleted on chromosome 10”
RAD50	: DNA repair protein
RAF	: Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	: Rat sarcoma
RCB	: Rezidü kanser yükü
RT-PCR	: “Reverse” transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
T-DM1	: Trastuzumab emtansine
T-DXd	: Trastuzumab deruxtecan
TDLÜ	: Terminal duktal lobüler ünite
TIL	: Tümör infiltre lenfosit
TNM	: Tümör-nod-metastaz
TOR	: Target of rapamycin
UICC	: Union for International Cancer Control

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Nonproliferatif ve proliferatif lezyonlardan meme kanseri gelişme riski	.6
Tablo 2: Modifiye Bloom-Richardson Derecelendirme Sistemi9
Tablo 3: Meme kanseri moleküler alt tiplerinin immünohistokimya karşılıkları11
Tablo 4: Olguların tedavi yanıtlarına göre dağılımı36
Tablo 5: non-pCR olan olguların MD Anderson skorlamasına göre dağılımı36
Tablo 6: Boyanma paternlerinin olgu sayısına göre dağılımı37
Tablo 7: Boyanma paternlerine göre MD Anderson skorlarının dağılımı43
Tablo 8: Olgulara ait klinik ve patolojik veriler ile tedavi yanıtı arasındaki ilişki	..44
Tablo 9: Çok değişkenli lojistik regresyon analiz sonuçları46
Tablo 10: Çalışmamızdaki eşik değerleri kullanarak İHK ile fokal, heterojen, homojen paternleri tanımlayan çalışmalar ve bu paternlerin dağılımları	.50
Tablo 11: İHK yöntemi ile fokal/heterojen/homojen paternleri tanımlayan ve tedavi yanıtı/sağkalım ile kıyaslayan çalışmalar52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi sinyal yolları	18
Şekil 2: HER2 ekspresyonu immünohistokimyasal değerlendirme algoritması	22
Şekil 3: HER2 immünohistokimyasal a. skor 0, b. skor 1, c. skor 2 ve d. skor 3	23
Şekil 4: Dual-probe ISH ile HER2 amplifikasyonu değerlendirme algoritması	24
Şekil 5: Yaşa göre olgu sayıları	34
Şekil 6: Olgu sayısına göre TIL skorları (%)	35
Şekil 7: Heterojen(%30-79 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma); kümesel ..	38
Şekil 8: Heterojen(%30-79 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma); mozaik ...	39
Şekil 9: Heterojen(%30-79 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma); kümesel ve mozaik (x200)	40
Şekil 10: Fokal(<%30 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma) (x100)	40
Şekil 11: Morfolojik heterojenite gösteren tümörde HER2 ile kümesel pozitiflik ...	41
Şekil 12: Morfolojik heterojenite gösteren tümöre ait HER2 boyanma paternleri ...	42

ÖZET

Amaç: HER2-pozitif meme kanserinde tedavi yanıtı ve sağkalım oranlarının heterojenite gösteren olgularda daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada immünohistokimyasal yöntem ile heterojen HER2 boyanmasının tedavi yanıtı üzerine etkisini saptamak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümünde Ocak 2011-Kasım 2023 tarihleri arasında özel tip içermeyen invaziv meme karsinomu tanısı alan, HER2 immünohistokimya sonucu skor 3 ve/veya skor 2 olup in situ hibridizasyon yöntemi ile amplifikasyon saptanan 115 olgu değerlendirildi. HER2 ile komplet membranöz boyanma yaygınlığı $<30\%$ ise fokal, $30-79\%$ arası ise heterojen, $\geq 80\%$ ise homojen olarak sınıflandı ve tedavi yanıtı ile ilişkisi incelendi. Ayrıca yaş, lokalizasyon, fokalite, tümör boyutu, pT evresi, lenf nodu tutulumu, pN evresi, histolojik derece, nükleer derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, TIL skoru, nekroz, ER, PR durumları ve ki67 proliferasyon indeksi ile tedavi yanıtı arasındaki ilişki değerlendirildi.

Bulgular: 9 olguda (7.8%) fokal, 31 olguda (27%) heterojen, 75 olguda (65.2%) homojen boyanma izlendi. Homojen boyanma gösteren olguların, nonhomojen boyanmaya göre daha yüksek pCR oranları ile ilişkili olduğu tek değişkenli analizde gösterildi ($p=0.041$). Ayrıca TIL skoru ve PR durumu ile tedavi yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (Sırasıyla $p=0.015$, $p=0.004$). Çok değişkenli analiz sonucu yalnızca TIL skoru ve PR durumunun tedavi yanıtına etki eden bağımsız faktörler olduğu gösterildi (Sırasıyla $p=0.034$, $p=0.012$).

Sonuçlar: HER2-pozitif hücreler ile HER2-negatif hücrelerin bir arada bulunması uygulanan hedefe yönelik tedavinin hücrelerin tümüne etki etmemesi ile sonuçlanmaktadır. Tedavi kararı ve klinik takip sürecini etkileyebileceğinden HER2 skoru raporlanırken pozitif ya da negatif ayırımına ek olarak boyanma yüzdelerinin de bildirilmesi önemlidir.

Anahtar Kelimeler: HER2, heterojenite, immünohistokimya, meme kanseri

ABSTRACT

Objective: It has been shown that treatment response and survival rates in HER2-positive breast cancer are lower in cases with heterogeneity. The present study aimed to determine the effect of heterogeneous HER2 staining determined by immunohistochemistry on treatment responses.

Materials and Methods: A total of 115 cases diagnosed with invasive breast carcinoma of no special type, whose HER2 immunohistochemistry results were score 3 and/or score 2 with HER2 gene amplification, between January 2011 and November 2023 at the department of pathology at Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital of University of Health Sciences were evaluated. HER2 staining was categorized as focal (<30%), heterogeneous (30-79%), or homogeneous (\geq 80%) based on the total percentage of cells with complete membranous staining and their effect on treatment response was examined. Age, localization, focality, tumor size, pT stage, lymph node involvement, pN stage, histological grade, nuclear grade, lymphovascular invasion, perineural invasion, TIL score, necrosis, ER, PR status and ki67 proliferation index were also analyzed whether they have any effect on the treatment response as well.

Results: Focal staining pattern was observed in 9 cases (7.8%), heterogeneous in 31 (27%), and homogeneous in 75 cases (65.2%). In the univariate analysis, cases with homogeneous staining had significantly better treatment responses ($p=0.041$). Additionally, a significant relationship was found between TIL scores and PR status with treatment responses ($p=0.015$ and $p=0.004$, respectively). In multivariate analysis, only TIL score and PR status were independent factors affecting treatment response ($p=0.034$ and $p=0.012$, respectively).

Conclusions: The coexistence of HER2-positive and negative cells results in the targeted therapy being unable to affect all the cells. It is important to report the percentages of staining along with the positive or negative results when reporting HER2 status, as it may affect the treatment decision and clinical follow-up process.

Keywords: HER2, heterogeneity, immunohistochemistry, breast cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

“Human epidermal growth factor-2” (HER2) pozitif meme karsinomları, primer meme tümörlerin %15-20’sini oluşturmaktadır. HER2-pozitif tümörler daha agresif histopatolojik özellikler ve kötü gidişatla ilişkilendirilmiş ancak anti-HER2 tedavilerinin (trastuzumab, pertuzumab vb.) geliştirilmesiyle birlikte rekürrens oranları düşmüş, sağkalım daha iyi hale gelmiştir. Bu nedenle HER2 durumu tüm invaziv meme karsinomlarında standart olarak raporlanmaktadır (1).

HER2 durumu, American Society of Clinical Oncology–College of American Pathologists (ASCO/CAP) rehberi esas alınarak immünohistokimya (İHK), in situ hibridizasyon (ISH) veya her iki yöntem birlikte kullanılarak değerlendirilmektedir. Rehberde göre önce İHK uygulanmakta ve bu yöntem ile skor 2 (belirsiz) değerlendirilen olgulara refleks test olarak ISH testi önerilmektedir. İHK skorlaması; %10 sınırı, boyanma şiddeti ve membranöz boyanmanın komplet olup olmaması esas alınarak yapılmaktadır. HER2-pozitif (skor 3) şeklinde skorlama için kuvvetli ve komplet membranöz boyanma yaygınlığının %10’dan fazla tümör hücresinde olması yeterlidir. Belirsiz kabul edilen skor 2 ise %10’un üzerinde zayıf-orta şiddette, komplet membranöz boyanma olan olgulara verilmektedir (2).

Meme tümörlerinde %40’a kadar HER2 heterojenitesinden bahsedilmekte ancak rutin pratikte immünohistokimyasal boyanmanın homojen ya da heterojen olması raporlanmamaktadır (1,3–7). ASCO/CAP 2008 kılavuzunda ISH yöntemi ile HER2 amplifikasyon heterojenitesi kavramını tanımlamış ve raporlanmasını önermiştir (8). İmmünohistokimyasal heterojen boyanma paternine 2018 ve 2023 yılındaki rehberlerde kısaca yer verilmiş, ayrıntılı bir tanımlama yapılmamış ve heterojenite durumunun raporlanması önerilmemiştir (2,9).

Literatürde immünohistokimya, in situ hibridizasyon, “gene protein assay” (GPA) gibi yöntemler kullanarak HER2’nin intratümöral heterojenitesini ortaya koyan ve heterojenitenin daha kötü tedavi yanıtı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (7,10–13). HER2 heterojenitesinin, primer ve metastatik bölgedeki tümör arasındaki immün profil uyumsuzluğu ve tedavi direnci ile ilişkili olabileceği düşünüldüğünde, immünohistokimyasal boyanma paterninin raporlanması ve bu olguların klinik tarafından daha sıkı takip edilmesi önerilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME EMBRYOLOJİSİ

Meme, aksilladan başlayıp uyluk üst medial kısmına kadar uzanan ve süt çizgisi olarak adlandırılan yapıdan gelişir. Fetal gelişim sırasında bu yapının çoğu regrese olur.

Gestasyonun 15. haftasında epitelyal bir sap etrafında mezenkim yoğunlaşmaya başlar ve meme tomurcuğu oluşur. Epitel adalarının mezenkim içerisine büyümesi ile meme glandına ait loblar meydana gelir. Fetal papiller dermis bu epitel adalarını sararak duktus ve lobüllerin etrafını çevreleyen fibröz dokuyu oluşturur. Retiküler dermis ise parankim içine uzanarak lobların etrafını sarar ve Cooper ligamentlerini meydana getirir. Myoepitelyal hücreler gestasyonun 23 ve 28. haftası arasında bazal hücrelerden köken alır ve laminin, tip IV kollajen, fibronektin gibi bazal membran bileşenleri ve büyüme faktörleri sentezlerler.

Gestasyonun son döneminde, maternal ve plasental hormonlara bağlı fetal meme dokusunda sekretuar aktivite görülür. Doğum sonrası 1-2. aylarda yenidoğandaki maternal hormonların gerilemesiyle sekretuar aktivite kaybolur ve gland küçülerek inaktif hale gelir. Lobüler yapılar persiste edebilse de bu aşamada geriye yalnızca glandüler diferansiasyon olmaksızın dallanan laktiferöz duktuslar kalır.

Puberte başlangıcı ile siklik östrojen ve progesteron uyarısı erişkin meme gelişimini sağlar. Duktus epiteli ve periduktal stroma gelişimi östrojene bağımlı gerçekleşir. Bu safhada aynı zamanda büyüme hormonu ve glukokortikosteroidler de görev alır. İnsülin, progesteron ve büyüme hormonu ise terminal duktus ve lobüler diferansiasyonu sağlar. Glandüler kısmın gelişimi çoğunlukla pubertede olsa da bu süreç 10 yıl kadar devam eder ve gebelikle daha da artar (14).

2.2. MEME ANATOMİSİ

Meme, deri ve subkutan yağlı doku ile kaplı, pektoralis major kası üzerinde yerleşmiş, aksillaya doğru uzanan glandüler bir organdır. Dermisten meme parankimi içine uzanan Cooper ligamentleri meme derisi ve meme başını sabitler. Parankimal

lezyonlar sonucu ligamentlerde uzama/sıkışma meydana gelirse meme derisi ve meme başında retraksiyonlar görülebilir.

Meme büyük oranda internal torasik arterin dalı olan internal mammaryan arterden ve daha az lateral torasik arterlerden beslenir. Venöz drenaj genel olarak arteriyel dolaşımı takip eder ancak kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Yüzeysel venler internal torasik vene, derin venler ise vertebral pleksusa drene olur. Lenfatik drenajın büyük çoğunluğu aksillaya, daha az kısmı ise internal mammaryan lenf nodlarına olur (14,15).

2.3. MEME HİSTOLOJİSİ

Erişkin bir kadında meme, değişken oranlarda fibröz ve yağlı dokudan oluşan stroma ve her biri meme başına açılan toplayıcı (laktiferöz) duktuslarla devamlılık gösteren 15 ila 25 lobdan oluşan glandüler kısımdan meydana gelir (14). Lobları oluşturan iki ana komponent terminal duktal lobüler ünite (TDLÜ) ve büyük duktus yapılarıdır. TDLÜ, pek çok asinusun bir araya gelerek oluşturduğu lobül yapısı ve terminal duktülden oluşan sekretuar birimdir. Bu yapı daha sonra sırasıyla subsegmental duktus, segmental duktus, laktiferöz duktus ve meme başına açılır.

Segmental ve laktiferöz duktuslar arasında meme başının altındaki genişleme laktiferöz sinüs olarak adlandırılır (16). Duktus orifislerinin yüzeysel kısmı skuamöz epitel ile döşelidir ve skuamokolumnar bileşke laktiferöz sinüsün distalinde görülür. Skuamöz epitelin laktiferöz sinüs içinde veya daha aşağıda görülmesi skuamöz metaplazi olarak adlandırılır ve bu durum duktuslarda tıkanıklığa yol açabilir (14).

Glandüler ünitenin duktus ve lobül şeklinde iki ana kısımda incelenmesinin sebebi, bu yapılardan gelişen hastalıklarla ilişkilidir. Welling ve ark.(17)nın gösterdiği üzere invaziv meme karsinomlarının köken aldığı yer duktuslar değil, TDLÜ'dür.

Glandüler komponentin tamamı (tüm duktal ve lobüler yapılar) içte (luminal) epitel, dışta (bazal) myoepitel ile döşelidir. Luminal epitel küboidal-kolumnar şekilli, soluk eozinofilik sitoplazmalı, uniform oval nükleuslu hücrelerden oluşur. Bu hücreler sitokeratin (CK) 7, 8, 18 ve 19 gibi düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler (LMWCK), mammogloblin, "Gross cystic disease fluid protein 15" (GCDFP-15) ve "GATA binding protein 3" (GATA3) gibi immünohistokimyasal antikorlar ile pozitif boyanma

gösterirler. Epitelyal membran antijen (EMA) ile epitel hücrelerinin sadece apikal yüzünde reaksiyon gözlenir.

Myoepitel hücreleri, luminal epitel ve bazal tabaka arasında yerleşmiştir. Hematoksilen eozin (HE) kesitlerde içsi, düzleşmiş hücreler şeklinde görülebilecekleri gibi geniş berrak sitoplazmalı epitelioid morfolojide de olabilirler. İmmünohistokimyasal olarak CK5/6 ve CK14 gibi yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler (HMWCK), “smooth muscle actin” (SMA), kalponin, myozin, p63, S100, CD10 ve p75 ile pozitif boyanırlar (15,16).

Normal bir lobül, çok sayıda kör sonlanan terminal duktülden (asinuslardan) oluşur. Asinusların etrafı intralobüler stroma ile çevrilidir ve daha dens, kollajenize olan interlobüler stromadan keskin bir sınırla ayrılır (15).

Meme başı, büyük toplayıcı kanallara ek olarak çok sayıda sebace gland ve erektil düz kasların bulunduğu fibröz bir stroma içerir. Areola üzerinde yaklaşık 10-20 adet “*Montgomery tüberkülleri*” adı verilen ve gebelikte belirgin hale gelen çıkıntı mevcuttur. Bu yapılar laktiferöz kanallar ile sebace glandların birleşimiyle oluşur. Meme başı ve areolayı kaplayan epidermiste, diğer bölgelerden farklı olarak bazal tabakada melanin artışı ve seyrek olarak berrak “*Toker hücreleri*” görülür (16).

Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) epitelyal hücrelerin nükleusunda yer alır. Normal meme dokusunda, lobüler hücrelerde daha fazla olmak üzere, epitel hücrelerinin yaklaşık %7’inde ER ekspresyonu mevcuttur (18). Hormon reseptör aktivitesi lobüller arasında belirgin heterojenite göstermektedir. Silva ve ark. ER pozitif hücrelerin proliferatif fazda (3-7. günler), PR pozitif hücrelerin ise foliküler fazda (8-14. günler) sayıca en fazla olduğunu gözlemlemiştir (19).

Hormonal değişikliklere bağlı olarak meme boyutunda ve komponentlerinde değişiklikler gözlenir. Menstrüel siklusun ilk günlerinde minimal sekresyon içeren ve proliferatif etkiyle lümenlerinin kapalı, kalabalık görüldüğü lobüllerde, siklusun ilerleyen dönemlerinde belirgin lümen formasyonu ve sekresyon izlenir. İlk günlerde ayırt edilemeyen myoepitelyal hücreler, günler ilerledikçe berrak hücre değişikliklerine uğrar. İntralobüler stroma siklusun başında yoğunken, gün geçtikçe daha gevşek ve ödemli görünmeye başlar. Foliküler faz (8-14. günler) memenin en az nodüler olduğu ve bu sebeple klinik meme muayenesi için en optimal olan dönemdir (14).

Gebelik boyunca terminal duktus ve lobüller hızla büyür, stromada vaskülerite ve mononükleer inflamatuvar hücreler artar. Areolada pigmentasyon artışı izlenir. 2. ve 3. trimestrla birlikte hücreler de büyümeye başlar ve proliferer olur. Lobüler epitel vakuolize hal alır ve lümen içerisinde sekresyon birikmeye başlar. Glandüler yapılarıdaki büyüme ve laktasyon, stromanın azalmasıyla sonuçlanır.

Söz konusu değişiklikler memede fokal alanlarda olabilir. Genellikle 3. trimestrda tanımlanan lokalize adenomatöz hiperplazi ve bu lezyonu takiben kitle oluşumuna yol açan laktasyon adenomu görülebilir. Laktasyonun sona ermesiyle 3 ay içerisinde involüsyon gerçekleşir (14).

Postmenapozal dönemde glandüler komponent ve kollajenöz stromada belirgin azalma, stromal yağlı dokuda ise artış gözlenir. Hormon seviyelerindeki düşüşe bağlı TDLÜ epitel ve intralobüler stromada involüsyon ve atrofi görülür (20).

Memede sebebi net olarak aydınlatılamamış değişiklikler tanımlanmıştır: 1) Gebelik-benzeri değişiklik, gebelik ya da laktasyon olmaksızın gözlenen, Arias-Stella benzeri görünüme yol açan bir meme lezyonudur. 2) Berrak hücre değişiklikleri, terminal duktus ve lobüllerde bol berrak/soluk, ince granüler sitoplazmalı epitel hücreleri ile karakterizedir (14).

2.4. BENİGN MEME HASTALIKLARI

Benign meme lezyonları çok sık karşılaşılan ve klinik, radyolojik, makroskopik ve mikroskopik olarak karsinomları taklit edebilen lezyonlardır. Gerçek neoplaziler değil, hormon seviyelerine bağlı olarak meme parankiminde izlenen hiperplastik değişikliklerdir (21). İntraduktal proliferatif lezyonlar ve nonproliferatif değişiklikler olmak üzere iki ana grupta incelenir.

Nonproliferatif değişiklikler; 1) kistler, 2) apokrin metaplazi, 3) fibrozis, 4) kalsifikasyon, 5) kronik inflamasyon şeklinde sınıflandırılır. İntraduktal proliferatif lezyonlar; 1) olağan duktal hiperplazi, 2) atipik duktal ve lobüler hiperplazi, 3) kolumnar hücre değişiklikleri ve “flat” epitelyal atipiden (FEA) oluşur.

Page benign meme hastalıkları ve karsinoma in situ lezyonlarını, meme kanseri gelişme risklerine göre sınıflamış ve Tablo 1’de gösterilen sonuçları elde etmiştir (22). Kanser gelişme riskleri farklı olduğundan bu lezyonları tanımak ve ayırt etmek klinik takip ve tedavi yönetimi açısından önem arz etmektedir.

Tablo 1: Nonproliferatif ve proliferatif lezyonlardan meme kanseri gelişme riski

Olağan duktal hiperplazi, hafif (nonproliferatif değişiklik)	Risk artışı yok.
Olağan duktal hiperplazi, orta ve florid (Atipisiz proliferatif hastalık)	x1.5 - 2 kat risk
Atipik duktal ve lobüler hiperplazi	x4 - 5 kat risk
Duktal ve lobüler karsinoma in situ	x8 - 10 kat risk

FEA, düşük dereceli neoplazilerin prekürsörü olarak görülmektedir ve atipisiz proliferatif lezyonlarla benzer meme kanseri gelişme riski taşımaktadır (x1.5 – 2 kat). Yapılan çalışmalarda kolumnar hücre değişikliklerinin sıklıkla düşük dereceli duktal karsinoma in situ (DCIS), lobüler karsinoma in situ (LCIS) ve tübüler karsinom ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (23–26).

2.5. MEME KANSERİ

Memenin epitelyal ve mezenkimal komponentlerinden köken alan pek çok tümörü mevcuttur. Meme karsinomu, memenin epitelyal hücrelerinden kaynaklanan malign tümördür ve pek çok farklı alt tipi tanımlanmıştır (27).

2.5.1. Lokalizasyon

Meme kanserlerinin %90 kadarı unifokaldır ve üst dış kadranda daha sıklıkla tanımlansa da herhangi bir kadranda görülebilir. Hastaların yaklaşık %2'sinde kontralateral memede senkron tümör bildirilmiştir. Yaklaşık %0.1'i ise net bir meme primeri olmaksızın (“*occult*” meme kanseri) aksiller metastaz ile prezente olur (28,29).

2.5.2. Klinik ve Radyolojik Özellikler

Tarama yapılmayan olgularda en sık bulgu ele gelen kitledir. Bu bulgu haricinde deride retraksiyon, meme başı inversiyonu, meme başı akıntısı görülebilir. İleri evre olan inflamatuvar meme karsinomu, meme derisinin 1/3'ünde ya da daha fazlasında eritem ve ödem ile klinik olarak tanı alır.

Mamografik tetkikte spiküle ya da iyi sınırlı kitle, arkitektürel bozukluk veya tek başına kalsifikasyonlar izlenebilir. Palpabl kitlelerin %5-15'i mamografide

saptanmayıp, ultrasonografi yardımıyla görüntülenebilir. Mamografik olarak dens memelerde ve 40 yaş altı kadınlarda ultrasonografi tercih edilir. Meme kanseri için yüksek risk taşıyan (*BRCA1*, *BRCA2* mutasyonları saptanan) kadınlarda tarama amaçlı en sensitif yöntem olan manyetik rezonans görüntüleme kullanılır (27).

2.5.3. Epidemiyoloji

Meme kanseri kadınlarda en sık tanı alan kanser ve kansere bağlı ölümlerin en sık sebebidir. GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında 2.3 milyon yeni tanıyla akciğer kanserini geçerek en sık tanı alan kanser olmuştur (30). Mamografinin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasından sonra meme kanseri insidansında belirgin artış görülmüştür. Bunların büyük çoğunluğu erken evre, 2 cm'den küçük ve DCIS içeren olgulardır (31,32).

2.5.4. Etiyoloji

Meme kanseri pek çok faktöre bağlı olarak gelişebilir. Tanımlanan risk faktörlerin çoğu uzun süreli östrojen uyarısı ile ilişkili görünmektedir.

Meme kanserinin %5-10 kadarı aileseldir. *BRCA1* ve *BRCA2* germline mutasyonları, meme kanserinin yanı sıra bazı diğer kanserlerin de (over, pankreas) yaşam boyu gelişimi açısından yüksek risk ile ilişkilidir. *BRCA1* ve *BRCA2* dışında *CHEK2*, *CDH1*, *RAD50* ve *PALB2* genleri meme kanseri gelişimi için düşük ila orta derece risk ile ilişkilidir. Herediter meme kanseri; Lynch sendromu ("mismatch repair" [MMR] genleri), Li-Fraumeni sendromu (*TP53*), ataksi-telenjiektazi sendromu (*ATM*), Cowden sendromu (*PTEN*) gibi multipil kanser sendromları ile birlikte de görülebilir (33–35).

Spesifik risk faktörlerinin, meme kanserinin farklı alt tiplerini geliştirme riskine farklı şekillerde katkıda bulunduğu öne sürülmektedir:

- Alkol tüketiminin hormon reseptörü-pozitif meme karsinomu gelişme riskini arttırdığı bulunmuştur.
- Germline *BRCA1* mutasyonları "triple" negatif meme kanserleri, *BRCA2* mutasyonları hormon reseptörü-pozitif meme karsinomları ile ilişkilendirilmiştir.
- Erken menarş, geç menapoz, nulliparite, ilk doğumun ileri yaşta olması da hormon reseptörü-pozitif meme karsinomu riskini arttırmaktadır.

- Postmenapozal kadınlarda vücut kitle indeksi ile hormon reseptörü-pozitif meme kanseri gelişme riskinin doğru orantılı, premenapozal kadınlarda ise zayıf olarak ters orantılı saptanmıştır (27).

Meme Kanseri Risk Faktöleri

- Aile öyküsü
- Genetik yatkınlık
- Menstrüasyon ve gebelik öyküsü (Erken menarş, geç gebelik)
- İntraduktal proliferatif lezyonlar
- Eksojen östrojen
- İyonize radyasyon
- Yüksek kalorili diyet
- Alkol tüketimi
- Fiziksel aktivite

2.5.5. Patogenez

Kanserin başlangıcı ve progresyonuna ilişkin, hormon reseptör durumu ve morfolojiye dayanan pek çok teori öne sürülmüştür. ER-pozitif invaziv meme karsinomunun öncülleri olarak FEA, atipik duktal hiperplazi ve ER-pozitif DCIS; ER-negatif karsinom öncülleri olarak ise ER-negatif DCIS ve mikroglandüler adenozis kabul edilmektedir (36).

Moleküler çalışmalardan elde edilen veriler de ER-pozitif ve ER-negatif meme karsinomlarının ayrı hastalıklar olduğunu göstermektedir. ER-pozitif tümörler çoğunlukla düşük-orta dereceli olup HER2 ve bazal belirteçlerle negatiftir. ER-negatif yolağtan gelişen tümörler ise orta-yüksek derecelidir (37). *TP53* mutasyonları ER-negatif tümörlerde sık izlenen bir genetik alterasyondur. *PIK3CA* mutasyonları ise hem ER-pozitif hem de ER-negatif grupta tanımlanmıştır. (38).

ER-negatif, HER2-pozitif grupta 17q12 amplifikasyonuna ek olarak *PIK3CA* mutasyonları tanımlanmıştır. ER-negatif, HER2-negatif tümörler ise yüksek proliferatif aktivite, artmış immünolojik yanıt, bazal-benzeri mezenkimal fenotip ve homolog rekombinasyon defekti gösterir (27).

2.5.6. Histopatoloji

İnvaziv meme karsinomları pek çok farklı morfolojide olabilir. Tümörün büyüme paterni, nükleer atipisi ve stromal özelliklerine göre histolojik alt tipler tanımlanmıştır. Eğer %90'dan fazlası benzer özellik gösteriyorsa pür tümör olarak kabul edilir, bunun haricindekiler “invaziv karsinom, özel tip içermeyen” olarak adlandırılır (27).

Tümörün derecesini belirlemek için Nottingham derecelendirme sistemi ve modifiye Scarf-Bloom-Richardson sistemi (39) standart olarak kullanılmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2: Modifiye Bloom-Richardson Derecelendirme Sistemi (39)

Tübül formasyonu	Tümörün %75'inden fazla	1
	Tümörde %10-75 arasında	2
	Tümörün %10'undan azında	3
Nükleer pleomorfizm	Minimal farklılık	1
	Orta derecede farklılık	2
	Belirgin farklılık	3
Mitoz sayısı (1 BBA: 0,196 mm ²)	≤ 7	1
	8-14	2
	≥ 15	3
Toplam skor	3-5: Histolojik derece 1 6-7: Histolojik derece 2 8-9: Histolojik derece 3	

BBA: Büyük büyütme alanı

2.5.7. Meme Kanseri Sınıflaması

Neoplastik lezyonların tanısında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından oluşturulan ve belirli aralıklarla güncellenen sınıflama sistemi kullanılmaktadır. Meme

tümörleri sınıflaması 2019 yılında güncellenmiştir ve günümüzde de halen kullanılmaktadır (40).

DSÖ İnvaziv Meme Karsinomu Sınıflaması (40)

- İnvaziv meme karsinomu, özel tip içermeyen
- Mikroinvaziv karsinom
- İnvaziv lobüler karsinom
- Tübüler karsinom
- Kribriform karsinom
- Müsinöz karsinom
- Müsinöz kistadenokarsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin diferansiasyon gösteren karsinom
- Metaplastik karsinom

Güncel sınıflama histomorfolojik özelliklere dayansa da klinik yönetim ve takip açısından büyük önem taşıdığından ek olarak moleküler sınıflama da yapılmaktadır. Moleküler testlerin zaman ve maliyet kısıtlamaları nedeniyle çoğu kurumda bu yöntem yerine immünohistokimyasal biyobelirteçler kullanılmaktadır (27).

2.5.8. Meme Kanseri Moleküler Sınıflaması

İlk kez 2000 yılında Perou ve ark. (41) tarafından yapılan bir çalışmada ortaya konan moleküler alt tipler, takip eden yıllarda revize edilmiştir ve günümüzde hala kullanılmaktadır. Gen ekspresyon analizleri sonucu 6 moleküler alt tip (Luminal A, Luminal B, HER2-zengin, bazal benzeri, normal meme benzeri ve “claudin-low”) tanımlanmıştır (41–43). Erken evre meme kanseri olan çoğu kadının söz konusu moleküler testleri yaptırması zor olduğundan, 2013 yılı St Gallen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı’nda düşük maliyetli ve daha yaygın uygulanabilir olan immünohistokimya tabanlı bir sınıflamanın kullanımı kabul edilmiştir (44). Buna göre Luminal A, Luminal B, HER2-zengin ve bazal benzeri moleküler alt tipler immünohistokimya kullanarak sınıflanabilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3: Meme kanseri moleküler alt tiplerinin immünohistokimya karşılıkları (44)

Luminal A	Luminal A benzeri	ER ve PR: pozitif HER2: negatif Ki67 indeksi: düşük
Luminal B	Luminal B benzeri (HER2 negatif)	ER: pozitif HER2: negatif Aşağıdakilerin en az biri: - ki67 indeksi: yüksek - PR: negatif / düşük
	Luminal B benzeri (HER2 pozitif)	ER: pozitif HER2: pozitif (overekspresyon/ amplifikasyon) Ki67 indeksi: % 0-100 PR: pozitif ya da negatif
Erb-B2 overekspresyonu	HER2 pozitif (nonluminal)	HER2: pozitif (overekspresyon/ amplifikasyon) ER ve PR: negatif
Bazal-benzeri	“Triple” negatif	ER ve PR: negatif HER2: negatif

Luminal A: En sık görülen (%50-60) moleküler alt tip ve en iyi prognoza sahip gruptur. Nüks diğer gruplara göre daha az olmak üzere kemikte sıktır. Histopatolojik ve klinik olarak düşük dereceli tümörlerdir. Tedavisinde cerrahi ve hormon tedavisi (tamoksifen, aromataz inhibitörleri) uygulanır. Kemoterapiden fayda görebilecek hasta grubunun belirlenmesi için genetik testler (PAM50, mammaprint vb.) uygulanabilir (45,46).

Luminal B: İnvaziv meme karsinomlarının %15-20’sini oluşturur. Luminal A grup tümörlere göre daha fazla proliferasyon-ilişkili gen eksprese ettiklerinden daha yüksek dereceli tümörlerdir ve sağkalım daha düşüktür (27). Luminal B, HER2-negatif ve HER2-pozitif (Luminal HER2) olmak üzere ikiye ayrılır. ER-pozitif/HER2-pozitif grup tümörler, ER-pozitif/HER2-negatif tümörlere kıyasla daha fazla tedavi direnci ile ilişkilendirilmiş ve daha yüksek dereceli tümörlerdir (47,48).

HER2-pozitif: HER2 gen amplifikasyonu/overekspresyonu %20 oranında görülmekte ve kötü prognoza işaret etmektedir. HER2-pozitif tümörler hormon reseptör durumuna göre luminal HER2 (ER+/HER2+) ve HER2-zengin (ER-/HER2+) olabilir. HER2 amplifiye/overeksprese tümörler daha agresif klinik gidişat ve yüksek histolojik dereceye sahiptir. Cerrahi ve standart kemoterapiye ek olarak HER2'yi hedef alan monoklonal antikorlar ile birlikte tedavi edilir (4,45).

“Triple” negatif: ER, PR ve HER2 negatif meme karsinomları yaklaşık %20'lik dilimi oluşturur. “Triple” negatif karsinomlar; bazal benzeri 1 ve bazal benzeri 2, “claudin-low”, mezenkimal, luminal androjen reseptör ve immünomodülatör olmak üzere 6 grupta incelenebilir. Daha agresif klinik gidişat ve erken nüks ile karakterize bu tümörler histolojik olarak az diferansiye ve proliferasyon indeksleri yüksektir. Bazal benzeri subtip CK5/6, CK14, EGFR gibi belirteçler ile pozitifdir. *BRCA1* mutant tümörler genellikle bu grupta yer alır (27,45).

2.5.9. Prognostik Faktörler

Meme kanserinin prognozuna etki eden pek çok klinik ve patolojik değişken tanımlanmıştır. Bazı belirteçlerin tedavi yanıtı hakkında prediktif değeri de vardır.

Yaş: Postmenapozal dönemde tanı alan kadınlar en iyi prognoza sahiptir. (Tarama sonucu daha erken evrede tanı alırlar ve tümörler genellikle iyi diferansiye ve ER-pozitifdir.) Genç yaş bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Genç kadınlarda tanı koymada geç kalınma ve buna bağlı daha ileri evrede tanı alma, sıklıkla nüks ve uzak metastaz bildirilmiştir (49).

Tümör boyutu: Luminal ve HER2-pozitif tümör grubunda, tümör boyutu ile lenf nodu metastazı ve sağkalım arasında doğru orantı saptanmıştır. Lenf nodu metastazı yapmamış tümörlerde ise nüks ve yayılma oranını tahmin etmede güçlü bir parametredir (50,51).

Histolojik tip: İnvaziv lobüler karsinom ile özel tip içermeyen invaziv meme karsinomu arasında prognostik açıdan fark olup olmadığı tartışmalı bir konudur. Bazı

çalışmalar invaziv lobüler karsinomu daha iyi prognoza sahip bulurken, bazıları daha kötü seyrettiğini, bir başka grup ise aralarında prognostik açıdan anlamlı fark olmadığını raporlamıştır. Tübüler karsinom, kribriform karsinom, pür müsinöz karsinom daha iyi prognoza sahip subtiplerdir (27).

Histolojik derece: Gland formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısına verilen skorların toplanarak nihai skorun histolojik dereceyi belirlediği modifiye Bloom-Richardson sistemi, özel tip içermeyen invaziv meme karsinomu başta olmak üzere tüm alt tiplere uygulanmaktadır. Buna göre histolojik derece 1 tümörler daha indolan seyir gösterirken, derece 2 daha kötü, derece 3 tümörler ise en kötü prognoza sahip grubu oluşturmaktadır (39).

Cerrahi sınırlar: Pozitif cerrahi sınıra sahip (mürekkep üzerinde tümör olan) meme kanseri daha yüksek nüks oranı ile ilişkilidir. Cerrahi sınırlar negatif olduğunda raporlarken tümörün uzaklığı da verilmelidir. Cerrahi sınıra 2 mm'den yakın mesafede DCIS varlığında reeksizyon önerilir (52).

Lenfovasküler invazyon: Lenfatik ya da kan damarlarında tümör trombusu varlığı, lenf nodu metastazı olmayan hastalarda lokal ve uzak nüks ile ilişkilendirilmektedir. Radyasyon tedavisi lokal nüksü önlemek için tedaviye eklenebilir (53).

Evreleme: Meme kanseri, American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union for International Cancer Control (UICC) önerileriyle, tümör-nod-metastaz (TNM) sistemine göre evrelenir. T tümör boyutu ile deri ve göğüs duvar invazyonu, N tutulan bölgesel lenf nodu sayısı ve M uzak metastaz durumu dikkate alınarak sınıflanır (54).

Proliferasyon: Özellikle luminal grupta önemli bir belirleyicidir (44). Proliferasyon indeksi yüksek tümörler daha kötü prognoz gösterir.

Aksiller lenf nodu metastazı: Pozitif lenf nodu sayısı, ektranodal yayılım ve metastatik tümör boyutu ile sağkalım oranları arasında direk ilişki bulunmuştur (55). Mikrometastazlar (> 0.2 ve ≤ 2 mm) ve izole tümör hücrelerinin (≤ 0.2 mm) klinik önemi olmadığı gösterilmiştir (56).

İnternal mammaryan lenf nodu metastazı: Bu grup lenf nodlarında tutulumu olan olguların, olmayanlara göre daha kötü prognoza sahip oldukları bulunmuştur. AJCC pTNM sınıflamasına göre aksiller lenf nodlarından 1-3 tanesinde metastaz pN1a iken, ipsilateral internal mammaryan lenf nodlarında metastaz pN1b olarak evrelenir (54).

Tümör infiltrate lenfositler (TILs): “Triple” negatif ve HER2-pozitif meme karsinomlarında daha fazla immün sistem yanıtı/TIL görülür. “Triple” negatif ve HER2-pozitif grup tümörlerde TIL’ın fazla olması daha iyi seyir ve immünoterapi, kemoterapiye daha iyi yanıt ile ilişkili bulunmuştur (57).

Gen ekspresyonları: Tedavi seçimine karar vermede yardımcı, hastaları prognostik ve prediktif anlamlı gruplara stratifiye eden ticari olarak temin edilebilir gen ekspresyon analizleri mevcuttur. Mammaprint (Microarray ile 70 gen ekspresyon analizi), OncotypeDx (RT-PCR ile 21 gen analizi) ve PAM50 (Microarray ile 50 gen analizi) en yaygın kullanılanlardır. Testlerin temel amacı, erken evre ve ER-pozitif meme karsinomlarında metastaz riskinin belirlenmesi ve buna göre hormon tedavisine ek standart kemoterapinin eklenip eklenmesine karar vermektir (58).

Hormon reseptörleri: ER durumu hem tedaviye yanıt açısından prediktif hem de prognostik bir biyobelirteçtir. ER’nin yüksek seviyelerde eksprese olması daha iyi prognoza işaret eder. Kısa dönem sağkalım ER-pozitif tümörlerde daha iyi olsa da geç dönemde nüks ve uzak metastaz eğilimi gösterirler. PR ekspresyon yüzdesi ER-pozitif tümörlerde önem taşır: düşük PR ekspresyonu kötü seyir ile ilişkilendirilmiştir (27).

HER2: Agresif klinik gidişat ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen HER2-pozitif meme karsinomlarında HER2'nin hedeflenebilir olması anti-HER2 tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamış, sağkalım önemli ölçüde artmıştır (59).

Neoadjuvan tedavi yanıtı: Patolojik komplet yanıt (pCR), HER2-pozitif ve “triple” negatif meme karsinomları için prognostik önem taşımaktadır (60). Neoadjuvan kemoterapi sonrası operasyon spesimenlerinde tümör yatağının boyutu, rezidü tümör selüleritesi, in situ karsinom oranı, pozitif lenf nodu sayısı ve metastatik tümör boyutu parametreleri kullanılarak MD Anderson Rezidü Kanser Yükü belirlenebilir. Hesaplama sonucu pCR, Residual Cancer Burden (RCB)-I, RCB-II ve RCB-III şeklinde nüks riskinin artarak gittiği gruplar bulunur (61).

2.5.10. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanseri yönetiminde cerrahi, radyoterapi, hormon tedavisi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi gibi pek çok tedavi seçeneği mevcuttur. Söz konusu tedavi modalitelerinden hangilerinin uygulanacağı, tümörün histolojik ve moleküler alt tipi, evresi, yaygınlığı gibi prognostik biyobelirteçlere bağlı olarak şekillenir.

Cerrahi: Erken evre meme kanserinde meme koruyucu cerrahi (lumpektomi, segmentektomi, kadranektomi) uygulanabilir. Multifokal ya da tümör boyutunun büyük olduğu meme kanserlerinde mastektomi tercih edilir (62). Tümör boyutu ≤ 2 cm olan ve ultrasonografi ile aksiller lenf nodu tutulumu için şüphe bulunmayan meme tümörlerinde, aksiller diseksiyon yerine sentinel lenf nodu örnekleme yapılır. Bu durumda 1 ya da 2 lenf nodunda metastaz varlığında aksiller diseksiyon prosedüre eklenmez (63).

Radyoterapi: Genellikle meme koruyucu cerrahi sonrası lokorejyonel nüksü engellemek için adjuvant (postoperatif) olarak diğer tedavilerle kombine uygulanır (64).

Hormon (endokrin) tedavisi: ER-pozitif meme kanserinde standart tedavi olarak selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM) tamoksifen, adjuvan (cerrahi sonrası) ya da neoadjuvan (cerrahi öncesi) olmak üzere 10 yıla kadar kullanılır. Ek

olarak “gonadotropin releasing hormone” (GnRH) analogları ile over fonksiyon supresyonu (OFS) uygulanabilir. Postmenapozal dönemde tamoksifene ek olarak aromataz inhibitörleri kullanılmaktadır (44).

Kemoterapi: Kemoterapi rejimleri neoadjuvan ya da adjuvan dönemde verilebilir. Meme kanserinde kullanılan kemoterapötik ajanlar arasında platin-bazlı kemoterapötikler (karboplatin), antimetabolit ajanlar (kapesitabin, metotreksat, florourasil), alkilleyici ajanlar (siklofosamid), antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin), taksanlar (albumin-bağlı paklitaksel, dosetaksel) yer almaktadır.

Adjuvan kemoterapi tümörün evresi ve moleküler özellikleri dikkate alınarak, cerrahi sonrası rezidü tümör ihtimaline karşı nüksü engellemek için uygulanır. Metastatik meme karsinomları, HER2-pozitif tümörler ve “triple” negatif meme karsinomlarında diğer tedaviler ile kombine olarak verilir.

Neoadjuvan kemoterapi boyutu büyük, lokal ileri meme kanserinde tümörü küçülterek meme koruyucu cerrahi uygulanabilmesini sağlar ve lenf nodu tutulumu olan hastalarda aksiller diseksiyon gerekliliğini azaltır. Ayrıca HER2-pozitif ve “triple” negatif meme karsinomlarında tedavi yanıtını değerlendirebilmek, yanıtı göre adjuvan dönemde uygulanacak tedaviyi seçmek ve nüks oranlarını azaltmak için neoadjuvan dönemde kemoterapi verilmektedir (65).

Hedefe yönelik tedavi: Meme kanserinde bu tedavilerin başında anti-HER2 ilaçlar gelmektedir. Klinik evresi $\geq T2$ ya da lenf nodu tutulumu olan HER2-pozitif meme kanserinde neoadjuvan dönemde tercih edilmektedir. Neoadjuvan-adjuvan ya da sadece adjuvan dönemde diğer tedavi yöntemleri ile kombine edilerek toplamda 12 ay süreyle uygulanır (66). Trastuzumab, pertuzumab ve lapatinib anti-HER2 ilaçların başlıcalarıdır. Sitotoksik etkilerini HER2 reseptörüne bağlanarak gösteren antikor-ilaç konjugatı ajanlar (ADC) da hedefe yönelik tedaviler arasında sayılabilir.

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri (olaparib, talazoparib) germline *BRCA* mutasyonları olan, HER2-negatif meme kanserinde kullanılabilen tedavi seçeneklerindedir (67).

İmmünoterapi: Tümör hücrelerine karşı immün sistem yanıtını güçlendirerek/aktive ederek etkinliğini gösteren immün “checkpoint” inhibitör (ICI) ilaçlar (anti-PDL1), erken evre ve metastatik “triple” negatif meme karsinomlarında uygulanabilir. ICI ilaçlara ek olarak “adoptive cell therapies” (ACT) adı verilen, kandaki T lenfositlerin *ex vivo* ortamda değiştirilip aktive edilerek hastaya geri aktarıldığı tedavi seçeneğinin meme kanserinde uygulanabilirliği araştırılmaktadır (68).

2.5.11. HER2-pozitif Meme Kanseri Tedavisi

Preoperatif (neoadjuvan) sistemik tedavi, $\geq cT2$ veya $\geq cN1$ olan HER2-pozitif meme tümörlerine uygulanmaktadır. Ek olarak $cT1c$ ve $cN0$ olan olgularda düşünülebilir.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) kılavuzu (v.1.2024) (69);

- Paklitaksel + trastuzumab,
- TCH (dosetaksel/karboplatin/trastuzumab), ya da
- TCHP (dosetaksel/karboplatin/trastuzumab/pertuzumab) rejimlerini önermektedir.

Neoadjuvan tedavi uygulanmadığı durumda ya da neoadjuvan tedavi uygulaması sonrası rezidü tümör yoksa (pCR), trastuzumab \pm pertuzumab tedavisi 1 yıla kadar devam eder. İlk evreleme sırasında lenf nodu tutulumu varsa trastuzumab + pertuzumab uygulanır.

Neoadjuvan tedavi sonrası rezidü tümör mevcutsa (non-pCR), tek başına Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) kullanılır. Yan etkiler sebebiyle devam edilemezse 1 yıla kadar trastuzumab \pm pertuzumab verilir. İlk evreleme sırasında lenf nodu tutulumu mevcutsa trastuzumab + pertuzumab uygulaması önerilir.

Ek olarak hormon reseptör pozitifliği varsa endokrin terapi tedavi planına eklenir (69).

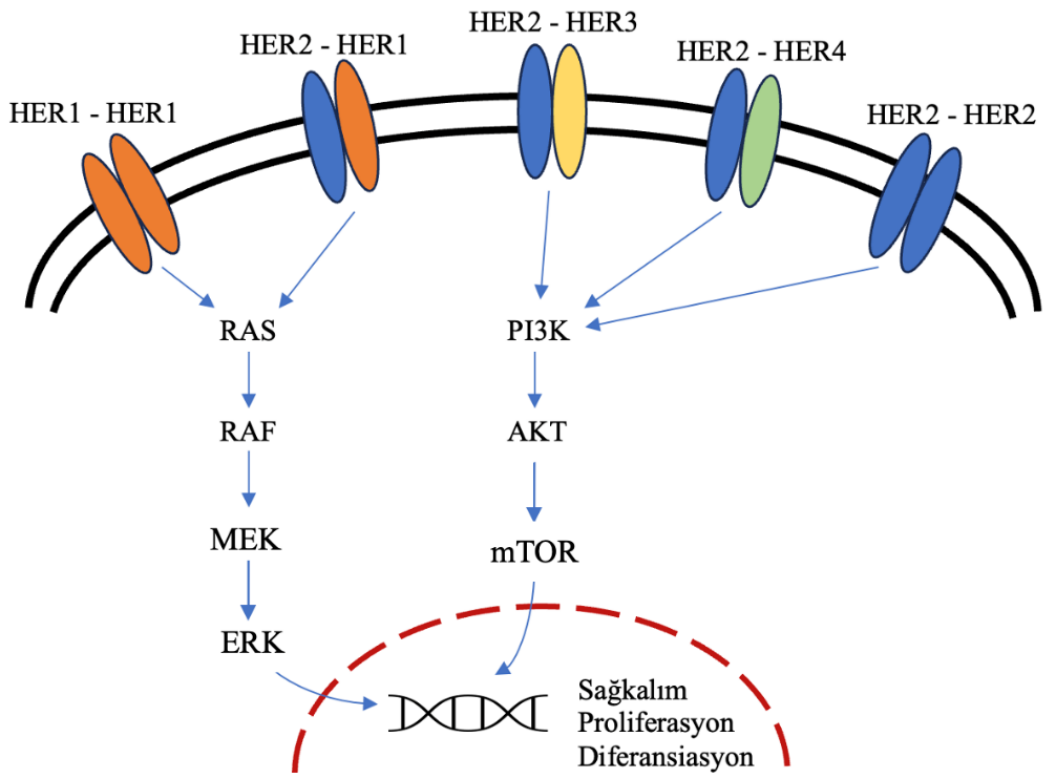
2.6. HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (HER) 2

HER2 (ErbB2, Her2/*neu*), tirozin kinaz aktivitesi gösteren transmembran bir glikoproteindir ve kromozom 17q21’de bulunan HER2 proto-onkogeni tarafından kodlanır. HER1 (ErbB1, EGFR), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4) ile birlikte epidermal

büyüme faktörü reseptör ailesini oluşturur ve RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR, Src kinaz ve STAT gibi sinyal yolları üzerinden hücrede büyüme, sağkalım, diferansiasyon gibi etkilere yol açarlar (Şekil 1) (3,60,70,71).

HER reseptörleri herhangi bir ligand bağlanmazsa monomerik haldedir. Ligand bağlandığında homodimer ya da heterodimerler oluşturur ve intraselüler kısımları transfosforilasyona uğrayarak aktive olur. HER2, EGF-benzeri ligandlarla HER1-HER2; neuregulin ile HER2-HER3 ve HER2-HER4 heterodimerleri oluşturarak aktive olur. Bunlardan en etkin heterodimer formu HER2-HER3'tür (72).

HER2 ve HER3 fonksiyonel olarak inkomplet reseptörlerdir: HER2'nin ekstraselüler bölgesi ligand bağlanma kapasitesi göstermez, bu nedenle HER2'nin sinyal iletimi heterodimer oluşturduğu diğer reseptörlere bağlıdır. HER3 ise diğer reseptörlerden farklı olarak katalitik bölgesinde ATP bağlanma noktası bulunmadığından katalitik olarak inaktiftir. Dolayısıyla HER3'ün sinyal iletimi de heterodimer oluşturduğu reseptöre bağlıdır (73).



Şekil 1: Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi sinyal yolları (74,75)

Nonneoplastik hücrelerde normal sınırlardaki HER2 ekspresyonu, ligand bağlandığında az sayıda HER2 heterodimeri oluşmasına ve normal hücre büyümesine neden olur. Amplifikasyon/overekspresyon durumunda daha fazla HER2 heterodimeri oluşur, sinyal iletimi uzun süre devam eder ve sonunda malignite gelişir (72).

2.6.1. HER2 - ER Sinyal Etkileşimi

HER sinyal yolağındaki moleküller (AKT, MAPK gibi) ER ekspresyonunu baskılayabilir. AKT, ER gen transkripsiyonunu düzenleyen Forkhead box O3a (FOXO3a) proteinini inhibe eder, MAPK ise ER'nin yıkılmasına neden olur ve ER-negatif fenotip görülür. ER-pozitif/HER2-pozitif tümörlerde ise, HER2'yi hedef alan inhibitör ilaçlar, bu mekanizmanın bir sonucu olarak ER gen transkripsiyonunda artış/reaktivasyona neden olabilir. Anti-HER2 tedavisine direnç mekanizmalarından biri olarak, tümör hücrelerinin artmış ER sinyalini kaçış yolu olarak kullanması gösterilmektedir.

ER ekspresyonunu baskılayan MAPK, PI3K/AKT gibi kinazlar aynı zamanda ER proteini ve ko-aktivatörlerini fosforile ederek aktif hale getirebilir. Bu durum ise hormon terapisine duyarsızlaşmayla sonuçlanır (47).

ER'nin genomik (klasik, nükleer) etkinliğine ek olarak nükleus dışında (nongenomik, membranöz) işlevleri de tanımlanmıştır. HER2 overekspresyonu, ER'nin sitoplazmaya geçişini uyarır ve nongenomik ER sinyalleri "insulin-like growth factor" 1 (IGF1) reseptörü, Shc ve Src gibi büyüme faktör moleküllerini aktive eder (48). Membranöz ER sinyalleri bir diğer yandan HER1 ve HER2'nin azalmasına yol açabilir. Alternatif büyüme faktör yollarının ER üzerinden aktive olması, HER hedefli tedavilere direnç gelişmesine neden olabilir (47).

Söz konusu iki yönlü etkileşim nedeniyle, hormon reseptörü (HR)+/HER2+ tümörlerde bu yollardan yalnız birine yönelik tedavi uygulandığında, diğerinin aktivasyonunun artması ve tümör hücrelerinin bunu bir kaçış yolu olarak kullanması kaçınılmazdır. Bu mekanizma dual blokaj gerekliliğini ortaya koymuş ve yapılan prelinik/klinik çalışmalarda luminal B (HER2-pozitif) tümör grubunda endokrin ve anti-HER2 tedavinin kombine kullanımı ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (76).

HR+/HER2+ gruptaki HER2 protein ve mRNA ekspresyonu, HR-/HER2+ tümörlerdekiyle kıyaslandığında daha az saptanmıştır (77). HER2 amplifikasyonu

gösteren tümörlerden luminal HER2-pozitif grupta daha fazla *PIK3CA* mutasyonu görülürken, HER2-zengin grup daha fazla *TP53* mutasyonu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada neoadjuvan kemoterapi ve anti-HER2 tedavisi gören HER2-pozitif grupta *PIK3CA* mutant tümörlerde, *PIK3CA* wild-type tümörlerdekine göre daha az pCR oranları gösterilmiştir (78,79).

2.6.2. HER2 Hedefli Tedaviler

HER2'yi hedef alan tedavilere HER2 reseptörünün çeşitli bölgelerine bağlanarak etki eden trastuzumab, pertuzumab, lapatinib ve antikor-ilaç konjugatı (ADC) olan trastuzumab-emtansine (T-DM1) ve trastuzumab deruxtecian (T-DXd) örnek gösterilebilir.

Trastuzumab: HER2 reseptörünün ekstraselüler bölgesini hedef alarak sinyal iletimini engelleyen ilk insan monoklonal antikorudur. Trastuzumab, kötü prognoz gösteren HER2-pozitif meme tümörlerinin tedavisinde oldukça etkili olmuştur. Amerika Gıda ve İlaç Dairesi "US Food and Drug Administration" (FDA) 1998 yılında metastatik, 2006 yılında erken evre HER2-pozitif meme karsinomunda adjuvan dönemde kullanımı için onay vermiştir (66,71). İlerleyen yıllarda neoadjuvan dönemde kemoterapi ile kombine kullanımı klinik çalışmalara konu olmuş ve tek başına kemoterapiye kıyasla daha yüksek pCR oranları gösterilmiştir (80–82).

Pertuzumab: HER2'nin farklı bir epitopuna bağlanarak HER2-HER3 dimerizasyonunu engeller ve PI3K/AKT sinyal yolağı inhibe olur. Trastuzumab ile farklı kısımlara bağlanmaları nedeniyle kombine kullanıldıklarında sinerjistik etki gözlenmiştir (71).

Lapatinib: HER2 ve EGFR'yi hedef alan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Trastuzumab ile tedavi sonrası progrese olan meme kanserinde kemoterapi ile kombine kullanımının, tek başına kemoterapiye kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir (83).

Trastuzumab emtansine (T-DM1): Mikrotübül polimerizasyonunu engelleyen bir maytansin türevine bağlı trastuzumab'dan oluşan bir antikor-ilaç konjugatı (ADC) ajandır. T-DM1, trastuzumab aracılığıyla HER2 reseptörüne bağlanır ve oluşan kompleks hücre içine girer. Daha sonra lizozomda yıkılmasıyla DM1 açığa çıkar ve sitotoksik etkisini gösterir (71). Sitotoksik ajanın kendiliğinden ayrışmasını engellemek ve olası yan etkileri azaltmak adına trastuzumab ile arasındaki bağ, lizozomal enzimlerle yıkılmadığı takdirde kopmayacak şekilde tasarlanmıştır. Bu sebeple T-DM1 sitotoksik etkisini yalnızca içine girebildiği (yüksek HER2 ekspresyonu gösteren) hücrelerde gösterir (84).

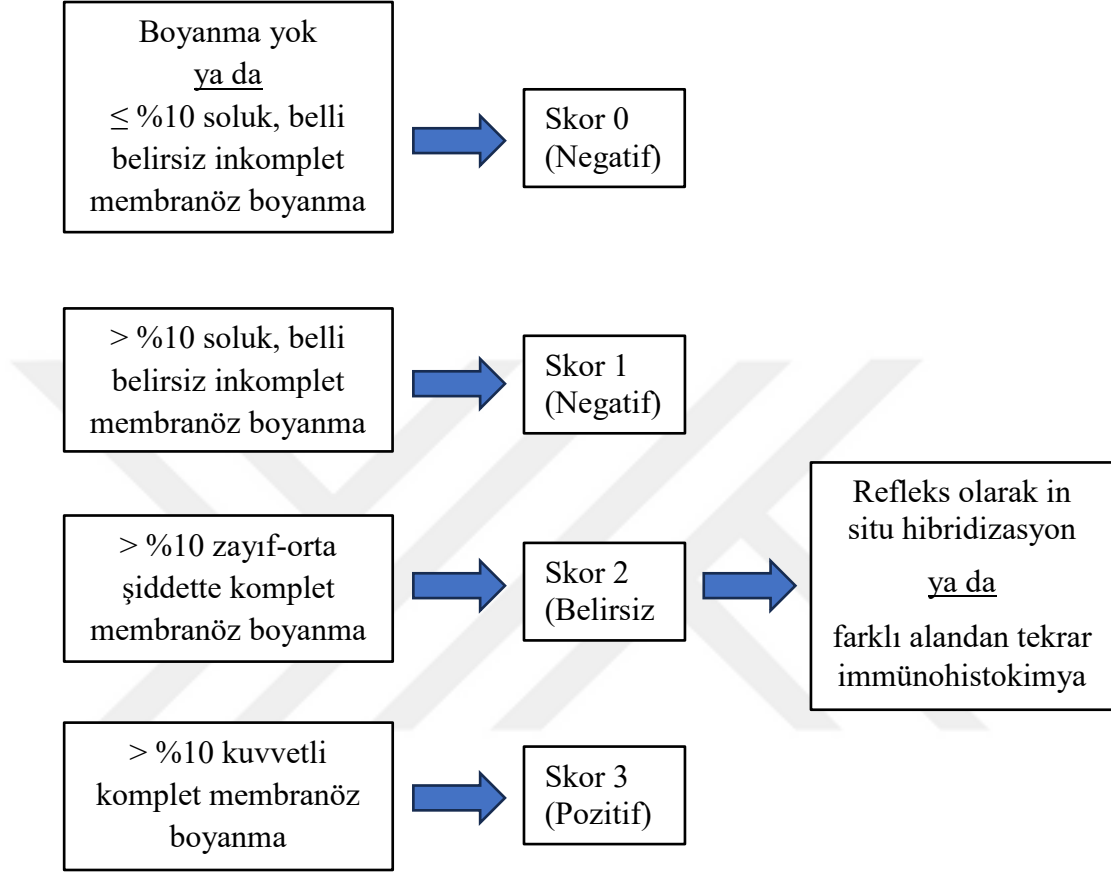
Trastuzumab deruxtecan (T-DXd): Trastuzumab'a yıkılabilir bir bağ ile bağlı bir exatecan türevi topoizomeras I inhibitöründen oluşan ADC ajandır. Diğer ADC'lerle kıyaslandığında ilaç oranı daha fazladır. Deruxtecan membranlardan geçebildiği ve trastuzumab ile arasındaki bağ yıkılabilir olduğundan, HER2-pozitif tümör hücrelerinin yanı sıra HER2-negatif hücreler üzerinde de toksik etki gösterir ("bystander killing effect") (66,84). 2022 yılında yapılan DESTINY-Breast04 çalışmasında T-DXd etkinliği metastatik HER2-negatif meme tümörlerinde incelenmiş ve standart kemoterapötik ajanlara kıyasla daha uzun progresyonsuz ve genel sağkalım oranları gösterilmiştir. Çalışma grubu HER2 skor 1 ve skor 2-ISH nonamplifiye tümörleri "HER2-low" olarak tanımlamış ve bu grup tümörlerde de HER2 hedefli tedavilerin etkinliğini göstermiştir (85).

2.6.3. HER2'nin İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

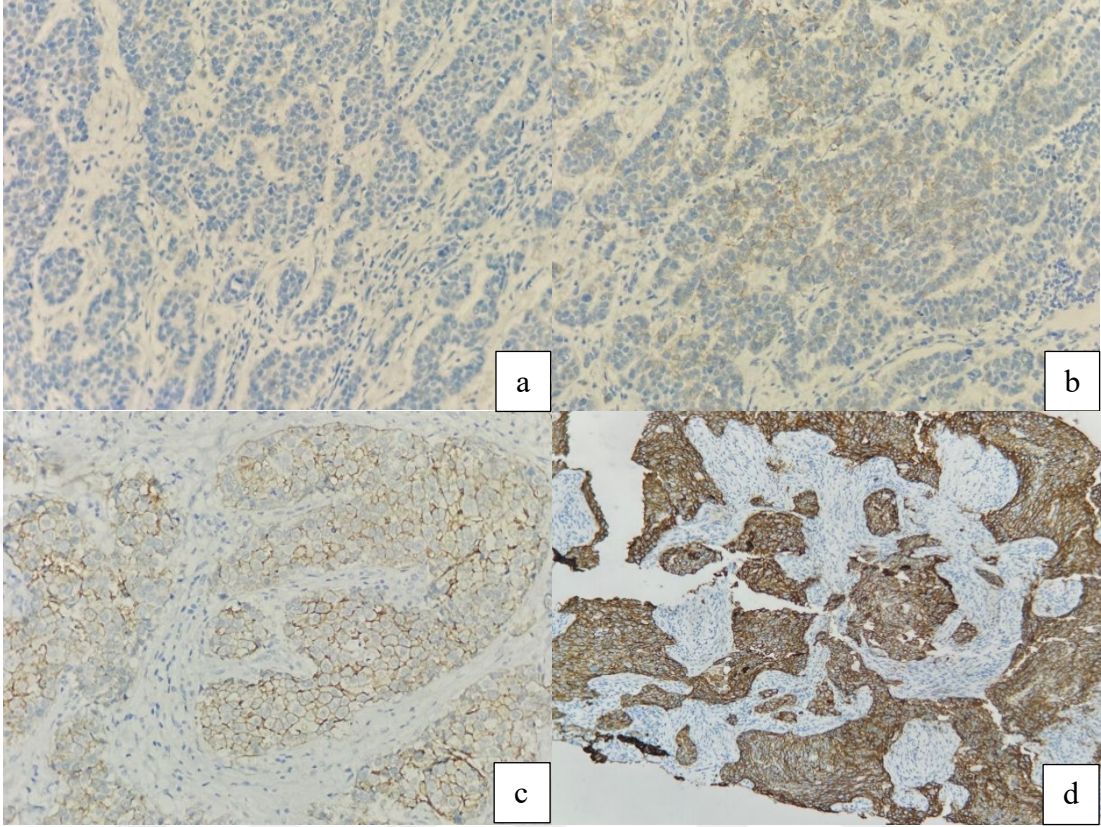
Meme kanserlerinin %15-20'sinde HER2 geninde amplifikasyon ve buna bağlı hücre yüzeyindeki reseptör sayısında artış (overekspresyon) izlenir (6). HER2-pozitif tümörlerin daha agresif seyretmesi ve HER2'yi hedef alan tedavi seçenekleri bulunması nedeniyle, HER2 durumu tüm invaziv meme karsinomlarında raporlanması gereken önemli bir prognostik ve prediktif parametredir. HER2 durumu ASCO/CAP kılavuzları esas alınarak raporlanmaktadır. Rehberine göre önce İHK uygulanması, belirsiz skor olarak değerlendirilirse refleks test ISH yöntemi önerilmektedir (2).

HER2 immünohistokimyasal boyanması lam üzerine eksternal kontrol de kesilerek, yalnızca invaziv komponentte değerlendirilmelidir. İmmünohistokimyasal

değerlendirme Şekil 2’de gösterilmiştir. Sırasıyla skor 0, skor 1, skor 2 ve skor 3 İHK örnekleri Şekil 3’te verilmiştir.



Şekil 2: HER2 ekspresyonu immünohistokimyasal değerlendirme algoritması (2)



Şekil 3: HER2 immünohistokimyasal a. skor 0, b. skor 1, c. skor 2 ve d. skor 3

2.6.4. HER2'nin İn Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi

HER2 amplifikasyonu, in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi kullanılarak ortaya konabilir. Yalnızca HER2 gen sinyali (single-probe ISH) ya da HER2 ve kromozom 17 sinyallerine birlikte (dual-probe ISH) bakılabilir. ASCO/CAP single-probe yerine dual-probe ISH kullanılmasını önermektedir (2).

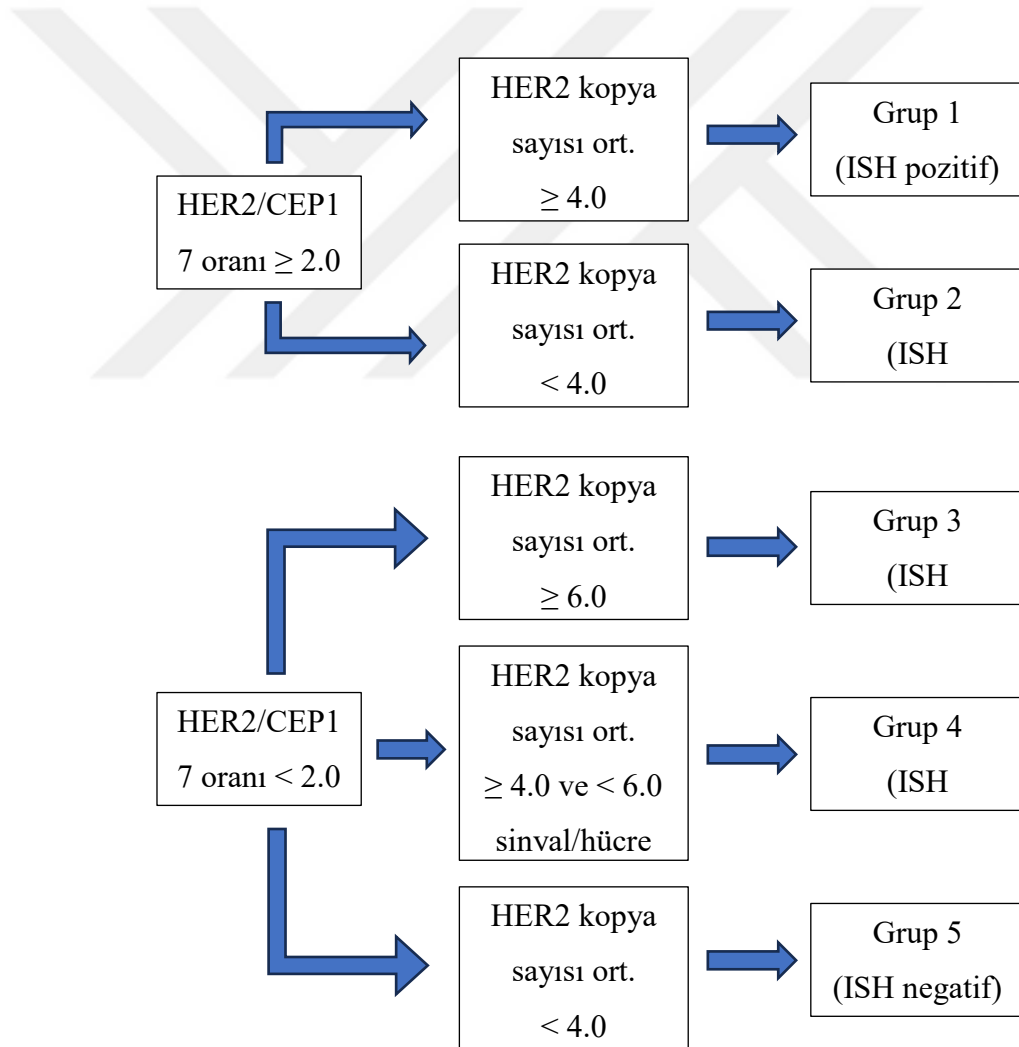
Single-probe ISH: ASCO/CAP uzman paneli single-probe ISH uygulandığı durumlarda mutlaka eşzamanlı İHK sonuçları ile birlikte değerlendirilmesini önermektedir. HER2 aşağıdaki durumlarda negatif kabul edilir:

- Hücre başına ortalama *HER2* kopya sayısı < 4.0 sinyal,
- Hücre başına ortalama *HER2* kopya sayısı ≥ 4.0 ama < 6.0 sinyal ve eşzamanlı İHK skor 0 ya da 1,
- Hücre başına ortalama *HER2* kopya sayısı ≥ 4.0 ama < 6.0 sinyal ve eşzamanlı dual-probe ISH grup 5

HER2 aşağıdaki durumlarda pozitif kabul edilir:

- Hücre başına ortalama *HER2* kopya sayısı ≥ 6.0 sinyal,
- Hücre başına ortalama *HER2* kopya sayısı ≥ 4.0 ama < 6.0 sinyal ve eşzamanlı İHK skor 3,
- Hücre başına ortalama *HER2* kopya sayısı ≥ 4.0 ama < 6.0 sinyal ve eşzamanlı dual-probe ISH grup 1 (27).

Dual-probe ISH: *HER2* gen kopya sayısı ile *HER2/CEP17* (centromere enumerator probe for chromosome 17) sinyal oranı birlikte değerlendirilir (Şekil 4).



Şekil 4: Dual-probe ISH ile *HER2* amplifikasyonu değerlendirme algoritması (2)

(*) Grup 2, 3 ve 4 olan ISH ile belirsiz sonuçlara ulaşırsa eşzamanlı İHK değerlendirilmesi gereklidir. Buna göre:

- İHK skor 0 ya da skor 1 ise HER2 negatif,
- İHK skor 2 ise ISH başka bir gözlemci tarafından en az 20 hücre olacak şekilde yeniden sayılır:
 - Tekrar aynı grup olarak değerlendirilirse, grup 2 ve grup 4 HER2 negatif; grup 3 HER2 pozitif kabul edilir.
 - Başka bir grup olarak değerlendirilirse algoritma takip edilir.
- İHK skor 3 ise HER2 pozitif kabul edilir (2).

2.6.5. HER2 Heterojenitesi

HER2 ile intratümöral ekspresyon/amplifikasyon durumunun farklı olduğu alanlar (intratümöral HER2 heterojenitesi) meme tümörlerinde %40'a kadar tanımlanmıştır (1,5,6). HER2 intratümöral heterojenitesi genetik ve nongenetik olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. HER2 gen amplifikasyonu olan ve olmayan hücrelerin bir arada bulunması genetik heterojenite; HER2 gen amplifikasyonu olan hücreler içinde protein overekspresyonu olan ve olmayanların bir arada bulunması ise nongenetik heterojenite olarak tanımlanmıştır (11).

2007 ASCO/CAP toplantısında, HER2 heterojenitesini ele alan ayrı bir rehber oluşturmak üzere ek bir toplantı yapılması uygun görülmüştür. Bu toplantı 2008 yılında CAP uzman paneli tarafından yapılmış, yayınlanan rehberde floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile HER2 amplifikasyon heterojenitesinin tanımı ve nasıl raporlanması gerektiğine yer verilmiştir. Kılavuza göre HER2 genetik heterojenitesi, %5'ten fazla ancak %50'den az tümör hücresinde HER2/CEP17 oranının 2.2'nin üzerinde ya da ortalama HER2 kopya sayısının 6'nın üzerinde olmasıdır. Heterojenite mevcutsa raporda belirtilmeli ve HER2 amplifikasyonu gösteren hücrelerin yüzdesi, amplifiye hücrelerin dağılık hücreler olarak mı belirli bir kümede mi mevcut olduğu, küme halindeyse bu bölgedeki ve nonamplifiye alandaki HER2/CEP17 oranı ayrıca not olarak yazılmalıdır. Küme halinde amplifiye hücreler en az 20 hücreden oluşmalı ve HE kesitlerde daha yüksek histolojik dereceli bir alana denk gelip gelmediği kontrol edilmelidir (8).

ASCO/CAP 2013 ve 2018 yılındaki toplantılarında da heterojenite kavramını ele almış ve 3 farklı paternde görülebileceğini belirtmiştir:

- Amplifiye ve nonamplifiye alanların keskin bir sınırla ayrıldığı (klonal/kümesel)
- Amplifiye ve nonamplifiye hücrelerin diffüz bir şekilde birbiri içine geçtiği (mozaik)
- Çoğunluğu nonamplifiye hücrelerden oluşan bir tümörde seyrek dağınık amplifiye hücrelerin olduğu (dağınık)

Uzman grubu, bu sınıflama içinden anlamlı olan grubun klonal/kümesel olduğunu savunmaktadır (86). Ancak yapılan çalışmalarda kümesel heterojenite, mozaik heterojeniteden çok daha az sıklıkta raporlanmıştır (5).

Ek olarak 2013 ve 2018 rehberleri, doğru bir hesaplama için amplifiye ve nonamplifiye hücrelerin olduğu 2'şer alan ve bu alanların içinde en az 20 ardışık ve üst üste gelmeyen/örtüşmeyen hücrenin sayılması gerektiğine dikkati çekmektedir (9,86).

2018 ve 2023 yılı kılavuzlarında İHK değerlendirme algoritması değişmemiş, ek olarak nadir boyanma paternlerinden bahsedilmiştir. Orta-kuvvetli şiddette bazolateral/lateral kenarlarda inkomplet boyanma gösteren bazı histolojik subtiplerin HER2 amplifikasyonu gösterdiği bildirilmiş ve bu boyanma paterninin skor 2 belirsiz kabul edilmesi önerilmiştir. Bir başka örnek, kuvvetli ve komplet membranöz boyanmanın %10'dan az hücrede sınırlı olduğu boyanma türüdür. ASCO/CAP bu durumu açıklarken "heterojen, ancak sınırlı yaygınlıkta" ifadesini kullanmıştır. Söz konusu boyanmanın skor 2 belirsiz şeklinde raporlanmasını önermiş, ancak tümörün farklı alanlarından HER2 İHK tekrarlandığında farklı boyanma yüzdelerininin görülebileceğini belirtmiştir (2,9).

İnatümöral HER2 heterojenitesi, İHK ve ISH yöntemleri kullanılarak gösterilebilir. Son yıllarda, dual-colour in situ hibridizasyon (DISH) ile İHK boyanmasını bir arada gösteren GPA yöntemi de kullanılmaya başlanmıştır. Amplifikasyon durumu ile protein ekspresyonunu aynı anda incelemeye olanak sağlayan bu yöntem ile genetik ve nongenetik heterojeniteyi ortaya koymak çok daha kolay hale gelmiştir (11,87,88). GPA yöntemi kullanarak en ayrıntılı sınıflamayı Hou ve ark. yapmış, HER2 durumunu 5 farklı gruba ayırmıştır (7):

- Tip 1: (*Klasik*) *homojen grup*. Amplifikasyon ve protein overekspresyonun birlikte görülmesi
- Tip 2: (*Non-klasik*) *homojen grup*. Amplifikasyon olan hücrelerde protein overekspresyonu görülmemesi
- Tip 3: *Heterojen grup*. Amplifikasyon ve overekspresyon gösteren hücreler ile nonamplifiye ve overekspresyon göstermeyen hücrelerin bir arada olması
- Tip 4: *Heterojen grup*. Amplifikasyon gösteren hücrelerin sadece bir kısmının protein overekspresyonu göstermesi
- Tip 5: *Heterojen grup*. Tip 3 ve tip 4 birlikte olması

Yapılan çalışmalarda İHK ile heterojenite; a) tümöre ait farklı korların farklı HER2 skorları göstermesi (89), b) kümesel, mozaik ve dağınık paternler şeklinde HER2-pozitif ve HER2-negatif hücrelerin bir arada görülmesi (1) veya c) komplet ve membranöz herhangi bir şiddette boyanmanın toplam yüzdesi esas alınarak yapılmıştır. Komplet membranöz boyanma ile toplam boyanma yüzdesi;

- < %30 ise fokal
- %30-79 ise heterojen
- \geq %80 ise homojen olarak sınıflanmıştır (13,90–92).

İnatütümöral HER2 heterojenitesi, yanlış skorlamaya ve bu sebeple tedavi planının etkilenmesine yol açabilir. Bir görüş de heterojen boyanma paterninin daha sık skor 2 (belirsiz) skorlamaya sebep olduğudur. Yapılan çalışmalarda da heterojenite bu görüş ile uyumlu olarak İHK skor 2 tümörlerde daha sık tanımlanmıştır (6,7).

Bazı çalışmalar HER2 heterojenitesi gösteren tümörlerde daha fazla sıklıkta kromozom 17 polizomisi saptamıştır. Bağımsız olarak izlenen CEP17 kopya sayısındaki artış, heterojenitenin kromozomal instabilite sonucu görülebileceği görüşünü destekleyebilir (6).

Prognosa etkisine bakıldığında, intratütümöral heterojenitenin daha kısa hastalısız sağkalım ve genel sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuş (3,90,93), bu grup tümörlerde tedavi yanıtlarının daha kötü olduğu saptanmıştır (7,10,90,94).

İntertütümöral heterojenite kavramı, metastatik tümör ile primer tümör arasındaki biyobelirteç uyumsuzluğunu ifade etmektedir. Buna göre 2018 yılında yapılan bir meta-analizde metastatik bölgede HER2 değişimi %10.3 oranında

görülmüş; bu grup içinde pozitiften negatife değişim %21.3, negatiften pozitive değişim oranı %9.5 olarak saptanmıştır (95). Bu durum tedavi yönetiminde değişikliklere yol açacağından, metastatik tümörde de mutlaka hormon reseptörleri ve HER2 durumunun yeniden test edilmesi önerilmektedir.

HER2 heterojenitesi diğer organların primer kanserlerinde de gözlenmektedir. Mide karsinomlarındaki heterojen boyanma paterni meme karsinomuna kıyasla daha fazla sıklıkta tanımlanmış, yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada anlamlı olarak daha kötü tedavi yanıtı ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (96–98).

Uterin karsinosarkomlarda HER2 heterojenitesini konu alan çalışmalarda %88 (99) ve %38 (100) oranında heterojenite tanımlanmıştır.

Rekürren yüksek grade endometrioid karsinomlarda HER2 heterojenitesini araştıran bir çalışmada %36 oranında heterojenite tanımlanmış, bu durum tedavi direnci ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (101).

Endometrial seröz karsinomlarda biyopsi ile eksizyon materyalleri arasındaki HER2 skor uyumsuzluğunu değerlendiren bir çalışmada ise intratümöral HER2 heterojenitesi %55 oranında saptanmıştır (102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Bölümünde Ocak 2011 - Kasım 2023 tarihleri arasında anti-HER2 tedavisini takiben opere edilen ve operasyon spesimenleri laboratuvarımızda incelenen; ilk tanısı özel tip içermeyen invaziv meme karsinomu ve tanı anındaki HER2 immünohistokimya sonucu skor 3 ve/veya skor 2 olup in situ hibridizasyon yöntemi ile amplifikasyon saptanan 151 olgu incelendi. 25 olguda preoperatif tru-cut biyopsi materyallerine ulaşamadığından, 7 olguya ait c-ERB-B2 (HER2) İHK lamları arşivde bulunamadığından ve 4 olguda c-ERB-B2 (HER2) İHK lamı soluk olduğundan değerlendirilemedi ve bu sebeple çalışmaya katılmadı. Toplamda 115 olgu çalışmada değerlendirildi.

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri:

- Belirtilen zaman aralığında kemoterapi + anti-HER2 tedavisini takiben meme cerrahisi uygulanmış olması ve operasyon spesimenlerinin laboratuvarımızda incelenmesi
- İlk tanının özel tip içermeyen invaziv meme karsinomu olması
- c-ERB-B2 (HER2) immünohistokimya sonucu skor 3 ve/veya skor 2 olup in situ hibridizasyon sonucu amplifikasyon saptanması

Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri:

- c-ERB-B2 (HER2) immünohistokimya lamlarının değerlendirilemeyecek halde (solmuş lamlar) olması
- Preoperatif c-ERB-B2 (HER2) immünohistokimya lamlarına ulaşamaması (dış merkez tanı olgular)
- Tanı sonrası tedavinin başka merkezlerde uygulanmış olması (Kemoterapi + anti-HER2 tedavisi sonrası operasyon spesimenleri laboratuvarımızda bulunmayan olgular)

İlk tanılara ait patoloji raporlarından retrospektif olarak yaş, lokalizasyon, fokalite, tümör boyutu, pT evresi, lenf nodu tutulumu, pN evresi, histolojik derece, nükleer derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, TIL skoru, nekroz varlığı olmak üzere histopatolojik ve klinik veriler ile ER, PR, c-ERB-B2 (HER2) durumları, ki67 proliferasyon indeksi olmak üzere immünohistokimyasal analiz bilgileri ve FISH sonuçlarına ulaşıldı. Lokalizasyon, fokalite, tümör boyutu, pT evresi, lenf nodu tutulumu bilgileri için eş zamanlı radyoloji raporlarından faydalanıldı. pN evresini belirleyebilmek için tedavi sonrası operasyon spesimenlerine ait patoloji raporları incelendi. Kemoterapi etkisi görülen lenf nodları, tedavi öncesinde metastatik kabul edilerek bu sayı esas alındı. TIL skoru verilmemiş olgularda, www.tilsinbreastcancer.org (International TIL's Working Group) adresindeki örnek resimlerden faydalanarak ve eş zamanlı karşılaştırarak TIL skorlaması yapıldı.

Neoadjuvan tedavi sonrası cerrahi spesimenlerindeki tedavi yanıtı değerlendirmesi için MD Anderson Rezidü Kanser Yükü skorlaması (61) kullanıldı. Skorum yapılmamış olgulara ait veriler ve lamalar yeniden incelenerek www3.mdanderson.org internet adresi üzerinden erişilebilen rezidü kanser yükü hesaplayıcısı kullanılarak skorlandı.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmünohistokimyasal boyama 2014 yılına kadar manuel yapılmış, 2014-2015 yıllarında Ventana Medical Systems-Benchmark XT otomatik boyama sistemi, 2015-2021 yılları arasında Leica Bond Max kapalı sistemi, 2021-2023 yıllarında ise Ventana Medical Systems-Benchmark Ultra/ISH Staining kapalı sistemi kullanılmıştır.

Ventana Medical Systems-Benchmark Ultra/ISH Staining kapalı sistemi ile yapılan immünohistokimyasal boyama için parafin bloklardan 3 mikron kalınlığında kesitler ile eksternal kontrol (HER2 skor 3 boyanan meme tümörü) pozitif şarjlı lamlara alındı ve 60° C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Takiben lamalar Benchmark Ventana Ultra marka Immünohistokimya cihazına alındı. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ile pH: 8'de (CC1) 32 dakika süren antijen geri kazanımı uygulandı. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) tavşan monoklonal primer antikoru 8 dakika boyunca uygulandı. Zemin boyaması için Harris Hematoksilen (Ventana Medical

Systems) 32 dakika uygulandı. Son olarak lamalar deterjanlı su ile yıkayıp kapama cihazında kapatıldı.

Çalışmaya dahil edilen olguların ilk tanı aldıkları (tedavi öncesi) tru-cut biyopsi materyallerine ait c-ERB-B2 (HER2) immünohistokimyasal lamaları ışık mikroskopunda yeniden incelendi. x10'luk büyütme kullanılarak ASCO/CAP kılavuzunda belirtildiği şekilde HER2 ile boyanma şiddeti ve yüzdeleri ayrı ayrı not edildi: a) Kuvvetli ve komplet membranöz boyanma yüzdesi, b) zayıf-orta şiddette ve komplet membranöz boyanma yüzdesi, c) inkomplet soluk boyanma veya hiç boyanmama yüzdeleri

Kuvvetli veya zayıf-orta komplet membranöz boyanma yaygınlığı toplamda \geq %80 ise homojen, %30-79 arasında ise heterojen ve $<$ %30 ise fokal boyanma şeklinde sınıflandı. Fokal ve heterojen boyanma paternleri mozaik ve kümesel olmak üzere iki grupta değerlendirildi.

Kuvvetli veya zayıf-orta komplet membranöz boyanma yaygınlığı %80'in hemen altı ya da üstünde olan 13 olguda ve %30'un hemen altı ya da üstünde olan 6 olguda değerlendirme tekrar edildi. İkinci bakıda x40'luk büyütme kullanılarak biyopsi materyalindeki tümör adaları ve içerdikleri hücreler kabaca sayıldı. a) Kuvvetli ve komplet membranöz boyanan, b) zayıf-orta şiddette ve komplet membranöz boyanan ve c) inkomplet soluk boyanan veya hiç boyanmayan hücrelerin sayıları ayrı ayrı not edildikten sonra toplanarak yeniden oranlandı.

3.3. İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ

Hibridizasyon öncesi, deparafinizasyon işlemi için lamalar 60° C'de 3 saat boyunca etüvde, takiben 20 dakika boyunca ksilen içerisinde bekletildi. Sırasıyla %100, %90 ve %70 azalan etanol serisinde 5'er dakika bekletildi. Distile suda 2 kez 2'şer dakika yıkandı. Önceden ısıtılmış 98° C'deki PT1 (Heat Pretreatment Solution Citric) solüsyonu içerisine konarak 15 dakika inkübe edildi. Ardından lamalar tekrar distile suda 2 kez 2'şer dakika yıkandı ve lam yüzeyi tamamen kurutuldu. 37° C'de pepsin solüsyonu damlatılarak 12 dakika bekletildi. Sonrasında Wash Buffer SSC solüsyonu ile 5 dakika yıkandı. %1 formaldehit solüsyonunda 15 dakika bekletildikten sonra yeniden Wash Buffer SSC solüsyonu ile 5 dakika yıkandı. Takiben distile suda

1 dakika durulandı. Sırasıyla %70, %90 ve %100 artan etanol serisinde 1'er dakika bekletilerek tamamen dehidrate edildi.

Hibridizasyon işlemleri için Thermo Electron Corporation marka in situ hibridizasyon sistemi kullanıldı. Kesit üzerine ZytoVision SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe eklendi. Lamel kenarları fixogum ("rubber cement") yardımıyla kapatıldıktan sonra kesitler in situ hibridizasyon sistemi içerisine kondu. Sistem içerisinde 10 dakika boyunca 75°C'de beklemenin ardından, 12 saat boyunca 37°C'de hibridizasyon için inkübasyon uygulandı.

Hibridizasyon sonrası yapıştırıcı fixogum kaldırıldı. 37°C'de Wash Buffer A solüsyonu içinde önce 5 dakika, sonra tekrar 10 dakika boyunca bekletildi. Sırasıyla %70, %90 ve %100 artan etanol serisinde 1'er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Hazır haldeki DAPI (6 - diamidin 2 fenilindol dihidroklorid antifade solüsyon) ile zemin boyaması gerçekleştirildi. Antifade içeren gliserol ile lamel kapatıldı ve lamel çevresine renksiz oje sürülerek sabit hale getirildi.

FISH yöntemi ile değerlendirilen olguların sonuçları için patoloji raporları retrospektif olarak incelendi ve kaydedildi.

3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Çalışmada veri analizi için SPSS 29.0.2 paket programı kullanıldı. Tek değişkenli analizde, kategorik değişkenlerin tedavi yanıtı ile ilişkisini değerlendirmek için Pearson Ki-Kare ve Fisher's exact test kullanıldı. Sürekli değişkenlerin analizi için öncelikle normal dağılım gösterip göstermedikleri incelendi. Yalnızca yaş değişkeni için Shapiro Wilk değeri $p > 0.05$ olarak bulunduğundan, yaş ve tedavi yanıtı arasındaki ilişki incelenirken parametrik testlerden bağımsız değişken T testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen diğer sürekli değişkenlerin analizi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ek olarak, sürekli değişkenlerden yaş ve TIL skoru için eşik değerler belirlenerek tedavi yanıtı ile ilişkileri yeniden incelendi. Yaş ≤ 40 ve > 40 , TIL skoru ≤ 10 ve > 10 olmak üzere iki grup halinde kategorik değişkenler olarak analiz edildi. Tek değişkenli analiz sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunan parametrelere daha sonra çok değişkenli lojistik regresyon analizi uygulandı. Tüm testler için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5. ETİK KURUL

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvuruldu. 18.12.2023 tarihinde HNEAH-KAEK 2023/231 karar numarası ile çalışmanın yapılabilmesi için onay alındı.

3.6. ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu tezin yürütülmesinde herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

3.7. ÇALIŞMA İÇİN İZLENEN KILAVUZ

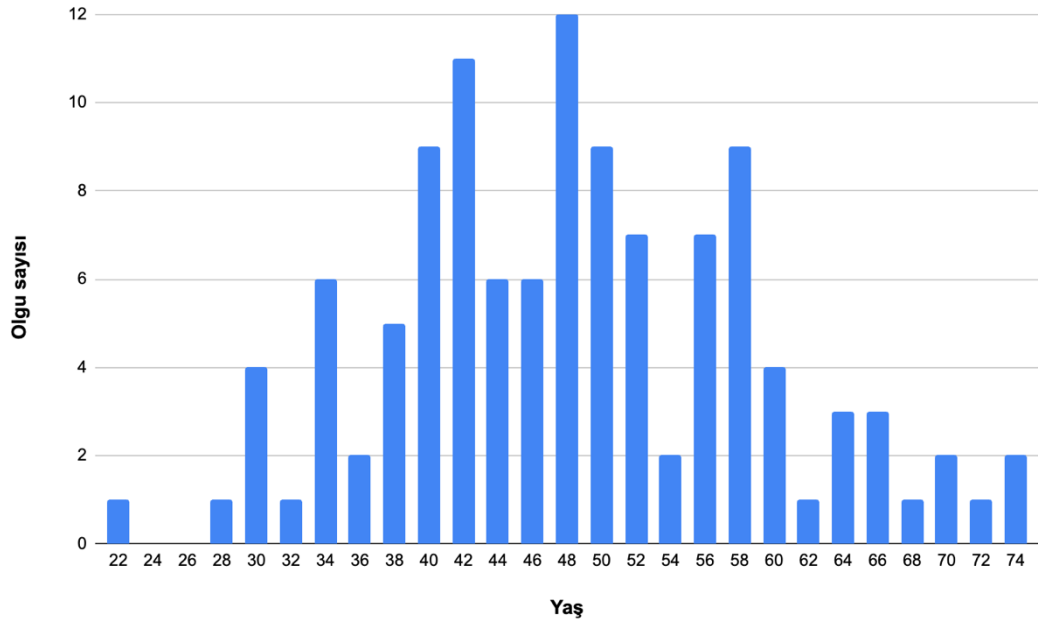
Çalışma tasarımı için STARD (Standards for Reporting Diagnostic Accuracy Studies) araştırma kılavuzu kullanılmıştır.

3.8. ÖZGÜNLÜK

Çalışmanın özgünlük açısından değerlendirilmesi için “Turnitin” intihal analiz programı kullanılmış olup benzerlik oranı %3 olarak saptanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan 115 olgunun tümünün cinsiyeti kadındı. Tanı anındaki yaşları 22 ve 75 arasında değişmekte olup ortalaması 48.85'tir (SS: 10.72). Yaşa göre olgu sayıları ve ikili intervaller şeklinde yaş dağılımı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Yaşa göre olgu sayıları

Tanı için 110 olguda (%95.6) tru-cut biyopsi, 5 olguda (%4.4) ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılmıştır. Olguların tümü özel tip içermeyen invaziv meme karsinomu tanısı almış olup, ek olarak 6'sında (%5.2) apokrin diferansiyasyon ve 3'ünde (%2.6) mikropapiller komponentin eşlik ettiği görüldü.

Olguların 52'si (%45.2) sağ memede, 62'si (%54) sol memede lokalizeydi. 1 olguda (%0.8) lokalizasyon bilgisine ulaşılamadı. Unifokal 83 olgu (%72.2), multifokal 30 olgu (%26.1) mevcuttu. 2 olguda (%1.7) fokalite bilgisine ulaşılamadı.

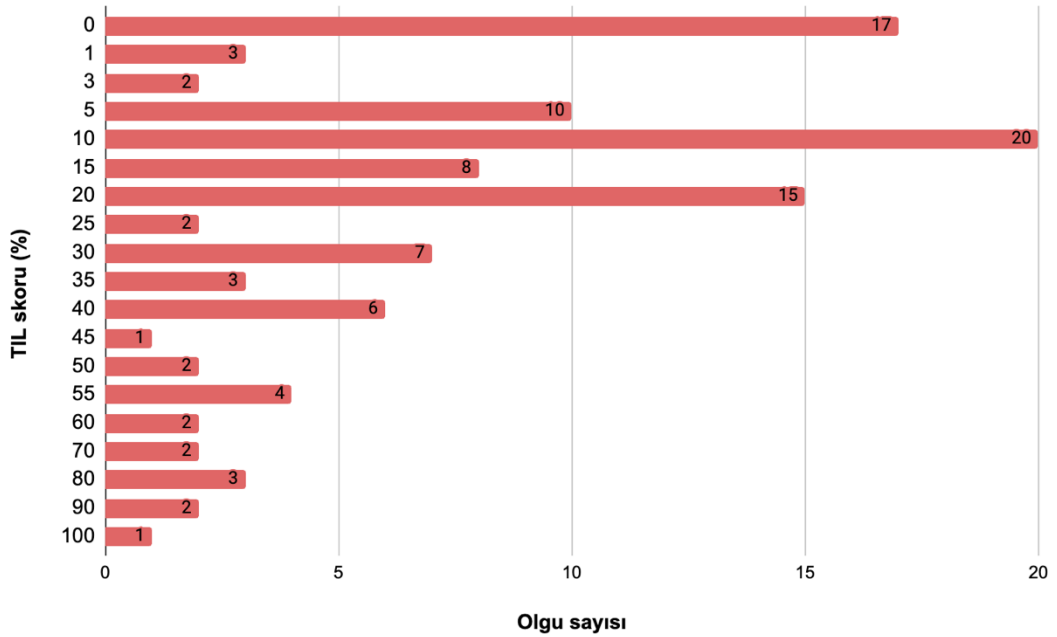
Tümör boyutları evreleme sistemine göre gruplandığında 4'ü (%3.5) 6-10 mm arasında (pT1b), 18'i (%15.6) 11-20 mm arasında (pT1c) olmak üzere 22'si (%19.1) pT1; 73'ü (%63.5) 21-50 mm arasında (pT2); 6'sı (%5.2) 50 mm'den büyüktür (pT3). Olguların 3'üne (%2.6) cilt tutulumu eşlik etmektedir (pT4). Kalan 11 (%9.6) olguya ait verilere, görüntüleme tetkikleri dış merkezde yapıldığından ulaşılamadı.

Lenf nodu tutulumu 98 olguda (%85.2) görülürken, 15 olguda (%13) saptanmadı. 2 olguda (%1.7) bu bilgiye ulaşamadı. Olguların 15'i (%13) pN0, 56'sı (%48.7) pN1, 17'si (%14.8) pN2, 3'ü (%2.6) pN3 olarak sınıflandı. 24'ünde (%20.9) pN evresi verilemedi.

Histolojik dereceye ait verilere 32 (%27.8) olguda ulaşamadı. Histolojik derecesi 2 olan 8 olgu (%7), 3 olan 75 olgu (%65.2) mevcuttu. Nükleer derece 18 olguda (%15.6) derece 2, 97 olguda (%84.4) derece 3 olarak kaydedildi.

Lenfovasküler invazyon olguların 45'inde (%39.1) görülürken, 64'ünde (%55.7) saptanmadı. 6 olguda (%5.2) lenfovasküler invazyon bilgisine ulaşamadı. Perinöral invazyon 7 olguda (%6.1) mevcuttu. 102 olguda (%88.7) saptanmadı. 6 olguda (%5.2) perinöral invazyon bilgisine ulaşamadı.

Olguların 17'sinde (%14.8) TIL saptanmadı. TIL skoru 35 olguda (%30.5) \leq %10, 23 olguda (%20) %11-20 arası, 9 olguda (%7.8) %21-30 arası, 9 olguda (%7.8) %31-40 arası, 3 olguda (%2.6) %41-50 arası, 6 olguda (%5.2) %51-60 arası, 2 olguda (%1.7) %61-70 arası, 3 olguda (%2.6) %71-80 arası, 2 olguda (%1.7) %81-90 arası ve 1 olguda (%0.9) %91-100 arası şeklinde değerlendirildi. İnce iğne aspirasyon biyopsisi ile tanı konan 5 olguda (%4.3) değerlendirme yapılamadı. TIL skorları ve dağılımı şekil 6'da özetlenmiştir.



Şekil 6: Olgu sayısına göre TIL skorları (%)

Nekroz, olguların 35'ine (%30.4) eşlik ederken, 74'ünde (%64.4) görülmedi. 6 olguda (%5.2) bu veriye ulaşılamadı.

Olguların 80'inde (%69.6) ER-pozitif, 35'inde (%30.4) ER-negatifti. PR-pozitif 47 olgu (%40.9), PR-negatif 68 olgu (%59.1) mevcuttu.

Ki67 proliferasyon indeksi minimum 8 ve maksimum 90 olup medyan değeri olarak 50 bulundu.

Moleküler sınıflamaya göre 115 olgunun 80'i (%69.6) luminal HER2 (ER+/HER2+) ve 35'i (%30.4) HER2-zengin (ER-/HER2+) idi.

Tedavi yanıtı değerlendirmesi için MD Anderson skorlama sistemi kullanıldı. Buna göre 72 olguda (%62.6) pCR, 43 olguda (%37.4) non-pCR görüldü (Tablo 4). Non-pCR grubun içinde 8'i (%18.6) RCB-I, 25'i (%58.1) RCB-II, 6'sı (%14) RCB-III olarak skor aldı. Kalan 4 olguda (%9.3) lenf nodu örnekleme yapılmadığından skorlama yapılamadı (Tablo 5).

Tablo 4: Olguların tedavi yanıtlarına göre dağılımı

	Sayı (#)	Yüzde (%)
pCR	72	62.6
non-pCR	43	37.4
Toplam	115	100

Tablo 5: non-pCR olan olguların MD Anderson skorlamasına göre dağılımı

	Sayı (#)	Yüzde (%)
RCB-I	8	18.6
RCB-II	25	58.1
RCB-III	6	14
Skorlanamayan	4	9.3
Toplam	43	100

HER2 ile immünohistokimyasal boyama sonucu 105 olgu (%91.3) skor 3, 10 olgu (%8.7) skor 2 şeklinde raporlandı. Tedavi yanıtlarına göre sınıflandığında skor 2 olarak raporlanan 10 olgunun 5'inde (%50) pCR elde edilmiştir. Buna karşılık skor 3 şeklinde raporlanan 105 olguda pCR oranı %63.8'dir (67/105). Skor 2 olan olgu

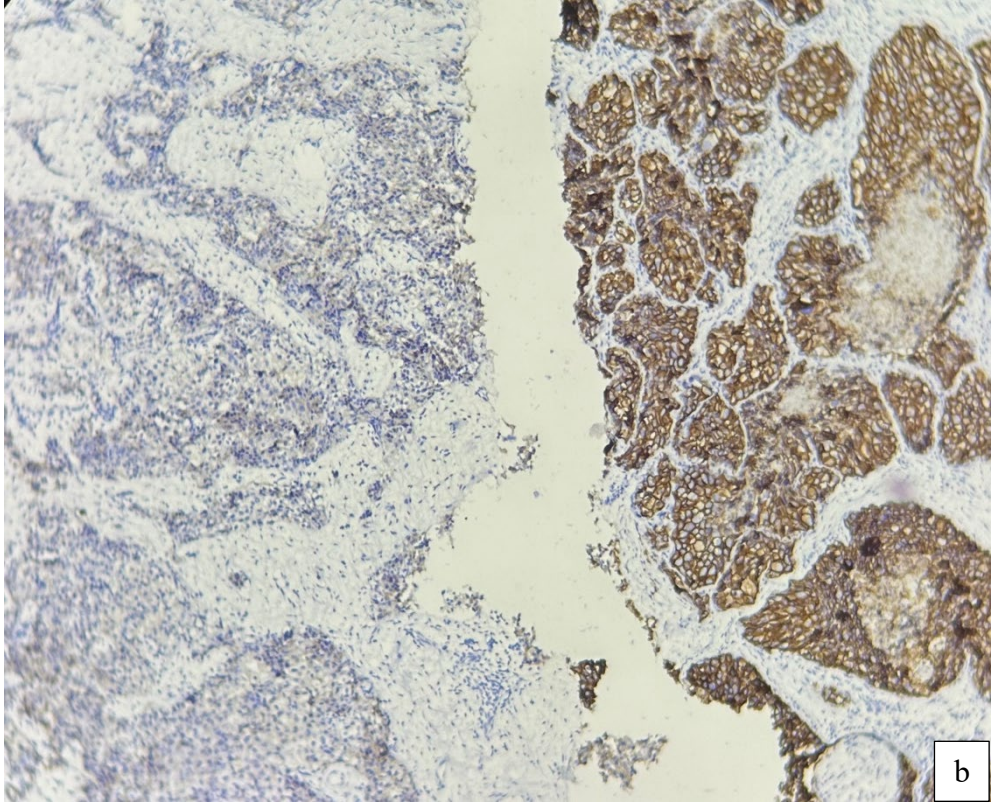
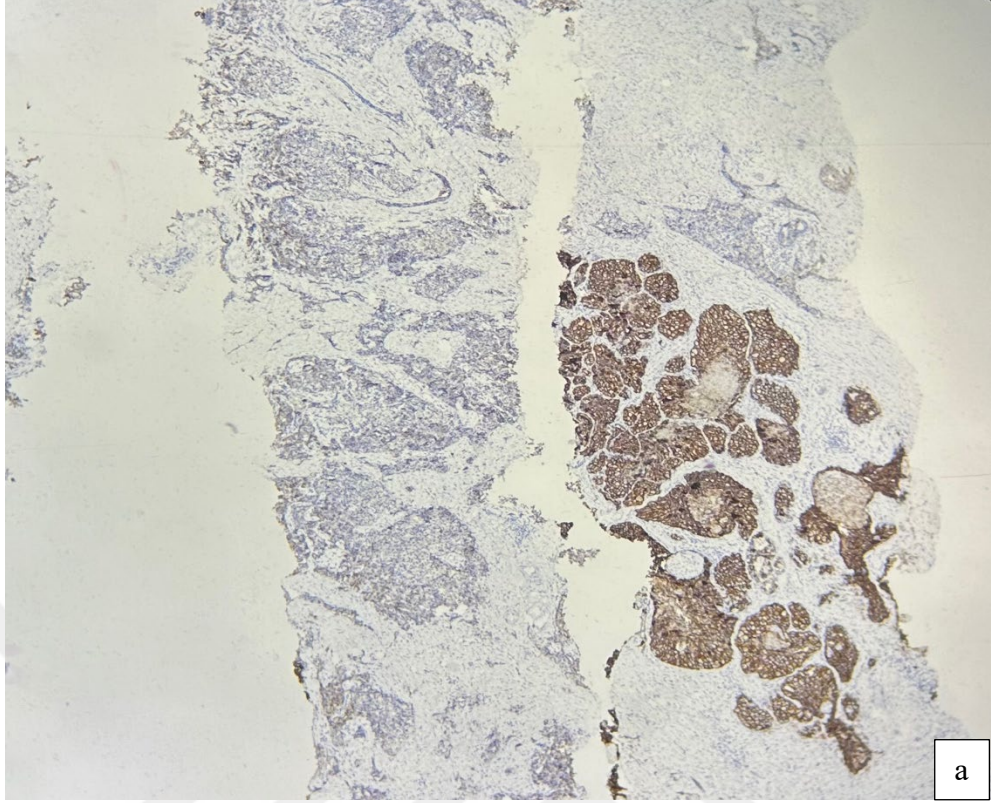
sayısının az olması nedeniyle bu iki grubu kıyaslamak anlamlı olmasa da skor 3 olan olgularda görece pCR oranının daha fazla olduğu görülmektedir.

HER2 boyanma paternleri fokal, heterojen ve homojen şeklinde üç grupta sınıflandı (Şekil 7-10). 9 olgu (%7.8) fokal, 31 olgu (%27) heterojen ve 75 olgu (%65.2) homojen olarak değerlendirildi. Fokal boyanma gösteren olguların 4'ünde kümesel (%44.4), 4'ünde mozaik (%44.4) ve 1'inde (%11.2) hem kümesel hem mozaik boyanma saptandı. Heterojen boyanma gösteren olguların ise 4'ü (%12.9) kümesel, 23'ü (%74.2) mozaik ve 4'ü (%12.9) hem kümesel hem mozaik şeklindeydi (Tablo 7).

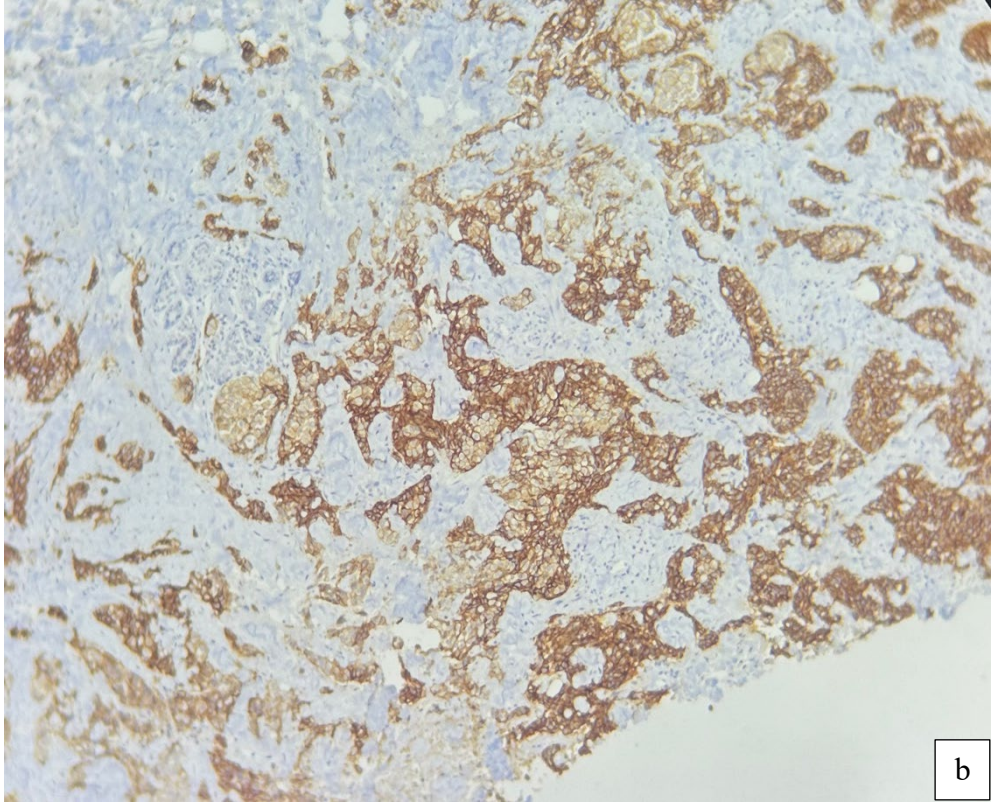
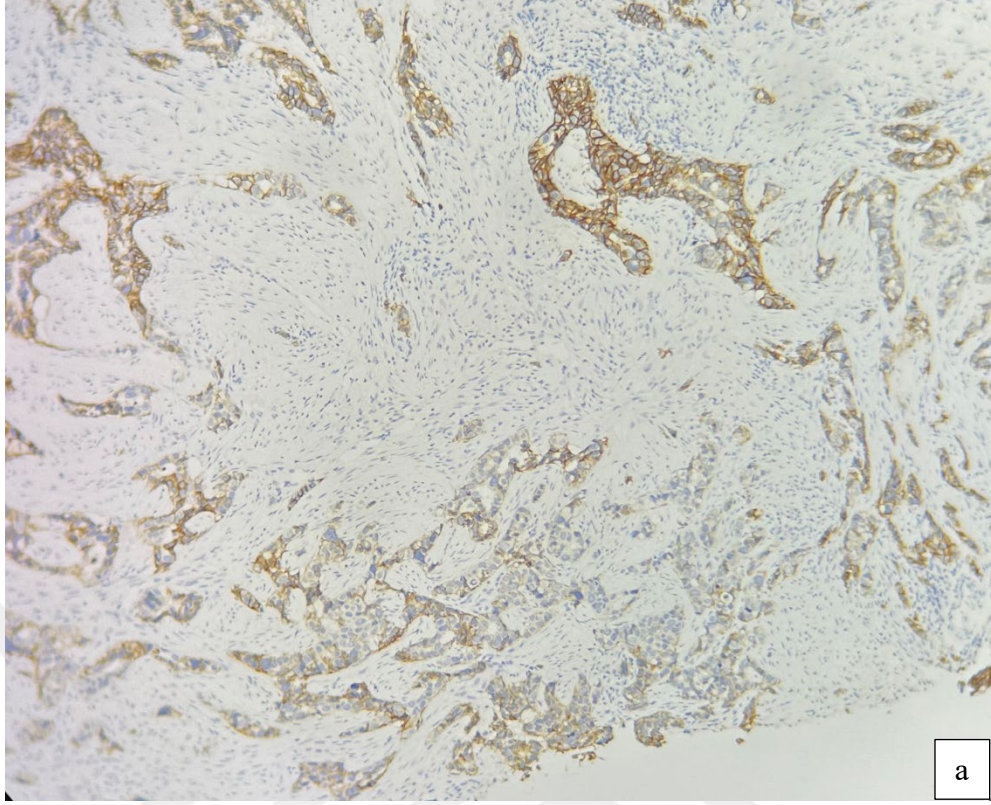
Tablo 6: Boyanma paternlerinin olgu sayısına göre dağılımı

	n (%)
Fokal	9 (7.8)
Kümesel	4
Mozaik	4
Miks (Küme ve mozaik)	1
Heterojen	31 (27)
Kümesel	4
Mozaik	23
Miks (Küme ve mozaik)	4
Homojen	75 (65.2)
Toplam	115

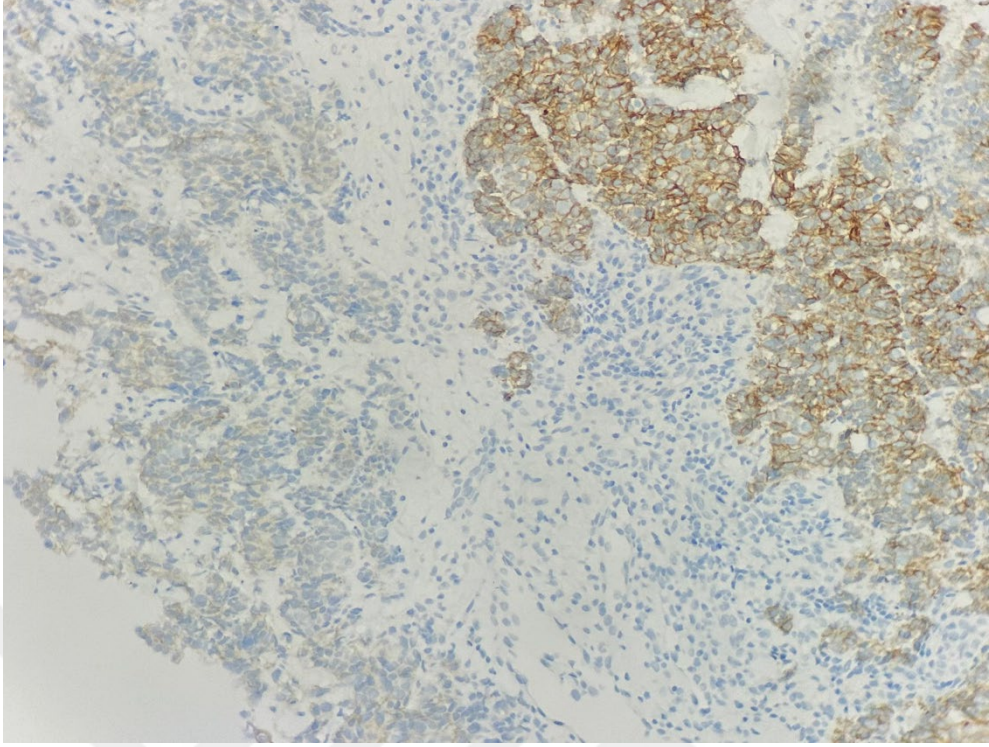
Heterojen-kümesel boyanma gösteren olgulardan 2'sinde, farklı HER2 skoruna sahip alanlarda farklı histolojik dereceye sahip tümör (morfolojik heterojenite) görüldü (Şekil 11 ve şekil 12).



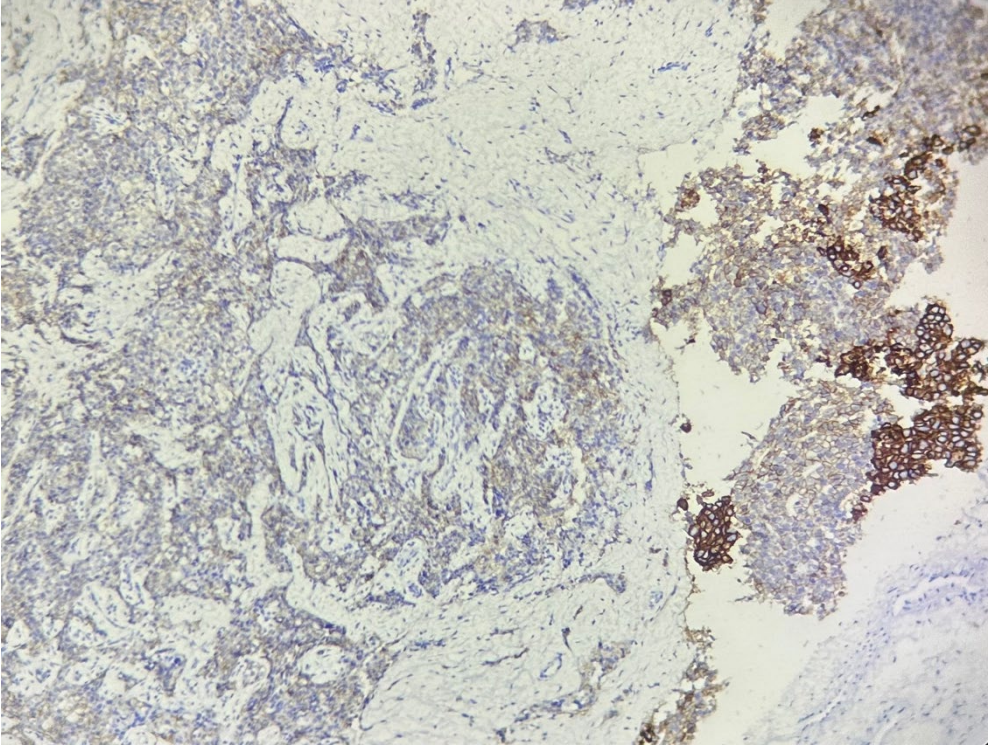
Şekil 7: Heterojen (%30-79 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma); kümesel
a. Büyütme x40, **b.** Büyütme x100



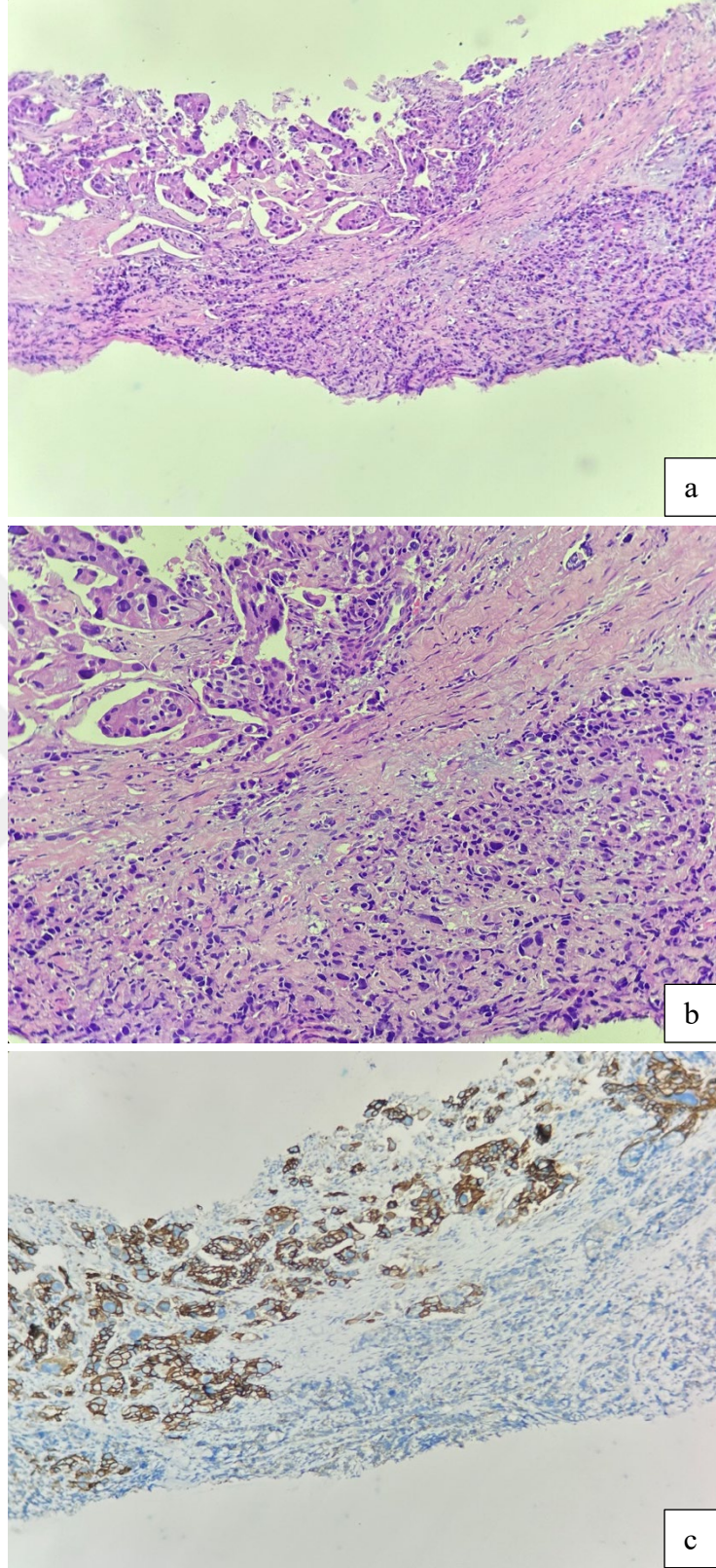
Şekil 8: Heterojen (%30-79 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma); mozaik
a. Büyütme x100, **b.** Büyütme x100



Şekil 9: Heterojen (%30-79 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma);
kümesel ve mozaik (x200)

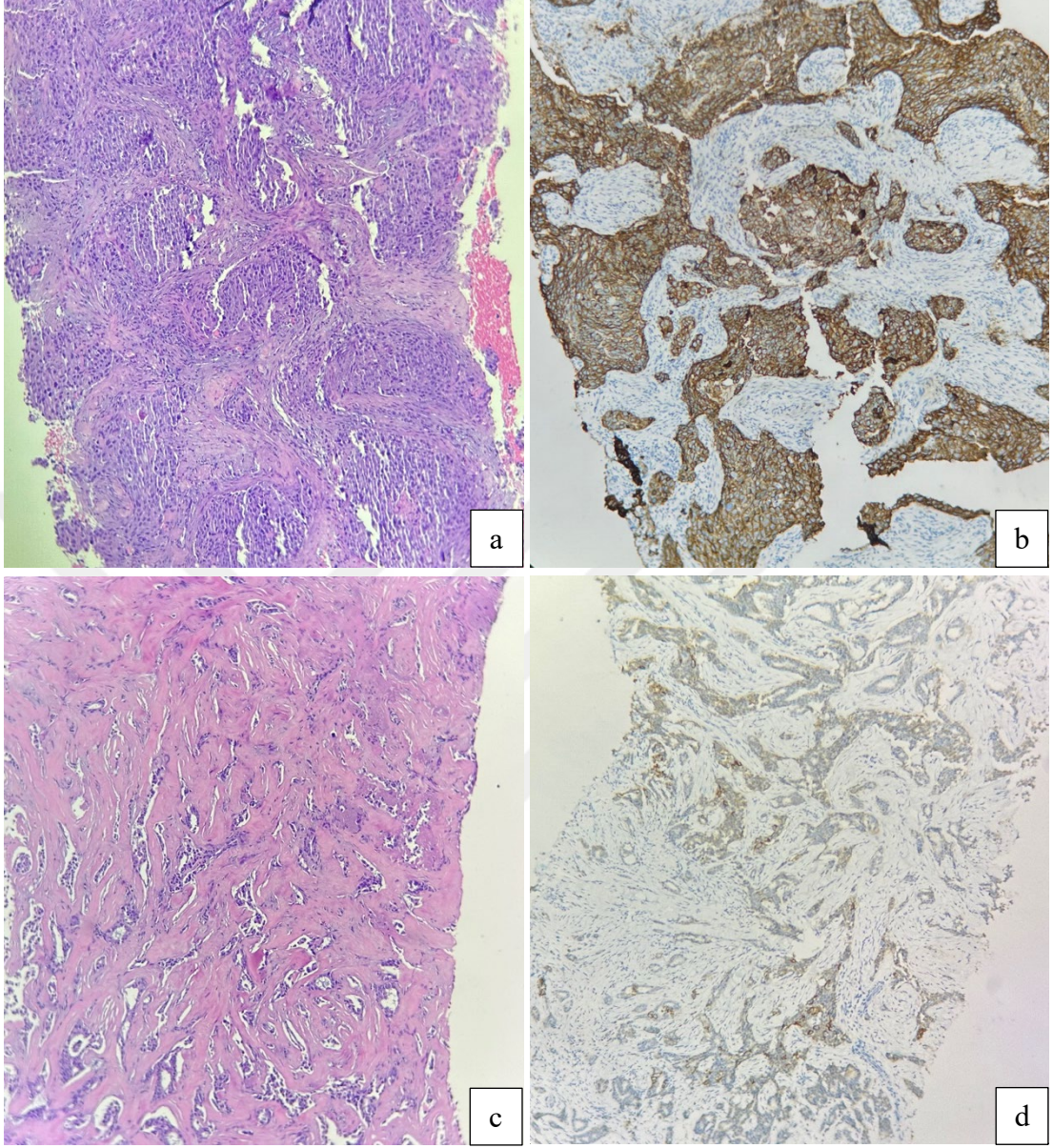


Şekil 10: Fokal (<%30 yaygınlıkta komplet membranöz boyanma) (x100)



Şekil 11: Morfolojik heterojenite gösteren tümörde HER2 ile kümesel pozitiflik

a. HE (x100), **b.** HE (x200), **c.** HER2 İHK (x200)



Şekil 12: Morfolojik heterojenite gösteren tümöre ait HER2 boyanma paternleri
a. Yüksek dereceli alan, HE (x100), **b.** Bu alanda HER2 ile kuvvetli ve komplet membranöz boyanma, İHK (x100), **c.** Düşük dereceli alan, HE (x100),
d. Bu alanda HER2 ile yaygınlıkta zayıf ve inkomplet membranöz boyanma, İHK (x100)

Fokal, heterojen ve homojen boyanma paternlerine göre MD Anderson Rezidü Kanser Yükü skorlarının dağılımı Tablo 7’de verilmiştir. Heterojen boyanma gösteren 1 olguda (%3.2) rezidü tümör mevcuttu ancak lenf nodu örneklenmemiş olduğundan

MD Anderson skorlaması yapılamadı. Benzer şekilde homojen boyanma gösteren olgulardan 3'ünde (%4) lenf nodu örnekleme yapılmadığından MD Anderson skoru verilemedi.

Tablo 7: Boyanma paternlerine göre MD Anderson skorlarının dağılımı

Tedavi yanıtı	HER2 boyanma paterni			Toplam
	Fokal n (%)	Heterojen n (%)	Homojen n (%)	
pCR	4 (44.4)	16 (51.6)	52 (69.4)	72
RCB-I	1 (11.2)	1 (3.2)	6 (8)	8
RCB-II	4 (44.4)	11 (35.5)	10 (13.3)	25
RCB-III	0	2 (6.5)	4 (5.3)	6
Skorlanamayan	0	1 (3.2)	3 (4)	4
Toplam	9 (100)	31 (100)	75 (100)	115

Klinikopatolojik özellikler, HER2 boyanma paternleri ve farklı şiddetteki boyanma yaygınlıkları tedavi yanıtlarına göre tek değişkenli analiz yapılarak kıyaslandı. pCR ve non-pCR gruplardaki yaş ortalamaları arasında anlamlı fark bulunmadı (Sırasıyla 50.04 ve 46.86). Yaş ≤ 40 ve > 40 olmak üzere iki kategoriye ayrıldığında tedavi yanıtları ile arasında istatistiksel olarak “sınırdan anlamlı” ilişki saptandı ($p=0.056$). TIL skoru ve PR durumu ile tedavi yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu (Sırasıyla $p=0.015$ ve $p=0.004$). TIL skoru için ayrıca %10 eşik değeri uygulandığında, >10 olan olgularda pCR oranları daha yüksek izlendi ($p=0.026$). Boyanma paternleri fokal, heterojen ve homojen olmak üzere gruplandığında tedavi yanıtları (pCR ve non-pCR) üzerine etkileri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.110$). Fokal ve heterojen grup birleştirilerek homojen boyanma ile karşılaştırıldığında, homojen grupta daha yüksek pCR oranları saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.041$). Değerlendirilen diğer parametreler tedavi yanıtları ile ilişkili bulunmadı (Tablo 8).

Tablo 8: Olgulara ait klinik ve patolojik veriler ile tedavi yanıtı arasındaki ilişki

		pCR (n=72) n (%)	non-pCR (n=43) n(%)	<i>p</i> değeri
Yaş	Ort. ± SS	50.04 ± 10.88	46.86 ± 10.25	^a 0.124
	n	(72)	(43)	
	≤ 40	11 (15.3)	13 (30.2)	^b 0.056#
	> 40	61 (84.7)	30 (69.8)	
Lokalizasyon	n	(72)	(42)	
	Sağ	32 (44.4)	20 (47.6)	^b 0.743
	Sol	40 (55.6)	22 (52.4)	
Fokalite	n	(71)	(42)	
	Unifokal	51 (71.8)	32 (76.2)	^b 0.612
	Multifokal	20 (28.2)	10 (23.8)	
Tümör boyutu	n	(66)	(37)	
	Medyan (min-max)	27 (7-58)	27(8-60)	^c 0.853
pT evresi	n	(66)	(38)	
	pT1	14 (21.2)	8 (21)	^d 0.246
	pT2	49 (74.3)	24 (63.2)	
	pT3	2 (3)	4 (10.5)	
	pT4	1 (1.5)	2 (5.3)	
Lenf nodu tutulumu	n	(71)	(42)	
	Var	59 (83.1)	39 (92.9)	^e 0.115
	Yok	12 (16.9)	3 (7.1)	
pN evresi	n	(59)	(32)	
	pN0	12 (20.3)	3 (9.4)	^d 0.445
	pN1	36 (61)	20 (62.5)	
	pN2	9 (15.3)	8 (25)	
	pN3	2 (3.4)	1 (3.1)	
Histolojik derece	n	(55)	(28)	
	Derece 2	6 (10.9)	2 (7.1)	^e 0.453
	Derece 3	49 (89.1)	26 (92.9)	
Nükleer derece	n	(72)	(43)	
	Derece 2	12 (16.7)	6 (14)	^b 0.698
	Derece 3	60 (83.3)	37 (86)	
LVİ	n	(69)	(40)	
	Var	27 (39.1)	18 (45)	^b 0.549
	Yok	42 (60.9)	22 (55)	
PNİ	n	(69)	(40)	
	Var	5 (7.2)	2 (5)	^e 0.491
	Yok	64 (92.8)	38 (95)	
TIL	n	(69)	(41)	
	Medyan (min-max)	20 (0-100)	10 (0-60)	^c 0.015*

	TIL ≤ %10	27 (39.1)	25 (61)	^b0.026*
	TIL > %10	42 (60.9)	16 (39)	
Nekroz	n	(69)	(40)	
	Var	22 (31.9)	13 (32.5)	^b 0.947
	Yok	47 (68.1)	27 (67.5)	
ER	n	(72)	(43)	
	Pozitif	47 (65.3)	33 (76.7)	^b 0.196
	Negatif	25 (34.7)	10 (23.3)	
PR	n	(72)	(43)	
	Pozitif	22 (30.6)	25 (58.1)	^b0.004†
	Negatif	50 (69.4)	18 (41.9)	
Ki67	n	(68)	(42)	
	Medyan (min-max)	55 (8-90)	45 (8-90)	^c 0.069
Moleküler sınıf	n	(72)	(43)	
	Luminal HER2	47 (65.3)	33 (76.7)	^b 0.196
	HER2-zengin	25 (34.7)	10 (23.3)	
HER2 paterni	n	(72)	(43)	
	Fokal (<%30)	4 (5.6)	5 (11.6)	^d 0.110
	Heterojen (%30-79)	16 (22.2)	15 (34.9)	
	Homojen (≥%80)	52 (72.2)	23 (53.5)	
HER2 paterni (nonhomojen-homojen)	n	(72)	(43)	
	Nonhomojen(<%80)	20 (27.8)	20 (46.5)	^b0.041*
	Homojen (≥%80)	52 (72.2)	23 (53.5)	
HER2 ekspresyonu	n	(72)	(43)	
Komplet-kuvvetli boyanma yaygınlığı (%)	Medyan (min-max)	62.5 (0-100)	60 (5-100)	^c 0.273
Komplet-zayıf/orta boyanma yaygınlığı (%)	Medyan (min-max)	19 (0-53)	20 (0-50)	^c 0.705
Komplet-herhangi bir şiddette boyanma yaygınlığı (%)	Medyan (min-max)	90 (15-100)	90 (17-100)	^c 0.316
İnkomplet-soluk boyanma veya hiç boyanmama yaygınlığı (%)	Medyan (min-max)	10 (0-85)	10 (0-83)	^c 0.316

^aBağımsız değişken T testi, ^bPearson ki-kare testi, ^cMann-Whitney U testi, ^dFisher-Freeman-Halton Exact Test, ^eFisher's exact test. #p değeri 0.05'e yakın †p<0.01 *p<0.05

ER: Östrojen reseptörü, LVİ: Lenfovasküler invazyon, Ort: Ortalama, PNİ: Perinöral invazyon, PR: Progesteron reseptörü, SS: Standart sapma, TIL: Tümör infiltrate lenfosit

Tek değişkenli analiz sonucu tedavi yanıtları ile istatistiksel olarak “sınırdan anlamlı” saptanan yaş > 40 olması ve anlamlı saptanan TIL skoru, PR durumu, HER2 heterojenitesi değişkenleri çok değişkenli analiz ile yeniden değerlendirildi (Tablo 9). Lojistik regresyon analizine göre TIL skorundaki her %1’lik artışın pCR olasılığını 1.025 kat arttırdığı (p=0.034), PR-pozitifliğinin ise pCR olasılığını 0.331 kat azalttığı (p=0.012) görüldü. Yaş > 40 ve HER2’nin nonhomojen olmasının tedavi yanıtlarını etkileyen bağımsız faktörler olmadığı saptandı (p>0.05).

Tablo 9: Çok değişkenli lojistik regresyon analiz sonuçları

	B	Odds Ratio	%95 Confidence Interval		p değeri
			Alt sınır	Üst sınır	
Yaş (>40)	0.707	2.027	0.757	5.431	0.160
TIL skoru	0.024	1.025	1.002	1.048	0.034
PR-pozitif	-1.104	0.331	0.140	0.783	0.012
HER2 heterojenitesi *	-0.481	0.618	0.256	1.494	0.286

* Nonhomojen boyanma, B: Coefficient

5. TARTIŞMA

HER2-pozitifliği meme kanserlerinin %15-20'sinde görülmekte ve daha kötü seyir ile ilişkilendirilmektedir (1). HER2 reseptörünü hedef alan ilaçların geliştirilmesiyle klinik gidişatta belirgin iyileşme görülse de yaklaşık %4-23 olguda tedaviye rağmen nüks ve metastaz görülebilmektedir. Bu durum düşük HER2 ekspresyon seviyeleri, membran yüzeyinde ilaç "efflux" pompalarının varlığı, eşlik eden hormon reseptör pozitifliği gibi faktörlerle açıklanabilir (103). Tüm bunlara ek olarak intratümöral HER2 heterojenitesinin de anti-HER2 tedavisine direnç mekanizmalarından biri olduğu öne sürülmektedir (11).

Çalışmamızda neoadjuvan dönemde kemoterapi ve anti-HER2 tedavi başlanan 115 olgunun 72'si (%62.6) pCR, 43'ü (%37.4) non-pCR şeklinde yanıt vermiştir. Bu durum literatürde bildirilen %34-76 arasındaki pCR oranları ile uyumludur (7,10,11,13,59,60,94,104–106).

Çalışmamızda tedavi yanıtı üzerine etkisi olabilecek klinikopatolojik özellikler ve HER2 heterojenitesi araştırılmıştır. Klinik özelliklerden yaş ortalaması 48.85 (± 10.72) bulunmuş ve tedavi yanıtlarına göre gruplandığında ortalamalar arası anlamlı fark saptanmamıştır. Yaş ≤ 40 ve > 40 olmak üzere iki gruba ayrıldığında, genç yaştaki olgularda daha az pCR oranları saptanmış ve iki grup arasındaki fark "sınırdan anlamlı" bulunmuştur ($p=0.056$). Çalışmamızla benzer olarak Chen (59), Krystel-Whittemore (60) ve Hou(7)'nin yürüttüğü çalışmalarda pCR ve non-pCR grup arasında medyan veya ortalama yaş değerleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Lee ve ark. (12) medyan yaş değerini 49 bulmuş, pCR oranlarını 50 yaş altı ve üstü olarak iki grupta değerlendirmiş ancak anlamlı fark bulamamıştır. Benzer şekilde Orrù ve ark. (104) medyan yaş değerini 54 bulmuş, bu yaştan genç veya yaşlı olunmasıyla pCR oranları arasında anlamlı bir fark saptamamıştır.

Tek değişkenli analiz yaparak tedavi yanıtı ile diğer klinikopatolojik özelliklerin ilişkisine bakıldığında pCR ve non-pCR grupları arasında TIL skoru medyan değerleri kıyaslandığında anlamlı fark saptanmıştır. Bu fark, TIL skoru için %10 eşik değeri kullanıldığında da anlamlı kalmış, $> \%10$ olan tümörlerin pCR oranları daha yüksek kaydedilmiştir. Bulgularımız ile uyumlu olarak de Haas ve ark. (13) HER2-pozitif meme karsinomlarında stromal TIL skorunun $> \%10$ olması ile,

Orrù ve ark. (104) ise \geq %10 olması ile pCR arasında tek değişkenli analizde anlamlı ilişki saptamıştır. Benzer şekilde Heppner ve ark. (107) her %10'luk TIL skoru artışının pCR oranlarını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca %60 eşik değeri uygulandığında da \geq %60 skor ile pCR arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Uluslararası TIL Çalışma Grubu'nun da belirttiği gibi yüksek ve düşük TIL skoru için belirli bir eşik değer bulunmamakta, bu durum çalışmalar arası kıyaslama yapmayı zorlaştırmaktadır (57). Yine de HER2-pozitif meme kanserinde artan TIL skorunun pCR oranlarını arttırdığını söylemek mümkündür.

Tek değişkenli analiz ile tedavi yanıtına etki ettiği saptanan bir diğer parametrenin PR durumu olduğu görölmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Hou (7) ve Krystel-Whittemore (60)'un çalışmalarında da PR durumunun tedavi yanıtlarını etkilediği gözlenmiştir. Bu bulgunun tersine Atallah ve ark. (106) PR durumu ile tedavi yanıtları arasında ilişki saptamamıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre lokalizasyon, fokalite, tümör boyutu, pT evresi, lenf nodu tutulumu, pN evresi, histolojik derece, nükleer derece, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, nekroz, ER durumu ve ki67 proliferasyon indeksi ile tedavi yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. Lokalizasyona baktığımızda bulgularımızdan farklı olarak Orrù ve ark. (104) sağ memede lokalize tümörlerin tedavi yanıtlarının sol memeye kıyasla daha iyi olduğunu söylerken, Chen ve ark. (59) ise lokalizasyon ile tedavi yanıtı arasında ilişki saptamamıştır. Multifokalitenin HER2-pozitif meme kanseri üzerinde araştırıldığı bir yayın bulunmadığından kıyaslama yapılamamıştır. Tümör boyutunun tedavi yanıtı ile ilişkisini incelemiş olan Scaltriti ve ark. (108)'nın çalışmasında bulgularımız ile örtüşen şekilde böyle bir ilişki saptanmamıştır. pT evresini incelediğimizde Chen ve ark. (59) bulgularımızın aksine bunun tedavi yanıtı ile ilişkili bir parametre olduğunu söylemişlerdir. Bulgularımızla benzer şekilde Arnould (105), Heppner (107) ve Krystel-Whittemore (60) ise böyle bir ilişki saptamamıştır. Lenf nodu tutulumunun tedavi yanıtına etkisinin olmadığı, bizim çalışmamıza benzer olarak Arnould (105), Atallah (106), Heppner (107), Krystel-Whittemore (60) ve Scaltriti (108) tarafından yürütölen çalışmalarda da gösterilmiştir. pN evreleme sistemine göre tedavi yanıtlarını Chen ve ark. (59) değerlendirmiş ve sonuçlarımız ile uyumlu olarak aralarında anlamlı ilişki saptamamıştır. Histolojik derece ile tedavi yanıtı arasında, bulgularımızın aksine

Atallah (106), Krystel-Whittemore (60) ve Orrù ve ark. (104) ilişki olduğunu göstermiş ancak Arnould (105), Hou (7) ve Heppner ve ark. (107) ise bir ilişki gösterememiştir. Nükleer derece ile tedavi yanıtlarını değerlendiren Hou ve ark. (7) bulgularımız ile benzer şekilde anlamlı bir ilişki saptamamıştır. Literatürde HER2-pozitif meme tümörlerinde lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve nekroz ile tedavi yanıtının ilişkisini değerlendiren çalışmaya rastlanmamış, dolayısıyla bulgularımızı kıyaslamak mümkün olmamıştır. ER durumuna baktığımızda çalışmamızın aksine Hou (7) ile Krystel-Whittemore ve ark. (60) ER durumunun tedavi yanıtı üzerine etkili olduğunu bulmuştur. Ki67 proliferasyon indeksini Chen ve ark. (59) %15 eşik değeri koyarak değerlendirmiş ve iki grup arasında tedavi yanıtlarının farklı olduğunu saptamıştır. Orrù ve ark. (104) ise %20 eşik değeri kullanarak oluşturulan grupları tedavi yanıtlarına göre kıyaslamış, ancak fark bulmamıştır.

Çalışmamızdaki 115 olgudan 80'i (%69.5) hormon reseptörü pozitif (Luminal HER2), 35'i (%30.5) hormon reseptörü negatif (HER2-zengin) tip olarak sınıflanmaktadır. Literatürde HER2-pozitif tümörlerin %60 ila %70'inde hormon reseptör pozitifliğinin eşlik ettiği bildirilmekte, bu durum bulgularımız ile uyumluluk göstermektedir (10,76). İntrinsik moleküler alt tiplere göre tedavi yanıtları kıyaslandığında HR+/HER2+ tümörlerin 47'si (%58.75) pCR, HR-/HER2+ tümörlerin 25'i (%71.4) pCR olarak dağılım göstermektedir. Örneklemimizde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamasa da HER2-zengin grup, Luminal HER2 gruba kıyasla görece daha yüksek pCR oranı içermekte, bu durum literatür ile uyumluluk göstermektedir (1,10,76).

HER2 heterojenitesi fokal, heterojen ve homojen boyanma şeklinde değerlendirildiğinde 9'unun (%7.8) fokal, 31'inin (%27) heterojen ve 75'inin (%65.2) homojen olduğu görülmüştür. Literatürde bu şekilde gruplama yapan de Haas ve ark. (13) %7 fokal, %12.2 heterojen ve %80.8 homojen; Perez ve ark. (90) %3.8 fokal, %9.7 heterojen ve %86.5 homojen; Denkert ve ark. (91) ise %11.2 fokal, %22 heterojen ve %66.8 homojen bulmuştur (Tablo 10). Boyanma paternleri arasındaki dağılımların farklı oluşu, bu çalışmalarda İHK ve/veya ISH yöntemi ile HER2-pozitif (örn. İHK skor 1 ancak ISH-amplifiye) tümörlerin çalışmaya dahil edilmesinden ötürü olabilir. Fokal boyanma paterni heterojen boyanmaya dahil edildiğinde, 115 olgunun

40'ında (%34.8) heterojenite görülmektedir. Bu oran literatürde bildirilen %5-40 oranı ile uyumludur (1,3-7).

Tablo 10: Çalışmamızdaki eşik değerleri kullanarak İHK yöntemi ile fokal, heterojen, homojen paternleri tanımlayan çalışmalar ve bu paternlerin dağılımları

	Fokal	Heterojen	Homojen
Bizim çalışmamız	%7.8	%27	%65.2
de Haas (13)	%7	%12.2	%80.8
Perez (90)	%3.8	%9.7	%86.5
Denkert (91)	%11.2	%22	%66.8

HER2 ile kümesel heterojenite gösteren olguların 2'sinde farklı ekspresyon gösteren alanlarda farklı morfoloji dikkati çekmiştir. Her iki olguda da HER2-pozitif alanda daha yüksek histolojik derece izlenirken, HER2-negatif alandaki histolojik derece daha düşüktür. Muller ve ark. (1) yaptıkları çalışmada heterojenite görülen 11 olgunun 3'ünde HER2 heterojenitesine eşlik eden morfolojik heterojenite tanımlamış ve benzer şekilde yüksek dereceli alanların HER2-pozitif, düşük dereceli alanların HER2-negatif olduğunu saptamıştır.

Tedavi yanıtları (pCR ve non-pCR) ile boyanma paternleri (fokal, heterojen, homojen) karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır. Takiben yapılan analizde fokal ve heterojen boyanma paternleri birlikte gruplandığında, nonhomojen boyanmanın homojen boyanmaya göre daha az pCR oranları ile ilişkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Heterojenite ile tedavi yanıtını kıyaslayan ve çalışmamızda uyguladığımız kriterleri kullanan de Haas ve ark. (13), bulgularımız ile uyumlu olarak homojen boyanma paterni ile pCR arasında anlamlı ilişki saptamıştır. Bu çalışmada erken evre HER2-pozitif meme kanserinde T-DM1 + pertuzumab ile TCH + P rejiminin kıyaslandığı faz III KRISTINE çalışmasındaki veriler incelenmiştir. Her iki tedavi seçeneğinde de literatür ile uyumlu olarak yüksek HER2 amplifikasyonu/ekspresyonu (HER2 İHK skor 3, HER2/CEP17 oranı ≥ 4 , yüksek mRNA seviyeleri ve İHK ile homojen HER2 ekspresyonu) bulunan tümörlerde daha fazla pCR oranları gösterilmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak, değerlendirdiğimiz parametrelerden heterojenite sıklığını (%27'ye karşılık %12.2) daha düşük rapor etmiş olsalar da sonuçlarımız uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda sağkalım verileri sunulmamış, heterojenitenin sağkalım üzerine etkilerini inceleyen iki çalışma kıyaslanmıştır: Perez ve ark. (90) ileri evre HER2-pozitif meme kanserinde T-DM1 ± pertuzumab ile trastuzumab + taksan arasındaki tedavi etkinliğinin kıyaslandığı faz III MARIANNE çalışmasındaki biyobelirteçleri değerlendirmiştir. Tüm tedavi kollarında nonfokal (heterojen ya da homojen) boyanma gösteren olguların, fokal boyanma gösteren olgulara kıyasla daha uzun progresyonsuz sağkalım gösterdiği bulunmuştur. Bu bulguya ek olarak, fokal ekspresyon paterni gösteren tümörlerdeki progresyonsuz sağkalım süresi, T-DM1 ± pertuzumab tedavi kolunda trastuzumab + taksan tedavisine göre daha düşük kaydedilmiştir. Bu durum, sistemik kemoterapi olmaksızın tek başına hedefe yönelik tedavinin etkinliğinin, hedef alınan molekülün yaygınlığıyla sınırlı olduğunu göstermektedir. Denkert ve ark. (91) ise neoadjuvan tedavi sonrası rezidü tümörlere adjuvan dönemde verilen trastuzumab ve T-DM1 etkinliğinin karşılaştırıldığı faz III KATHERINE çalışmasındaki biyobelirteçleri analiz etmiştir. Fokal HER2 ekspresyon paterni gösteren olgular dışında, diğer olgularda T-DM1 ile daha uzun hastalısız sağkalım oranları elde edilmiştir. Ancak şaşırtıcı şekilde trastuzumab tedavi kolundaki hastalarda fokal grup, daha yüksek hastalısız sağkalım oranları göstermiştir. Bu şaşırtıcı durum yazarlar tarafından, fokal boyanma gösteren olguların az sayıda olması ve buna bağlı olarak progresyon ile ilişkilendirilen olayların da daha az gözlenmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

De Haas (13), Perez (90) ve Denkert (91)'in yürüttüğü çalışmalardan hareketle, HER2 ile fokal/heterojen boyanma paternlerinin neoadjuvan/adjuvan dönemde verilen HER2 hedefli tedavilere daha kötü yanıt verdiği ve tedavi rejimleri arası yanıt farklılıklarına yol açtığı söylenebilir.

Tablo 11: İHK yöntemi ile fokal/heterojen/homojen paternleri tanımlayan ve tedavi yanıtı/sağkalım ile kıyaslayan çalışmalar

	de Haas (13)	Perez (90)	Denkert (91)
Olgu sayısı	444	1095	1486
Spesimen tipi	Biyopsi	Biyopsi	Biyopsi ve rezeksiyon
Tedavi dönemi	Neoadjuvan	Metastatik	Adjuvan
Tedavi	- T-DM1 + P - TCH + P	- T-DM1 ± P - Trastuzumab + taksan	- Trastuzumab - T-DM1
Tedavi yanıtları	Nonhomojen patern, homojene göre daha düşük pCR ile ilişkili	VY*	VY*
Sağkalım	VY*	Fokal patern, nonfokal paterne göre daha düşük PFS ile ilişkili	T-DM1 kolunda; fokal patern, nonfokal paterne göre daha düşük PFS ile ilişkili

P: Pertuzumab, PFS: Progresyonsuz sağkalım, T-DM1: Trastuzumab emtansine, TCH: dosetaksel / karboplatin/trastuzumab, VY: Veri yok

Heterojeniteyi FISH yöntemiyle tanımlayan ve tedavi yanıtlarını kıyaslayan Metzger Filho ve ark. (10) sonuçlarımız ile benzer şekilde HER2 heterojenitesinin tedavi yanıtını etkilediğini gözlemlemiştir. Yaptıkları faz II klinik çalışmasında, HER2 heterojenitesinin neoadjuvan T-DM1 + pertuzumab yanıtlarına etkisi araştırılmıştır. Nonheterojen grupta %55 oranında pCR izlenirken, heterojen grubun hiçbirinde pCR görülmemiştir. Ek olarak heterojenite gösteren tümörlerde daha fazla nonamplifiye hücreler saptanmış ve bu hücrelerin yaygınlığı ile tedaviye direncin (non-pCR) ilişkili olduğu gösterilmiştir. Nonamplifiye hücrelerin kümesel ya da mozaik halde görülmesi arasında ise fark izlenmemiştir. ASCO/CAP, sadece FISH yöntemi ile saptanan kümesel heterojenitenin anlamlı olduğunu belirtmiş olsa da (86) Metzger Filho'nun çalışmasındaki bulgu bu bilgiyle uyumlu değildir.

FISH yöntemi ile heterojeniteyi araştıran bir diğer alışma Muller ve ark. (1) tarafından yapılmış, heterojenite oranı duşuk saptandığından tedavi yanıtlarını kıyaslamak anlamlı sonuca ulaştırmamıştır. Bu çalışmada toplamda 2531 adet tru-cut biyopsi ve mastektomi spesimeninden 11'inde (%0.4) FISH ile genetik heterojenite tanımlanmıştır. Heterojenite görülen olgulara ait İHK lamları incelendiğinde nonamplifiye alanların skor 0, 1 ya da 2 olduğu görülmüş, İHK ile heterojenite kümesel ve mozaik patern şeklinde sınıflanmıştır.

Heterojenitenin tedavi yanıtı ve sağkalıma etkisini inceleyen Lee ve ark. (12) bulgularımız ile benzer şekilde HER2 heterojenitesi ile non-pCR tedavi yanıtı arasında anlamlı ilişki tanımlamıştır. Bu çalışmada metastatik HER2-pozitif (İHK skor 3 ve skor 2 ya da skor 1-FISH amplifiye) meme kanserinde HER2/CEP17 oranı ve HER2 gen kopya sayısı kullanılarak bölgesel ve genetik heterojenite kavramları tanımlanmış ve İHK ile farklı şiddeteki boyanma yüzdeleri kaydedilmiştir. ROC analizi uygulanarak HER2/CEP17 oranı > 2.2 olan hücreler için %80; kuvvetli-komplet membranöz boyanan hücreler için %75 eşik değer belirlenmiştir. Tek değişkenli analiz ile HER2 amplifikasyon seviyeleri, HER2/CEP17 oranı ile tanımlanan bölgesel HER2 heterojenitesi ve HER2/CEP17 oranı > 2.2 olan %80'den az ya da fazla hücre olması progresyon süresi, genel sağkalım ve tedavi yanıtına etki eden faktörler olarak tanımlanmıştır. Kuvvetli-komplet membranöz boyanan hücrelerin %75'ten az ya da fazla olması ise tedavi yanıtını etkileyen bir faktör olarak bulunmuştur. Progresyon ve sağkalım ile, HER2/CEP17 oranı kullanarak tanımlanan genetik HER2 heterojenitesi arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. HER2 gen kopya sayısı kullanılarak tanımlanan genetik ve bölgesel heterojenite ise genel sağkalım ile ilişkili saptanmış, ancak progresyon süresi ile ilişkili izlenmemiştir.

HER2 heterojenitesinin sağkalıma etkisini araştıran bir başka alışma Lee ve ark. (93) tarafından adjuvan trastuzumab tedavisi gören hasta grubunda yapılmıştır. Tanımlanan bölgesel HER2 heterojenitesi ile daha kısa hastalıksız sağkalım ilişkili bulunmuş, genetik heterojenite ile böyle bir ilişki saptanmamıştır. Aynı değişkenler hormon reseptörü pozitif ve negatif gruplarda da incelenmiş, HR+/HER2+ grupta bölgesel heterojenite ve HER2/CEP17 oranı ≥ 2 olan hücrelerin %75'ten az olmasının hastalıksız sağkalımı etkilediği görülürken, HR-/HER2+ grupta ise böyle bir ilişki saptanmamıştır. Ayrıca İHK ile kuvvetli ve komplet membranöz boyanan hücrelerin

yaygınlığı ve hastalısız sağkalım arasındaki ilişki incelenmiş, ancak ilişkili bulunamamıştır (93). Lee ve ark. (12)'nin çalışmasından farklı olarak söz edilen değişkenin bu çalışmada ilişkili saptanmaması, değerlendirilen hasta gruplarının farklı evrelerde (metastatik ve adjuvan dönem) olmasından ötürü olabilir. Yine bu çalışmada HER2 heterojenitesi olan tümörlerin daha düşük histolojik derece, yaygın olmayan intraduktal komponent, hormon reseptör pozitifliği, İHK ile skor 2 ekspresyon, düşük HER2 gen amplifikasyonu ve düşük HER2/CEP17 oranları içerdiği görülmüştür (93). Bizim alışmamızda da HR-pozitif grupta heterojen boyanma paternleri daha sıklıkla tanımlanmıştır.

Benzer şekilde Seol ve ark. (3) hem bölgesel hem de genetik HER2 heterojenitesini daha kısa hastalısız sağkalım ile ilişkili bulmuştur. FISH ile amplifikasyon gösteren olgularda heterojeniteyi araştırdıkları çalışmada “tissue microarray” korları oluşturmuş ve her bir olgu için korlar arası fark varsa (amplifikasyon var/yok ya da var/belirsiz) bölgesel heterojenite; her bir olgudaki HER2/CEP17 oranı %5-50 hücrede > 2.2 ise genetik heterojenite şeklinde sınıflamıştır. Bölgesel heterojenite, İHK ile korlar arası farklı protein ekspresyon skorlamasına yol açarken; genetik heterojenite protein ekspresyon seviyelerine yansıyan bir bulgu olmamıştır.

FISH yöntemi ile HER2 heterojenitesinin insidansını araştıran Öhlschlegel ve ark. (109) İHK skoru 0, 1, 2 ve 3 olan olguları değerlendirmiş ve FISH ile genetik heterojeniteyi (en fazla skor 2 olgularda olmak üzere) tüm örneklemde %14.7; nonamplifiye olgularda ise %16.1 oranında saptamıştır. İHK ile heterojen boyanma gösteren alanlara FISH ile bakıldığında amplifiye ve nonamplifiye hücrelerin bir arada olduğu, İHK ile heterojen boyanmanın genetik heterojeniteyi yansıttığı gözlenmiştir (109). Genetik heterojenite Seol ve ark. (3) tarafından İHK ile korele bulunmasa da bu çalışmada ilişkili saptanmıştır. Amplifikasyon durumu ile protein ekspresyonlarının her zaman örtüşmediği düşünüldüğünde bu farklılık anlaşılabilir bir durumdur. hlschlegel ve ark. (109) skor 2 grup üzerine yoğunlaştıklarında, genetik heterojenite gösteren olgularda daha fazla oranda polizomi 17 ve yüksek histolojik derece saptamıştır. Heterojenite ve hormon reseptör durumu arasında ise ilişki bulunmamıştır. Ayrıca genetik heterojenite saptanan skor 2 olguların %95'inin nonamplifiye grupta olduğu görülmüştür. Bu alışma, mevcut kılavuza göre nonamplifiye olarak

tanımlanan ve HER2 hedefli tedavi verilmeyen olguların bir kısmında %50'ye kadar amplifiye hücrelerin olduğunu ortaya koymuştur. Yaklaşık 10 yıl sonra Modi ve ark. (85) "HER2-low" şeklinde tanımladıkları HER2 İHK skor 2/FISH nonamplifiye ve skor 1 tümörlerin de HER2 hedefli tedavilerden fayda görebileceğini göstermiştir. Modi ve ark. (85)'nin çalışmasındaki "HER2-low" grupta tedavinin işe yaraması aslında bu grubun bir kısmının heterojen olmasından ötürü olabilir.

Benzer şekilde Yang ve ark. (110) FISH ile ASCO/CAP'in tanımladığı genetik heterojenite insidansını İHK skor 3, 2, 1 ve 0 olan olgularda araştırmıştır. Genetik heterojenite %15.2 oranında hem amplifiye hem de nonamplifiye olgularda saptanmış, ancak HER2 amplifikasyon seviyesi yüksek ($HER2/CEP17 \geq 4$) olguların hiçbirinde izlenmemiştir. Klinikopatolojik özellikler değerlendirildiğinde, genetik heterojenite gösteren tümörlerin HER2-negatif tümörlere daha çok benzediği dikkati çekmiş, yazarlar bu gözlem üzerine heterojen tümörlerin HER2-hedefli tedaviler için uygun olmayabileceğine değinmiştir. Öhlschlegel ve ark. (109)'nin çalışmasında olduğu gibi örneklem kümesine HER2-negatif tümörler de dahil edilmiştir ve her iki çalışmada bulunan oranlar birbiriyle uyumluluk göstermektedir. HER2-negatif grubun dahil edilmesi sayesinde heterojenite gösteren olgular, HER2-pozitif tümörlerin yanı sıra HER2-negatif tümörlerle de karşılaştırılabilmiştir.

HER2 heterojenitesini GPA yöntemi kullanarak ortaya koyan çalışmalarını incelediğimizde ise Horii ve ark. (11)'nin çalışma sonuçları bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu çalışmada heterojenite gösteren tümörlerin hiçbirinde neoadjuvan tedavi sonrası pCR elde edilmediği vurgulanmıştır. Nonhomojen gruptaki pCR oranının (%0) bizim oranımızdan (%50) bu kadar farklı olması, bu çalışmada heterojenitenin %7 gibi az bir oranda saptanmasından dolayı olabilir. Horii ve ark. heterojen olmayan grupta ise %52.6 oranında pCR izlemiştir. Ayrıca HER2 gen kopya sayısı ≥ 6 ve HER2 İHK skor 3 şiddetinde boyanan hücrelerin sayısı arttıkça pCR oranlarının arttığı görülmüş ve ROC analizine göre bu hücreler için eşik değeri %80 olarak belirlenmiştir (11).

Heterojenitenin tedavi yanıtı üzerine etkisini değerlendiren bir başka çalışmada Hou ve ark. (7) tedavi yanıtı pCR olanların %13'ünde, non-pCR olanların ise %56'sında tedavi öncesi heterojenite tanımlamış ve bu farkı anlamlı bulmuştur. Çalışmamızdaki olguları bu şekilde kıyasladığımızda pCR elde edilen olguların

%27.8'i, non-pCR olanların ise %46.5'inde heterojenite saptanmış ve benzer şekilde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda tedavi yanıtı ile ilişkisini değerlendirdiğimiz bir diğer parametre HER2 ile kuvvetli ve komplet membranöz boyanma yaygınlığıdır ve bulgularımız, tedavi yanıtı ile arasında ilişki olmadığı yönündedir. Farklı olarak Horii ve ark. (11) İHK skor 3 şiddeti ile boyanan hücrelerin >%80 olmasını pCR oranlarını arttıran anlamlı bir parametre olarak tanımlamıştır. Lee ve ark. (12) \geq %75 hücrede kuvvetli ve komplet membranöz boyanma olmasını, pCR ve daha uzun progresyon süresi ile ilişkili bulmuştur. Bir başka çalışmada Lee ve ark. (93) bulgularımızla uyumlu olarak kuvvetli-komplet membranöz boyanma yüzdesini tedavi yanıtları ile ilişkili saptamamıştır. Çalışmalar arası farklı sonuçlar elde edilmesinin sebebi metastatik, adjuvan ve neoadjuvan gibi farklı dönemlerde tedavi gören hasta gruplarının kıyaslanması olabilir. Çalışmamızla benzer şekilde neoadjuvan tedavi gören hasta grubunu araştırmasına rağmen Horii ve ark. (11) ile sonuçlarımız farklılık göstermektedir.

Heterojenite kavramını değerlendirmeyen, ancak literatürde heterojenite ile ilişkilendirilmiş değişkenlerin (HER2 İHK skor 2, düşük HER2 amplifikasyon seviyeleri, düşük mRNA seviyeleri) tedavi yanıtına etkisini araştırmış çalışmalar da mevcuttur. Örneklemimizde İHK skoru 2 olan olgu sayısı skor 3'e göre çok az olduğundan kıyaslamak anlamlı olmasa da skor 3 olan olgularda görece daha yüksek pCR oranları izlenmiştir (sırasıyla %63.8 ve %50). Bununla ilgili literatürdeki çalışmalar incelendiğinde Krystel-Whittemore ve ark. (60) neoadjuvan dönemde tedavi gören İHK skor 3 olan olgularda %67 oranında, skor 2 veya skor 1/0 olup FISH ile amplifiye olgularda ise %17 oranında pCR saptamıştır. Bu sonuçlarla uyumlu şekilde Chen ve ark. (59) İHK skor 3 olguların %46'sında, skor 2 olguların %25'inde neoadjuvan tedaviye tam yanıt görmüş ve farkı istatistiksel olarak anlamlı saptamıştır. Orrù ve ark. (104) da skor 3 olgularda, skor 2 olgulara kıyasla neoadjuvan tedavi sonucu daha yüksek pCR oranları saptamıştır (sırasıyla %49.2 ve %11.8). Atallah ve ark. (106) ise İHK skor 3 olguların skor 2 olanlardan daha yüksek pCR oranları gösterdiğini saptamış (sırasıyla %57 ve %22), ancak böyle bir ilişkiyi HER2 gen kopya sayısı (<9.0 veya \geq 9.0) ve HER2/CEP17 oranı (<4.0 veya \geq 4.0) ile anlamlı olarak bulmamıştır. Bu çalışmadan hareketle, HER2 İHK protein ekspresyonunun hücre

yüzeyindeki HER2 reseptör sayısı ile korele olduğu ve hedefe yönelik tedavilerin bu reseptörlere bağlanarak etki ettikleri düşünüldüğünde, tedavi yanıtını tahmin etmede İHK yönteminin gen amplifikasyonunu gösteren ISH yönteminden daha üstün olduğu söylenebilir (60,104).

Öte yandan Arnould ve ark. (105) HER2 İHK skor 3 ve skor 2/FISH amplifiye tümörlerde sadece HER2 ile yüksek amplifikasyon seviyelerinin (gen kopya sayısı > 10) neoadjuvan tedavi yanıtını anlamlı olarak etkilediğini bulmuştur. Benzer şekilde Rye ve ark. (94) dijital sayım yöntemiyle hesaplama yaparak HER2 gen kopya sayısı arttıkça pCR oranlarının arttığını saptamıştır. HER2 gen kopya sayısı heterojen olan tümörlerde ise daha yüksek nüks ve meme kanseri-nedenli ölüm bildirilmiştir. pCR elde edilmeyen 20 olguda tedavi öncesi ve sonrası materyallerde hücresel yapıdaki değişiklikler incelenmiş ve az değişiklik saptanan olgularda daha yüksek progresyon riski saptanmıştır. Bu durum, bahsi geçen tümör grubunda hedefe yönelik tedavinin başarısız olduğu ve tedavinin hedef aldığı mekanizmanın asıl sürücü olmayabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda HER2 heterojenitesi tek değişkenli analiz sonucunda tedavi yanıtını etkileyen bir faktör olarak saptanmış, ER-pozitifliği (ve luminal HER2 sınıfı) anlamlı bir faktör olarak bulunmamıştır. Nonhomojen patern HR-pozitif grupta %40 oranında, HR-negatif grupta ise %22.8 oranında kaydedilmiştir. Lee ve ark. (111) da benzer şekilde HR-pozitif grupta, HR-negatif gruba göre daha fazla HER2 genetik heterojenitesi saptamıştır (%11.2 ve %2.9). Olguları homojen ve nonhomojen olarak gruplara ayırdığımızda HR-pozitifliği homojen grupta %64, nonhomojen grupta ise %80 oranında saptanmıştır. Metzger Filho ve ark. (10) da homojen olmayan grupta daha fazla HR-pozitifliği tanımlamıştır. Örneklem kümemizdeki ve alt gruplardaki dağılımlar literatürdeki bulgular ile uyumluluk göstermektedir.

Perez ve ark. (90) fokal ve heterojen ekspresyon paterni gösteren tümörlerde daha fazla *PIK3CA* mutasyon oranları saptamıştır. Daha sıklıkla HER2-negatif/amplifikasyon seviyesi düşük hücrelerde tanımlanan *PIK3CA* mutasyonu, beklendiği üzere HER2-negatif ve pozitif hücrelerin bir arada bulunduğu heterojen grupta homojen gruba kıyasla daha fazla karşımıza çıkmaktadır.

Hormon reseptör durumu ile İHK skorları kıyaslandığında Chen ve ark. (59) İHK skor 2 tümörlerde ER/PR pozitifliğinin, skor 3 tümörlerden daha fazla olduğunu

gözlemlemiştir. Loi ve ark. (112) ise HERceptin Adjuvan (HERA) çalışmasındaki olguların ER ve HER2 ekspresyon seviyelerini analiz etmiş ve ER-negatif tümörlerde daha yüksek HER2 amplifikasyon seviyeleri saptamıştır. Zhao ve ark. (77) da HR+/HER2+ grupta, HR-/HER2+ gruba kıyasla daha düşük HER2 ekspresyon seviyeleri olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar HER2 – ER sinyal yolları arasındaki etkileşimi destekler niteliktedir. HER2-pozitif hücrelerin ER-pozitifliği kazanması, bu hücrelerde HER2 seviyelerinin azalmasına ve bazı hücrelerin HER2-negatif dönüşmesine neden olur. Heterojenite de muhtemelen bu mekanizmanın bir ürünü olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda çok değişkenli analiz sonucunda yalnızca PR durumu ve TIL skorunun tedavi yanıtını etkileyen bağımsız etkenler olduğu gösterilmiştir. HER2 heterojenitesi ve yaş > 40 olması ise tedavi yanıtı üzerine bağımsız olarak etkili faktörler değildir. Bulgularımızla benzer şekilde Hou ve ark. (7) ile Krystel-Whittemore ve ark. (60) PR durumunun tedavi yanıtı üzerine bağımsız olarak etkili olduğunu saptamıştır. TIL skoruna baktığımızda çalışmamızdaki gibi çok değişkenli analiz sonucu anlamlı bulanlar Orrù (104) ve Heppner (107) tarafından yürütülen çalışmalardır. Bulgularımızın aksine de Haas ve ark. (13) ise TIL skorunun tedavi yanıtını etkileyen bağımsız bir faktör olmadığını gözlemlemiştir.

Sağ tarafta lokalize tümörlerin tedaviye daha iyi yanıt vermesi, Orrù ve ark. (104) tarafından yapılan çalışmada çok değişkenli analiz sonucunda da anlamını korumuştur. pT evresine baktığımızda, Chen ve ark. (59) bunun tedavi yanıtlarını etkileyen bağımsız bir faktör olduğunu bulmuştur. Atallah ve ark. (106) ile Krystel-Whittemore ve ark. (60) çalışmalarında histolojik derecenin çok değişkenli analiz sonucu tedavi yanıtını etkileyen bağımsız bir prediktif faktör olduğunu bulmuş; Orrù ve ark. (104) ise kendi çalışmalarında böyle bir ilişki olmadığını gözlemlemiştir. Tek değişkenli analiz sonucu ER durumunu tedavi yanıtı ile ilişkili bulan Hou ve ark. (7) ile Krystel-Whittemore ve ark. (60), çok değişkenli analiz sonucu ER'nin tedavi yanıtlarını etkileyen bağımsız bir faktör olmadığını görmüştür. Ki67 proliferasyon indeksine bakıldığında %15 ve üzeri olmasının tedavi yanıtlarını diğer faktörlerden bağımsız olarak etkilediği Chen ve ark. (59) tarafından görülmüştür.

Çalışmamızda heterojenitenin tedavi yanıtlarını etkileyen bağımsız bir parametre olmadığı saptanmıştır. Bulgularımızla benzer şekilde de Haas ve ark. (13)

da çok değişkenli analiz sonucu heterojenitenin tedavi yanıtına etki etmediğini görmüştür. Bu bulgulardan farklı olarak Hou ve ark. (7)'nin çalışmasında heterojenite, tedavi yanıtını etkileyen bağımsız bir faktör olarak tanımlanmıştır. Lee ve ark. (12) HER2/CEP17 oranı kullanarak tanımlanan bölgesel heterojenitenin tedavi yanıtı, progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımı bağımsız olarak etkilediğini bulmuştur. Bu çalışmada ayrıca düşük/belirsiz HER2 amplifikasyonu ve HER2/CEP17 oranı > 2.2 olan %80'den az hücrenin olması da tedavi yanıtları ve sağkalım oranları ile bağımsız olarak ilişkili saptanmıştır. Lee ve ark. (93) HR-pozitif alt grubunda bölgesel heterojenite ve HER2/CEP17 oranı > 2 olan %75'ten az hücre olmasının hastalısız sağkalımı etkileyen bağımsız faktörler olduğunu görmüştür. Bu sebeple intratümöral HER2 heterojenitesinin özellikle HR+/HER2+ grupta raporlanması önerilmiştir. Seol (3) ve ark. ise hormon reseptör durumuna bakılmaksızın hem genetik hem de bölgesel HER2 heterojenitesinin hastalısız sağkalım üzerine bağımsız olarak etkili olduğunu saptamıştır. Benzer şekilde Shen ve ark. (87) heterojenitenin uzak metastaz ve ölüm riski ile bağımsız olarak ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgulardan farklı olarak Perez ve ark. (90) yaptıkları çalışmada heterojenitenin çok değişkenli analiz sonucunda progresyonsuz sağkalım üzerine etkili olmadığını bulmuştur.

HER2 ile heterojen boyanma paternleri patologlar için yabancı olmayan bir kavram olsa da rutin olarak raporlanmadığından klinik etkileri ile ilgili farkındalık pek yaygın değildir. HER2 intratümöral heterojenitesi uzun yıllardan beri pek çok çalışmaya konu olmuş, klinikopatolojik özellikleri ve klinik gidişatı araştırılmıştır. HER2 heterojenitesi İHK, ISH veya GPA yöntemlerinin herhangi biri kullanılarak gösterilebilir. Heterojeniteyi göstermek için farklı yöntemler ve farklı kriterlerin tanımlanmış olması, bazı çalışmalardaki örneklem kümelerinin HER2-pozitif grup yanı sıra HER2-negatif tümörleri de içermesi, çalışmalarda tedavi dönemlerinin (neoadjuvan/adjuvan/metastatik) ve dahil edilen materyallerin (biyopsi/rezeksiyon) farklılık göstermesi çalışmalar arası kıyaslama yapmayı zorlaştırmaktadır. ASCO/CAP yalnızca ISH yöntemi ile heterojenite kavramını tanımlamış, diğer yöntemler kullanılarak heterojenite değerlendirmesinden bahsetmemiştir. Çalışmalara yol göstermesi ve çalışmalar arası karşılaştırmaların daha doğru yapılabilmesi için, özellikle tüm laboratuvarların en sık kullandığı İHK yöntemi ile de heterojenitenin tanımlanması gereklidir.

HER2 durumu rutin patoloji pratiğinde ilk etapta İHK uygulayarak ve skor 2 olarak değerlendirilirse FISH yöntemi yapılarak raporlanmaktadır. ASCO/CAP kılavuzları an itibariyle İHK ile heterojen boyanma paternlerinin raporlanması ile ilgili bir öneride bulunmasa da raporlarda kuvvetli ve komplet membranöz boyanma gösteren hücrelerin yüzdesine yer verilmelidir. FISH ile değerlendirme yaparken de heterojen olguların atlanmaması için sinyal sayımının tümörün en az iki farklı alanında yapılması önemlidir. Çalışmamızda kuvvetli ve komplet membranöz boyanma gösteren hücre yüzdesinin tedavi yanıtlarını etkilediğini saptamasak da bu ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur (11,12).

Tru-cut biyopsi materyalinde HER2 İHK skor 2 olarak değerlendirilen olgularda genellikle rezeksiyon spesimeninde HER2 testi tekrar edilmektedir. Buna ek olarak yüksek histolojik derece ve agresif klinik seyir eşlik ediyorsa negatif olarak skorlanan tümörlerde de testin tekrar edilmesi, olası HER2-pozitif komponentin kaçırılmaması açısından anlamlı olacaktır. Greer ve ark. (113) aynı olguya ait tru-cut biyopsi ve operasyon spesimeni arasındaki biyobelirteçlerin uyumunu değerlendirdiği çalışmada HER2 durumunda belirgin uyumsuzluk saptamıştır. Bu olguların hemen hepsinde HER2 ekspresyonunun heterojen olduğunu gözlemlemiş ve heterojeniteyi büyük boyutlu, multifokal/multisentrik tümörlerde daha sıklıkla tanımlamıştır. Literatürde de heterojen HER2 ekspresyonu/amplifikasyonunun sonuçların yanlış değerlendirilmesine sebep olduğu bildirilmektedir.

HER2 heterojenitesini klinisyenlerin nasıl yorumladığına baktığımızda Muller ve ark. (1) biyopsi materyalinde %30 hücrede HER2-pozitifliği gösteren heterojen bir olguyu örnek göstermiştir. Bu olgu başka bir merkezde opere edilmiş, rezeksiyon spesimeninde HER2 testi FISH yapılarak tekrarlanmış ve negatif olarak sonuçlanmıştır. Bunun sonucunda klinisyen ilk biyopsideki HER2 sonucunu yanlış pozitif kabul ederek tedaviye anti-HER2 ilaçları eklememiştir. Yazarlar HER2 durumu değerlendirilirken tümörün tamamının dikkate alınması, biyopsi materyalinin küçük bir alanı temsil ettiği düşünülerek bu sonuçların göz ardı edilmemesi hususunda uyarıda bulunmaktadır. Özellikle tedavisiz kaldığında çok daha kötü seyreden HER2-pozitif meme kansinimleri için bu son derece önemlidir.

Günlük pratikte meme tümörleri için uygulanan İHK paneli çoğu zaman tek bir blok üzerinden yapılmaktadır. Lewis ve ark. (114) skor 2 şeklinde değerlendirilen

tümörlerin %68'inde aynı ya da farklı bir blokta test tekrar edildiğinde farklı skor verildiğini gözlemlemiş ve bundan heterojeniteyi sorumlu tutmuştur. Literatürdeki çalışmalar heterojeniteyi en sık skor 2 tümörlerde tanımlasa da nihai skoru 3 olan ve heterojenite gösteren bir olgunun, İHK uygulanan bloğunda skor 1/0 bir alanın denk gelmesi ve başka bir blok test edilmediği için pozitif alanın kaçırılması da ihtimal dahilindedir. Heterojenite riski taşıyan tümörler ayırt edilebilirse bu olgularda birden fazla bloğun incelenmesi önerilebilir. Bu amaçla HER2 heterojenitesinin klinikopatolojik özelliklerini doğru tanımlayabilmek patoloğun iş yükünü azaltırken hastaların sağkalımına da önemli katkı sağlayacaktır.

Hou ve ark. (103) 2023 yılında yayınladıkları bir makalede, HER2 ekspresyonu homojen ise hormon reseptör durumuna göre HER2 hedefli tedaviye endokrin tedavi ya da kemoterapi eklenmesini; heterojen ise hormon reseptör durumuna bakılmaksızın mutlaka kemoterapinin eklenmesini neoadjuvan dönem için önermiştir. 2024 yılında yayınlanan güncel NCCN rehberleri de neoadjuvan tedavi için anti-HER2 tedavisi ile birlikte kemoterapötik ajanların uygulanmasını önermektedir. Neoadjuvan tedavi sonrası rezidü tümör yoksa 1 yıla kadar trastuzumab ± pertuzumab; tümör mevcutsa tek başına T-DM1 uygulanır (69).

Yapılan çalışmalar ışığında, erken evre HER2-pozitif meme karsinomu tedavisinde kemoterapötikleri olabildiğince azaltarak HER2-hedefli tedavilerin tek başına uygulanması ("de-escalation" stratejisi) heterojenite varlığında mantıklı bir seçim olmayabilir. HER2 ile uniform ekspresyon/amplifikasyon göstermeyen tümörlerde etkinliği gösterilmiş T-DXd gibi ajanların bu grupta kullanılması daha faydalı olabilir (10). 2022 yılında Nakajima ve ark. (92) T-DXd uygulanan metastatik HER2-pozitif meme karsinomlarını retrospektif olarak incelemiştir. Bu çalışmada HER2 heterojenitesi saptanan 2 olguda parsiyel yanıt ve prograse olmadan stabil dönem elde edilmiştir. Ayrıca ilk uygulanan HER2 hedefli tedaviden sonra İHK skoru negatife dönüşen 4 olgunun 3'ünde parsiyel yanıt elde edilmiştir. Bu olguların hiçbirinin daha önce uygulanan T-DM1'e yanıt vermediği ve T-DXd'den fayda gördüğü belirtilmiştir. Bulgular umut verici olmakla birlikte, T-DXd'nin etkinliğini daha doğru şekilde kıyaslayabilmek için, heterojenite gösteren ve göstermeyen tümörler arasında T-DXd grubu ve standart tedavi kontrol grubu oluşturularak tedavi yanıtlarını kıyaslayacak prospektif çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızın en büyük kısıtlılığı HER2 ile farklı şiddetlerdeki boyanma yüzdelерinin tek bir patoloğ tarafından oranlanıp bu yüzdelere göre heterojenitenin sınıflamanmasıdır. Slaytın tamamına bakarak yüzde verilmesi gereken diğер tüm değeriendirmeler gibi, HER2 İHK değeriendirmesi de gözlemci içi ve gözlemciler arası değerişkenliğı yüksek olan bir yöntemdir. Çalışma kapsamında heterojenite araştırılırken, doğruluk ve tutarlılığı arttırmak adına otomatize sayım sistemlerinden faydalanmak daha akılcı bir yaklaşım olabilir. Çalışmamızın bir diğер kısıtlılığı verilen tedavi rejimlerinin ayrıntılı olarak bilinmemesidir. Ek olarak HER2 boyanma paternleri ile sağkalım verilerinin kıyaslanmamıştır. Tedavi yanıtı nüks ile ilişkilendirilen bir parametredir ve sağkalımı dolaylı olarak etkilemektedir.

Sonuç olarak intratümöral HER2 heterojenitesi daha sıklıkla düşük HER2 ekspresyon/amplifikasyon seviyesine sahip tümörlerde görülse de İHK ile skor 3 olarak değeriendirilen olgularda da karşımıza çıkan bir bulgudur. HER2 değeriendirilirken heterojenite kavramı akılda tutulmalı, güncel rehberin belirttiğı şekilde kuvvetli ve komplet membranöz boyanan hücrelerin yüzdesi İHK skoru ile birlikte raporda yazılmalıdır. Bu sayede HER2 hedefli tedaviye daha kötü yanıt verme ihtimali olan olgular önceden belirlenip daha sıkı takip edilebilir ya da yeni ajanların kullanımını için aday olabilir.

6. SONUÇLAR

1. Olguların tanı anındaki yaşları 22 ve 75 arasında değişmekte olup ortalaması 48.85 (SS: 10.72) olarak bulundu.
2. Olguların 10'u (%8.7) skor 2, 105'i (%91.3) skor 3 idi.
3. Tedavi yanıtlarına göre gruplandığında 72 olgu (%62.6) pCR, 43 olgu (%37.4) non-pCR şeklinde yanıt verdi.
4. Skor 2 olan 10 olgunun 5'inde (%50) pCR, skor 3 olan 105 olgunun 67'sinde (%63.8) pCR görüldü.
5. MD Anderson Rezidü Kanser Yüklü sınıflamasına göre non-pCR olan 43 olgunun 8'i (%18.6) RCB-I, 25'i (%58.1) RCB-II, 6'sı (%14) RCB-III olarak sınıflandı. 4 olgu (%9.3) skorlanmadan non-pCR olarak kaydedildi.
6. Moleküler sınıflamaya göre 80 olgu (%69.5) luminal HER2, 35 olgu (%30.5) HER2-zengin tipti.
7. Luminal HER2 tümörlerde 47 olgu (%58.75) pCR, HER-zengin tümörlerde 25 olgu (%71.4) pCR olarak dağılım gösterdi.
8. HER2 ile boyanma paternleri 9 olguda (%7.8) fokal, 31 olguda (%27) heterojen, 75 olguda (%65.2) homojen olarak sınıflandı.
9. Fokal boyanma gösteren olguların 4'ünde kümesel (%44.4), 4'ünde mozaik (%44.4), 1'inde (%11.2) hem kümesel hem mozaik boyanma saptandı. Heterojen boyanma gösteren olguların 4'ünde (%12.9) kümesel, 23'ünde (%74.2) mozaik, 4'ünde (%12.9) hem kümesel hem mozaik boyanma saptandı.
10. Fokal boyanma paterni heterojen boyanmaya dahil edildiğinde, 115 olgunun 40'ında (%34.8) heterojenite saptandı.
11. Tek değişkenli analizde;
 - Yaş > 40 olması ile pCR oranları arasında **“sınırdan anlamlı” istatistiksel ilişki bulundu.**
 - HER2 ile fokal, heterojen ve homojen boyanma paternleri ile pCR ve non-pCR tedavi yanıtları arasında **istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.**
 - Nonhomojen grupta homojen gruba göre daha az pCR oranları saptandı ve bu **fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.**

- TIL skorunun tedavi yanıtlarını etkilediği **istatistiksel olarak anlamlı bulundu.**
- TIL skoru $> \%10$ olan olgularda $\leq \%10$ olan olgulara göre daha fazla pCR oranı saptandı ve **aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.**
- PR durumu ile pCR ve non-pCR tedavi yanıtları arasında **istatistiksel anlamlı ilişki bulundu.**

12. Çok değişkenli analizde;

- Yalnızca TIL skoru ve PR durumunun tedavi yanıtlarını etkileyen bağımsız faktörler olduğu bulundu.
- TIL skorundaki her %1'lik artışın pCR olasılığını **1.025 kat arttırdığı bulundu.**
- PR-pozitifliğinin pCR olasılığını **0.331 kat azalttığı bulundu.**
- Yaş > 40 olmasının tedavi yanıtını etkilemesi durumunun geçersiz olduğu bulundu.
- HER2 nonhomojen boyanma paterninin tedavi yanıtını etkilemesi durumunun geçersiz olduğu bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Muller KE, Marotti JD, Tafe LJ. Pathologic Features and Clinical Implications of Breast Cancer with HER2 Intratumoral Genetic Heterogeneity. *Am J Clin Pathol*. 2019 Jun 5;152(1):7–16.
2. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond MEH, Hayes DF, Mcshane LM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2023 Aug 1;41(22):3867–72.
3. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: Its clinicopathological significance. *Modern Pathology*. 2012 Jul;25(7):938–48.
4. Hanna W, Nofech-Mozes S, Kahn HJ. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer - A rare event. *Breast Journal*. 2007 Mar;13(2):122–9.
5. Grassini D, Cascardi E, Sarotto I, Annaratone L, Sapino A, Berrino E, et al. Unusual Patterns of HER2 Expression in Breast Cancer: Insights and Perspectives. Vol. 89, *Pathobiology*. S. Karger AG; 2022. p. 278–96.
6. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. Vol. 72, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2021. p. 123–35.
7. Hou Y, Nitta H, Wei L, Banks PM, Portier B, Parwani A V., et al. HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with incomplete response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Nov 1;166(2):447–57.
8. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, Fitzgibbons PL, Hicks DG, Jenkins RB, et al. CAP Laboratory Improvement Programs Genetic Heterogeneity in HER2 Testing in Breast Cancer Panel Summary and Guidelines. Vol. 133, *Arch Pathol Lab Med*. 2009.
9. Wolff AC, Elizabeth M, Hammond H, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018;36:2105–22. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2018>.
10. Filho OM, Viale G, Stein S, Trippa L, Yardley DA, Mayer IA, et al. Impact of her2 heterogeneity on treatment response of early-stage her2-positive breast cancer: Phase ii neoadjuvant clinical trial of t-dm1 combined with pertuzumab. *Cancer Discov*. 2021;11(10):2474–87.
11. Horii R, Nitta H, Nojima M, Maruyama R, Ueno T, Ito Y, et al. Predictive significance of HER2 intratumoral heterogeneity, determined by simultaneous gene and protein analysis,

- for resistance to trastuzumab-based treatments for HER2-positive breast cancer. *Virchows Archiv*. 2021 Jul 1;479(1):13–21.
12. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, et al. HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with her2-positive metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2014 Dec 1;142(6):755–66.
 13. de Haas SL, Slamon DJ, Martin M, Press MF, Lewis GD, Lambertini C, et al. Tumor biomarkers and efficacy in patients treated with trastuzumab emtansine + pertuzumab versus standard of care in HER2-positive early breast cancer: an open-label, phase III study (KRISTINE). *Breast Cancer Research*. 2023 Dec 1;25(1).
 14. Paul P. Rosen, Edi Brogi, Syed A. Hoda, Frederick C. Koerner. *Rosen's Breast Pathology*. 4th Edition. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2014.
 15. Stacey E. Mills. *Histology for Pathologists*. 5th Edition. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2020.
 16. John R. Goldblum, Laura W. Lamps, Jesse K. McKenney, Jeffrey L. Myers. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. In: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 11th Edition. ELSEVIER; 2018. p. 1434–527.
 17. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. *An Atlas of Subgross Pathology of the Human Breast With Special Reference to Possible Precancerous Lesions* 1,2.
 18. O W Petersen, P E Høyer, B van Deurs. Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Res*. 1987 Nov 1;
 19. Silva JS, Georgiade GS, Dilley WG, Mccarty Sr KS, Jr SAW, Mccarty Jr KS, et al. Menstrual Fluid Cycle-Dependent Variations of Breast Cyst Proteins and Sex Steroid Receptors in the Normal Human Breast.
 20. Cowan DF, Herbert TA. Involution of the breast in women aged 50–104 years: A histopathological study of 102 cases. *Surgical Pathology*. 1989;323–33.
 21. Connolly JL, Schnitt SJ. Benign breast disease resolved and unresolved issues. Vol. 71, *Cancer*. 1993. p. 1187–9.
 22. Page DL. Cancer risk assessment in benign breast biopsies. *Hum Pathol*. 1986;17(9):871–4.
 23. Abdel-Fatah TMA, Powe DG, Hodi Z, Lee AHS, Reis-Filho JS, Ellis IO. High Frequency of Coexistence of Columnar Cell Lesions, Lobular Neoplasia, and Low Grade Ductal Carcinoma In Situ With Invasive Tubular Carcinoma and Invasive Lobular Carcinoma. 2007.
 24. Leibl S, Regitnig P, Moinfar F. Flat epithelial atypia (DIN 1a, atypical columnar change): An underdiagnosed entity very frequently coexisting with lobular neoplasia. *Histopathology*. 2007 Jun;50(7):859–65.
 25. Collins LC, Achacoso NA, Nekhlyudov L, Fletcher SW, Haque R, Quesenberry CP, et al. Clinical and pathologic features of ductal carcinoma in situ associated with the presence

- of flat epithelial atypia: An analysis of 543 patients. *Modern Pathology*. 2007 Nov;20(11):1149–55.
26. Sams SB. Flat epithelial atypia is a common subtype of B3 breast lesions and is associated with noninvasive cancer but not with invasive cancer in final excision histology. *Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine*. 2011 Jan;2011:28–9.
 27. Emad A, Rakha, Kimberly H, Allison, Ian O, Ellis, Frédérique, Penault-Llorca, Anne, Vincent-Salomon, Shinobu Masuda, et al. Invasive breast carcinoma: General overview. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board Breast tumours [Internet]. 5th Edition. Lyon; 2019.
 28. Bright CJ, Rea DW, Francis A, Feltbower RG. Comparison of quadrant-specific breast cancer incidence trends in the United States and England between 1975 and 2013. *Cancer Epidemiol*. 2016 Oct 1;44:186–94.
 29. Walker G V., Smith GL, Perkins GH, Oh JL, Woodward W, Yu TK, et al. Population-based analysis of occult primary breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer*. 2010 Sep 1;116(17):4000–6.
 30. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
 31. Garfinkel L, Boring CC, Heath CW. Changing trends: An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer*. 1994;74(1 S):222–7.
 32. Sondik EJ. Breast cancer trends Incidence, mortality, and survival. *Cancer*. 1994;74(3 S):995–9.
 33. Stuckey AR, Onstad MA. Hereditary breast cancer: An update on risk assessment and genetic testing in 2015. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Aug 1;213(2):161–5.
 34. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. Vol. 16, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention; 2015. p. 2177–85.
 35. Gutmacher AE, Collins FS, Wooster R, Weber BL. Breast and Ovarian Cancer [Internet]. Vol. 348, *n engl j med*. 2003. Available from: <http://www.genome.ucsc.edu>
 36. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. Vol. 223, *Journal of Pathology*. John Wiley and Sons Ltd; 2011. p. 308–18.
 37. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. Vol. 57, *Histopathology*. 2010. p. 171–92.
 38. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61–70.

39. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;403–10.
40. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours [Internet]. 5th Edition. Vol. 2. Lyon; 2019.
41. Perou CM, Sorlie T, Elsen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *letters to nature* [Internet]. 2000; Available from: www.stanford.edu/molecularportraits/
42. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications [Internet]. 2001. Available from: www.winstat.com
43. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007 May 10;8(5).
44. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. 2013 Sep 1;24(9):2206–23.
45. Erasmo Orrantia-Borunda, Patricia Anchondo-Nuñez, Lucero Evelia Acuña-Aguilar, Francisco Octavio Gómez-Valles, Claudia Adriana Ramírez-Valdespino. Subtypes of Breast Cancer. In: *Breast Cancer* [Internet]. 2022.
46. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Jul 10;28(20):3271–7.
47. Giuliano M, Trivedi M V., Schiff R. Bidirectional crosstalk between the estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor 2 signaling pathways in breast cancer: Molecular basis and clinical implications. Vol. 8, *Breast Care*. S. Karger AG; 2013. p. 256–62.
48. Todorović-Raković N, Nešković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D. Cross-talk between ER and HER2 in breast carcinoma. Vol. 14, *Archive of Oncology*. 2006. p. 146–50.
49. Pali U, Ayasinghe WJ, Ichard R, Aylor T, Ohn J, Oyages B. Is age at diagnosis an independent prognostic factor for survival following breast cancer? Vol. 75, *ANZ J. Surg*. 2005.
50. Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. Vol. 350, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 1993.
51. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181–7.

52. Houssami N, Macaskill P, Luke Marinovich M, Morrow M. The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: A meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2014 Mar;21(3):717–30.
53. Rakha EA, Martin S, Lee AHS, Morgan D, Pharoah PDP, Hodi Z, et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2012 Aug 1;118(15):3670–80.
54. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Edition. 2018.
55. Maguire A, Brogi E. Sentinel lymph nodes for breast carcinoma: An update on current practice. Vol. 68, *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 152–67.
56. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM, Anderson SJ, Harlow SP, et al. Effect of Occult Metastases on Survival in Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011 Feb 3;364(5):412–21.
57. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E, Fineberg S, Shear J, Turner S, et al. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. Vol. 7, *npj Breast Cancer*. Nature Research; 2021.
58. Arpino G, Generali D, Sapino A, Lucia DM, Frassoldati A, de Laurentis M, et al. Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective. Vol. 22, *Breast*. Churchill Livingstone; 2013. p. 109–20.
59. Chen HL, Chen Q, Deng YC. Pathologic complete response to neoadjuvant anti-HER2 therapy is associated with HER2 immunohistochemistry score in HER2-positive early breast cancer. *Medicine (United States)*. 2021 Nov 5;100(44).
60. Krystel-Whittemore M, Xu J, Brogi E, Ventura K, Patil S, Ross DS, et al. Pathologic complete response rate according to HER2 detection methods in HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. Vol. 177, *Breast Cancer Research and Treatment*. Springer New York LLC; 2019. p. 61–6.
61. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Oct 1;25(28):4414–22.
62. de Boniface J, Frisell J, Bergkvist L, Andersson Y. Breast-conserving surgery followed by whole-breast irradiation offers survival benefits over mastectomy without irradiation. *British Journal of Surgery*. 2018 Nov 1;105(12):1607–14.
63. Giuliano AE, Ballman K V., McCall L, Beitsch PD, Brennan MB, Kelemen PR, et al. Effect of axillary dissection vs no axillary dissection on 10-year overall survival among women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2017 Sep 12;318(10):918–26.
64. Pierce LJ. The use of radiotherapy after mastectomy: A review of the literature. Vol. 23, *Journal of Clinical Oncology*. 2005. p. 1706–17.

65. Mouabbi JA. Breast Cancer Treatment Protocols [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 25]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/2006464-overview?form=fpf#a3>
66. Dowling GP, Keelan S, Toomey S, Daly GR, Hennessy BT, Hill ADK. Review of the status of neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. Vol. 13, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
67. Cortesi L, Rugo HS, Jackisch C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. Vol. 16, *Targeted Oncology*. Adis; 2021. p. 255–82.
68. Debieu V, De Caluwé A, Wang X, Piccart-Gebhart M, Tuohy VK, Romano E, et al. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. Vol. 9, *npj Breast Cancer*. Nature Research; 2023.
69. National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2024.
70. Riese DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. Vol. 20, *BioEssays*. John Wiley & Sons, Inc; 1998.
71. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. Vol. 25, *Cancer Cell*. Cell Press; 2014. p. 282–303.
72. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Annals of Oncology*. 2001;12(SUPPL. 1).
73. Moasser MM. The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Vol. 26, *Oncogene*. 2007. p. 6469–87.
74. Lv Q, Meng Z, Yu Y, Jiang F, Guan D, Liang C, et al. Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.
75. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: At last, cancer therapy meets systems biology. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012. p. 553–63.
76. Pegram M, Jackisch C, Johnston SRD. Estrogen/HER2 receptor crosstalk in breast cancer: combination therapies to improve outcomes for patients with hormone receptor-positive/HER2-positive breast cancer. Vol. 9, *npj Breast Cancer*. Nature Research; 2023.
77. Zhao S, Liu XY, Jin X, Ma D, Xiao Y, Shao ZM, et al. Molecular portraits and trastuzumab responsiveness of estrogen receptor-positive, progesterone receptor-positive, and HER2-positive breast cancer. *Theranostics*. 2019;9(17):4935–45.
78. Loibl S, Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Paepke S, Lehmann A, Rezai M, et al. PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Oct 10;32(29):3212–20.
79. Ferrari A, Vincent-Salomon A, Pivot X, Sertier AS, Thomas E, Tonon L, et al. A whole-genome sequence and transcriptome perspective on HER2-positive breast cancers. *Nat Commun*. 2016 Jul 13;7.

80. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmuüller S, Lebeau A, Kreienberg R, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: Results from the TECHNO Trial of the AGO and GBG study groups. In: *Journal of Clinical Oncology*. 2011. p. 3351–7.
81. Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: Results from the GeparQuattro study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Apr 20;28(12):2024–31.
82. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): Follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol*. 2014;15(6):640–7.
83. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Gilles Romieu C, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer [Internet]. 2006. Available from: www.nejm.org
84. Ocaña A, Amir E, Pandiella A. HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates. Vol. 22, *Breast Cancer Research*. BioMed Central Ltd.; 2020.
85. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Jul 7;387(1):9–20.
86. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.
87. Shen T, Nitta H, Wei L, Parwani A V., Li Z. HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with distal metastasis and overall survival in HER2-positive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 Jun 1;181(3):519–27.
88. Hou Y, Nitta H, Li Z. HER2 gene protein assay is useful to determine HER2 status and evaluate HER2 heterogeneity in HER2 equivocal breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(1):89–95.
89. Allott EH, Geradts J, Sun X, Cohen SM, Zirpoli GR, Khoury T, et al. Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Research*. 2016 Jun 28;18(1).
90. Perez EA, De Haas SL, Eiermann W, Barrios CH, Toi M, Im YH, et al. Relationship between tumor biomarkers and efficacy in MARIANNE, a phase III study of trastuzumab emtansine ± pertuzumab versus trastuzumab plus taxane in HER2-positive advanced breast cancer. *BMC Cancer*. 2019 May 30;19(1).
91. Denkert C, Lambertini C, Fasching PA, Pogue-Geile KL, Mano MS, Untch M, et al. Biomarker Data from the Phase III KATHERINE Study of Adjuvant T-DM1 versus

- Trastuzumab for Residual Invasive Disease after Neoadjuvant Therapy for HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2023 Apr 15;29(8):1569–81.
92. Nakajima H, Harano K, Nakai T, Kusuhara S, Nakao T, Funasaka C, et al. Impacts of clinicopathological factors on efficacy of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast*. 2022 Feb 1;61:136–44.
 93. Lee HJ, Kim JY, Park SY, Park IA, Song IH, Yu JH, et al. Clinicopathologic significance of the intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in HER2-positive breast cancer patients treated with adjuvant trastuzumab. *Am J Clin Pathol*. 2015 Oct 1;144(4):570–8.
 94. Rye IH, Trinh A, Sætersdal AB, Nebdal D, Lingjærde OC, Almendro V, et al. Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER2+ breast tumors. *Mol Oncol*. 2018 Nov 1;12(11):1838–55.
 95. Schrijver WAME, Suijkerbuijk KPM, Van Gils CH, Van Der Wall E, Moelans CB, Van Diest PJ. Receptor conversion in distant breast cancer metastases: A Systematic Review and Meta-analysis. Vol. 110, *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press; 2018. p. 568–80.
 96. Wakatsuki T, Yamamoto N, Sano T, Chin K, Kawachi H, Takahari D, et al. Clinical impact of intratumoral HER2 heterogeneity on trastuzumab efficacy in patients with HER2-positive gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2018 Nov 1;53(11):1186–95.
 97. Yagi S, Wakatsuki T, Yamamoto N, Chin K, Takahari D, Ogura M, et al. Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity on trastuzumab efficacy using endoscopic biopsy specimens in patients with advanced HER2 positive gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2019 May 1;22(3):518–25.
 98. Kaito A, Kuwata T, Tokunaga M, Shitara K, Sato R, Akimoto T, et al. HER2 heterogeneity is a poor prognosticator for HER2-positive gastric cancer. *World J Clin Cases*. 2019 Aug 1;7(15):1964–77.
 99. Yoshida H, Nishikawa T, Matsumoto K, Mori M, Hirashima Y, Takehara K, et al. Histopathological features of HER2 overexpression in uterine carcinosarcoma: proposal for requirements in HER2 testing for targeted therapy. *Virchows Archiv*. 2021 Jun 1;478(6):1161–71.
 100. Rottmann D, Snir OL, Wu X, Wong S, Hui P, Santin AD, et al. HER2 testing of gynecologic carcinosarcomas: tumor stratification for potential targeted therapy. *Modern Pathology*. 2020 Jan 1;33(1):118–27.
 101. Shen S, Ma W, Brown D, Da Cruz Paula A, Zhou Q, Iaasonos A, et al. HER2 Genetic Intratumor Heterogeneity Is Associated With Resistance to Trastuzumab and Trastuzumab Emtansine Therapy in Recurrent High-Grade Endometrial Cancer. *Modern Pathology*. 2023;
 102. Rottmann D, Hisham Assem H, Matsumoto N, Wong S, Hui P, Buza N. Does Specimen Type Have an Impact on HER2 Status in Endometrial Serous Carcinoma? Discordant

HER2 Status of Paired Endometrial Biopsy and Hysterectomy Specimens in the Presence of Frequent Intratumoral Heterogeneity. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2021;

103. Hou Y, Nitta H, Li Z. HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept. Vol. 15, *Cancers*. MDPI; 2023.
104. Orrù S, Pascariello E, Pes B, Rallo V, Barbara R, Muntoni M, et al. Biomarker dynamics affecting neoadjuvant therapy response and outcome of HER2-positive breast cancer subtype. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
105. Arnould L, Arveux P, Couturier J, Gelly-Marty M, Loustalot C, Ettore F, et al. Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clinical Cancer Research*. 2007 Nov 1;13(21):6404–9.
106. Atallah NM, Alsaleem M, Toss MS, Mongan NP, Rakha E. Differential response of HER2-positive breast cancer to anti-HER2 therapy based on HER2 protein expression level. *Br J Cancer*. 2023 Nov 9;129(10):1692–705.
107. Heppner BI, Untch M, Denkert C, Pfitzner BM, Lederer B, Schmitt W, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes: A predictive and prognostic biomarker in neoadjuvant-treated HER2-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016 Dec 1;22(23):5747–54.
108. Scaltriti M, Nuciforo P, Bradbury I, Sperinde J, Agbor-Tarh D, Campbell C, et al. High HER2 expression correlates with response to the combination of lapatinib and trastuzumab. *Clinical Cancer Research*. 2015 Feb 1;21(3):569–76.
109. Öhlschlegel C, Zahel K, Kradofer D, Hell M, Jochum W. HER2 genetic heterogeneity in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2011 Dec;64(12):1112–6.
110. Yang YL, Fan Y, Lang RG, Gu F, Ren MJ, Zhang XM, et al. Genetic heterogeneity of HER2 in breast cancer: Impact on HER2 testing and its clinicopathologic significance. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Aug;134(3):1095–102.
111. Lee HJ, Park IA, Park SY, Seo AN, Lim B, Chai Y, et al. Two histopathologically different diseases: Hormone receptor-positive and hormone receptor-negative tumors in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;145(3):615–23.
112. Loi S, Dafni U, Karlis D, Polydoropoulou V, Young BM, Willis S, et al. Effects of Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Levels on the Efficacy of Trastuzumab A Secondary Analysis of the HERA Trial. *JAMA Oncol*. 2016 Aug 1;2(8):1040–7.
113. Greer LT, Rosman M, Mylander WC, Hooke J, Kovatich A, Sawyer K, et al. Does breast tumor heterogeneity necessitate further immunohistochemical staining on surgical specimens? In: *Journal of the American College of Surgeons*. 2013. p. 239–51.
114. Lewis JT, Ketterling RP, Halling KC, Reynolds C, Jenkins RB, Visscher DW. Analysis of intratumoral heterogeneity and amplification status in breast carcinomas with equivocal (2+) HER-2 immunostaining. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(2):273–81.