

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ONKOLOJİ VE KANSER BİYOLOJİSİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MEME KARSİNOMUNDA PD-L1 EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ

BETÜL YAŞIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuket ÖZKAVRUK ELİYATKIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
“TPF-17070” Proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji ve Kanser Biyolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Betül YAŞIN tarafından hazırlanan “Meme Karsinomunda PD-L1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2018

Üye (T.D.): Doç. Dr. Nuket ELİYATKIN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Kemal ERGİN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Safiye AKTAŞ	Dokuz Eylül Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her zaman büyük bir özveriyle yaklaşan, hoşgörülle beni dinleyen, tecrübeleriyle bana yol gösteren, bu yoğun süreçte çalışmamla her şekilde ilgilenen ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Nuket ÖZKAVRUK ELİYATKIN'a teşekkürü borç bilirim.

Kendisine danıştığım konularda kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, her durumda beni destekleyen ve motive eden sayın hocam Prof. Dr. Kemal ERGİN'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Hayata ve Kansere bakış açımı değiştiren başta Prof. Dr. Sabri BARUTÇA olmak üzere Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ve Kansere Biyolojisi Anabilim Dalı tüm Öğretim Üyeleri'ne teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Gülden DİNİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi manevi desteklerini ve ilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili Anneme, Babama ve hayatımın ilk anından beri hep yanımda olan biricik abim Abdullah YAŞIN'e ve varlıklarıyla mutlu olduğum canım yeğenlerim Mahmut Can, Halime Dua ve Hazal-Hilal'e bütün kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.2. Kontrol Noktası İnhibitörleri	5
2.2.1 CTLA-4	7
2.2.2 PD-1/ PD-L1	8
2.3. Kanserde İmmünoterapi	11
2.3.1. Meme Kanserinde İmmünoterapi	12
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Araştırmanın Tipi	16
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	16
3.3. Materyal Toplanması Ve Örneklerin Hazırlanması.....	16
3.4. Araştırmanın Sınırlıkları.....	17
3.5. Etik Kurul Onayı	17
3.6.Yöntem	18
3.6.1. Çoklu blok-doku mikroarray hazırlanması.....	18
3.6.2. İHK uygulama prensibi	19
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	20
3.7.1. İstatiksel Yöntem.....	20
4. BULGULAR	21
4.1. Çalışma Olgularının Bulgularına Genel Bakış	21
4.2. İstatistiksel Bulgular	24
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	30

KAYNAKLAR.....	30
EKLER	42
ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ASCO/CAP	: Amerikan Klinik Onkoloji Derneği ve Amerikan Patologlar Derneği (American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists)
CCR5	: C-C kemokin reseptörü 5
CD28	: Cluster of differantiation 28
CD80	: Cluster of differantiation 80
CD 8 +	: Sitotoksik T hücresi
CTLA4	: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4
CXCR3	: C-X-C kemokin Reseptörü 3
ER	: Östrojen Reseptörü
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
ICR	: Immunologic constant of rejection
IFNγ	: İnterferon gama
mAbs	: Moleküler Antikorlar
PD-1	: Programlı Hücre Ölüm Reseptörü 1
PD-L1	: Programlı Hücre Ölüm Ligandı 1
PD-L2	: Programlı Hücre Ölüm Ligandı 2
PgR	: Progesteron Reseptörü
TIL	: Tümör-infiltrate edici Lenfosit
TNBC	: Triple-negatif Meme Kanseri
TCR	: T Hücre Reseptörü
Treg	: Düzenleyici T Hücre
Th17	: Yardımcı T Hücre 17

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Meme Kanserinde Moleküler Sınıflandırma.....	4
Şekil 2. Ko-İnhibitör/Ko-Stimulaör Reseptör Ve Ligandları.....	5
Şekil 3. Tümör Hücrelerinin T Lenfosit İnhibisyonu.....	8
Şekil 4. İmmünoterapi İle Hücre Aktivasyonu.....	10
Şekil 5. IFNy Aracılı T Hücre İnhibisyonu.....	12
Şekil 6. Doku Mikroarray (TMA) Hazırlanması.....	18
Şekil 7. Moleküler Suptiplere Göre Olgu Sayısı.....	22
Şekil 8. Tüm Olgulara Genel Bakış	23
Şekil 9. İmmünohistokimyasal Yöntemle PD-L1 Durumu	23
Şekil 10. Moleküler alttiplere göre PD-L1 durumu	25

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışma Olgularının Özellikleri	22
Tablo 2. Pozitif Olguların Genel Özellikleri	24

ÖZET

MEME KARSİNOMUNDA PD-L1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yaşın B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji ve Kanser Biyolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.

Kanser ve immün sistem arasındaki temel etkileşimlerden biri de PD-L1'in (Programmed cell Death Ligand), PD-1'e (Programmed cell Death) bağlanma sinyalini içermektedir. Normalde immün sistem işleyişinin bir parçası olan PD-1 / PD-L1 interaksiyonunu kanser hücreleri immün sistemden kaçmak için kullanır. Böylece PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 ye bağlanması, T hücre aktivasyonunu engellemektedir.

Değişik çalışmalarda farklı birçok tümörün PD-L1 eksprese ettiği bildirilmiştir. Meme kanserinde ise PD-L1 ekspresyonu, büyük tümör boyutu, yüksek histolojik ve nükleer derece, yüksek proliferasyon indeksi, östrojen reseptörünün negatifliği ve HER2'nin pozitifliği ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek proliferasyon indeksine sahip meme kanseri alt tiplerinde (triple-negatif meme kanseri, HER2+ gibi) daha güçlü immün cevap oluşumu tanımlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında meme karsinomu tümör doku örneklerinden elde edilen PD-L1 ekspresyon profillerinin, doku mikroarray'i kullanılarak immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Parafine gömülü dokulardan kesit alınarak immünohistokimyasal boyamaya geçilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama için Ventana i-View DAB kiti, VENTANA "PD-L1 (SP263) Rabbit Monoclonal Primary" antikorunu kullanılmış ve PD-L1 Ventana Benchmark XD ĐHK otomatik boyama makinesi ile boyanmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda meme karsinomu doku örneklerinde PD-L1 ekspresyonu % 8,4 oranında görülmüştür. Daha agresif tip olarak bilinen HER2+ ile PD-L1 arasında istatistiksel korelasyon saptanmıştır (**p=0,333**). Bununla bağlantılı olarak Lüminal grubun tek bir çatı altında toplanması ile oluşan lüminal dışı grup ile PD-L1 ekspresyonu arasında literatür bilgilerini destekler nitelikte anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (**p=0,029**).

Bu sonuçlar PD-1 / PD-L1 moleküllerinin daha immünojenik olan HER2+ ve triple-negatif subtiplerde yeni bir terapötik hedef olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kontrol noktası blokajı, PD-1, PD-L1, İmmünoterapi, Meme kanseri

ABSTRACT

EVALUATION OF PD-L1 EXPRESSION IN BREAST CARCINOMA

Yasin B. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute Basic Oncology and Biology of Cancer Master Thesis, Aydın, 2018.

One of the key interactions between cancer and the immune system is the connection of PD-L1 (Programmed cell Death Ligand) and PD-1 (Programmed cell Death). The PD-1 / PD-L1 intervention, normally part of the immunological system process, is used by cancer cells to escape from the immune system. Thus, binding of PD-1 to PD-L1 and PD-L2 inhibits T cell activation.

Various studies have reported that many different tumors express PD-L1. In breast cancer, PD-L1 expression has been associated with large tumor size, high histological and nuclear grade, high proliferation index, negative estrogen receptor, and HER2 positivity. A stronger immune response pattern has been described in breast cancer subtypes with high proliferation index (such as triple-negative breast cancer, HER2 +).

In this study, it was aimed to evaluate PD-L1 expression profiles obtained from breast carcinoma tumor tissue samples by immunohistochemical method using tissue microarray. Ventana i-View DAB kit was used for immunohistochemical staining with VENTANA PD-L1 (SP263) Rabbit Monoclonal Primary antibody and stained with PD-L1 Ventana Benchmark XD ĐHK automatic staining machine.

As a result of this study, PD-L1 expression in breast carcinoma tissue specimens was 8.4%. As a more aggressive type, statistical correlation was found between HER2 + and PD-L1 ($p = 0.333$). There was also a significant correlation between PD-L1 expression and the non-luminal group ($p = 0.029$).

These results demonstrate that PD-1 / PD-L1 molecules may be a new therapeutic target for more immunogenic subtypes.

Keywords: Check point inhibitor, PD-1, PD-L1, Immunotherapy, Breast cancer

1. GİRİŞ

Kanser hücreleri, immün sistemden kaçabilme yeteneği ile normal hücrelerden daha bağımsız ve kontrolsüz bir yaşam sürmektedir. Kanser hücrelerinin, bu şekilde immün sistemden kaçabilmesi çok çeşitli ve oldukça karmaşık mekanizmalarla mümkün olmaktadır. Bunlar arasında yabancı tümör antijenlerinin down regülasyon ile immün sistem tarafından fark edilmemesi, anti-enflamatuvar sitokinleri sekrete ederek immün supressif bir mikroçevre oluşturması, ve kanserle savaşıyan immün hücreleri etkin şekilde sessizleştiren immün sistemin negatif düzenleyicilerini eksprese etmesi gibi mekanizmalar sayılmaktadır. Kanser ve immün sistem arasındaki temel etkileşimlerden biri de PD-L1'in (Programmed cell Death Ligand), PD-1'e (Programmed cell Death) bağlanma sinyalinin içermektedir. PD-L1, tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunurken PD-1 aktive B lenfositlerinin ve aktive T lenfositlerinin yüzeyinde bulunmaktadır (Dong ve ark., 2002; Freeman ve ark., 2000). Değişik çalışmalarda farklı birçok tümörün PD-L1 eksprese ettiği bildirilmiştir (Dong ve ark., 2002; Freeman ve ark., 2000; Liu ve ark., 2007; Thompson ve ark., 2004). Buna dayanarak, son zamanlarda, PD-1 ve PD-L1'in etkileşimini inhibe eden ajanların geliştirilmesi, kanser hastalarının tedavisinde umut verici olmuştur. Hem minimal toksisite hem de artmış sağkalım ile potent bir etki sağladığı gösterilmiştir (Dong ve ark., 2002; Freeman ve ark., 2000; Joseph ve ark., 2013; Liu ve ark., 2007; Shin ve Ribas, 2015; Sunshine ve Taube, 2015; Swaika ve ark., 2015; Thompson ve ark., 2004).

Meme kanserinde, PD-L1 ekspresyonu, büyük tümör boyutu, yüksek histolojik ve nükleer derece, yüksek proliferasyon indeksi, östrojen reseptörünün negatifliği ve HER2'nin pozitifliği ile ilişkilendirilmiştir (Muenst ve ark., 2014). Ayrıca, PD-L1 ekspresyonunun azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Emens ve ark., 2014; Muenst ve ark., 2014). Benzer şekilde over kanserinde de PD-L1 ekspresyonunun azalmış sağkalım ile korele olduğu saptanmıştır (Hamanishi ve ark., 2007; Matsuzaki ve ark., 2010).

Birçok solid tümörde, tümöre karşı immün cevabın görüldüğü bilinmektedir, ancak bu immün cevabın immün supresif faktörlerle dengelenmiş olduğu da gösterilmiştir (Schütz ve ark., 2017). Buna ek olarak, invivo şartlarda PD-L1 ekspresyonunun karsinogenezde rol aldığı ve invazyonu arttırdığı, bunun yanı sıra tümör hücreleri tarafından artmış PD-L1 ekspresyonunun spesifik CD8 + T hücrelerini daha az işlevsel hale getirdiği gösterilmiştir (Iwai ve ark., 2002). Bu veriler ışığında kanser hücrelerinde, spesifik antikolar kullanılarak

PD-1 / PD-L1 yolunun bloke edilmesinin, hücrel immünoterapilerde daha güçlü bir tümör regresyonuna yol açtığı invivo ortamda gösterilmiştir (Kodumudi ve ark., 2016).

İmmün modülasyon solid tümörlerde umut verici bir strateji gibi gözükmektedir. İmmün kontrol noktaları, immün sistemden kaçışın ana mekanizmalarından biridir. Tümör hücrelerinde PD-L1'in ekspresyonu, daha düşük aktivite gösteren spesifik CD8+ T hücrelerinin gelişimini yol açmaktadır (Iwai ve ark., 2002). PD-1 veya PD-L1'e karşı antikörlerin etkinliği, çeşitli klinik çalışmalarla araştırılmaktadır ve günümüzde akciğer (Konishi ve ark., 2004), böbrek (Strome ve ark., 2003) ve ileri evre malin melanom (Taube ve ark., 2014) hastalarında etkinliği ispatlanmış, rutin kullanıma girmiştir.

Yüksek proliferasyon indeksine sahip meme kanseri alt tiplerinde (triple-negatif ve HER2+ gibi) de güçlü immün cevap oluşumu tanımlanmıştır. Bu bağlamda triple-negatif meme kanserlerinin %20' sinde PD-L1'in artmış ekspresyonu bildirilmiştir (Mittendorf ve ark., 2014).

Bu çalışma kapsamında meme karsinomu tümör doku örneklerinden elde edilen PD-L1 ekspresyon profillerinin, doku mikroarray'i kullanılarak immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

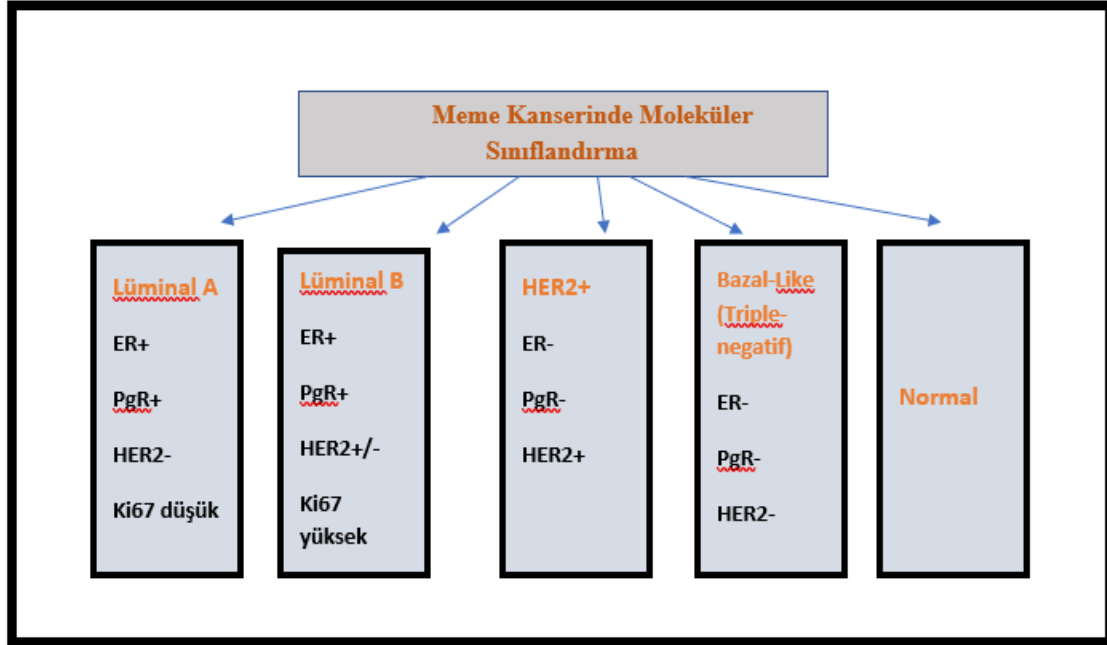
2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Torre ve ark., 2015). Uluslararası Kanser Ajansının 2012 verilerine göre Meme Kanseri dünyada en çok tanı konulan kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır (%11.9). Tüm kanser hastalarının % 25' ini ve kadın kanser ölümlerinin % 15 ini oluşturur. Bu verilere göre dünyada kanser tanısı alan her 4 kadından birinde kanser tipi, meme kanseridir. Bununla birlikte, son yıllarda özellikle kadınlarda meme kanseri insidansının ve meme kanserinden ölümlerin arttığı bilinmektedir. Bu nedenle meme kanserinin erken teşhisi için tarama yöntemlerinin yanı sıra tedavisine yönelik bilimsel çalışmalar her geçen gün artmaktadır.

Meme kanserinde, yakın bir zamana kadar histolojik görünümüne göre sınıflama yapılmaktayken, günümüzde pratik uygulamalara yön veren moleküler sınıflama ilk kez 2000 yılında Perou ve ark. (Ignatiadis ve ark., 2000) tarafından tanımlanmıştır. Bu sınıflamayı gen ekspresyon çalışmaları ışığında östrojen reseptörü (ER) varlığına göre yapmışlardır. Meme kanserinde heterojenitenin anlaşılmasından sonra moleküler özelliklerine göre bazı alt tipler tanımlanmıştır (Foulkes, 2008; Ignatiadis ve ark., 2000; Yersal ve Barutca, 2014). Bu sınıflama ile temelde Lüminal A, Lüminal B, HER2, bazal benzeri (triple-negatif) ve sınıflandırılmayan normal meme kanseri olarak beş gruba ayrılmıştır (Şekil 1).

ER pozitif olan Lüminal A ve Lüminal B tümörler, meme bezlerinin lümene bakan (lüminal) hücrelerine benzer gen ekspresyonu, sitokeratin profili ve diğer lüminal hücrelerle ilişkili belirteçleri bulundurmaktadır. ER negatif tümörlerin bir kısmı -yaklaşık % 15-20'si- HER2 gen amplifikasyonu ya da bu genin protein ürününün aşırı ekspresyonunu gösterebilirler. Bu grup HER2+ tümörler olarak bilinmektedir. Lüminal grup dışı tümörlerin HER2 negatif olanları ise meme bezlerinin normal bazal hücrelerine benzer gen ekspresyonu ve immün aktivite göstermektedir. Bunlarda genellikle ER ve PgR de negatif bulunduğundan bu grup bazal-benzeri (basal-like) ya da triple (üçlü)-negatif meme kanseri olarak adlandırılmaktadır (Eliyatkin ve ark., 2015; Fu ve ark., 2014; Ignatiadis ve ark., 2000, 2014; Tran ve Bedard, 2011)

Yapılan çalışmalar sonucu meme tümörlerinin %75'inde östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PgR) bulunduğu ve çoğu tümörün lüminal grupta olduğu belirtilmiştir (Yersal ve Barutca, 2014).



Şekil 1: Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırma

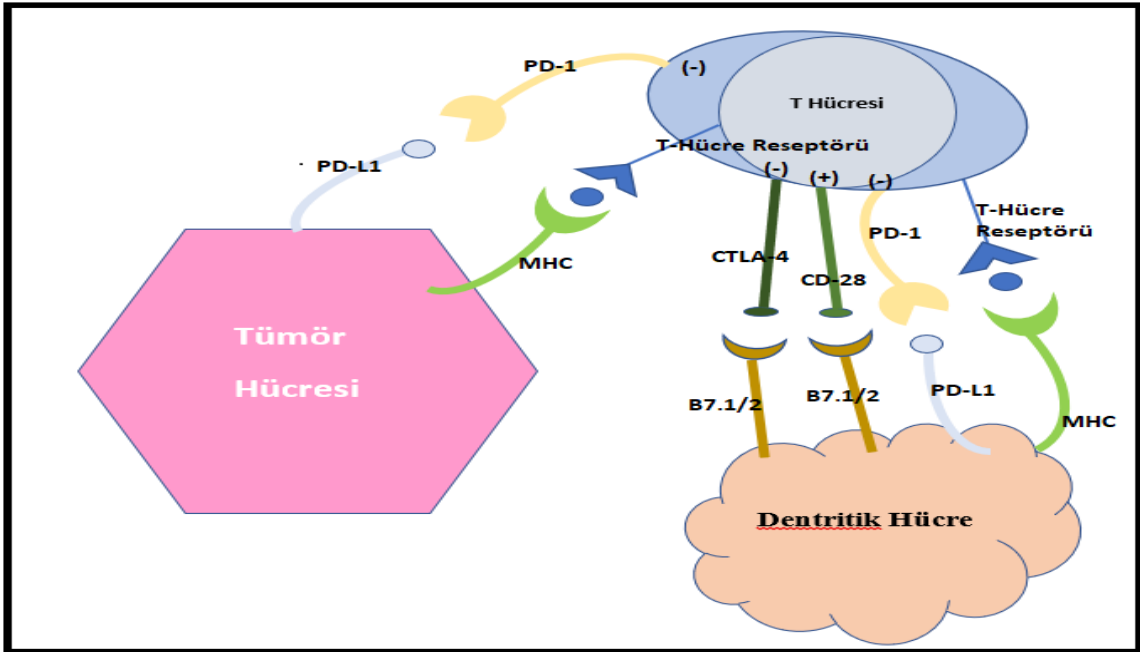
Meme kanseri, tedavisinde belirgin şekilde ilerlemeler olmasına rağmen hâlâ önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Meme kanserinde başlıca prognostik belirteçler; lenf nodu tutulumu, tümör boyutu, metastaz durumu, p53 mutasyonu, tümörün diferansiyasyon derecesi, hastanın yaşı, hormon reseptörlerinin durumu, HER2 ekspresyon seviyesi, Ki67 proliferasyon indeksi, invazyon, tümörün histolojisi, neoadjuvan kemoterapi ve hormon terapiye yanıt durumudur (Anderson ve ark., 2014; Kesse-Adu ve Shousha., 2004; Tsutsui ve ark., 2003). Bu belirteçler meme kanserinde tanı, tedavi ve hastanın yönetimi açısından oldukça faydalıdır. Ancak yine de primer ve sekonder direnç durumu, konvansiyonel antineoplastik ilaçların yan etkileri gibi nedenlerle yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan biri de son zamanlarda çok popüler olan kontrol noktası inhibitörlerinin kullanılmasıdır.

2.2. Kontrol Noktası İnhibitörleri

İmmün kontrol noktaları, immün sistemin normal işleyişini dengede tutan kendi hücrelerine karşı toleransın korunması ve doku hasarını en aza indirmek için bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir.

Meme kanseri de dahil tümörlerin bir çoğu ko-inhibitör molekülleri eksprese edebilirler. Ko-inhibitör moleküller T hücre aracılı immün kontrolden kaçmayı önleyen önemli yapılardır (Bedognetti ve ark., 2016).

T hücreleri, hem adaptif hem de doğuştan gelen efektör mekanizmalarını entegre ederek çeşitli immün tepkileri kontrol edebilir. T hücrelerinin doğru aktivasyonu sağlanması için , T hücresi sağkalımını, proliferasyonunu ve / veya antijenlere tepkisini düzenleyen 2 sinyal gerekmektedir. İlk sinyal antijen tanıma yoluyla T hücresi reseptörü (TCR) tarafından başlatılmaktadır. İkincisi ise, özellikle B7 ailesi üyelerini içeren immün kontrol noktaları olarak da bilinen ko-stimülatör ve / veya ko-inhibitör sinyallerin reseptörleri ve ligandları arasındaki etkileşime aracılık etmektedir (Ceeraz ve ark., 2013; Chen ve Flies, 2013) (Şekil 2).



Şekil 2: Ko-İnhibitör / Ko-Stimülatör Reseptör Ve Ligandları

Fizyolojik koşullar altında, self toleransı ve immün homeostazını sürdürmek için çok önemli olan ko-inhibitör ve ko-stimülatör sinyaller arasında bir denge vardır, böylece immün sistem patojeni etkin bir şekilde temizlediğinde dokuları gereksiz hasarlardan korumaktadır (Jung ve Choi, 2013).

Bu nedenle, ko-stimülatör reseptörlerin agonistleri veya ko-inhibitör reseptörlerin antagonistleri antijen spesifik T hücre yanıtının amplifikasyonuna yol açmaktadır (Maj ve ark., 2013; Sanmamed ve ark., 2015).

İnhibitör reseptörlerin ligandları ile etkileşimi, özel moleküller tarafından bloke edilebilir. Bu özel moleküllerden sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen-4 (CTLA-4) 'e ve yeni bir yaklaşım olan programlanmış hücre ölüm proteini (PD-1) 'ne karşı monoklonal antikolar (mAbs), melanoma (anti-CTLA-4 ve anti- PD-1 mAbs) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (anti-PD-1 mAbs) tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. Ayrıca son yapılan çalışmalar meme kanserinde PD-1 sinyalinin engellenmesinin mümkün olabileceğini göstermiştir (Brahmer ve ark., 2012; Schalper ve ark., 2014)

Gelişen teknoloji sayesinde, bilimsel çalışmalarda faydalanılabilecek yüksek verimli analizler kullanılarak, T hücre aracılı kanser eliminasyonundan sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşturulmuştur (Galon ve ark., 2013; Schumacher ve Schreiber., 2015; Wang ve ark., 2013).

Tümörlerde, PD-L1 gibi immün inhibitör moleküller, aşırı immün reaksiyonların ve immün direncinin zayıflatılmasıyla sonuçlanan onkojenik transformasyonun ardından eksprese edilmektedir (Bedognetti ve ark., 2016).

Kontrol noktası blokajı kanser tedavisinde yeni bir hedefe yönelik tedavinin önünü açmıştır. Normalde immün sistem işleyişinin bir parçası olan PD-1/ PD-L1 interaksyonunu kanser hücreleri immün sistemden kaçmak için kullanır. Böylece PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 ye bağlanması, T hücre aktivasyonunu engellemektedir (Pardoll, 2012). Ko-stimülatör molekül olan PD-1 in ligandı PD-L1 ile etkileşiminin hem T_{reg} hem de Th17 hücrelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu etkileşim efektör immün yanıtı daha çok bastıran T_{reg} hücre proliferasyonuna yol açmaktadır. PD-1 / PD-L1'in bloke edilmesi ile T_{reg} etkinliği azalmaktadır. Ve Th17 enflamatuar hücrelerinin azalması gerçekleşmektedir (Fife ve ark., 2009; Francisco ve ark., 2009).

Son yıllarda, kanser immünoterapisi alanında immün kontrol noktaları inhibitörleri olan, sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4) ve daha yakın zamanda Programlanmış Hücre Ölümü inhibitörleri yaygın olarak çalışılmaktadır (Bertucci ve ark., 2016).

Monoklonal antikolar (mAbs) kullanarak immün kontrol noktalarının bloke edilmesinin, sadece melanom ve renal hücreli karsinom gibi klasik 'immünojenik' tümör tiplerinde değil, aynı zamanda akciğer (Rizvi ve ark., 2015), kolorektal (Le ve ark., 2015), over (Dong ve ark., 2002), özofagus (Shah, 2015), mesane (Bracarda ve ark., 2015) ve daha yakın zamanlarda meme kanseri (Emens ve ark., 2014; Nanda ve ark., 2014) dahil olmak üzere birçok solid tümörde etkili anti-tümör tepkilerini tetiklediği de gösterilmiştir (Bracarda ve ark., 2015; Hodi ve ark., 2010; Robert ve ark., 2014)

2.2.1 CTLA-4

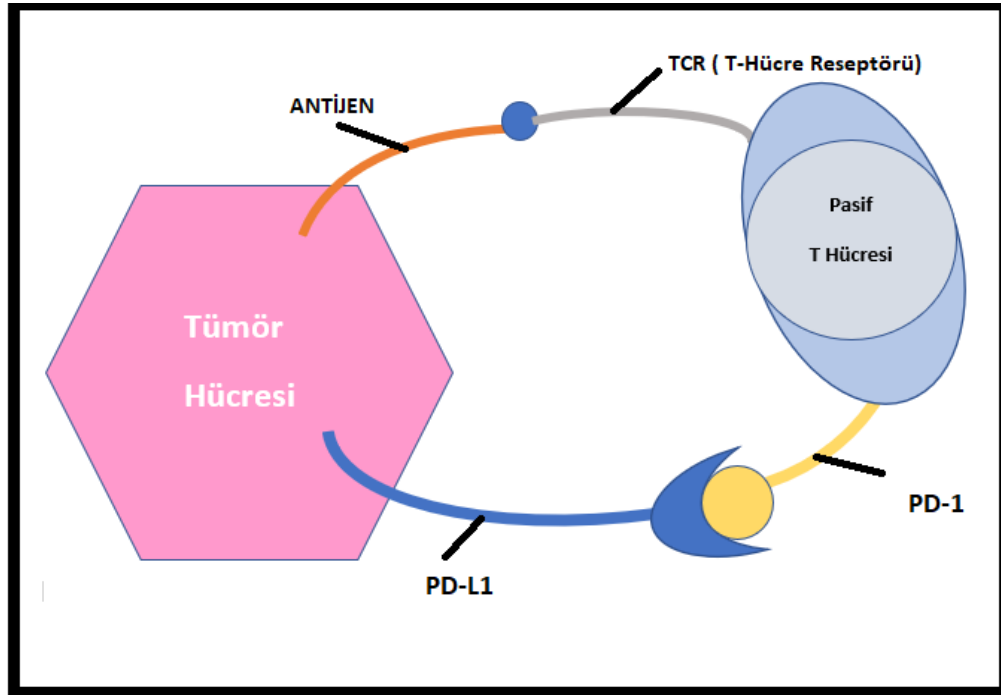
CTLA-4, T hücresinin ko-stimülatör reseptörü ve CD28'e karşı koyan ilk immün kontrol noktası reseptörü olarak tanımlanmıştır (Walunas ve ark., 1994). Antijen tanınmasından sonra, CD28 ve ligandları CD80 ve CD86 ile etkileşimi, T hücrelerini aktive etmek için TCR (T-Hücre Reseptörü) sinyalinin güçlendirmektir ve bunu bir CTLA-4 upregülasyonu izlemektedir (Krummel ve Allison, 1996). CTLA-4, CD80 ve CD86 için daha yüksek bir afiniteye sahiptir, böylece T hücresi aktivasyonunu ve CD28'i baskılamaktadır (Egen ve Allison, 2002). CTLA-4, aktive edilmiş CD8+ efektör T hücreleri tarafından eksprese edilmesine rağmen, T yardımcı hücre aktivitesini modüle ettiği ve düzenleyici T hücre (Treg) aracılı immün baskılamayı geliştirdiği için CD4+ T hücreleri açısından daha önemli olduğu bildirilmiştir (Pardoll, 2012; Takahashi ve ark., 2000). CTLA-4 kanser hücreleri tarafından da eksprese edilmektedir. Meme kanserinde yeni yapılan bir çalışmada, sitoplazmik CTLA-4 noktalarının varlığının kısa sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yu ve ark., 2015). Bu ekspresyonun değerlendirilmesinden başka, fare modellerinde yapılan çalışmalar, CTLA-4 ün T hücreleri üzerinde düzenleyici bir etki gösterdiğini desteklemiştir (Ward ve ark., 2013).

Anti-CTLA-4 mAb İpilimumab, metastatik melanomanın tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. İpilimumab'ın etki mekanizması, CTLA-4 sinyallerinin inhibisyonu yoluyla T hücresi yanıtının geliştirilmesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, İpilimumab'ın, CTLA-4 pozitif melanoma hücre hattında antikora bağımlı sitotoksositeye neden olduğu da gösterilmiştir (Laurent ve ark., 2013).

Akciğer kanserinde de, İpilimumab'ın kemoterapi ile birlikte test edildiği faz II çalışmaları yapılmıştır, faz III çalışmaları ise devam etmektedir (Lynch ve ark., 2012).

2.2.2 PD-1 / PD-L1

Kanser hücreleri, immün sistemden kaçabilme yeteneği ile normal hücrelerden daha bağımsız ve kontrolsüz bir yaşam sürmektedir. Kanser hücrelerinin, bu şekilde immün sistemden kaçabilmesi çok çeşitli ve oldukça karmaşık mekanizmalarla mümkün olmaktadır. Bunlar arasında yabancı tümör antijenlerinin down regülasyon ile immün sistem tarafından fark edilmemesi, anti-enflamatuar sitokinleri sekrete ederek immün supressif bir mikroçevre oluşturması, ve kanserle savaşan immün hücreleri etkin şekilde sessizleştiren immün sistemin negatif düzenleyicilerini eksprese etmesi gibi mekanizmalar sayılabilir. Kanser ve immün sistem arasındaki temel etkileşimlerden biri PD-L1'in (Programmed cell Death Ligand), PD-1'e (Programmed cell Death) bağlanma sinyalini içermektedir (Fife ve ark., 2009; Francisco ve ark., 2009; Latchman ve ark., 2001).



Şekil 3: Tümör Hücrelerinin T Lenfosit İnhibisyonu

T hücreleri dahil çeşitli bağışıklık hücreleri tarafından eksprese edilen bir hücre yüzey membran proteini olan PD-1, dendritik hücreler, makrofajlar veya B hücreleri gibi antijen

önleyici hücreler tarafından eksprese edilmektedir. Ve ligandları olan PDL-1 ve PDL-2 ile aktive edilir (Pardoll, 2012; Sponaas ve ark., 2015). PD-1 ligandları ile interaksiyonu sonucu, lenfosit aktivasyonunu zayıflatmaktadır ve düzenleyici T (Treg) hücre gelişimini ve fonksiyonunu desteklenmektedir ve bağışıklık tepkisinin inhibisyonunu sağlamaktadır (Şekil 3) (Bertucci ve ark., 2016).

Tümör hücrelerinin farklı bölgelerinde PD-L1 eksprese edildiği bilinmektedir. Bu mekanizmayı kanser hücreleri immün sistemden kaçarak yaşamaya devam etmek ve daha agresif hücreler oluşturmak için kullanmaktadır.

PD-1 / PD-L1 inhibitörlerinin klinik denemelerinden, özellikle melanoma, akciğer ve mesane karsinomlarında, kalıcı yanıtlarla umut verici sonuçlar elde edilmiştir (S. L. Topalian ve ark., 2012). Bu kapsamda immün kontrol noktası düzenleyicileri olan PD-1 / PD-L1' in inhibisyonu, ileri evre malin melanom ve küçük hücreli olmayan dışı akciğer kanseri gibi kötü prognozlu malignitelerde son zamanlarda klinik çalışmalarda kullanılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiştir. İleri evre malin melanom (2014'te) ve küçük hücreli olmayan dışı akciğer kanserinde (2015'te) FDA onayı alınmıştır. Bunun yanında tümör ve/veya bağışıklık hücreleri üzerindeki PD-L1 ekspresyonu ile objektif cevap arasındaki korelasyon rapor edilmiştir (S. L. Topalian ve ark., 2012)

PD-1 genellikle immün düzenlemede rol alır ve "kontrol noktası molekülü" olarak adlandırılır ve sistemin kendi hücrelerine karşı var olan toleransı korumaya yardımcı olur. PD-1, birçok tümör infiltre edici CD8+ T hücresinin yanı sıra CD4+ T hücreleri, doğal öldürücü (NK) T hücreleri, B hücreleri, aktive edilmiş monositler ve dendritik hücreler üzerinde eksprese edilmektedir (Dong ve ark., 2002; Freeman ve ark., 2000; Keir ve ark., 2006). Ayrıca T hücre düzenlenmesinde yer alan PD-1, ligandları (PD-L1 veya PD-L2) ile bir kompleks oluşturmaktadır (Pardoll, 2012). Bu kompleksin inhibe edici sinyalleri ileterek ve aktive edilmiş CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu azaltarak, bağışıklık sisteminin negatif düzenleyicisi olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Flies ve ark., 2011).

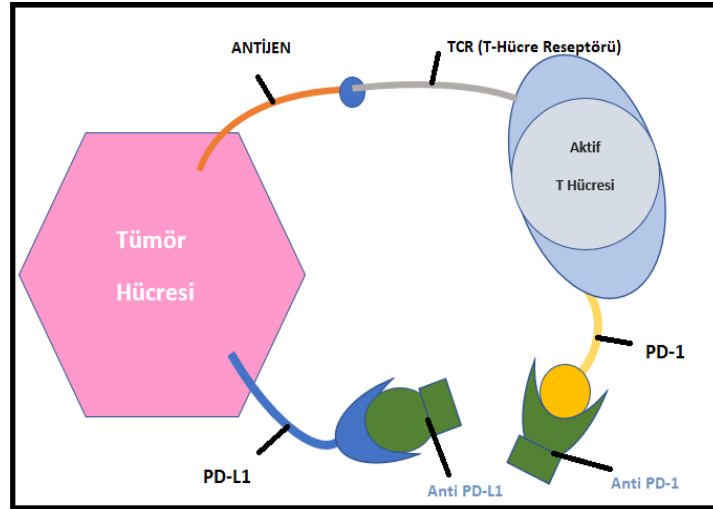
PD-L1 ise, enflamasyona yanıt olarak hematopoietik, endotelial ve epitelyal hücreler üzerinde eksprese edilmektedir (S. Topalian ve ark., 2012) ve tümör mikroçevrede immün supresyonda önemli bir rol oynar.

Over (Hamanishi ve ark., 2007) , akciğer (Konishi ve ark., 2004) ve renal hücre karsinomları (Thompson ve ark., 2004) gibi bir çok tümörde eksprese edilmektedir. Özellikle, tümör

hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun T hücresi aktivasyonunu baskıladığı ve T hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (Blank ve ark., 2005). Buna dayanarak, son zamanlarda, PD-1 ve PD-L1'in etkileşimini inhibe eden ajanların geliştirilmesi, kanser hastalarının tedavisinde umut verici olmuştur. Hem minimal toksisite hem de artmış sağkalım ile potent bir etki sağladığı bildirilmiştir (Muenst ve ark., 2014). İşte bu yüzden PD-1 ve PD-L1'i inhibe eden antikorlarla bu yolu hedeflemek önem taşımaktadır.

Son çalışmalar, PD-1 / PD-L1 yolağının aktivasyonunun tümörlerin konakçıya ait immün sistemden kaçmasına izin veren bir mekanizma olduğunu göstermektedir (Muenst ve ark., 2014). Bu yolağın kanser hücreleri tarafından kullanılması kanser aşularının kansere özgü T hücrelerini indüklemesine rağmen tümör büyümesinin neden kontrol edilmediği ile yorumlanmıştır (Muenst ve ark., 2014).

Anti-CTLA4'e ek olarak, PD-1 ve PD-L1'e karşı yönlendirilen mAb'ler, kanser hastalarının tedavisinde önemli terapötik araçlar olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 4). Bu ilaçlar, daha iyi bir güvenlik profili ve daha belirgin anti-tümör aktivitesi ile karakterizedir.



Şekil 4: İmmünoterapi İle T Hücre Aktivasyonu

Anti-CTLA-4 ve anti-PD-1 / anti-PD-L1 gibi immün kontrol noktası inhibitörlerinin amacı negatif yollarını bloke ederek "frenleri serbest bırakmak" ve T hücresi aktivasyonunu arttırmaktır (Schütz ve ark., 2017).

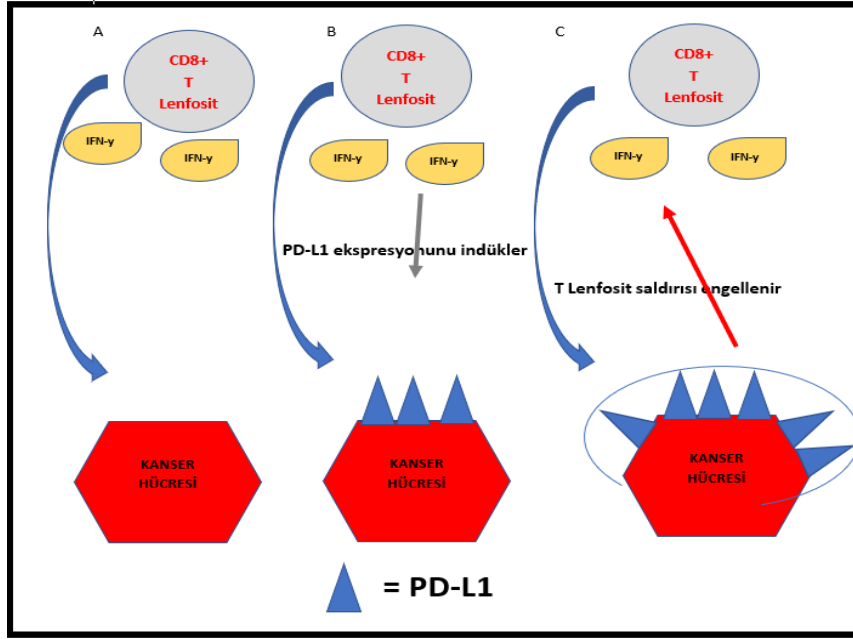
Kanser hücrelerinin immün sistemden kaçış mekanizmasını kullandığı düşünüldüğünde, PD-1 / PD-L1 etkileşim yolağının engellenmesinin, CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated

Protein 4) blokajına kıyasla daha fazla anti-tümör aktivite ve daha az yan etki göstereceği öngörülmüştür. Bu bağlamda PD-L1'i bloke eden antikör çalışmaları arttırılmıştır. Güncel olarak ileri evre malign melanom (2014) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (2015) tedavisi için kullanılan anti-PD-L1 benzeri anti-tümör aktivite gösteren, anti PD-1 antikoru Pembrolizumab ve Nivolumab FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (Adachi ve Tamada, 2015; Anagnostou ve Brahmer, 2015; Melero ve ark., 2013). Anti PD-1 / PD-L1 antikörleri diğer malignitelerde araştırılmaya devam etmektedir.

2.3. Kanserde İmmünoterapi

Birçok solid tümörde, tümöre karşı immün cevabın görüldüğü bilinmektedir, ancak bu immün cevabın immün supresif faktörlerle dengelenmiş olduğu da gösterilmiştir (Schütz ve ark., 2017). Buna ek olarak, invivo şartlarda PD-L1 ekspresyonunun karsinogenezde rol aldığı ve invazyonu arttırdığı, bunun yanı sıra tümör hücreleri tarafından artmış PD-L1 ekspresyonunun spesifik CD8+ T hücrelerini daha az işlevsel hale getirdiği ve spesifik antikörler kullanılarak PD-1 / PD-L1 yolunun bloke edilmesinin, hücrel immünoterapilerde daha güçlü bir tümör regresyonuna yol açtığı invivo ortamda gösterilmiştir (Iwai ve ark., 2002).

İmmün modülasyon solid tümörlerde umut verici bir strateji gibi gözükmektedir. İmmün kontrol noktaları, immün sistemden kaçışın ana mekanizmalarından biridir. Tümör hücrelerinde PD-L1'in ekspresyonu, daha düşük aktivite gösteren spesifik CD8+ T hücrelerinin gelişimini yol açmaktadır (Şekil 5) (Iwai ve ark., 2002). PD-1 veya PD-L1'e karşı antikörlerin etkinliği, çeşitli klinik çalışmalarla araştırılmaktadır.



Şekil 5: IFN γ Aracılı T Hücre İnhibisyonu

Melanom ve küçük hücreli olmayan dışı akciğer kanserinde PD-1 / PD-L1 inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda PD-L1 ekspresyonunun daha yüksek yanıt oranı ile ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür (Taube ve ark., 2014; Teng ve ark., 2015) ve melanom , küçük hücreli olmayan dışı akciğer kanseri ve renal hücreli karsinomda PD-1 / PD-L1 antikoları kullanılarak yapılan klinik çalışmalarda, güvenli ve dayanıklı tümör regresyonu gösterilmiştir (Brahmer ve ark., 2012; Herbst ve ark., 2014; Taube ve ark., 2012; Teng ve ark., 2015).

2.3.1. Meme Kanserinde İmmünoterapi

Meme kanseri zayıf immünojenik olarak kabul edilmiştir ve interlökin 2 veya interferonlar ile immünoterapi tedavisinden iyi sonuçlar elde edilemediği kaydedilmiştir (Bertucci ve ark., 2016). Aslında, meme kanseri, çeşitli moleküler alt tipler içeren heterojen bir kanser türüdür ve bu alt tiplerin bazılarında, bağışıklık sisteminin rolü son zamanlarda ortaya çıkmıştır. Triple-negatif (ER / PgR / ERBB2-negatif) ve HER2+ alt tiplerde, tümör infiltrate edici lenfosit (TIL)' lerin (Loi ve ark., 2014) veya immün yanıt belirteçlerinin (Sabatier ve ark., 2011) olması immünoterapi için uygulanabileceği ile ilişkilendirilmiştir.

PD-L1 ekspresyonu böbrek, akciğer, pankreas, özofagus, yumurtalık, kolorektal kanserler, baş-boyun kanserleri, skuamöz hücreli karsinom, melanom ve glioma gibi farklı kanser türlerinde gösterilmiştir. Meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunun yaygınlığı ilk defa 2006 yılında Ghebeh ve ark. tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada immünohistokimya (İHK) ile tümör hücreleri veya TIL'ler üzerinde PD-L1 ekspresyonu analiz edilmiştir. Değerlendirilen primer meme kanseri örneklerinin 22 / 44'ünde (% 50) PD-L1 ekspresyonunun mevcut olduğu bildirilmiştir (Ghebeh ve ark., 2006).

Meme kanserinde mamografik tarama, hormon tedavisi ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2)' ye karşı hedefe yönelik tedavilerin kullanımı, son yirmi yıl içinde 5 yıllık sağkalım oranları ile tedavi sonuçlarında belirgin iyileşmeler sağlamıştır ve bu oran şimdi birçok ülkede % 90'a yaklaşmıştır (AIHW, 2014). Bununla birlikte, hormon negatif ve HER2 protein ekspresyonu / HER2 gen amplifikasyonu bulunmayan, triple-negatif hasta grubu için, prognoz kötüdür ve tedavi seçeneğinin oldukça sınırlı olduğu bilinmektedir (Beckers ve ark., 2016). Bu nedenle triple-negatif meme kanseri hastalarında yeni tedavi stratejileri belirlemek önem taşımaktadır. Meme kanserinde anti-PD-1 anti-PD-L1 çalışmaları, birçok tümörde PD-1 blokajı çalışmaları ile elde edilen iyi sonuçlardan dolayı son birkaç yılda yoğunlaşmıştır.

Meme kanserinde, PD-L1 ekspresyonunun, büyük tümör boyutu, yüksek histolojik ve nükleer derece, yüksek proliferasyon indeksi, östrojen reseptörünün negatifliği ve HER2'nin pozitifliği ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Muenst ve ark., 2014) Aynı çalışmada hasta yaşı küçüldükçe PD-L1 ekspresyon oranı artmış ve prognoz kötüleşmiştir. Ayrıca, PD-L1 ekspresyonunun azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Emens ve ark., 2014; Muenst ve ark., 2013) Benzer şekilde over kanserinde de PD-L1 ekspresyonunun azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Hamanishi ve ark., 2007; Matsuzaki ve ark., 2010).

Yüksek proliferasyon indeksine sahip meme kanseri alt tiplerinde (triple-negatif meme kanseri, HER2+ gibi) de güçlü immün cevap oluşumu tanımlanmıştır. Triple-negatif meme kanserlerinin %20'sinde PD-L1'in artmış ekspresyonu bildirilmiştir (Mittendorf ve ark., 2014).

Meme kanserinde PD-L1 ekspresyonu ile ilgili bugüne kadar çok sınırlı veri bulunmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar, meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunu hem kötü prognostik bir faktör (Muenst ve ark., 2014) hem de koruyucu bir faktör (Schalper ve ark., 2014) olarak tanımlamaktadır.

Solid tümörlerle yapılan çok sayıda çalışma, T helper 1 polarizasyonu sergileyen tümörlerin immünoterapiye daha iyi yanıt verdiğini ve daha iyi bir prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (Brahmer ve ark., 2012; Ribas ve ark., 2014; Robert ve ark., 2014; Shin ve Ribas, 2015; S. L. Topalian ve ark., 2014). Bu tümörlerin ICR (İmmunologic constant of rejection) olarak adlandırılan bazı spesifik yolakların aktivasyonu ile karakterize oldukları bilinmektedir (Bedognetti ve ark., 2010; Galon ve ark., 2013; Murtas ve ark., 2013). Bu yolaklar IFN ile uyarılan gen yolağını (IRF1 ve STAT1 ortak noktasında), CXCR3 ve CCR5 ligand yollarını (örn., CXCL9–11 ve CCL3–5) ve immünefektör fonksiyon genlerini (örn., Perforin, granülisin) içermektedir (Galon ve ark., 2013; Murtas ve ark., 2013). Meme kanserinde de çeşitli prognostik ve prediktif immün ilişkili belirteçler ICR yolağında toplanır (Bedognetti ve ark., 2015).

Meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesi son derece karmaşıktır. PD-L1, bir interferon (IFN) stimüle edici gendir ve modülasyonunun, IFNy tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği bilinmektedir (Bedognetti ve ark., 2016). Bu durum, PD-L1 seviyesi ile aktivasyonu sonrası IFNy salgılayan tümör infiltre edici lenfositlerin (TILs) yoğunluğu arasındaki güçlü korelasyonla ilişkilendirilmiştir (Taube ve ark., 2014). Tümör hücrelerinin intrinsik genetik programı, farklı hastalıklarda değişik oranlarda da olsa PD-L1'in modülasyonunda da rol oynamaktadır. Örneğin Hodgkin olmayan lenfomada, kromozom 9p24'ün amplifikasyonu, yüksek ekspresyon seviyeleri olan PD-L1 ve PD-L2' nin eşlik ettiği tekrarlayan bir genomik değişikliği temsil ettiği açıklanmıştır (Ansell ve ark., 2015). Meme kanserinde, benzer kromozomal amplifikasyonun PD-1 ligandlarının daha yüksek ekspresyonuyla ilişkili olduğu, 41 triple-negatif meme kanseri olgularının 12' sinde gözlenmiştir, ancak ER+ veya HER2+ meme karsinomu dokularında görülmemiştir (Barrett ve ark., 2015). Başka bir çalışma, diğer alt tiplere kıyasla triple-negatif tümörlerde daha yüksek bir PD-L1 amplifikasyonu bildirmiştir (Sabatier ve ark., 2015). Genel olarak, meme kanserinde, PD-L1 transkriptlerinin, kopya sayısı değişikliği ile anlamlı derecede ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Ali ve ark., 2015). Aslında, PD-L1'in yokluğu, bir tümörün T hücresi invazyonuna daha fazla izin vermesini sağlayacağı ve ardından, aktive edilmiş lenfositler (veya doğal öldürücü hücreler) tarafından salgılanan IFNy, PD-L1' i eksprese etmek için tümör hücrelerini indükleyeceği böylece PD-L1 yapısal aktivasyonu ve ex vivo ekspresyon arasında bir uyumsuzluğa neden olacağı bilinmektedir. Ve tam tersine PDL-1 in ekspresyonu (ilgili genin amplifikasyonunu takiben) T hücre infiltrasyonuna, bunun sonucunda da IFNy salınımının azalmasına ve PD-L1 ekspresyonunun devamlı olarak artmasının engellenmesine

neden olacağı bildirilmiştir (Bedognetti ve ark., 2016). Bu nedenle, kopya sayısı varyasyonları PD-L1 ekspresyonunu etkilese de, PD-L1 ekspresyonu ile klinik veriler arasında korelasyonun anlamlı olmadığı belirtilmiştir (Bedognetti ve ark., 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma laboratuvar materyali ile yapılan tanımlayıcı deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zaman

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarında, Ocak 2015-Ocak 2017 yılları arasında meme karsinom tanısı alan hastalara ait doku örneklerinde yapılmıştır. Çalışmada, doku mikroarray kullanılarak PD-L1 İHK (İmmünohistokimyasal) boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Olguların tedavi sonrası izlemleri için ilgili klinik doktorundan bilgi alınmıştır.

3.3. Materyal Toplanması Ve Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışma örnekleme için, Ocak 2015-Ocak 2017 yılları arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarında, meme karsinomu doku tanısı alan ve klinik bilgisi bulunan 107 örnek seçilerek elektronik ortamda kayıt edildi. Hastalara ait tüm preparatlar, preparat arşivinden çıkarılarak dikkatlice incelendi. Nekroz içermeyen canlı tümör dokusundan oluşan doku içeren bloklar çalışmaya dahil edildi. Hastaların demografik bilgileri laboratuvar elektronik arşivinden ve klinik doktorlarından elde edildi. Işık mikroskopik değerlendirmeyle saptanan tüm histopatolojik parametreler kaydedildi.

Ayrıca hasta yaşı, tümör boyutu, metastatik lenf düğümü sayısı, lokal nüks ve metastaza kadar geçen süre, tam sağkalım süresi ve izlem süresi de ölçüm verileri ile ölçeklendirildi. Vasküler ve lenfatik invazyon, perinodal tutulum, tümör boyutu, tümör derecesi, lokal nüks, metastaz, organ metastazı sayısal verilerle değerlendirildi.

3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada primer amaç, meme kanseri hastaların doku mikroarray kullanarak İHK'sal yöntem ile tümör mikroçevresinde PD-L1 etkisini araştırmaktır. Ancak doku örnekleri tüm tümör dokusunu temsil etmemektedir. Bu durum tümör heterojenitesi açısından pozitif olguların yanlış negatif olarak değerlendirilmesine neden olmuş olabilir. Ayrıca örnek sayısının kısıtlı olması ve gruplar içinde dağılım gösteren alt tiplerde olgu sayısının çok az olması istatistiksel analizde anlamlı sonuçları kısıtlamış olabileceği düşünöldü.

3.5. Etik Kurul Onayı

Bu araştırma ADÜ Bilimsel Araştırma Daire Başkanlığı tarafından "TPF-17070" numaralı proje olarak desteklenmiştir ve 24.08.2017 tarihinde 2017/1210 no ile etik kurul onayı alınmıştır (Ekler: 8.1).

3.6. Yöntem

3.6.1. Çoklu blok-doku mikroarray hazırlanması:

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait primer tümör dokusuna ait tanıtıcı tümör alanlarını içeren H&E preparatlar örnekleme için seçildi. Bu seçilen preparatlara ait arşiv parafin bloklarında, tümör alanına uyan alandan, 2 mm-çapında doku kolları bloklara yerleştirildi. Alınan örnekler haritalandırılarak parafin bloklar içerisine gömüldü. Yeni çoklu parafin bloklar elde edildi; Ventana SP263 antikoru ile Ventana Benchmark XT cihazında boyandı. Olgular, boyanma şiddetinden bağımsız olarak boyanma oranına göre değerlendirildi. Bu olguların tümör içeren parafin bloklarına eşlik eden lamaları yeniden mikroskopik incelenerek uygun alanlar seçildi. Bu tümörlü bloklardan 2mm lik punch kullanılarak doku microarray blokları (TMA) hazırlandı (Şekil 6). TMA bloklarından alınan 4 mikronluk kesitler ticari kitler kullanılarak; anti-PD-L1; anti-CD8 ve anti-CDX2 için immunhistokimyasal olarak boyandı. Değerlendirme ışık mikroskopunda, tümör ve tümör çevresindeki immun hücrelerdeki boyanma yoğunluğu ve yüzdesi dikkate alınarak yapıldı. PDL-1 için %1'in üzeri pozitif kabul edildi.



Şekil 6: Doku Mikroarray (TMA) Hazırlanması

3.6.2. İHK uygulama prensibi:

İmmünohistokimyasal testler; hücre veya doku antijenlerinin, uygulanan antikor ile tepkimeye girme esasına dayalı testlerden biridir. Bu test ile hücre veya dokuda bulunan antijenler, ve bu antijenlere yönelik olarak geliştirilmiş, farklı ara elemanlarla etiketlenmiş antikorlarla karşılaştırılır. Böylece hücre ya da dokuda var olan antijen, antikor ile reaksiyona girer ve mikroskopik değerlendirmede görünür hale gelir. Bu IgG monoklonal antikorlar deney hayvanlarından elde edilir. Daha sonra başka bir deney hayvanında, bu antijene karşı geliştirilmiş olan antikorlara karşı, yine bir deney hayvanında sekonder antikorlar yaptırılır. Sekonder antikorlar bir enzimle işaretlenir. Bu enzim de mikroskopik değerlendirmede görünür hale gelmeyi sağlayan kromojeni aktive eder. Avidin-biotin kompleks (ABC) sistemi ise indirekt olarak tanımlanan bir testtir. Bu testte sekonder antikor enzimle işaretlenmez. ABC yöntemi ile uygulama, yumurta akında bulunan avidin adlı bir glikoproteininin biyotin olarak bilinen vitaminle arasındaki affiniteye göre geliştirilmiştir. Avidin glikoproteinine benzer bir molekül olan streptavidin, bir bakteriden elde edilir. Streptavidin, nötral yapıda bir molekül olduğu için ve karbonhidrat komponenti taşımadığı için bu molekülün kullanımında nispeten boya artefaktı daha az olarak görülür. Biotinin, değişik enzim ve antikorlar ile bağ kurması daha kolaydır. Primer antikorla avidin-biotin kompleksi arasındaki ilişkinin sağlanması sekonder antikorlar aracılığı ile olur. Bu mekanizma tüm enzim kompleksi testlerindeki gibidir. Dokuda antijen mevcut değilse, antikor bağlanacak antikor bulamaz ve yıkamalar esnasında antikorla bağlanmayan tüm antijenler atılır ve boyanma olmaz. Primer antikorlar dışındaki tüm ara reaktifler, üniversal şekilde ticari forma sahiptir.

Bu çalışmada immünohistokimyasal boyama yöntemi olarak biyotinsiz, hidrojen peroksit substrat ve 3, 3' diaminbenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (Ventana ultraView™ Universal DAB Kit) ve tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazı (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems) kullanıldı. Doku kesitleri elektrostatik yüklü lamlara (ISOTERM, ca.75x25mm/ 3x1 inch, positive charged) alınıp, 60°C'de en az iki saat tutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dâhil olmak üzere tüm immunohistokimyasal boyama süreci BenchMark XT (Ventana Medical Systems,) tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazında gerçekleştirildi. Cihazda zıt boyaması hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu ve ksilen ile şeffaflandırılması elle; lamel kapatılması aşaması ise otomatik olarak (Dako CoverStainer) yapılarak işlem sonlandırıldı. BenchMark XT (Ventana Medical Systems) markalı immunohistokimya/ in situ hibridizasyon cihazında otomatik olarak boyanan PD-L1 (VENTANA PD-L1 (SP263) Rabbit Monoclonal Primary Antibody) İHK antikoru kullanıldı.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi:

İHK'sal değerlendirme yüzde olarak belirlendi. Yüzde 1 boyanma bile olsa pozitif kabul edildi.

3.7.1. İstatistiksel Yöntem:

Tüm hastalara ait histopatolojik parametreler kaydedildi. Yapılan İHK analizler sonucu ortaya çıkan veriler ile birlikte SPSS programı kullanılarak sonuçlar değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığı tek-yönlü Ki-kare testi ve dört gözden birinde 5'in altında değer varsa Fisher's exact testi kullanılarak belirlendi. Anlamlılık sınırı $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

Olgular değerlendirilirken HER2+ bir grup ve diğer moleküler alttipler diğer grup olarak ayrılarak değerlendirildi. Benzer şekilde Lüminal A ve Lüminal B tek grupta toplanarak daha agresif olan HER2+ ve triple-negatif grup ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

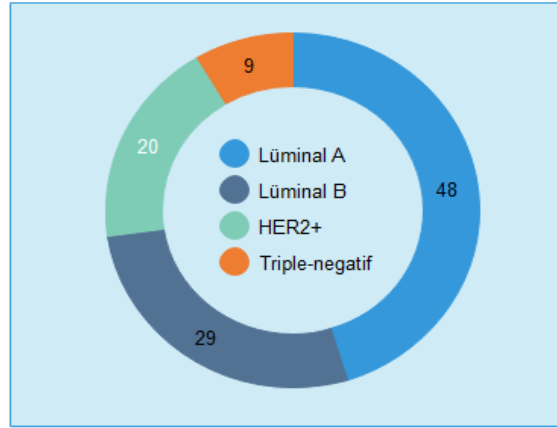
4.1. Çalışma Olgularının Bulgularına Genel Bakış:

Meme kanseri tanısı alan 107 hasta değerlendirmeye alındı. Tüm hastalar kadındı. Hastaların hiçbirinde tanı sırasında metastaz bulgusu yoktu. Hastaların ortalama yaşı $56,13 \pm 11,75$ yıl (28-82 yıl) olarak hesaplandı. Tanıdan sonra uygun tedavi protokolleri ile tedavileri yapılan hastalarda son vizit tarihi 30.03.2018 olarak belirlendi. Bu tarihe kadar 6 olgu hariç tümü sağ ve sağlıklı idi. Ortalama tümör boyutu $3,04 \pm 2,29$ cm (0,3-15 cm) idi. Altmışiki olguda (%57,9) tümör sağ meme, 40 olguda (%37,4) tümör sol meme lokalizasyonluydu. Ayrıca 5 olguda her iki memede de karsinom bulguları saptandı. Olguların 85'i (%79,4) invaziv duktal karsinom, 5'i (%4,7) invaziv lobüler karsinom, 17'si (%15,9) diğer histolojik subtip (müsinöz karsinom, invaziv kribri form karsinom, mikropapiller karsinom, kombine meme karsinomu gibi) morfolojisindeydi.

Olgular histolojik dereceye göre sırasıyla; 9 olgu (%8,6) histolojik derece I, 66 olgu (%62,9) histolojik derece II, 30 olgu (%28,6) histolojik derece III olarak dağılım gösterdi. İki olguda histolojik derece (konsültasyon veya tümörün çok sınırlı olması nedeniyle) belirlenemedi. DKİS 34 olguda (%33) izlenirken, 69 olguda (%67) izlenmedi. Lenfovasküler invazyon 48 olguda (%44,9), perinöral invazyon 36 olguda (%33,6) mevcuttu. Yüzbir olguda lenf nodu (sentinal lenf nodu örnekleme ya da aksiler diseksiyon) disseke edildi. Disseke edilen lenf düğümü sayısının ortalaması $8,23 \pm 6,82$ (1-48) idi. Lenf nodu metastazı 44 (%43,6) hastada saptandı. Metastatik lenf düğümü sayısının ortalaması $4,18 \pm 3,35$ (1-12) olarak bulundu.

ER reseptörü 85 olguda (%81) pozitifken, PgR reseptörü 79 olguda (%75,2) pozitifti. Tüm olgularda cerbB2 protein ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Skorlama ASCO/CAP 2013 kılavuzuna göre yapıldı. cerbB2 22 olguda (%20,6) skor 0, 4 olguda (%3,7) skor 1 (+), 16 olguda (%15) skor 2 (++), 65 olguda (%60,7) skor 3 (+++) olarak değerlendirildi. Skor 2 olan olgularda HER2 gen amplifikasyonu, FISH yöntemi ile belirlendi. Ki-67 proliferasyon indeksi, 101 olguda değerlendirildi ve 60 olguda (%59,4) %14'ün üzerindeydi.

Moleküler subtipleme hormon reseptör durumu, HER2 durumu ve Ki-67 proliferasyon indeksine göre yapıldı. Sırasıyla 48 olgu (%45,3) Lüminal A; 29 olgu (%27,4) Lüminal B; 20 olgu (%18,9) HER2+ tip; 9 olgu (%8,5) triple negatif olarak bulundu (Şekil 7)



Şekil 7: Moleküler Subtiplere Göre Olgu Sayısı

Otuzbir olguda (%29) evre I tümör, 57 olguda (%53,3) evre II tümör, 19 olguda (%17,8) evre III tümör saptandı.

Olguların özellikleri Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1: Çalışma Olgularının Özellikleri

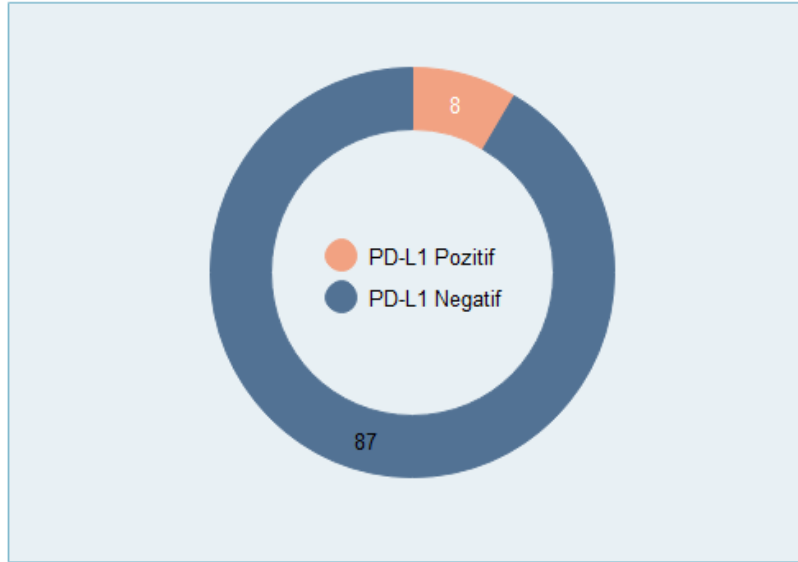
ÖZELLİKLER	n (%)
Yaş (Ortalama yıl)	56,13±11,75
Tümör Boyutu (Ortalama cm)	3,04±2,29
Lokalizasyon	
Sağ meme	62 (57,9)
Sol meme	40 (37,4)
Bilateral	5 (4,7)
Histolojik Subtip	
İnvaziv duktal karsinom	85 (79,4)
İnvaziv lobüler karsinom	5 (4,7)
Diğer subtipler	17 (15,9)
Histolojik Derece	
Derece I	9 (8,6)
Derece II	66 (62,9)
Derece III	30 (28,6)
Lenfovasküler İnvazyon	
Var	48 (44,9)
Yok	59 (55,1)
Perinöral İnvazyon	
Var	36 (33,6)
Yok	71 (66,4)
Moleküler Subtip	
Lüminal A	48 (45,3)
Lüminal B	29 (27,4)
HER2 pozitif	20 (18,9)
Triple Negatif	9 (8,5)
Evre	
Evre I	31 (29)
Evre II	57 (53,3)
Evre III	19 (17,8)

İmmünohistokimyasal yöntemle tüm olgularda doku mikroarray yapılarak PD-L1 protein ekspresyonu değerlendirildi (Şekil 8).



Şekil 8: Tüm Olgulara Genel Bakış

PD-L1 8 olguda (% 8,4) pozitif, 87 olguda (%91,6) negatif (Şekil 9).



Şekil 9: İmmünohistokimyasal Yöntemle PD-L1 Durumu.

PD-L1 pozitif olguların histopatolojik özellikleri tabloda verilmiştir.

Tablo 2: Pozitif Olguların Genel Özellikleri

Olgular	PD-L1 pozitiflik yüzdesi	Tm boyutu	Tm tipi	Histolojik derece	Ki67	Moleküler tip	Lenf düğümü metastazı
Olgu1	1	1.2	İnvaziv duktal karsinom	derece3	%14 üstü	Lüminal A	Yok
Olgu2	2	4.0	(İnvaziv duktal + İnvaziv lobüler)	derece3	%14 üstü	HER2+	Yok
Olgu3	2	2.8	İnvaziv duktal karsinom	derece2	%14 altı	HER2+	Var (2)
Olgu4	5	4.5	İnvaziv duktal karsinom	derece3	%14 üstü	HER2+	Var (5)
Olgu5	30	3.0	İnvaziv lobüler karsinom	derece2	%14 altı	Lüminal B	Yok
Olgu6	50	2.5	Metaplastik karsinom	derece3	%14 üstü	Triple-negatif	Yok
Olgu7	60	3.0	İnvaziv duktal karsinom	derece3	%14 üstü	Lüminal A	Var (7)
Olgu8	70	3.2	İnvaziv duktal karsinom	derece3	%14 üstü	HER2+	Yok

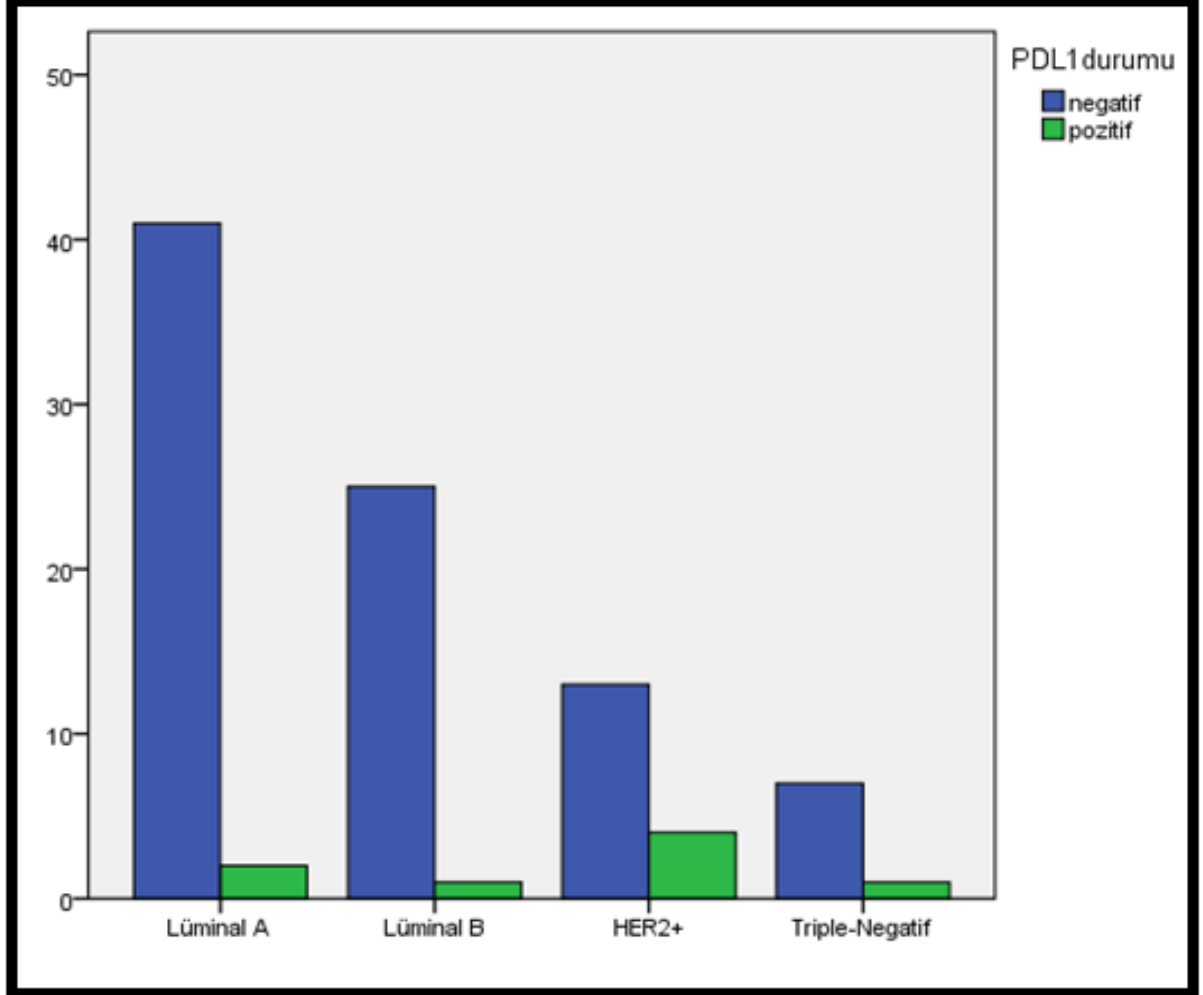
PD-L1 boyanan olgularda boyanma yüzdesi en çok %70 oranında idi. Bu olgunun tümör çapı 3.2 mm, Ki67 değeri %14 üzeri ve moleküler tipi Her2+ idi. PD-L1 pozitif olguların 3 tanesinde sayıca en fazla 7, en az 2 adet olan lenf nodu tutulumu gözlemlendi. PD-L1 pozitif olgular incelendiğinde 4 olguda Ki67 değerinin %14 üzerinde olduğu belirlendi. Tümör boyutu en yüksek 4,5 mm çapında, derece 3, HER2+ özellikli olguydu.

4.2. İstatistiksel bulgular:

PD-L1 pozitif olan ve negatif olan olgular arasında lenfovasküler invazyon ($p=0,454$), perinöral invazyon ($p=0,482$), dermal lenfatik tutulumu ($p=0,464$), meme başı tutulumu ($p=0,377$), cerrahi sınırdaki tümör varlığı ($p=0,666$), lenf nodu metastazı ($p=0,559$), lenf nodu perikapsüler invazyonu ($p=0,391$), ER pozitifliği ($p=0,205$), PgR pozitifliği ($p=0,132$) ile ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi.

PD-L1 pozitif olan 8 olgunun 6'sında Ki-67 proliferasyon indeksi %14'ün üzerinde idi. Ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ($p=0,296$) yoktu. Triple negatif olgular içinde de PD-L1 pozitifliği açısından anlamlı bir sonuç yoktu ($p=0,485$), bu gruptaki hastaların yalnızca 1'inde PD-L1 pozitifliği vardı. HER2 + subtip ile PD-L1 pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,033$). Toplam 20 olgu HER2 + subtipde olmasına rağmen 17'sinde PD-L1 değerlendirilebildi. Ayrıca grupları, tüm lüminal grupları (lüminal A ve lüminal B) bir araya getirerek tekrar lüminal grup olarak bir alt grup yaparak değerlendirdiğimizde lüminal olmayan grupta (hormon resptörü negatif) PD-L1 pozitifliği

istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,029$). Ancak lüminal A ve lüminal B şeklinde gruplama yaptığımızda diğer gruplarla PD-L1 pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu (Lüminal A için $p=0,197$) (Lüminal B için $p=0,293$) (Şekil 10).



Şekil 10: Moleküler Altıplere Göre PD-L1 Durumu

5. TARTIŞMA

PD-L1 meme dahil birçok tümörde eksprese edilen immün modülatördür. Anti- PD-L1 ajanları ileri evre kötü prognozlu çeşitli kanserlerde kullanılmaktadır. HER2+ ve triple-negatif meme kanseri gibi kötü prognozlu moleküler subtiplerde çalışmalar sürmektedir. Kötü prognozlu olduğu bilinen bu iki grup meme kanserlerinden HER2+ için günümüzde transtuzumab denilen hedefe yönelik ajanla etkin bir tedavi mümkündür. Ancak bu tedaviye cevap veren bazı hastalarda zamanla progresyon geliştiği de bilinmektedir. Progresyon gelişen bu hastalar için yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Benzer şekilde kötü prognozla ilişkili triple-negatif meme kanseri hastalarında da tedavi seçeneği çok kısıtlı olduğu için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma kapsamında yeni bir tedavi seçeneği olabilecek ve bugün çeşitli kanserlerde çalışılan yukarıda ayrıntılı anlatılan PD-L1 ekspresyon durumu ve klinikopatolojik parametreler arasında ilişki olup olmadığı değerlendirildi.

Meme kanserinde PD-L1 protein ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmada primer meme kanseri örneklerinin (152/650) %23,4'ünde PD-L1 ekspresyonu bulunmuştur (Muenst ve ark., 2014). Bu çalışmada yaş, tümör boyutu, tümörün histolojik derecesi, lenf nodu tutulumu, tümör evresi ile PD-L1 ekspresyonu arasında belirgin bir ilişki bulunmuş. Yine aynı çalışmada, Ki67+ liği (P=0.0043), HER2+ liği (P=0.0237), ER- liği (p=0.0020) ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Ancak, PgR ile anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Moleküler subtipler arasında PD-L1 ekspresyonu açısından önemli farklılıklar saptanmıştır (Muenst ve ark., 2014). Pozitif lenf nodu varlığı ve agresif seyir ile de PD-L1 in ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Böylece PD-1 / PD-L1 yolağının aktivasyonu bu tip tümörlerde anti tümör immün yanıtın cevapsız kalabileceğini ve daha hızlı bir şekilde proliferasyon olarak yayılabileceğini göstermiştir (Muenst ve ark., 2014). Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, bizim çalışmamızda agresif tümör tipi olarak bilinen triple-negatif meme kanserinde PD-L1 ekspresyon seviyesi anlamlı bulunmazken (p=0,485), HER2+ meme kanseri ile PD-L1 arasında korelasyon saptandı (**p=0.033**). Literatürdeki birçok çalışmada, triple-negatif meme kanserinde PD-L1 ekspresyon seviyesinin anlamlı şekilde yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Muenst ve ark., 2014; Sabatier ve ark., 2015; Soliman ve ark., 2014). Bu çalışmalar incelendiğinde olgu sayılarının sırasıyla 127/650, 1205/5454, 61/61 olduğu görülmektedir. Bizim çalışma olgularımız içinde ise

yalnızca 9'u triple-negatif gruptaydı. Bu sayının istatistiksel değerlendirmede yeterli olmayabileceği için anlamlı bir ilişki bulunamamış olabilir diye düşünüyoruz. HER2+ meme kanseri ile PD-L1 protein ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalarla benzer şekilde (Muenst ve ark., 2014) ($p=0,0131$) bizim çalışmamızda da HER2+ meme kanseri ile PD-L1 protein ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardı (**$p=0.033$**).

Ayrıca grupları, tüm lüminal grupları (lüminal A ve lüminal B) bir araya getirerek tekrar lüminal grup olarak bir alt grup yaparak değerlendirdiğimizde lüminal olmayan grupta (hormon reseptörü negatif) PD-L1 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti (**$p=0,029$**). Ancak lüminal A ve lüminal B şeklinde gruplama yaptığımızda PD-L1 pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu (Lüminal A için $p=0,197$) (Lüminal B için $p=0,293$).

Son on yılda, kanserde PD-L1 ekspresyonu temel olarak İHK kullanılarak protein ekspresyon durumunun değerlendirilmesi seviyesinde çalışılmıştır, ancak özellikle prognostik değeri ile ilgili farklı kaynaklarda farklı sonuçlar bildirilmiştir (Gadiot ve ark., 2011; Rimm ve ark., 2014; Velcheti ve ark., 2014). Bu farklı sonuçlar PD-L1 çalışmalarında İHK' nın standardizasyonunun olmaması ile ilişkilendirilmiştir (Gadiot ve ark., 2011; Rimm ve ark., 2014; Schalper ve ark., 2014). mRNA analizi gibi alternatif analitik yöntemler geliştirilmiştir (Sabatier et al., 2015) Benzer şekilde İHK kullanılarak ölçülen PD-L1 protein ekspresyonu, zayıf sağkalım ile ilişkili bulunmuştur ($p<0,01$) (Muenst et al., 2014). Bizim çalışmamızda ise İHK ile yapılan değerlendirme sonucunda PD-L1 ekspresyonu ile sağkalım arasında korelasyon bulunmadı ($p=0,419$).

Literatürde meme karsinom olgularında PD-L1 protein ekspresyon oranları değişkendir. Ghebeh ve ark. (2006) 44 hastadan alınan dokuyu analiz eden çalışmalarında meme kanserinin % 34 ünde PD-L1 ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir. Muenst ve ark. (2014) ise bu oranı %23,4 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda bu oran % 8,4 olup oldukça küçük bir değerdir. Çalışmamız doku mikroarray çalışması olduğundan tümör içermeyen alanların çalışılması ve İHK'sal eksiklikler nedeniyle bu oranın elde edildiği düşünüldü. Bu nedenle çalışmanın moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Schalper ve ark. (2014) yaptıkları meme kanser çalışmasında PD-L1 mRNA ekspresyon değerini %58 oranında saptamışlardır. Bu kadar yüksek bir PD-L1 mRNA ekspresyon oranının, İHK'sal değerlendirme ile her zaman paralellik göstermeyebileceği belirtilmiştir. Bugünkü

bilgilerimize göre, bu durum, tüm nükleer mRNA ekspresyonunun gerçek protein ekspresyonuna dönüşmemesi ile açıklanabilir.

Ghebeh ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada ayrıca PD-L1 ekspresyonu ile yüksek tümör derecesi, HER2 ekspresyonu ve ER negatifliği arasında ilişki olduğunu bildirmiş ancak lenf nodu durumu ve hasta yaşı ile anlamlı korelasyon bulunmamıştır. Ghebeh ve ark. (2006)'nın çalışmasına benzer şekilde, bizim çalışmamızda da, PD-L1 pozitif ve negatif olgular arasında yaş ($p=0,851$) ve tümör boyutu ($p=0,427$) ile anlamlı ilişki bulunmadı. Disseke edilen lenf nodu sayısı ile fark yoktu ($p=0,512$)

Meme kanserinde moleküler alt tiplerin tanımlanmasından beri bu alt tiplerde hedef tedavi seçenekleri oluşturabilecek biyolojik belirteçlerin belirlenmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İmmünoterapi ise tüm kanser tiplerinde etkinliği yeni araştırılan etkin hedefler arasındadır. 2015 yılında Sabatier ve ark. tarafından ilk kez, PD-L1 protein ekspresyonunun meme kanseri moleküler alt tiplerinde farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. PD-L1 proteininin artmış ekspresyonunun, hormon reseptörü negatifliği, HER2+ liği, artmış Ki67 proliferasyon indeksi, bazal subtipler ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da moleküler subtipler arasında Lüminal A ($p=0,196$), Lüminal B ($p=0,293$), Triple-negatif meme kanserleri ($p=0,485$) ile HER2 pozitifler ($p=0,333$) arasında PD-L1 pozitifliği açısından fark vardı. Ayrıca literatür bilgilerini destekler nitelikte Lüminal grubun tek bir çatı altında toplanması ile oluşan lüminal dışı grup (Hormon reseptörü negatif) ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki vardı (**$p=0,029$**).

Başka bir çalışmada artmış PD-L1 protein ekspresyonu ile Ki67 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirtilmiştir ($p=0,0043$) (Muenst et al., 2014). Bizim çalışmamızda ise Ki67 indeksi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,296$).

İmmünoterapi, özellikle de PD-1 / PD-L1 yolağının blokajı önemli bir tedavi yaklaşımıdır. Son çalışmalara göre meme kanserinde de anti-PD-1, anti-PD-L1 için Faz 1 ve Faz 2 çalışmalarından %5 ile %42 oranında yanıt elde edildiği rapor edilmiştir (Wein ve ark., 2018). Ayrıca immünoterapinin HER2+ meme kanseri hastalarında da yararlı olabileceği fikri de öne sürülmüştür (Wein ve ark., 2018).

Meme kanserinde anti-PD-L1 hedef tedavisi için en yaygın olarak Pembrolizumab (anti-PD-1) ve Atezolizumab kullanılmıştır. PANACEA, ileri evre, transtuzumab dirençli, HER2+

meme kanserlerinde Pembrolizumab'ın 1b/2 çalışmasıdır. Trastuzumab direnci olan olgularda kombine edilerek (trastuzumab+pembrolizumab) kullanılmıştır.

ER+ meme kanserinde immünoterapi etkinliğine dair çok az veri bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada ER+ / HER2- 25 meme kanseri hastası değerlendirilmiş ve %19 PD-L1 pozitif tümör hücresi saptanmıştır. Bu durum, bu olgularda düşük immünojenite ile ilişkilendirilmiştir (Rugo ve ark., 2015).

Bu çalışmalar gösteriyor ki PD-L1'in artmış ekspresyonu ile tümör hücre proliferasyonunda artış arasındaki korelasyon daha agresif tümör tiplerinde daha fazladır. Bunun nedeni yüksek immünojeniteden sorumlu olan yüksek proliferatif aktivite gösteren tümör hücrelerinin daha yüksek oranda mutasyon olma ihtimali ile açıklanmıştır (Sabatier ve ark., 2015; Wein ve ark., 2018). Böylece HER2+ ve triple-negatif gibi daha immünojenik kabul edilen alttiplerde çalışmalar yoğunlaşmıştır.

PD-1 / PD-L1 inhibisyonu kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi ve diğer kontrol noktası inhibitörleriyle kombine edilerek klinikte yanıt oranı arttırılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu çalışma kapsamında yeni bir tedavi seçeneği olabilecek ve bugün çeşitli kanserlerde çalışılan PD-L1 ekspresyon durumu ve klinikopatolojik parametreler arasında ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir. Meme kanseri tanısı alan 107 olguda doku mikroarray ile değerlendirilen PD-L1 protein ekspresyonu yalnızca 8 olguda saptanmıştır. Bu oranın çok düşük olması doku mikroarrayinin tüm tümör alanında değil yalnızca tümör alanının bir kısmında değerlendirme yapan bir yöntem olmasının etkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca tümör heterojenitesi de bir başka etken olabilir. Bu nedenle İHK' nin yetersiz kaldığı durumlarda ve doku ile ilgili tanımlama yapılamadığında mRNA analizi için RT-PCR yapılması uygun olabilir.

- PD-L1 ekspresyon durumunun, olgu sayısı küçük de olsa moleküler subtipler arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ile literatürdeki bilgileri destekler nitelikte Her2+ ve triple-negatif meme kanserinde PD-L1 ekspresyonun diğer gruplara oranla anlamlı olduğu saptanmıştır. Bu nedenle HER2+ ve triple-negatif meme kanseri tanısı alan hastaların tedavi ve prognozlarının iyi takip edilmesi için PD-L1 gen ekspresyonu bakılmalıdır.

- Yalnızca HER2+ ve triple-negatif olduğu bilinen gruplarda immünohistokimya, moleküler teknikler ve biyoinformatik analizler kullanılarak çalışma genişletilmelidir.

- PD-L1 normal immün sistem elemanı olmasına rağmen kanser hücreleri tarafından bu yolak daha agresif olabilmek için kullanılmaktadır. Son zamanlarda meme kanseri anti-PD-1 anti-PDL-1 ajanı olan İpilimumab, Pembrolizumab, Atezoluzimab hem kombine hem de tek başına kullanılmakta ve etkin sonuçlar alınmaktadır.

- Bu çalışmadaki tüm olgulara ait PD-L1 protein ekspresyonu değerlendirmesinin doku mikroarray örneklerinde yapılması bir kısıtlılıktır. Bu nedenle İHK' sal boyamanın, aynı hastayı ilgilendiren birden fazla doku örneğinde çalışılması gerekmektedir.

- Olgu sayısı artırılarak çalışılması durumunda daha anlamlı istatistiksel sonuçlar elde edebileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

Adachi K., Tamada K., Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. *Cancer Science* 2015. <https://doi.org/10.1111/cas.12695>

AIHW (2014). *Cancer in Australia: an overview. Cancer series no. 90.*

Ali H. R., Glont S. E., Blows F. M., Provenzano E., Dawson S. J., Liu B., Caldas C., PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Annals of Oncology* 2015, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv192>

Anagnostou V. K., Brahmer J. R. (2015). Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2015. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-1187>

Anderson W. F., Rosenberg P. S., Prat A., Perou C. M., Sherman M. E., How many etiological subtypes of breast cancer: Two, three, four, or more? *Journal of the National Cancer Institute* 2014. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju165>

Ansell S. M., Lesokhin A. M., Borrello I., Halwani A., Scott E. C., Gutierrez M., Armand P., PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411087>

Barrett M. T., Anderson K. S., Lenkiewicz E., Andreozzi M., Cunliffe H. E., Klassen C. L., Pockaj B. A., Genomic amplification of 9p24.1 targeting JAK2, PD-L1, and PD-L2 is enriched in high-risk triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4494>

Beckers R. K., Selinger C. I., Vilain R., Madore J., Wilmott J. S., Harvey K., O'Toole S. A., Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology* 2016, 69(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/his.12904>

Bedognetti D., Hendrickx W., Marincola F. M., & Miller L. D., Prognostic and predictive immune gene signatures in breast cancer. *Current Opinion in Oncology* 2015. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000234>

Bedognetti D., Maccalli C., Al Bader S. B. J., Marincola F. M., Seliger B., Checkpoint Inhibitors and Their Application in Breast Cancer. *Breast Care* 2016, 11(2), 108–115. <https://doi.org/10.1159/000445335>

Bedognetti D., Wang E., Sertoli M. R., Marincola F. M., Gene-expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer. *Expert Review of Vaccines* 2010. <https://doi.org/10.1586/erv.10.55>

Bertucci F., Finetti P., Birnbaum D., Mamessier E., The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. *OncImmunity* 2016, 5(3), 1–3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1085148>

Blank C., Gajewski T. F., Mackensen A., Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: Implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2005. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0593-x>

Bracarda S., Altavilla A., Hamzaj A., Sisani M., Marrocolo F., Del Buono S., Danielli R., Immunologic checkpoints blockade in renal cell, prostate, and urothelial malignancies. *Seminars in Oncology* 2015. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.02.004>

Brahmer J. R., Tykodi S. S., Chow L. Q. M., Hwu W.-J., Topalian S. L., Hwu P., Wigginton J. M., Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine* 2012. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>

Ceeraz S., Nowak E. C., Noelle R. J., B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.003>

Chen L., Flies D. B., Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* 2013. <https://doi.org/10.1038/nri3405>

Dong H., Strome S. E., Salomao D. R., Tamura H., Hirano F., Flies D. B., Chen L., Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 2002, 8(8), 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>

Egen J. G., Allison J. P., Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 2002. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00259-X)

Eliyatkın N., Özgür H., Erçetin P., Aktaş S., Küpeliöğlü A., Meme karsinomlarında HER-2 durumunun immunohistokimyasal ve moleküler analizlerle değerlendirilmesi Evaluation of

HER-2 status with immunohistochemical and molecular analyses in breast carcinomas 2015, 25(1), 19–27. <https://doi.org/10.5222/terh.2015.019>

Emens L., Braithe F., Cassier P., Delord J., Eder J., Shen X., Krop I., Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer. In *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2014. <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.904288>

Fife B. T., Pauken K. E., Eagar T. N., Obu T., Wu J., Tang Q., Bluestone J. A., Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nature Immunology* 2009. <https://doi.org/10.1038/ni.1790>

Flies D. B., Sandler B. J., Sznol M., Chen L., Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale Journal of Biology and Medicine* 2011, 84(4), 409–421.

Foulkes W. D., Inherited Susceptibility to Common Cancers. *New England Journal of Medicine* 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0802968>

Francisco L. M., Salinas V. H., Brown K. E., Vanguri V. K., Freeman G. J., Kuchroo V. K., Sharpe A. H., PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2009. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>

Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Honjo T., Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 2000, 192(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>

Fu X., Osborne C. K., Schiff R., Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/ HER2-negative breast cancer. *Breast* 2014, 22(02), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.08.001>.Biology

Gadiot J., Hooijkaas A. I., Kaiser A. D. M., Van T.H., Van B.H., Blank C., Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer* 2011. <https://doi.org/10.1002/cncr.25747>

Galon J., Angell, H.K., Bedognetti D., Marincola, F.M., The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.008>

Ghebeh H., Mohammed S., Al-Omair A., Qattant A., Lehe C., Al-Qudaihi G., Dermime

S., The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors. *Neoplasia* 2006, 8(3), 190–198. <https://doi.org/10.1593/neo.05733>

Ghebeh H., Tulbah A., Mohammed S., ElKum, N., Bin Amer S.M., Al-Tweigeri, T., Dermime S., Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *International Journal of Cancer* 2007. <https://doi.org/10.1002/ijc.22703>

Hamanishi J., Mandai M., Iwasaki M., Okazaki T., Tanaka Y., Yamaguchi K., Fujii S., Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611533104>

Herbst R. S., Soria J. C., Kowanetz M., Fine G. D., Hamid O., Gordon M. S., Hodi F. S., Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014. <https://doi.org/10.1038/nature14011>

Hodi F. S., O'Day S. J., McDermott D. F., Weber R. W., Sosman J. A., Haanen J. B., Urba W. J., Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>

Ignatiadis M., Bedard P., Haibe-Kains B., Singhal S., Loi S., Criscitiello C., Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N., Botstein D., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Ignatiadis M., Bedard P., Haibe-Kains B., Singhal S., Loi S., Criscitiello C., Sotiriou, C., A Meta-Analysis of Gene Expression Profiling Studies Identifies Clinically Relevant Oncogenic Pathways in Basal-Like Breast Cancer.: *Cancer Research* 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS-09-106>

Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002 99(19), 12293–12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>

Joseph R. W., Parasramka M., Eckel-Passow J. E., Serie D., Wu K., Jiang L., Castle E., Inverse Association between Programmed Death Ligand 1 and Genes in the VEGF Pathway

in Primary Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2013, 1(6), 378–385. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0042>

Jung K., Choi, I., Emerging Co-signaling Networks in T Cell Immune Regulation. *Immune Network* 2013. <https://doi.org/10.4110/in.2013.13.5.184>

Keir M. E., Liang S. C., Guleria I., Latchman Y. E., Qipo A., Albacker L. A., Sharpe A. H., Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine* 2006. <https://doi.org/10.1084/jem.20051776>

Kesse-Adu R., Shousha S., Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma. *Modern Pathology* 2004. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800103>

Kodumudi K. N., Siegel J., Weber A. M., Scott E., Sarnaik A. A., Pilon-Thomas S., Immune checkpoint blockade to improve tumor infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy. *PLoS ONE* 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153053>

Konishi J., Yamazaki K., Azuma M., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Nishimura M., B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0428>

Krummel M. F., Allison J. P., CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.183.6.2533>

Latchman Y., Wood C. R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Freeman G. J., PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2001. <https://doi.org/10.1038/85330>

Laurent S., Queirolo P., Boero S., Salvi S., Piccioli P., Boccardo S., Pistillo M., The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- α production. *Journal of Translational Medicine* 2013. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-108>

Le D. T., Uram J. N., Wang H., Bartlett B. R., Kemberling H., Eyring A. D., Diaz L. A., PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine* 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>

- Liu J., Hamrouni A., Wolowiec D., Coiteux V., Kuliczowski K., Hetuin D., Quesnel B.,** Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007, *110*(1), 296–304. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-051482>
- Loi S., Michiels S., Salgado R., Sirtaine N., Jose V., Fumagalli D., Sotiriou C.,** Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. *Annals of Oncology* 2014. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu112>
- Lynch T. J., Bondarenko I., Luft A., Serwatowski P., Barlesi F., Chacko R., Reck M.,** Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: Results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *Journal of Clinical Oncology* 2012, *30*(17), 2046–2054. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4032>
- Maj T., Wei S., Welling T., Zou W.,** T cells and costimulation in cancer. *Cancer Journal (United States)* 2013. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000002>
- Matsuzaki J., Gnjatic S., Mhawech-Fauceglia P., Beck A., Miller A., Tsuji T., Odunsi K.,** Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003345107>
- Melero I., Grimaldi A. M., Perez-Gracia J. L., Ascierto P. A.,** Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination. *Clinical Cancer Research* 2013. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2214>
- Mittendorf E. A., Philips A. V., Meric-Bernstam F., Qiao N., Wu Y., Harrington S., Alatrash G.,** PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Immunology Research* 2014, *2*(4), 361–370. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0127>
- Muenst S., Schaerli A. R., Gao F., Daster S., Trella E., Droeser R. A., Soysal S. D.,** Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2014, *146*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2988-5>
- Muenst S., Soysal S. D., Gao, F., Obermann E. C., Oertli D., Gillanders W. E.,** The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated

with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2013. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2581-3>

Murtas D., Maric D., De Giorgi V., Reinboth J., Worschech A., Fetsch P., Tomei S., IRF-1 responsiveness to IFN- γ predicts different cancer immune phenotypes. *British Journal of Cancer* 2013. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.335>

Nanda R., Chow L., Dees E., Berger R., Gupta S., Geva R., Buisserset L., A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer. In *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2014. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Pardoll D.M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2012. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Ribas A., Hodi F. S., Kefford R., Hamid O., Daud A., Wolchok J. D., Robert C., Efficacy and safety of the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475 in 411 patients (pts) with melanoma (MEL). *Journal of Clinical Oncology* 2014. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.18_suppl.lba9000

Rimm D., Schalper K., Pusztai L., Unvalidated antibodies and misleading results. *Breast Cancer Research and Treatment* 2014. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3061-0>

Rizvi N. A., Hellmann M. D., Snyder A., Kvistborg P., Makarov V., Havel J. J., Chan T. A., Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>

Robert C., Ribas A., Wolchok J. D., Hodi F. S., Hamid O., Kefford R., Daud A., Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: A randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet* 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60958-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60958-2)

Rugo H., Delord J., Im S., Ott P., Piha-Paul S., Bedard P., Tan A., Preliminary efficacy and safety of pembrolizumab (MK-3475) in patients with PD-L1-positive, estrogen receptor-positive (ER+)/HER2-negative advanced breast cancer enrolled in KEYNOTE-028. In *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2015. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS15-S5-07>

Sabatier R., Finetti P., Mamessier E., Adelaide J., Chaffanet M., Ali H.R., Bertucci F., Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget* 2015, 6(7), 5449–5464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3216>

Sabatier R., Finetti P., Mamessier E., Raynaud S., Cervera N., Lambaudie E., Bertucci

F., Kinome expression profiling and prognosis of basal breast cancers. *Molecular Cancer* 2011. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-86>

Sanmamed M. F., Pastor F., Rodriguez A., Perez-Gracia J. L., Rodriguez-Ruiz M. E., Jure-Kunkel M., Melero I., Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunorapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Seminars in Oncology* 2015. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.014>

Schalper K.A., Velcheti V., Carvajal D., Wimberly H., Brown J., Pusztai L., Rimm D. L., In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased tils and better outcome in breast carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2702>

Schumacher T. N., Schreiber R. D., Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4971>

Schütz F., Stefanovic S., Mayer L., Von Au A., Domschke C., Sohn C., PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment* 2017, 40(5), 294–297. <https://doi.org/10.1159/000464353>

Shah M. A., Update on metastatic gastric and esophageal cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.1799>

Shin D. S., Ribas A., The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: What's here, what's next? *Current Opinion in Immunology* 2015, 33, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.006>

Soliman H., Khalil F., Antonia S., PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS ONE* 2014, 9(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088557>

Sponaas A. M., Moharrami N.N., Feyzi E., Standal T., Rustad E. H., Waage A., Sundan, A., PDL1 expression on plasma and dendritic cells in myeloma bone marrow suggests benefit of targeted anti PD1-PDL1 therapy. *PLoS ONE* 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139867>

Strome S. E., Dong H., Tamura H., Voss S. G., Flies D. B., Tamada K., Chen L. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 2003.

Sunshine J., Taube J. M., PD-1/PD-L1 inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 2015,

23, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>

Swaika A., Hammond W. A., Joseph R. W., Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Molecular Immunology* 2015, 67(2), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.009>

Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Sakaguchi S., Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4. *Journal of Experimental Medicine* 2000, 192(2), 303–309. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.303>

Taube J. M., Anders R. A., Young G. D., Xu H., Sharma R., McMiller T. L., Chen L., Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science Translational Medicine* 2012. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>

Taube J. M., Klein A., Brahmer J. R., Xu H., Pan X., Kim J. H., Anders R. A., Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clinical Cancer Research* 2014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3271>

Teng M. W. L., Ngiow S. F., Ribas A., Smyth M. J., Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Research* 2015. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.

Thompson R. H., Gillett M. D., Cheville J. C., Lohse C. M., Dong H., Webster W. S., Kwon E.D., Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(49), 17174–17179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406351101>

Topalian S., Drake C., Pardoll D., Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology* 2012, 24(2), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.12.009>. Targeting

Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., McDermott D. F., Sznol M., Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine* 2012. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>

Topalian S. L., Sznol M., McDermott D. F., Kluger H. M., Carvajal R. D., Sharfman W. H., Hodi F. S., Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with adva

nced melanoma receiving nivolumab. *Journal of Clinical Oncology* 2014. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.0105>

Torre L. A., Bray F., Siegel R. L., Ferlay J., Lortet-tieulent J., Jemal A., Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 2015, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.

Tran B., Bedard P. L., Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets, *Breast Cancer Research* 2011, <https://doi.org/10.1186/bcr2904>

Tsutsui S., Ohno S., Murakami S., Kataoka A., Kinoshita J., Hachitanda Y., Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer, *American Journal of Surgery* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(02\)01203-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(02)01203-5)

Velcheti V., Schalper K. A., Carvajal D. E., Anagnostou V. K., Syrigos K. N., Sznol M., Rimm, D. L., Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer, *Laboratory Investigation* 2014. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.130>

Walunas T. L., Lenschow D. J., Bakker C. Y., Linsley P. S., Freeman G. J., Green J. M., Bluestone J. A., CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation, *Immunity* 1994. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X)

Wang E., Bedognetti D., Tomei S., Marincola F. M., Common pathways to tumor rejection, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013. <https://doi.org/10.1111/nyas.12063>

Ward F. J., Dahal L. N., Wijesekera S. K., Abdul-Jawad S. K., Kaewarpai T., Xu H., Barker R. N., The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses, *European Journal of Immunology* 2013. <https://doi.org/10.1002/eji.201242529>

Wein L., Luen S. J., Savas P., Salgado R., Loi S., Checkpoint blockade in the treatment of breast cancer: current status and future directions, *British Journal of Cancer* 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0126-6>

Yersal O., Barutca S., Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications, *World Journal of Clinical Oncology* 2014. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>

Yu H., Yang J., Jiao S., Li Y., Zhang W., Wang J., Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunology Immunotherapy : CII*. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1696-2>

Zielinski C., Knapp S., Mascaux C., Hirsch F., Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2013, 24(5), 1170–1179. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds647>

EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 25/08/2017-E.47843



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 53043469-050.04.04
Konu : Kararlar

Sayın Yrd.Doç.Dr. Nuket ELİYATKIN
Öğretim Üyesi

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.08.2017 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 17 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

e-imzalıdır

Prof.Dr. Mustafa Selim ÖZKÖK
Kurul Başkanı

KARAR 17

Protokol No : 2017/1210
Sorumlu Yürütücü : Yrd.Doç.Dr.Nuket ELİYATKIN
Patoloji AD

Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Nuket ELİYATKIN'ın "**Meme karsinomunda PDL-1 ekspresyonunun değerlendirilmesi**" başlıklı klinik araştırmasının 10.08.2017 tarihli kurul kararında eksiklikler saptanmıştı. 16.08.2017 tarihli gelen dilekçesi ve ekleri görüldü.

Sonuçta, klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde (ADÜBAP başvuru onay belgesinin dosyaya konulmak üzere gelmesi şartıyla) gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde taahhüt edilen **çalışma bittikten sonra nihai raporun**, [Sonuç Raporu (web'te) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] **gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına** ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YAŞİN Betül
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : VAN- 01.01.1990
Telefon : 05364591034
E-mail : btlyasin@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (3.05 / 4.00)	17.06.2015