



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL HAYDARPAşA NUMUNE
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ**

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**EVRE I-III OPERE MİDE KANSERİNDE HİSTOPATOLOJİK
ÖZELLİKLERİN VE TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERİN
SAĞKALIM AÇISINDAN PROGNOSTİK VE PREDİKTİF ÖNEMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ayşe Albayrak

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL HAYDARPAŞA NUMUNE
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**EVRE I-III OPERE MİDE KANSERİNDE HİSTOPATOLOJİK
ÖZELLİKLERİN VE TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERİN
SAĞKALIM AÇISINDAN PROGNOSTİK VE PREDİKTİF ÖNEMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ayşe Albayrak

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Murat Sarı

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren engin bilgi, tecrübe ve sabrıyla yetiştirmemde büyük emeği olan, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, duruşuyla iyi bir insan ve iyi bir hekim olma yolunda örnek aldığım, kliniğimizin eğitim ve idari sorumlusu çok değerli hocam Prof. Dr. Kadir KAYATAŞ' a,

Tez çalışmamın seçimi ve gerçekleştirilmesi sürecinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yol gösteren, bilimsel bakış açısı ve mesleki yetkinliğiyle akademik gelişimime katkı sağlayan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Murat SARI' ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca akademik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yetiştirmeme büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Funda Müşerref TÜRKMEN ve Prof. Dr. Refik DEMİRTUNÇ' a,

Tez çalışmamın histopatolojik değerlendirmeleri için büyük emek ve zaman harcayan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Fügen VARDAR AKER ve Uz. Dr. Aylin GÖNÜLTAŞ' a,

Asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım, daima anımsayacağım ve çok özleyeceğim tüm asistan arkadaşlarıma, tez çalışmamda her türlü yardım ve desteğinden dolayı arkadaşım Uz. Dr. Büşra YEMİŞ' e

İç hastalıkları kliniğinde beraber çalıştığım tüm uzman abi ve ablalarım, hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, başarılarımın esas kahramanları canım annem Hatice ALBAYRAK ve canım babam Ali ALBAYRAK' a ve canım kardeşlerime

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Ayşe ALBAYRAK

İstanbul, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. MİDE KANSERİ	2
2.1.1. Mide Kanseri İnsidansı ve Epidemiyolojisi	2
2.1.2. Mide Kanserinde Risk Faktörleri	3
2.1.3. Mide Kanserinin Sınıflandırılması.....	4
2.1.4. Mide Kanserinde Klinik Belirti ve Bulgular.....	4
2.1.5. Mide Kanserinde Tanı.....	5
2.1.6. Mide Kanserinde Evreleme.....	6
2.1.7. Mide Kanserinde Tedavi.....	8
2.2. TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLER (TİL).....	9
2.3. İMMÜNSKOR.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	12
3.1. OLGULAR.....	12
3.1.1. Hasta Grubunun Belirlenmesi	12
3.1.2. Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri	12
3.1.3. Araştırmaya Dahil Edilmeme Kriterleri	13

3.1.4. Verilerin Oluşturulması	13
3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	13
3.2.1. Doku Örneklerinin Seçimi, Hazırlanması ve Değerlendirilmesi.....	13
3.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama.....	14
3.2.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	16
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	16
3.4. ÇIKAR ÇATIşMASI	17
3.5. ETİK KURUL ONAYI	17
4. BULGULAR	18
5. TARTIşMA	52
6. SONUÇLAR	56
7. KAYNAKLAR	57
8. EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 1: Etik Kurul Onay Belgesi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
9. ÖZGEÇMİş.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR LİSTESİ

AFP:	Alfa-fetoprotein
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
BRCA-1:	Breast cancer 1
BRCA-2:	Breast cancer 2
BT:	Bilgisayarlı tomografi
CA19-9:	Kanser antijeni 19-9
CA72-4:	Kanser antijeni 72-4
CA-125:	Kanser antijeni 125
CEA:	Karsinoembriyonik antijen
CKİ:	Charlson Komorbidite İndeksi
CT:	Center of tumor
CTLA-4:	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4
DFS:	Disease-free survival
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DSS:	Disease-specific survival
ECOG:	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
EMR:	Endoskopik mukozal rezeksiyon
ESD:	Endoskopik submukozal diseksiyon
ESMO:	European Society for Medical Oncology
EUS:	Endoskopik ultrasonografi
FDG:	Florodeoksiglukoz
FFPE:	Formalin-fixed paraffin-embedded
GİS:	Gastrointestinal sistem
H&E:	Hematoksilen-eosin
HER2:	Human epidermal growth factor receptor-2
IHC:	Immunohistochemistry
IM:	Invazive margin
ISH:	İn-situ hibridizasyon

İM: İnvazif marjin

İS: İmmünskor

MÖ: Milattan önce

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

NK: Naturel killer

NLR: Nötrofil/lenfosit oranı

NSAİİ: Non-steroidal anti-inflamatuar ilaç

OS: Overall survival

PD-1: Programmed cell death protein 1

PD-L1: Programmed cell death ligand 1

PET-BT: Pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografi

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SUAM: Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

TİL: Tümörü infiltre eden lenfosit

TM: Tümör merkezi

UICC: Union for International Cancer Control

VKİ: Vücut kitle indeksi

WHO: World Health Organization

5-FU: 5-Florourasil

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 1: Mide Kanserinde AJCC/UICC TNM Evreleme Sistemi I.....	7
Tablo 2: Mide Kanserinde AJCC/UICC TNM Evreleme Sistemi II.....	8
Tablo 3: Hastaların demografik özellikleri.....	18
Tablo 4: Hastaların klinik ve patolojik özellikleri.....	20
Tablo 5: Tümörü infiltrate eden lenfosit (TİL) sayıları ve aralığı.....	22
Tablo 6: Tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TİL) çeşitli değişkenlerle korelasyonu.....	25
Tablo 7: Tümörü infiltrate eden lenfositler (TİL) ve hastalık nüksü arasındaki ilişki...	26
Tablo 8: Her bir tümör bölgesindeki (TM veya İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre tüm hastalar için medyan hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri..	28
Tablo 9: Her iki tümör bölgesindeki (İM ve TM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre tüm hastalar için medyan hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri..	29
Tablo 10: Her bir tümör bölgesindeki (TM veya İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluğuna göre tüm hastalar için medyan genel sağkalım (OS) süreleri.....	35
Tablo 11: Her iki tümör bölgesindeki (TM ve İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre tüm hastalar için medyan genel sağkalım (OS) süreleri.....	36
Tablo 12: Tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri.....	37
Tablo 13: Tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre genel sağkalım (OS) süreleri.....	41

Tablo 14: Hastaliksız sağkalım (DFS) için tek değişkenli ve çok değişkenli analizler.....	44
Tablo 15: Genel sağkalım (OS) için tek değişkenli ve çok değişkenli analizler.....	47
Tablo 16: Evre ve İmmünskor (İS) durumlarına göre hastaliksız sağkalım (DFS) süreleri.....	49
Tablo 17: Evre ve İmmünskor (İS) durumlarına göre genel sağkalım (OS) süreleri.....	50
Tablo 18: Tümörün merkezinde (TM) ve invazif marjinde (İM) tümör-infiltrate eden lenfositler (TİL) ve genel sağkalım arasındaki ilişki.....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

- Şekil 1:** Tüm dünyada 2020 yılında her iki cinsten, tüm yaşlarda yeni vakaların ve ölümlerin sayısı.....2
- Şekil 2:** Türkiye’de 2020 yılında her iki cinsten, tüm yaşlarda yeni vakaların sayısı...3
- Şekil 3:** Tümör nüksü olan (siyah çubuklar) ve tümör nüksü olmayan (beyaz çubuklar) olgularda tümör invazif marjiniindeki(İM) ve tümörün merkezindeki(TM) tümör-infiltrate eden lenfosit tiplerine göre hücre yoğunlukları ortalamasının karşılaştırılması.....27
- Şekil 4:** CD3 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjiniindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastalıksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi.....30
- Şekil 5:** CD8 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjiniindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastalıksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi.....31
- Şekil 6:** PD-1 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjiniindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastalıksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi.....32
- Şekil 7:** PD-L1 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjiniindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastalıksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi.....33
- Şekil 8:** İki immün hücrenin birlikte analiz edildiği tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) eğrileri.....38
- Şekil 9:** Üç immün hücrenin birlikte analiz edildiği tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) eğrileri.....39

Şekil 10: Tümör merkezindeki (TM) CD3 ve PD-1 in birlikte analiz edildiği genel sağkalım (OS) eğrisi.....	42
Şekil 11: Tümör merkezindeki (TM) CD3, CD8 ve PD-L1 in birlikte analiz edildiği genel sağkalım (OS) eğrisi.....	42
Şekil 12: CD3+CD8+PD-L1 immünskor ile hastalıksız sağkalım (DFS) arasındaki ilişki eğrisi.....	45
Şekil 13: Evre ile hastalıksız sağkalım (DFS) arasındaki ilişki eğrisi.....	46
Şekil 14: Evre ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre hastalıksız sağkalım (DFS) eğrileri.....	49
Şekil 15: Evre ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre genel sağkalım (OS) eğrisi.....	50

ÖZET

Amaç: Mide kanseri tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Bugüne dek yapılan çalışmalarda mide kanserinde histopatolojik özelliklerinin ve tümörü infiltre eden lenfositlerin belirlenmesinin prognoz tayininde kullanılabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızda evre I-III opere mide kanserinde tanı anında histopatolojik özelliklerin ve tümörü infiltre eden lenfositlerin saptanması ile hem genel sağkalımın, hem de hastalıksız sağkalımın öngörülebilmesini ve aynı zamanda bu patolojik belirteçlerin tedavi yanıtına etkisini belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza S.B.Ü. Haydarpaşa Numune SUAM' nde evre I-III mide kanseri tanısı alan, opere edilen ve onkoloji polikliniğinden takipli hastalar dahil edildi. Bu hastaların patoloji arşivindeki parafin bloklarından tümörün merkezini ve invazif sınırını içeren uygun kesitler alındıktan sonra histopatolojik özellikler ve tümörü infiltre eden lenfositler incelendi. PD-1+, PD-L1+, CD3+ ve CD8+ T lenfositlerin sayımı yapıldı. Hem tümörün merkezinde hem de invazif sınırında ayrı ayrı yoğunlukları belirlendi. Daha sonra bu hastaların onkoloji polikliniğindeki dosyaları incelendi. 3 yıllık takiplerinde hastaların genel sağkalım, hastalıksız sağkalım ve verilen tedaviye yanıtları ile histopatolojik özelliklerin ve tümörü infiltre eden lenfositlerin ilişkisi analiz edildi. Sonuç olarak elde edilen patolojik verilerin evre I-III opere mide kanserinde prognostik ve prediktif önemi değerlendirildi.

Bulgular: Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı mide kanserinin genel özellikleri ile uyumluydu. CD3, CD8, PD-1 ve PD-L1 in tümörün merkezinde veya invazif marjindeki infiltrasyon oranları ile sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunamadı. Sadece PD-L1 infiltrasyonunun düşük yoğunlukta olmasının sağkalımı olumlu yönde etkilediği görüldü. İmmün hücrelerin ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonları ile oluşturulan immünskorlardan; CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 immünskorlar ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptandı. Tümörü infiltre eden lenfositler ile tedavi yanıtı arasında korelasyon saptanmadı.

Sonuç: Toplam 95 hasta ile yapılan bu çalışmada tümörü infiltre eden lenfositlerden CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 kombinasyonlarının prognostik değeri olduğu gösterildi. İmmünskor ile evre birlikte değerlendirildiğinde; evrenin

azalmasının ve immünskorun yükselmesinin sağkalımı pozitif yönde etkilediği saptandı.

Anahtar Kelimeler: İmmünskor, mide kanseri, tümörü infiltre eden lenfositler (TİL)



ABSTRACT

Aim: Gastric cancer is a cause of morbidity and mortality all over the world. In studies conducted to date, it has been shown that histopathological features and detection of tumor infiltrating lymphocytes can be used in the determination of prognosis in gastric cancer. In our study, we aimed to gather information about predicting both overall survival and disease-free survival by detecting histopathological features and tumor-infiltrating lymphocytes at the time of diagnosis in stage I-III operated gastric cancer, as well as determining the effects of these pathological markers on the treatment response.

Materials and Methods: Patients diagnosed with stage I-III gastric cancer in S. B. Ü. Haydarpaşa Numune SUAM, operated on and followed up in the oncology outpatient clinic were included in our study. After taking appropriate sections containing the center and invasive margin of the tumor from the paraffin blocks in the pathology archive of these patients, histopathological features and lymphocytes infiltrating the tumor were examined. CD3+, CD8+, PD-1+ and PD-L1+ T lymphocytes were counted. Their separate densities were determined both in the center of the tumor and at the invasive margin. Then, the files of the patients in the oncology outpatient clinic were reviewed. The relationship between histopathological features, tumor infiltrating lymphocytes and overall survival, disease-free survival, response to treatment were analyzed in the 3-year follow-up of the patients. As a result, the prognostic and predictive significance of the pathological data obtained in stage I-III operated gastric cancer was evaluated.

Results: The age and gender distribution of the patients were compatible with the general characteristics of gastric cancer. No significant correlation was found between the infiltration rates of CD3, CD8, PD-1 and PD-L1 at the center or invasive margin of the tumor and survival. It was observed that only the low intensity of PD-L1 infiltration had a positive effect on survival. Immunoscores formed by double, triple and quadruple combinations of immune cells; a significant correlation was found between CD3+PD-1 and CD3+CD8+PD-L1 immunoscores and survival. There was no correlation between tumor infiltrating lymphocytes and treatment response.

Conclusion: In this study which was conducted with a total of 95 patients, it was shown that CD3+PD-1 and CD3+CD8+PD-L1 combinations from tumor

infiltrating lymphocytes have prognostic value. When the immunoscore and the stage are evaluated together; it was determined that the decrease in the stage and the increase in the immunoscore affected the survival positively.

Key Words: Gastric cancer, immunoscore, tumor infiltrating lymphocytes (TIL)



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri tüm dünyada sıklıkta görülen bir kanser türüdür. Türkiye de ise erkeklerde 5., kadınlarda 6. sıklıkta görülür (1). Erken evrelerde non-spesifik belirtiler göstermesi sebebiyle genellikle zor tanı alır, bu yüzden prognozu oldukça kötü seyretmektedir.

Mide kanseri tanısı alan hastalarda, prognozu belirlerken ve buna göre tedavi kararı verirken uluslararası geçerliliği olan TNM sınıflandırması kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar aynı evredeki hastalarda hastalığın seyrinin, yayılımının ve nüks oranının farklı olabildiğini göstermektedir. Bu sebeple, klinik değerlendirmede hastaların prognozunu belirlemede ek parametrelerin kullanılması gündeme gelmiştir. Tümörü infiltrate eden lenfositlerin varlığının prognozu belirlemedeki önemini gösteren çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bütün bu çalışmalar sonucunda tümörü infiltrate eden lenfositlerin tipinin (CD3+, CD8+, PD-1+, PD-L1+ gibi), dansitesinin ve lokasyonunun (tümör merkezi, invazif tümör sınırı gibi) prognoz belirlemedeki en önemli belirteçler olduğu görülmüştür (2). Özellikle kolorektal kanserler başta olmak üzere birçok farklı kanser türünde immün hücre yanıtı-prognoz ilişkisi çalışmaları yapılmış ve benzer olumlu sonuçlar elde edilmiştir (3). Bu çalışmada histopatolojik özelliklerin ve tümörü infiltrate eden lenfositlerin opere mide kanserinde genel sağkalımla, rekürrensiz sağkalımla ilişkisinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Bir diğer kolda, tedavi alan hastalarda tümörü infiltrate eden lenfositlerin oranına göre tedaviden fayda görme veya görmeme durumlarını da analiz edilerek adaptif immün yanıtın prediktif değeri olabileceğini ve tedavi kararı verirken kullanabileceğini göstermek hedeflenmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalarda özellikle kolorektal kanserler başta olmak üzere birçok kanser türünde tanı anında belirlenen histopatolojik özelliklerin ve tümörü infiltrate eden lenfositlerin sağkalım açısından öngörücü olabileceği gösterilmiştir (3). Yine kolorektal kanserlerde tümörü infiltrate eden lenfositlerin yerleşimleri ve yoğunlukları ile tedaviye yanıt arasında anlamlı ilişki olduğunu öne süren çalışmalar yapılmıştır (4). Çalışmamızın özgün değeri; mide kanseri hastalarında histopatolojik özelliklerin ve tümörü infiltrate eden lenfositlerin prognostik değerinin yanı sıra hastaların tedaviye yanıtını öngörücü etkisinin yani prediktif değerinin de incelenmesidir.

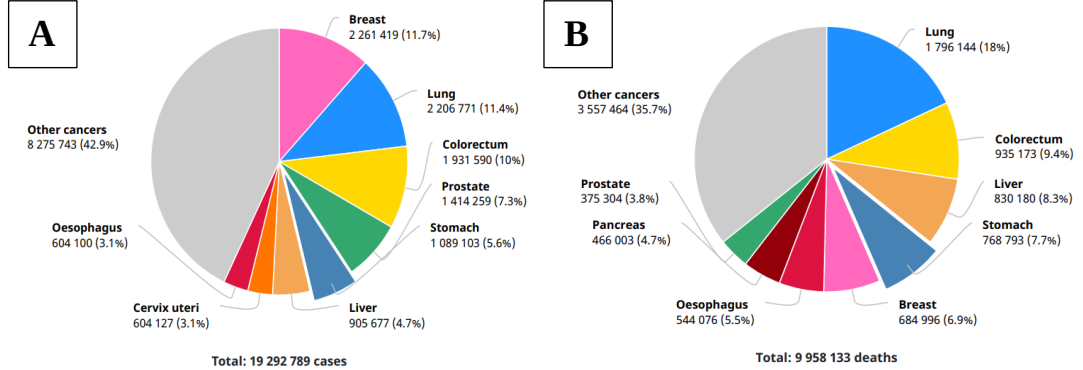
2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİDE KANSERİ

2.1.1. Mide Kanseri İnsidansı ve Epidemiyolojisi

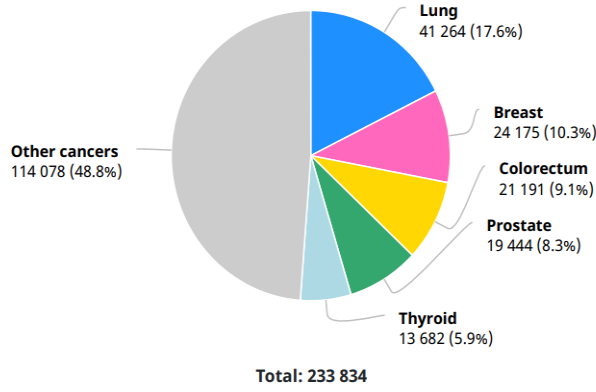
Mide kanseri ilk olarak eski Mısır'da hiyeroglif yazıtlarda ve el yazmalarında M.Ö. 3000 yıllarında tanımlanmıştır. 1760-1839 yılları arasında İtalya'nın Verona şehrinde toplanan verileri kullanarak yapılan kanser insidansı ve mortalitesinin ilk büyük istatistiksel çalışması; mide kanserinin en yaygın ve en mortal seyirli kanser olduğunu göstermiştir. Günümüze gelene kadar önemli coğrafi, etnik ve sosyoekonomik farklılıklar göstermesine rağmen mide kanseri en önemli kanserlerden biri olmaya devam etmektedir.

Mide kanseri tüm dünyada sık görülen ve ölüm oranı oldukça yüksek kanserlerden biridir. Yalnızca 2020 yılında dünya çapında 1 milyondan fazla yeni vakadan ve 780.000 ölümden sorumlu tutulmaktadır (Şekil 1) (5).



Şekil 1: A. Tüm dünyada 2020 yılında her iki cinste, tüm yaşlarda yeni vakaların sayısı (5), **B.** Tüm dünyada 2020 yılında her iki cinste, tüm yaşlarda ölümlerin sayısı (5)

Türkiye’de ise nüfus artışına paralel olarak yıllık yeni tanı alan kanser hasta sayısı da artmaktadır. **2020** yılında Türkiye nüfusu 84.339.067 iken, yıllık yeni kanser vaka sayısı 233.834 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 126.335 olarak bildirilmiştir. 2020 yılında ülkemizde en sık görülen ilk 5 kanser türü, akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve tiroid kanseridir. Mide kanseri ise 6. sırada gelmektedir (Şekil 2).



Şekil 2: Türkiye’de 2020 yılında her iki cinsten, tüm yaşlarda yeni vakaların sayısı (5)

Mide kanseri insidansı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika’da en yüksek oranlarda görülürken, Kuzey Amerika ve Afrika’nın bazı bölgelerinde en düşük oranlarda görülmektedir.

Mide kanseri riski yaşla birlikte artar. En sık 5. dekatta görülmektedir. 2014 ve 2018 yılları arasında mide kanseri vakalarının %2 si 34 yaşının altında, %38 i 35 ile 64 yaşları arasında, %60 ı ise 65 yaşının üzerinde görülmüştür (6). Erkeklerde mide kanseri görülme olasılığı kadınlardan iki kat daha fazladır (7).

2.1.2. Mide Kanserinde Risk Faktörleri

Mide kanseri heterojen ve yaygın bir grup hastalıktır. Çeşitli genetik ve çevresel etkenler gelişiminde rol oynayabilmektedir. Vakaların çoğu sporadiktir. Yaklaşık %10 kadarında ailesel geçiş görülebilmektedir (8).

Mide kanserinde risk faktörü olan etmenler aşağıda sıralanmıştır:

- Yaş ve cinsiyet
- A kan grubu
- Aile öyküsü (birinci derece akrabalarda mide kanseri öyküsü olması)
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonu
- *Epstein-Barr virüs* enfeksiyonu
- Pernisiyöz anemi
- Sigara içimi
- Alkol tüketimi

- Obezite
- Nutrisyonel sebepler (yüksek tuz tüketimi, düşük A ve C vitamin alımı, tükülenmiş gıda tüketimi, yetersiz sebze-meyve ve lif alımı)
- Genetik mutasyonlar (ailesel gastrik kanserler, herediter non-polipozis kolon kanserleri, familyal adenomatöz polipozis sendromu, Li-Fraumeni sendromu, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları)
- Predispozan durumlar (adenomatöz gastrik polipler, kronik atrofik gastrit, displaziler, intestinal metaplazi, menetrier hastalığı)
- Mesleki maruziyet (lastik, kauçuk sanayisinde çalışanlar, kömür işçileri)

2.1.3. Mide Kanserinin Sınıflandırılması

Mide kanserlerinin %95 ini adenokarsinomlar oluşturur. Geri kalanlar ise lenfoma, yassı hücreli karsinom, karsinoid tümör, leiomyosarkom gibi daha nadir görülen tümörlerdir.

Mide kanserleri makroskopik sınıflandırılmasında en sık Borrmann sınıflaması kullanılır. Morfolojik özelliklere göre yapılan Borrmann sınıflamasına göre tümörler polipoid (tip I), ülseratif (tip II), ülsero-infiltratif (tip III) ve diffüz infiltratif (tip IV) olarak 4 gruba ayrılmıştır (9).

Lauren tarafından 1965 yılında yapılan sınıflandırmaya göre mide kanserleri histolojik özelliklerine göre intestinal ve diffüz olmak üzere ikiye ayrılmıştır (10). Vakaların %70 i intestinal, %25 i diffüz, %5 i ise mikst tiptedir. Diffüz tipte mide karsinomları, intestinal tipte mide karsinomlarına göre daha kötü prognozludur.

Mide kanserinin histolojik derecelendirilmesi ise; GX: Değerlendirilemeyen, G1: İyi diferansiye, G2: Orta derecede diferansiye, G3: Az diferansiye ve G4: Andiferansiye şeklinde yapılmaktadır.

2.1.4. Mide Kanserinde Klinik Belirti ve Bulgular

Mide kanseri erken evrelerde genellikle asemptomatik seyretmektedir. Ancak ileri evrelerde belirti ve bulgu verdiği için tedavisi oldukça güç ve mortalitesi yüksek

bir kanser türüdür. Tanı anında en sık görülen belirtiler kilo kaybı ve karın ağrısıdır (11). Daha az sıklıkla mide bulantısı, disfaji (yutma güçlüğü), erken doyma hissi, karında şişkinlik gibi şikayetler de görülebilmektedir. Ayrıca hastalar kitleden kanama olması sonucu okült veya aşıkır gastrointestinal kanama kliniği ile de başvurabilmektedir. Melena veya hematemez hastaların %20 sinden azında görülebilmektedir (11).

Hastalar ayrıca uzak metastatik hastalığın belirti veya bulguları ile de başvurabilirler. Metastatik hastalığın en sık görüldüğü bölgeler karaciğer, periton ve bölgesel olmayan veya uzak lenf nodlarıdır. Daha az yaygın olarak, yumurtalıklar, beyin, kemik, akciğer, plevra veya yumuşak doku metastazları oluşabilir.

Lenfatik yayılımı olan hastalarda fizik muayenede sol supraklaviküler lenf nodu (metastatik hastalığın en sık fizik muayene bulgusu olan Virchow nodülü) saptanabilir (12). Ayrıca periumblikal bölgede nodül (Sister Mary Joseph nodülü) veya sol aksiller lenf nodu metastazı (Irish nodülü) da ortaya çıkabilir. Gastrik karsinomların overlere metastazı (Krukenberg tümörü) ya da rektouterin ve rektovezikal mesafeye metastazı [rektal veya vajinal muayenede kitle, Blumer rafi (13)] da görülebilmektedir.

Mide kanserlerinde laboratuvar tetkiklerinde gizli kanamaya sekonder gelişen demir eksikliği anemisi görülebilir ve gaitada gizli kan pozitifliği saptanabilir. Ayrıca mide kanserli hastalarda serumda CEA, CA125, CA 19-9, CA 72-4 ve AFP seviyeleri farklı oranlarda yükselebilmektedir.

2.1.5. Mide Kanseri Tanı

Erken evre mide kanserlerinin çoğu asemptomatiktir. Gelişen semptomların nonspesifik olması sebebiyle tanı geç konulmaktadır. Gastrik mukozanın değerlendirilmesinde endoskopi ve radyolojik görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Mide kanserinde kesin tanı histopatolojik olarak konur. Bu sebeple üst GİS endoskopisi, biyopsi örneği alınarak tümörün histopatolojik incelenmesine olanak sağladığından en duyarlı ve anlamlı teşhis metodu olarak kabul edilir.

Endoskopik ultrasonografi (EUS) mide kanserlerinde evrelemede kullanılabilmektedir. EUS ile gastrointestinal sistemin farklı katmanları daha hassas şekilde ayırt edilebilir ve bölgesel lenf düğümleri değerlendirilebilir. Ayrıca, EUS eşliğinde ince iğne aspirasyonu aracılığıyla şüpheli lezyon veya lenf nodu örneklerinden patolojik inceleme yapılabilir (14).

Radyolojik incelemeler mide kanseri tanısı için genellikle gerekli değildir. Bilgisayarlı tomografi (BT), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve Pozitron Emisyon Tomografi (PET-BT) çoğunlukla tanı konulduktan sonra evreleme amaçlı kullanılabilmektedir. FDG pozitif hastalarda metabolik yanıtın gösterilmesi ile tedaviye yanıtın takibinde FDG PET-BT kullanılabılır (15).

2.1.6. Mide Kanserinde Evreleme

Mide kanserinde evreleme yapılması, optimal tedavinin düzenlenmesine olanak sağlar ve prognozu öngördürücü niteliktedir. Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC) tarafından ortaklaşa geliştirilen TNM evrelemesi tüm dünyada en yaygın kullanılan evreleme sistemidir. En son 2017 de 8. baskısı yayınlanmıştır (Tablo 1, Tablo 2).

TNM evrelemesinde; tümör 'T' ile, lenf nodu 'N' ile, ve metastaz 'M' ile kodlanmıştır. T tümör invazyonunu ve çapını, N pozitif lenf nodunu göstermektedir (16). Büyük kurvatur, büyük omentum, gastroduodenal, gastroepiploik, pre-pilorik, antrum ve pankreatikoduodenal küçük kurvatur, küçük omentum, sol gastrik, kardiyoözefagial, common hepatikler, çölyak, hepatoduodenal, bilateral pankreatik ve splenik lenf nodları (pankreatikolienal, peripankreatik, splenik) bölgesel lenf nodlarıdır. Diğer intraabdominal lenf nodları (hepatoduodenal, retropankreatik, portal, mesenterik, and paraaortik) uzak metastaz sayılır (17).

Tablo 1: Mide Kanserinde AJCC/UICC TNM Evreleme Sistemi I

Primer Tümör (T)	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ: Lamina propria invazyonu olmadan intraepitelial tümör
T1	Tümörün lamina propria, muskularis mukoza ya da submukoza işgali
T1a	Tümörün lamina propria veya muskularis mukoza işgali
T1b	Tümörün submukoza işgali
T2	Tümörün muskularis propriayı işgali
T3	Tümörün visseral periton veya komşu yapılara invazyonu olmadan subseröz bağ dokusuna yayılımı
T4	Tümör seroza (visseral periton) ya da komşu yapılara invaze
T4a	Tümörün seroza (visseral periton) invaze
T4b	Tümör komşu yapılara invaze
Bölgesel Lenf Düğümleri (N)	
Nx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1 ile 2 Bölgesel lenf nodu metastazı
N2	3 ila 6 bölgesel lenf nodu metastazı
N3	7'den fazla bölgesel lenf nodu metastazı
N3a	7-15 bölgesel lenf nodlarına metastaz
N3b	16 veya daha fazla bölgesel lenf metastazı
Uzak Metastaz (M)	
Mx	Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Tablo 2: Mide Kanserinde AJCC/UICC TNM Evreleme Sistemi II

EVRE IA	T1 N0 M0	EVRE IB	T2 N0 M0 T1 N1 M0
EVRE IIA	T3 N0 M0 T2 N1 M0 T1 N2 M0	EVRE IIB	T4a N0 M0 T3 N1 M0 T2 N2 M0 T1 N3 M0
EVRE IIIA	T4a N1 M0 T3 N2 M0 T2 N3 M0	EVRE IIIB	T4b N0 M0 T4b N1 M0 T4a N2 M0 T3 N3 M0
EVRE IIIC	T4b N2 M0 T4b N3 M0 T4a N3 M0	EVRE IV	M1(Uzak metastaz)

2.1.7. Mide Kanserinde Tedavi

Mide kanserinde tedavi hastalığın evresine göre planlanmaktadır. Tedavi seçenekleri endoskopik tedavi, cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiden oluşmaktadır.

Erken evre mide kanserlerinin bir alt grubunda endoskopik olarak R0 rezeksiyon yapılmaktadır. Endoskopik tedavi, hastanın tüm midesini ve iyi bir yaşam kalitesini korumasını sağlayan minimal invaziv bir tedavi yöntemidir. Kullanılan ana endoskopik teknikler; endoskopik mukozal rezeksiyon (EMR) ve endoskopik submukozal diseksiyon (ESD) dur (18).

Cerrahi tedavi, küratif veya palyatif amaçlarla yapılabilmektedir. Küratif tedavide tümörün yerleşim yerine göre total veya subtotal gastrektomi

uygulanabilmektedir. Palyatif tedavi ise daha çok metastatik mide kanserlerinde semptomları gidermek ve yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla yapılmaktadır.

Kemoterapide tedavi seçiminde tümörün tipi ve evresi, hastanın genel durumu, tedavinin riski, performans statüsü ve hasta isteği göz önünde bulundurulmalıdır. Kemoterapide kullanılabilecek ajanlar 5-fluorourasil (5-FU), kapesitabin, oksaliptatin, sisplatin, karboplatin, paklitaksel, dosetaksel, irinotekan ve antrasiklinlerdir (18).

İmmün sistemde önemli kontrol noktaları olan CTLA-4, PD-1 ve de PD-L1 i hedef alan monoklonal antikorlar ve inhibitörler, kemoterapi ve radyoterapi gibi diğer standart tedavilerle kombinasyon şeklinde kullanılabilmektedir (19).

2.2. TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLER (TİL)

Kanser gelişimi ve ilerlemesinde immün sistemin rolü çok eski yıllardan beri bilinmektedir. İmmün sistem, değişime uğramış neoplastik hücreleri sayıca artmadan önce tanıyıp yok ederek kanser gelişimine engel olmaya çalışır. Kanserın immün düzenlenmesi eliminasyon, denge ve kaçış olmak üzere üç fazdan oluşur. Eliminasyon fazı aslında immün gözetim fazıdır. İmmün sistemin, değişime uğrayan hücrelerin gelişimini engellemesi ve tümör hücresine dönüşmeden yok etmesi immün gözetim (immün sürveyans) olarak adlandırılır. Bu fazda tümör hücreleri immün sistem tarafından yok edilir. Eliminasyon fazından kaçan tümör hücreleri denge fazına ulaşır. Denge fazında immün sistem hücreleri tümör hücrelerine karşı savaşıır. Bunun sonucunda ya tümör hücreleri yok edilir, ya tümör hücreleri ve immün sistem hücreleri bir süre aynı şekilde kalır, ya da tümör hücreleri immün sistemden kaçarak kaçış fazında ilerler. Kaçış fazında tümörün progresyonu söz konusudur. İmmün sistemi baskılayan veya immün sistemden kaçan tümör hücreleri kontrolsüz bir şekilde büyümeye başlar ve metastaz yaparak ilerler. Böylece malign hastalıklar oluşur (20).

Tümörler genellikle T ve B lenfositler, NK hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller, eozinofiller ve mast hücreleri gibi immün hücreler tarafından infiltre edilmektedirler. Bu hücreler tümör içinde değişken bir şekilde dağılım gösterirler ve çeşitli sitokinler, kemokinler, inflamatuvar ve sitotoksik mediatörler ile etkileşerek tümöre karşı yanıt oluştururlar. Tümör hücresinde bulunan mutasyona uğramış veya aşırı eksprese edilen proteinler, mutasyona uğramış onkogenler, tümör

supresör genler veya onkojenik virüsler antijenik etki gösterirler. Bu tümör antijenlerine karşı T hücre yanıtı, kanser immünolojisinin temelini oluşturur.

Bağıışıklık sistemi hücrelerinden olan lenfositlerin tümör dokusunda bulunması, immün sistemin tümör gelişiminde ve tümöre karşı savunmada rol aldığını göstermektedir. Bu lenfositler tümörü infiltre eden lenfositler (TİL) olarak isimlendirilmiştir. İlk başlarda TİL' in kanser hücrelerinde kronik inflamasyonu gösterdiği düşünülmüş ancak daha sonra prognoz ile ilişkisi olduğu saptanmıştır. Malignitelerde immün hücre infiltrasyonu ile prognoz arasındaki ilişki ilk kez meme kanserinde araştırılmıştır (21). Daha sonra yapılan çalışmalarla immün sistem yanıtının prognostik etkisinin olduğunun görülmesi üzerine; hem prognozu tayin edebilmek hem de immün sistemi hedef alan tedaviler geliştirerek kanser tedavisinde büyük ilerlemeler sağlayabilmek amacıyla bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle meme kanseri ve kolorektal kanserlerde tümörü infiltre eden lenfositlerin prognostik değeri kanıtlanmıştır. Meme kanserinde tümörü infiltre eden lenfositlerin değerlendirilmesinin standardize edilmesi için çeşitli kriterler oluşturulmuştur (22). Kolorektal kanserlerde ise TNM sınıflamasına ek olarak immün değerlendirmenin de yapılması önerilmiştir (23).

Mide kanserinde tümörü infiltre eden lenfositlerin nasıl değerlendirilmesi gerektiği ve nasıl sınıflandırılacağı ile ilgili henüz bir görüş birliğine varılamamıştır. Ancak Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mide kanserinde tümörü infiltre eden lenfositler değerlendirilirken hem tümörün merkezindeki hem de invazif marjindeki yoğunluklarının belirlenmesinin en iyi değerlendirme yöntemi olduğu öne sürülmüştür (24).

Kolon, melanom, pankreas, over, mide, rektum gibi pek çok kanserde de TİL varlığının yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (25-29). Tümörü infiltre eden lenfositlerin iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiş olsa da, T lenfosit infiltrasyonunun kötü prognostik faktör olabileceği de unutulmamalıdır. Bu sebeple bu hücrelerin farklı alt tiplerinin iyi bilinmesi ve incelenmesi önem taşımaktadır.

2.3. İMMÜNSKOR

Tümördeki adaptif immün reaksiyonun, prognozu belirlemedeki öneminin bilinmesinin ardından bu konuda klinik çalışmalar hız kazanmıştır. Tanı anında tümörü infiltre eden immün hücrelerin standart bir yöntemle belirlenmesi, sonrasında bu verileri diğer prognostik faktörler ve klinik değerlendirmeler ile birleştirerek prognozu belirlemek, tedavi kararını vermek için klinik pratiğe uyarlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Kolorektal kanserlerde prognozu öngörmeye kullanılan, dijital patoloji ile belirlenen, tümörün hem merkezindeki hem de invazif marjindeki iki (CD3+ ve CD8+) lenfosit grubunun toplam sayıları immünskor olarak adlandırılmıştır. CD3 ve CD8 için hem tümörün merkezindeki, hem de invazif marjindeki hücre yoğunluğuna göre toplam dört yüzde belirlenmiştir. Daha sonra bu yüzdelerin ortalamasına göre immünskor 0 ile 4 arasında numaralandırılmıştır. İmmünskor düşükten yükseğe doğru gittikçe hem genel, hem hastalığa özgü, hem de hastalıksız sağkalımının olumlu yönde etkilendiği görülmüştür. İmmünskorun kanser sınıflamasında TNM sınıflamasının yeni bir komponenti olarak TNM-I (TNM-Immune) şeklinde kullanımı önerilmiştir (30). Yapılan çalışmalar sonucu immünskorun etkililiğinin görülmesi; diğer kanser türlerinde de immün hücre infiltrasyonunun değerlendirilmesini, immünskorun zamanla diğer kanser türlerine de uyarlanmasını ve klinik pratikte kullanımını anlamlı kılmıştır.

İmmünskor; tümörün merkezindeki ve invazif marjindeki CD3+ ve CD8+ T hücrelerinin dansitesini/yoğunluğunu ölçen bir skora sistemidir. İmmün infiltratı tespit etmek için oluşturulmuş, standardize edilmiş, uluslararası geçerliliğe sahip, ilk dijital patoloji tabanlı değerlendirme yöntemidir (23). WHO sindirim sistemi tümörlerinin sınıflandırılmasında temel ve istenen bir kriter olarak immünskorun kullanılmasını önermiştir. 2020 yılında Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) kolon kanserlerinde immünskorun nüksü öngörmeye etkili olduğunu belirtmiştir (31).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. OLGULAR

3.1.1. Hasta Grubunun Belirlenmesi

Çalışmamız retrospektif gözlemsel bir çalışma niteliğindedir. Çalışmaya Ocak 2011 ile Aralık 2018 tarihleri arasında S.B.Ü. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde opere edilen evre I-III mide kanseri patolojik tanısı alan ve Tıbbi Onkoloji polikliniğinden en az 3 yıl takipli olan hastalar dahil edildi. Tıbbi Onkoloji polikliniği arşivindeki mide kanserli hastaların dosyaları ve kayıtları incelendi. Tanısı biyopsi ile doğrulanmış ve hastanemizde opere edilmiş mide kanseri olan 350 hasta dosyası bulundu. Bu hastaların içinden evre IV mide kanseri olan hastalar, neoadjuvan tedavi alan hastalar, patoloji arşivinde parafin bloklarına ulaşılamayan hastalar ile tıbbi onkoloji dosyalarında ve takiplerinde eksikleri olan hastalar çıkarıldı. Geri kalan 106 hastanın patoloji arşivinden parafin blokları çıkarıldı. Yeterli ve iyi boyanmayan ve tümör dokusu bozulmuş 11 hasta çalışma dışı bırakıldı. Toplam 95 hasta çalışmaya dahil edildi.

3.1.2. Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

- Histopatolojik olarak doğrulanmış mide kanseri tanısı
- 18 yaşından büyük hastalar
- Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) TNM sınıflandırmasına göre patolojik olarak doğrulanmış opere, R0 rezeksiyon yapılmış evre I-II-III hastalık
- Hastaların almış olduğu, kurumsal standartlara göre uygulanan kemoterapi ile adjuvan tedavi alanlar
- Hastaların demografik verileri ve hastalığın seyri ile ilgili verileri içeren en az 3 yıllık takipteki hastalar

3.1.3. Araştırmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

- 18 yaşından küçük hastalar
- Evre IV mide kanseri tanısı olan hastalar
- Hastanemiz patoloji arşivinde tümör bloklarına ulaşılamayan hastalar
- Hastanemiz tıbbi onkoloji polikliniğinde takibi olmayan veya eksik olan hastalar
- Neoadjuvan kemoterapi veya radyoterapi uygulanan hastalar
- İnoperabl mide kanserli hastalar

3.1.4. Verilerin Oluşturulması

Hastalar total veya subtotal gastrektomi ve D2 lenfadenektomi operasyonlarını geçirmişti. Seçilen hastaların tıbbi onkoloji arşivindeki dosyaları ve hastane bilgisayar kayıt sistemi incelendi. Hastaların protokol numaraları, yaş, cinsiyet, boy, kilo, VKİ, mevcut ek hastalıkları, ECOG performans skoru, Charlson komorbidite indeksi (CKİ), mide kanserinin evresi, tümörün boyutu, histolojik tipi ve derecesi, operasyon tarihi, kemoterapi, radyoterapi alıp-almadığı, kemoterapi rejimi, HER-2 pozitifliği, hemogram parametreleri, albümin değerleri, CEA ve CA19-9 düzeyleri, nüks durumu, ölüm tarihi gibi bilgiler veri tabanına kaydedildi. Daha sonra bu kayıt altına alınan veriler ile patolojik değerlendirmeden elde edilen sonuçlar analiz edilerek, histopatolojik özelliklerin ve T lenfositlerin CD3+, CD8+, PD-1+, PD-L1+ boyanma oranının, hastaların sağkalımı açısından prognostik değeri ve tedaviye yanıtı olan etkisi incelendi.

3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

3.2.1. Doku Örneklerinin Seçimi, Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Patoloji laboratuvarı arşivinden elde edilen, olguların rezeksiyon piyeslerine ait tümörü temsil eden birden fazla hematoksilen-eosin (H&E) boyalı preparatlar konvansiyonel ışık mikroskopunda yeniden değerlendirildi. Değerlendirmeye uygun olmayan preparatların parafin bloklarından yeniden 4 mikron kalınlığında kesitler

alınarak tekrar hematoksilin-eosin (H&E) ile boyandı. Bu preparatlar hastaların klinik sonuçlarına kör bir patoloji uzmanı tarafından yeniden incelendi. Tümör tipi, tümör invazyon derinliği (T evre), lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve lenf nodu metastaz durumu (N evre) gibi parametreler yeniden gözden geçirildi ve orijinal patoloji raporu doğrulandı. Olgular primer adenokarsinom, özel varyant adenokarsinom ve başka tümör ile birliktelik gösteren adenokarsinom, nöroendokrin karsinom, gastrointestinal stromal tümör tanısı alan, R0 tümörler, T1, T2, T3, T4 patolojik evre tümörler, tüm N evreli tümörler, tanı sırasında uzak metastazı olmayan evre I-II-III mide kanseri hastaları idi. Tümörler 8. Basım WHO'ya göre sınıflandırıldı.

İmmünohistokimyasal çalışma için her olgunun hematoksilin-eosin (H&E) ile boyalı preparatları ışık mikroskopunda x20 objektifte ve x40 objektifte incelenerek mikroskopik kesitlerde tümör merkezinde ve tümör invazif sınırında nekroz ve/veya hyalinizasyon, artefakt ve inflamasyon içermeyen alanlar seçildi. Bu alanlarda tümör merkezindeki lenfositleri değerlendirmek için tümör kümelerinde araya stromanın girmedığı ve tümör hücreleri ile doğrudan teması olan lenfositler seçildi. Tümör invazif sınırında ise tümör ile stroma arasında tümör hücreleri ile direkt etkileşimi olmayan lenfositler seçildi. Lenfosit agregatlar veya lenfoid foliküller değerlendirmeye alınmadı (22).

3.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama

FFPE doku örneği 20 dk önce -10°C ye ayarlanmış histo-line Medite soğuk plaka üzerinde bekletildi. Leica Bond-Max model IHC/ISH tam otomatik boyama cihazına uygun barkod basımı yapılarak çalışmada kullanılacak olan pozitif şarjlı lamalar barkodlandı. Doku örneği içeren parafin bloklardan 3 mikron kalınlığında kesitler alınarak 44°C de sabitlenmiş olan su banyosu aracılığıyla pozitif şarjlı lamlara alındı. Yapılacak olan her farklı çalışma için doku kesitlerinin altına pozitif kontrol dokusu alındı. Hazırlanan kesitler daha önceden ayarlanmış 80°C etüvde 20 dakika fiziksel deparafinize edildi. Leica Bond-Max model IHC/ISH otomatik boyama cihazında DS9800 Polymer DAB IHC Detection Kit kullanılarak aşağıda belirtilen protokol ile çalışmalar tamamlandı. Çalışması biten preparatlar ikişer dakika %96 alkol ve ksilende işlem gördü. Lamel kapaması yapıldı.

CD3 LEİCA (LN10 CLONE) antikoruna için önerilen uygulama protokolü;

Teknik: LEİCA BOND-MAX IHC/ISH MODULE

Kontroller: TONSİL

Kit: DS9800 BOND POLYMER REFINE DETECTION

Protokol: Deparafinizasyon, 20 dk hücre iyileştirme (antijen retrieval 2-EDTA), perokside block 10 dk. Antikor (Primer) 30 dk. Post primer 8 dk. Polymer 8 dk. Dab 2 kere sırasıyla 0 ve 8 dk. Zıt boyama hematoksilin 11 dk.

CD8 LEİCA (4B11 CLONE) antikoruna için önerilen uygulama protokolü;

Teknik: LEİCA BOND-MAX IHC/ISH MODULE

Kontroller: TONSİL

Kit: DS9800 BOND POLYMER REFINE DETECTION

Protokol: Deparafinizasyon, 20 dk hücre iyileştirme (antijen retrieval 1-citrat), perokside block 10 dk. Antikor (Primer) 30 dk. Post primer 8 dk. Polymer 8 dk. Dab 2 kere sırasıyla 0 ve 8 dk. Zıt boyama hematoksilin 11 dk.

PD-1 CELLMARQUE (NAT105 CLONE) antikoruna için önerilen uygulama protokolü;

Teknik: LEİCA BOND-MAX IHC/ISH MODULE

Kontroller: TONSİL

Kit: DS9800 BOND POLYMER REFINE DETECTION

Protokol: Deparafinizasyon, 20 dk hücre iyileştirme (antijen retrieval 2-EDTA), perokside block 10 dk. Antikor (Primer) 30 dk. Post primer 8 dk. Polymer 8 dk. Dab 2 kere sırasıyla 0 ve 8 dk. Zıt boyama hematoksilin 11 dk.

PDL-1 LEİCA (73-10 CLONE) antikoruna için önerilen uygulama protokolü;

Teknik: LEİCA BOND-MAX IHC/ISH MODULE

Kontroller: TONSİL

Kit: DS9800 BOND POLYMER REFINE DETECTION

Protokol: Deparafinizasyon, 20 dk hücre iyileştirme (antijen retrieval 2-EDTA), perokside block 10 dk. Antikor (Primer) 30 dk. Post primer 8 dk. Polymer 8 dk. Dab 2 kere sırasıyla 0 ve 8 dk. Zıt boyama hematoksilen 11 dk.

3.2.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Tüm preparatlar, hastaların klinik özelliklerini ve sonuçlarını bilmeyen bir uzman patolog tarafından incelendi.

CD3 ve CD8 için; tümörün merkezinde ve invazif sınırında T lenfosit infiltrasyonunun yoğunluğunu ölçmek için bilgisayara bağlı bir kamera (EasyPath, Cameram-Argenit, Sürüm: 1.4.1.0, İstanbul, Türkiye) ve bir mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) kullanılarak dijital görüntü analizi yapıldı. İmmünohistokimya ile boyalı preparatlar EasyScan dijital slayt tarayıcısı ile x10 objektifte Argenit EasyPath programı ile görüntülendi. Dijital slayt tarayıcısı seçilen bölgelerde hücre yoğunluğu için eşik oluşturmak amacıyla 0.175 mikrometre piksel değerine ayarlandı. 1 mm² deki T lenfosit sayısını belirleyebilmek için x10 objektifte ardışık iki alan seçilerek toplam 1 mm² lik alan oluşturuldu. CD3+ ve CD8+ T lenfositler hem tümörün merkezinde, hem de tümörün invazif sınırında ayrı ayrı otomatik olarak sayıldı. Daha sonra mm² deki toplam CD3 ve CD8 sayısı ve yoğunluğu belirlenerek immünskorlar oluşturuldu.

PD-1 ve PD-L1 için; immünohistokimya ile boyanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) x200 büyütme ile incelendi. Tümörün merkezindeki ve invazif marjindeki boyanma oranları ayrı ayrı değerlendirildi. T lenfositlerdeki membranöz boyanma değerlendirmeye alındı ve >%1 boyanma pozitif boyanma olarak kabul edildi. Alandaki PD-1+ ve PD-L1+ boyanan T lenfosit sayısı, alandaki toplam T lenfosit sayısına oranlandı. Elde edilen yüzdelerle immünskorlar oluşturuldu.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm istatistiksel analizler SPSS istatistik paketi (versiyon 25) kullanılarak yapılmıştır. Hastalığa özgü sağkalım (DSS), hastalıksız sağkalım (DFS) ve genel sağkalım (OS), sırasıyla ameliyattan mide kanseri ölümüne, ilk mide kanserinin

nüksetmesine ve herhangi bir nedenden ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Kaplan–Meier yöntemi ve log-rank testi yardımıyla DSS, DFS ve OS süreleri hesaplanmıştır. Sürekli ve kategorik değişkenlerin tanımı için sırasıyla medyan değer (çeyrekler arası aralık), ortalama (standart sapma) ve frekans (yüzde) değerleri bulunmuş ve kategorik değişkenlerin karşılaştırılması ki-kare testi (veya uygunsa Fisher ekzakt testi) kullanılarak yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılması ise grup sayısına göre Wilcoxon, Student's t-testi, Kruskal-Wallis veya ANOVA testlerinden biri kullanılarak yapılmıştır. X^2 testi veya Fisher exact testi, moleküler belirteç ifadesi ile çeşitli klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişkiyi incelemek için kullanılmıştır. Markör ifadeleri arasındaki ilişkileri incelemek için Spearman korelasyonu kullanılmıştır. CD3 +, CD8 +, PD-1 + veya PD-L1 + TİL yoğunluğuna göre tek değişkenli sağkalım analizi Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak yapılmış ve sağkalım eğrileri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar log-rank testi ile değerlendirilmiştir. Çok değişkenli analiz, tek değişkenli analizlerde anlamlı olduğu bulunan tüm ortak değişkenlerin sağkalım üzerindeki eş zamanlı etkisini test eden Cox regresyon risk modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.4. ÇIKAR ÇATIŞMASI

Tezi yazan, tez danışmanı ve tezin yazılma sürecine katkıda bulunanlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

3.5. ETİK KURUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurularak 17.05.2021 tarihinde HNEAH-KAEK 2021/151 karar no'su ile Etik Kurul onayı alınmıştır. (EK 1: Etik Kurul Onay Belgesi)

Çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021/116).

4. BULGULAR

Çalışmaya mide kanseri tanısı alan ve opere edilen toplam 95 hasta dahil edildi. Hastaların 67 si (%70.5) erkek, 28 i (%29.5) kadındı. Ortanca yaş 60, en düşük hasta yaşı 29, en yüksek hasta yaşı ise 85 idi. Hastaların 88 inin (%92.7) ECOG performans skoru 0 ve 1 olarak hesaplandı, 7 sinde (%7.3) ise skor 2 ve üstündeydi. Ortanca boy 167 cm, ortalanca ağırlık 63 kg ve ortalanca vücut kitle indeksi 22.6 idi (Tablo 3).

Hastaların mevcut komorbid hastalıkları irdelenerek Charlson komorbidite indeksi hesaplandı. 59 unda (%62.1) skor 2-4 arasında, 36 sında (%37.9) ise 5-8 arasında saptandı (Tablo 3).

Tablo 3: Hastaların demografik özellikleri

Yaş (yıl)	
Medyan (minimum-maksimum)	60 (29-85)
Ortalama ± Standart sapma	60 ± 12
Cinsiyet	
	n, (%)
Erkek	67 (70.5)
Kadın	28 (29.5)
ECOG (performans skoru)	
	n, (%)
0-1	88 (92.7)
2 ve üstü	7 (7.3)
Boy (cm)	
Medyan (minimum-maksimum)	167 (145-185)
Kilo (kg)	
Medyan (minimum-maksimum)	63 (36-97)
VKİ (kg/m²)	
Medyan (minimum-maksimum)	22.6 (16.5-33.3)
Charlson komorbidite indeksi (CCI)	
	n, (%)
2-4	59 (62.1)
5-8	36 (37.9)

Hastaların 46'sına (%48.4) subtotal gastrektomi, 49'una (%51.6) total gastrektomi operasyonu yapılmıştı. Tümör 25 hastada (%26.3) kardiyada, 23 hastada (%24.2) korpusta, 47 hastada (%49.5) antrumda yerleşmişti. En küçük tümör boyutu 1 cm, en büyük tümör boyutu 15 cm olmak üzere ortalama tümör boyutu 5.5 cm idi. Operasyonda çıkarılan lenf nodu sayısı ortalama 35, metastatik lenf nodu sayısı ortalama 3'tü. Lauren sınıflamasına göre olguların 42'si (%44.2) intestinal tipte, 39'u (%41.1) diffüz tipte ve 14'ü (%14.7) mikst tipteydi. 32 (%33.7) hastada tümör iyi-orta diferansiye, 60 (%63.2) hastada ise kötü ve andiferansiye idi (Tablo 4).

TNM evrelemesine göre; hastaların 5'i (%5.3) evre Ia, 10'u (%10.5) evre Ib, 12'si (%12.6) evre IIa, 13'ü (%13.7) evre IIb, 20'si (%21.1) evre IIIa, 23'ü (%24.2) evre IIb, 12'si (%12.6) evre IIIc idi. 73 (%76.8) hastada lenfovasküler invazyon, 58 (%61.1) hastada perinöral invazyon mevcuttu. 9 (%9.5) hastada HER2 pozitif saptandı (Tablo 4).

Hastaların 19'u (%20) herhangi bir adjuvan tedavi almamıştı. 2 (%2.1) hasta sadece radyoterapi, 11 (%11.6) hasta sadece kemoterapi, 60 (%63.2) hasta ise hem kemoterapi hem de radyoterapi almıştı. Platin bazlı kemoterapi alanların sayısı 30 (%31.6) idi. 58 (%61.1) hasta adjuvan tedavisini tamamlayabilmişti. 8 (%8.4) hastada tedavi sürecinde doz sınırlayıcı toksisite gelişmişti (Tablo 4).

Hastaların tanı esnasında CEA değeri ortalama 2.1 ng/mL iken, operasyon sonrası ortalama değer 1.9 ng/mL'ye gerilemişti. CA19-9 değeri ise tanı esnasında ortalama 5.5 U/mL iken, operasyon sonrasında ise 7.5 U/mL idi. Operasyon öncesi ve operasyon sonrası NLR ortalama sırasıyla 2.4 ve 2.2 idi (Tablo 4).

Tablo 4: Hastaların klinik ve patolojik özellikleri

Operasyon tipi	n, (%)
Subtotal	46 (48.4)
Total	49 (51.6)
Tümör yerleşim yeri	n, (%)
Kardiya	25 (26.3)
Korpus	23 (24.2)
Antrum	47 (49.5)
Histolojik tip	n, (%)
İntestinal	42 (44.2)
Diffüz	39 (41.1)
Mikst	14 (14.7)
Grad	n, (%)
İyi-orta	32 (33.7)
Kötü-andiferansiye	60 (63.2)
Tümör çapı	
Medyan (minimum-maksimum) (cm)	5.5 (1-15)
T	n, (%)
T1	7 (7.4)
T2	13 (13.7)
T3	42 (44.2)
T4	33 (34.7)
N	n, (%)
N0	28 (29.5)
N1	14 (14.7)
N2	18 (18.9)
N3a	24 (24.5)
N3b	11 (11.6)
Çıkarılan lenf nodu sayısı	
Medyan (minimum-maksimum)	35 (8-75)
Metastatik lenf nodu sayısı	
Medyan (minimum-maksimum)	3 (0-38)
Evre	n, (%)
Evre 1a	5 (5.3)
Evre 1b	10 (10.5)
Evre 2a	12 (12.6)

Evre 2b	13 (13.7)
Evre 3a	20 (21.1)
Evre 3b	23 (24.2)
Evre 3c	12 (12.6)
Cerrahi sınır	R0/R1
Proksimal	91/4
Radyal	91/4
Distal	91/4
Lenfovasküler invazyon	n, (%)
	73 (76.8)
Perinöral invazyon	n, (%)
	58 (61.1)
HER2 amplifikasyonu	n, (%)
	9 (9.5)
Adjuvan tedavi	n, (%)
Radyoterapi	2 (2.1)
Kemoterapi	11 (11.6)
Kemoterapi + Radyoterapi	60 (63.2)
Yok	19 (20.0)
Adjuvan platin-bazlı tedavi	n, (%)
	30 (31.6)
Adjuvan tedaviyi tamamlama	n, (%)
	58 (61.1)
Doz sınırlayıcı toksisite	n, (%)
	8 (8.4)
Bazal CEA (ng/mL)	2.1 (0-178)
Postoperatif CEA (ng/mL)	1.9 (0.5-178)
Bazal CA19.9 (U/mL)	5.5 (0-2653)
Postoperatif CA19.9 (U/mL)	7.5 (2.0-344)
Preoperatif NLR	2.4 (0.6-42.8)
Postoperatif NLR	2.2 (0.6-17.5)

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2, CEA: Karsinoembriyonik antijen, CA19.9: Kanser antijeni 19-9, NLR: Nötrofil/lenfosit oranı

Tümör infiltre eden lenfositlerde CD3, CD8, PD-1 ve PD-L1 boyanma oranı hem tümörün merkezinde hem de tümörün invazif marjinde ayrı ayrı değerlendirildi. CD3 ve CD8 için mm² deki pozitif boyanan toplam hücre sayısı baz alınırken; PD-1 ve PD-L1 için pozitif boyanan T lenfositlerin sayısı, toplam T lenfosit sayısına oranlandı. Medyan CD3+ hücre sayısı invazif marjinde 483/mm², tümör merkezinde 582/mm², *p* değeri 0.09, medyan CD8+ hücre sayısı invazif marjinde 484/mm², tümör merkezinde 452/mm², *p* değeri 0.52 olarak hesaplandı. PD-1 için pozitif boyanma invazif marjinde medyan değer %9, tümör merkezinde medyan değer %11, *p* değeri 0.001, PD-L1 için pozitif boyanma invazif marjinde medyan değer %6, tümör merkezinde medyan değer %2, *p* değeri 0.54 saptandı. 4 ayrı immün boyanma içinde sadece PD-1 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptandı (*p*=0.001)(Tablo 5).

Tablo 5: Tümörü infiltre eden lenfosit (TİL) sayıları ve aralığı

TİL	İM	TM	<i>p</i> – değeri
CD3 (hücre sayısı/mm²)			
Medyan	483	582	0.09
Interquartile range	273-672	321-770	
CD8 (hücre sayısı/mm²)			
Medyan	484	452	0.52
Interquartile range	342-653	291-660	
PD-1 (%)			
Medyan	9	11	0.001
Interquartile range	4-14	2-26	
PD-L1 (%)			
Medyan	6	2	0.54
Interquartile range	1-13	0-12	

İM: İnvazif marjin, TM: Tümör merkezi

Tümörü infiltre eden lenfositlerin çeşitli değişkenlerle korelasyonu incelendi. Cinsiyet, tümörün T evresi ve genel evresi, lenfovasküler invazyon, pre-op albümin değeri, post-operatif CEA ve CA19-9 düzeyleri, post-operatif lökosit, nötrofil sayıları ve post-operatif NLR (nötrofil/lenfosit oranı) ile tümörü infiltre eden lenfositler arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı (Tablo 6).

Tümör merkezindeki PD-1 infiltrasyonu ile yaş arasında pozitif yönde korelasyon saptandı. ECOG performans skoru arttıkça tümör merkezindeki PD-L1

infiltrasyon yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. Charlson komorbidite indeksi ile tümör merkezindeki PD-1 infiltrasyonu arasında pozitif korelasyon saptandı (Tablo 6).

Tümör çapının artmasıyla hem tümörün merkezindeki, hem de invazif marjindeki PD-L1 yoğunluğunun arttığı saptandı. Tümörün N evresi ve perinöral invazyon ile sadece tümörün invazif marjindeki PD-1 infiltrasyonu arasında negatif yönde korelasyon izlendi (Tablo 6).

Pre-operatif laboratuvar parametreleri ile tümörü infiltre eden lenfositler arasındaki ilişki incelendi. CA19-9 düzeyi ile tümör merkezindeki PD-L1 pozitifliği arasında, CEA düzeyi ile invazif marjindeki CD3 pozitifliği arasında, lökosit sayısı ile hem tümör merkezindeki hem de invazif marjindeki PD-L1 pozitifliği arasında, trombosit sayısı ile tümör merkezindeki PD-1 pozitifliği arasında, nötrofil sayısı ile hem tümör merkezindeki hem de invazif marjindeki PD-L1 pozitifliği arasında, lenfosit sayısı ile invazif marjindeki CD3 pozitifliği arasında, monosit sayısı ile hem tümör merkezindeki hem de invazif marjindeki PD-L1 pozitifliği arasında, NLR (nötrofil/lenfosit oranı) ile tümör merkezindeki PD-L1 pozitifliği arasında pozitif yönde korelasyon; hemoglobin değeri ile tümör merkezindeki PD-1, hem tümör merkezindeki hem de invazif marjindeki PD-L1 pozitifliği arasında ise negatif yönde korelasyon saptandı (Tablo 6).

Post-operatif laboratuvar parametreleri ile tümörü infiltre eden lenfositler arasındaki ilişki incelendi. Lenfosit sayısı ile invazif marjindeki CD3 pozitifliği arasında, monosit sayısı ile invazif marjindeki CD3 ve invazif marjindeki PD-L1 pozitifliği arasında, albümin değeri ile invazif marjindeki PD-1 pozitifliği arasında pozitif yönde korelasyon; hemoglobin değeri ile tümör merkezindeki PD-1 pozitifliği arasında ve trombosit sayısı ile invazif marjindeki PD-1 pozitifliği arasında ise negatif yönde korelasyon saptandı (Tablo 6).

Tümörü infiltre eden lenfositlerin birbirleri ile korelasyonu analiz edildi. En anlamlı korelasyonun CD3 ve CD8 arasında olduğu görüldü. Hem tümörün merkezindeki, hem de invazif marjindeki CD3 infiltrasyonunun yoğunluğu arttıkça CD8 ve tümörün diğer bölgesindeki CD3 infiltrasyonunun yoğunluğunun da arttığı izlendi. Aynı durumun CD8 için de geçerli olduğu görüldü (Tablo 6).

PD-1 ile diğer tümörü infiltre eden lenfositler arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. İnvazif marjindeki PD-L1 infiltrasyonu ile her iki bölgedeki CD3, invazif

marjindeki CD8 ve tümör merkezindeki PD-L1 arasında pozitif yönde korelasyon saptandı. Tümör merkezindeki PD-L1 infiltrasyonu ile invazif marjindeki PD-L1 infiltrasyonu arasında yüksek düzeyde korelasyon olduğu görüldü (Tablo 6).



Tablo 6: Tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TİL) çeşitli değişkenlerle korelasyonu

Değişkenler	CD3 İnvazif Marjin	CD3 Tümör Merkezi	CD8 İnvazif Marjin	CD8 Tümör Merkezi	PD-1 İnvazif Marjin	PD-1 Tümör Merkezi	PD-L1 İnvazif Marjin	PD-L1 Tümör Merkezi
Yaş	0,121	-0,028	0,048	0,007	0,031	,224*	0,075	0,172
Cinsiyet	0,123	0,164	0,142	-0,073	0,079	0,025	-0,076	-0,093
ECOG-PS	0,035	-0,049	0,102	-0,068	-0,015	-0,092	0,038	,259*
CKİ	0,022	-0,076	0,027	-0,001	0,009	,268**	0,076	0,175
Tümör çapı	0,090	0,013	0,006	0,041	0,040	0,058	,257*	,294**
TNM Tümör	-0,026	-0,048	-0,020	0,036	-0,055	-0,047	-0,118	-0,034
TNM Nod	-0,134	-0,060	-0,142	0,084	-,234*	-0,092	-0,140	-0,033
Evre	-0,120	-0,083	-0,122	0,046	-0,162	-0,082	-0,147	-0,040
Lenfovasküler invazyon	-0,017	-0,139	-0,064	-0,019	-0,100	-0,019	-0,115	-0,053
Perinöral invazyon	-0,108	-0,039	-0,038	-0,008	-,226*	-0,034	-0,116	0,013
Pre-op CA 19-9	-0,127	0,069	0,006	0,036	-0,053	-0,060	0,076	,235*
Pre-op CEA	,221*	0,040	0,075	0,005	-0,047	0,118	0,164	-0,041
Pre-op Lökosit sayısı	0,133	-0,032	0,127	0,054	0,127	0,128	,260*	,290**
Pre-op Hemogloblin	-0,066	0,033	-0,062	0,044	-0,086	-,355**	-,300**	-,358**
Pre-op Platelet	0,014	-0,184	-0,124	-0,066	-0,044	,306**	0,003	-0,021
Pre-op nötrofil sayısı	0,058	-0,041	0,092	0,007	0,081	0,072	,223*	,297**
Pre-op lenfosit sayısı	,264**	0,057	0,139	0,183	0,143	0,168	0,035	-0,084
Pre-op monosit sayısı	0,009	-0,096	-0,005	0,003	0,097	0,129	,247*	,268**
Pre-op NLR	-0,060	0,107	-0,032	-0,018	-0,048	-0,047	0,071	,249*
Pre-op albumin değeri	0,078	-0,009	-0,015	-0,001	-0,139	-0,095	0,067	-0,074
Post-op CA 19-9	0,020	-0,028	-0,067	0,009	0,095	-0,055	-0,081	-0,021
Post-op CEA	0,191	0,083	0,141	0,111	0,043	-0,026	0,200	0,005
Post-op Lökosit sayısı	0,163	0,083	0,045	0,055	0,018	0,170	0,172	-0,018
Post-op Hemogloblin	-0,146	0,055	0,024	-0,006	0,000	-,294*	-0,184	-0,076
Post-op Platelet	-0,033	0,009	0,096	0,109	-,258*	0,214	0,056	-0,121
Post-op nötrofil sayısı	0,081	0,034	-0,012	0,051	-0,024	0,145	0,100	-0,072
Post-op lenfosit sayısı	,247*	0,157	0,115	0,026	0,128	0,171	0,126	0,148
Post-op monosit sayısı	,255*	0,144	0,200	0,045	-0,026	-0,050	,285*	0,003
Post-op NLR	-0,067	-0,082	-0,107	0,002	-0,039	0,052	-0,019	-0,138
Post-op albumin değeri	0,209	0,171	-0,007	0,041	,246*	-0,056	0,054	0,028
CD3 İnvazif Marjin		,394**	,508**	,250*	0,071	0,195	,440**	0,145
CD3 Tümör Merkezi		,394**	,466**	,628**	0,072	-0,012	,229*	0,029
CD8 İnvazif Marjin		,508**	,466**	,609**	-0,069	0,082	,207*	0,024
CD8 Tümör Merkezi		,250*	,628**	,609**	0,141	0,184	0,161	0,045
PD-1 İnvazif Marjin		0,071	0,072	-0,069	0,141	0,184	0,142	0,124
PD-1 Tümör Merkezi		0,195	-0,012	0,082	0,184	0,184	0,185	0,187
PD-L1 İnvazif Marjin		,440**	,229*	,207*	0,161	0,142	0,185	,494**
PD-L1 Tümör Merkezi		0,145	0,029	0,024	0,045	0,124	0,187	,494**

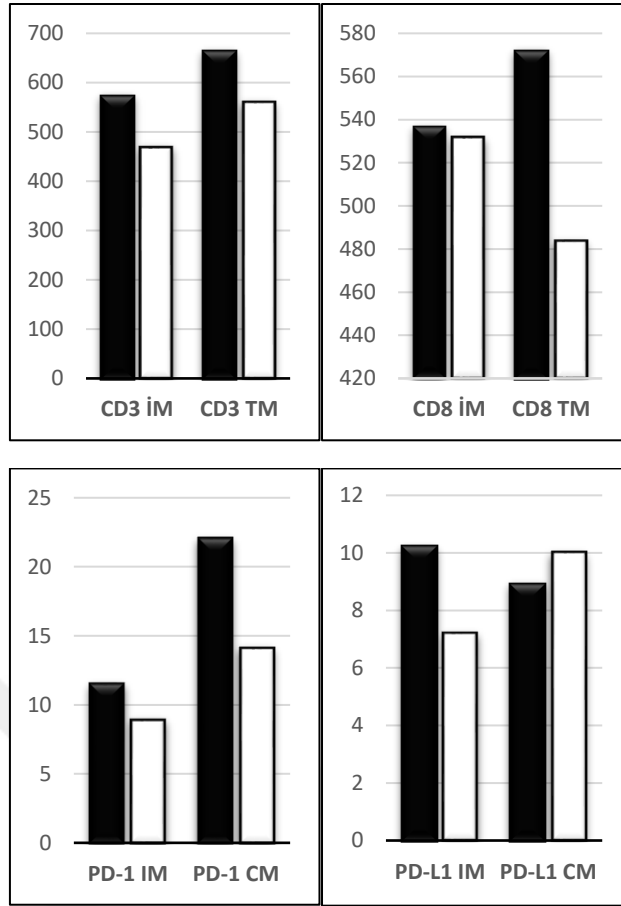
CKİ: Charlson Komorbidite İndeksi, DFS: Hastalısız sağkalım, ECOG-PS: Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu-Performans Skoru, NLR: Nötrofil/Lenfosit oranı

*. Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır. **. Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır.

CD3 boyanmada tümörün invazif marjinde nüks olmayan olgularda ortalama hücre sayısı 572.61, nüks eden olgularda 468.5, p değeri 0.09, tümörün merkezinde nüks olmayan olgularda ortalama hücre sayısı 663.75, nüks eden olgularda 559.51, p değeri 0.19 saptanmıştır. CD8 boyanmada tümörün invazif marjinde nüks olmayan olgularda ortalama hücre sayısı 537.02, nüks eden olgularda 531.63, p değeri 0.92, tümörün merkezinde ise nüks olmayan olgularda ortalama hücre sayısı 571.8, nüks eden olgularda 483.69, p değeri 0.23 saptanmıştır. PD-1 boyanmada tümörün invazif marjinde nüks olmayan olgularda ortalama boyanma %11.5, nüks eden olgularda %8.9, p değeri 0.14, tümörün merkezinde nüks olmayan olgularda ortalama boyanma %22, nüks eden olgularda %14.1, p değeri 0.047 saptanmıştır. PD-L1 boyanmada tümörün invazif marjinde nüks olmayan olgularda ortalama boyanma %10.2, nüks eden olgularda %7.2, p değeri 0.16, tümörün merkezinde ise nüks olmayan olgularda ortalama boyanma %8.9, nüks eden olgularda %10, p değeri 0.73 saptanmıştır. Tümör-infiltrate eden lenfositler ile hastalık nüksü arasında tümörün merkezinde PD-1 boyanmada istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0.047$)(Tablo 7). Bu bulgular grafik şeklinde Şekil 3’ te gösterilmiştir.

Tablo 7: Tümörü infiltrate eden lenfositler (TİL) ve hastalık nüksü arasındaki ilişki

	Nüks yok	Nüks var	p -değeri
CD3 İM	572,61	468,5	0,09
CD3 TM	663,75	559,51	0,19
CD8 İM	537,02	531,63	0,92
CD8 TM	571,8	483,69	0,23
PD-1 İM	11,5	8,9	0,14
PD-1 TM	22	14,1	0,047
PD-L1 İM	10,2	7,2	0,16
PD-L1 TM	8,9	10	0,73



Şekil 3: Tümör nüksü olan (siyah çubuklar) ve tümör nüksü olmayan (beyaz çubuklar) olgularda tümör invazif marjindeki (İM) ve tümörün merkezindeki (TM) tümör-infiltrate eden lenfosit tiplerine göre hücre yoğunlukları ortalamasının karşılaştırılması

Tüm hastalar için tümörün merkezindeki ve invazif marjindeki adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre hastalıksız sağkalım süreleri hesaplandı. Tümör invazif marjindeki düşük ve yüksek yoğunlukta CD3 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 67.2 ve 72.3 ay, p değeri 0.85 saptanmıştır. Tümör merkezindeki düşük ve yüksek yoğunlukta CD3 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 43.2 ve 100.1 ay, p değeri 0.09 saptanmıştır. Tümör invazif marjindeki düşük ve yüksek yoğunlukta CD8 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 51.4 ve 75.8 ay, p değeri 0.5 saptanmıştır. Tümör merkezindeki düşük ve yüksek yoğunlukta CD8 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 49.9 ve 100.1 ay, p değeri 0.26 saptanmıştır. Tümör invazif

marjindeki düşük ve yüksek yoğunlukta PD-1 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 50.3 ve 83.1 ay, p değeri 0.57 saptanmıştır. Tümör merkezindeki düşük ve yüksek yoğunlukta PD-1 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 43.2 ve 83.1 ay, p değeri 0.28 saptanmıştır. Tümör invazif marjindeki düşük ve yüksek yoğunlukta PD-L1 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 39.5 ve 75.8 ay, p değeri 0.71 saptanmıştır. Tümör merkezindeki düşük ve yüksek yoğunlukta PD-L1 (+) boyanma gözlenen hastaların medyan hastalıksız sağkalım süreleri sırasıyla 100.1 ve 43.6 ay, p değeri 0.11 saptanmıştır. Sonuç olarak düşük ya da yüksek yoğunlukta, tümörün merkezinde veya invazif marjinde CD3, CD8, PD-1 veya PD-L1 boyanma ile hastalıksız sağkalım ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 8). Bu ilişki aynı zamanda Kaplan-Meier eğrileri ile Şekil 4, 5, 6 ve 7’ de de gösterilmiştir.

Tablo 8: Her bir tümör bölgesindeki (TM veya İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre tüm hastalar için medyan hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri

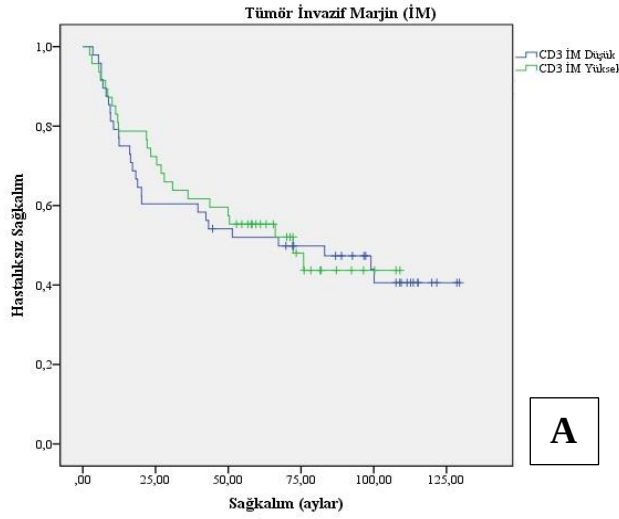
		Medyan	%95 CI (alt-üst sınır)		p -değeri
CD3 (+) İM	Düşük	67,253	1,741	132,764	0,85
	Yüksek	72,345	38,238	106,452	
CD3 (+) TM	Düşük	43,236	0,000	88,083	0,09
	Yüksek	100,140			
CD8 (+) İM	Düşük	51,417	0,000	104,246	0,5
	Yüksek	75,893	29,508	122,278	
CD8 (+) TM	Düşük	49,938	9,794	90,083	0,26
	Yüksek	100,140			
PD-1 (+) İM	Düşük	50,398	0,000	101,431	0,57
	Yüksek	83,121			
PD-1 (+) TM	Düşük	43,236	40,284	46,188	0,28
	Yüksek	83,121	53,258	112,984	
PD-L1 (+) İM	Düşük	39,556	0,000	103,345	0,71
	Yüksek	75,893	28,185	123,602	
PD-L1 (+) TM	Düşük	100,140			0,11
	Yüksek	43,663	4,043	83,284	

TM: Tümör merkezi, İM: İnvazif marjin, CI: Güven aralığı

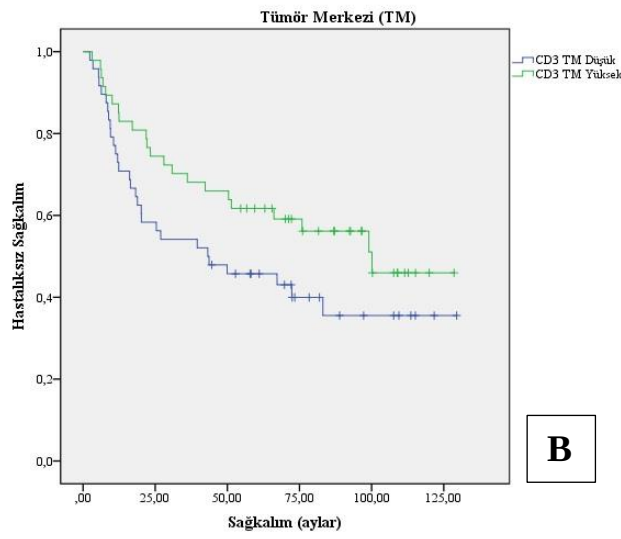
Her iki tümör bölgesindeki (TM ve İM) adaptif immün yanıt hücrelerinin yoğunluklarının hem düşük, hem yüksek, hem de karışık olmak üzere hastalıksız sağkalım ile ilişkisi ayrı ayrı incelendiğinde ise CD3 için p değeri 0.46, CD8 için p değeri 0.52, PD-1 için p değeri 0.57 ve PD-L1 için p değeri 0.21 saptanmış olup, arada istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 9).

Tablo 9: Her iki tümör bölgesindeki (İM ve TM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre tüm hastalar için medyan hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri

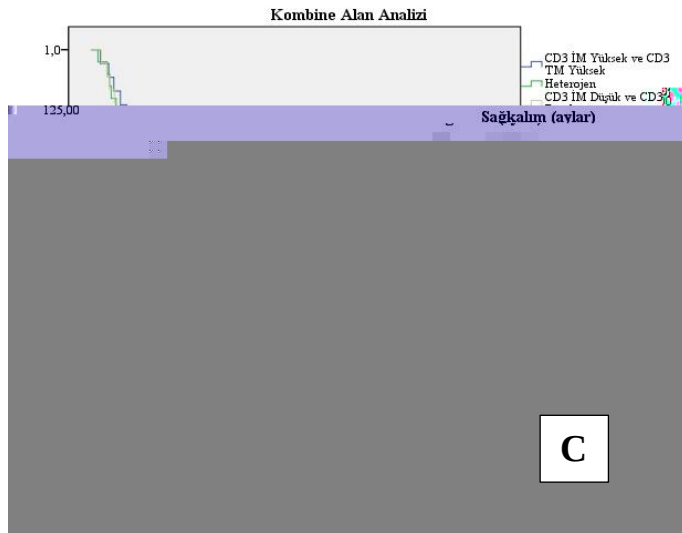
		Medyan	%95 CI (alt-üst sınır)		p -değeri
CD3 (+) İM ve CD3 (+) TM	Her ikisi yüksek	75,893			0,46
	Heterojen	99,055	43,397	154,714	
	Her ikisi düşük	39,556	0,000	91,576	
CD8 (+) İM ve CD8 (+) TM	Her ikisi yüksek	100,140	47,783	152,497	0,52
	Heterojen	72,345			
	Her ikisi düşük	43,236	0,000	105,066	
PD-1 (+) İM ve PD-1 (+) TM	Her ikisi yüksek	83,121			0,57
	Heterojen	75,893	5,852	145,934	
	Her ikisi düşük	43,663	6,586	80,740	
PD-L1 (+) İM ve PD-L1 (+) TM	Her ikisi yüksek	50,398	6,284	94,512	0,21
	Heterojen	100,140			
	Her ikisi düşük	36,140	0,000	116,831	



A

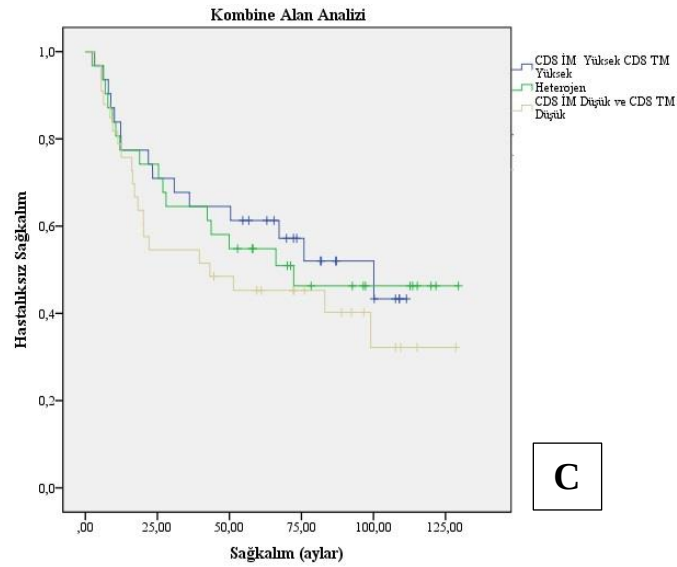
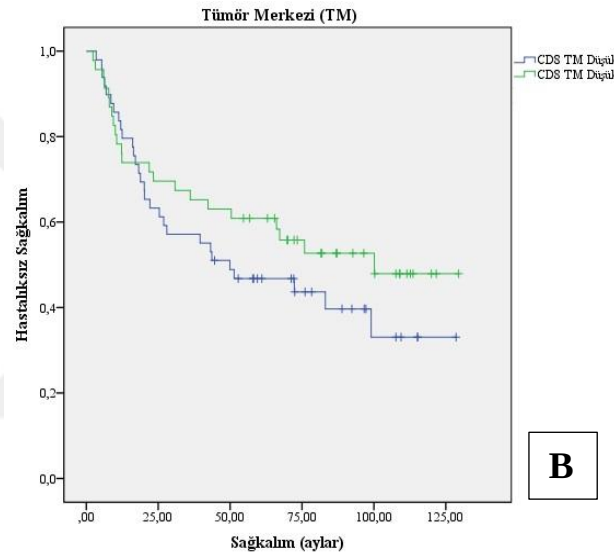
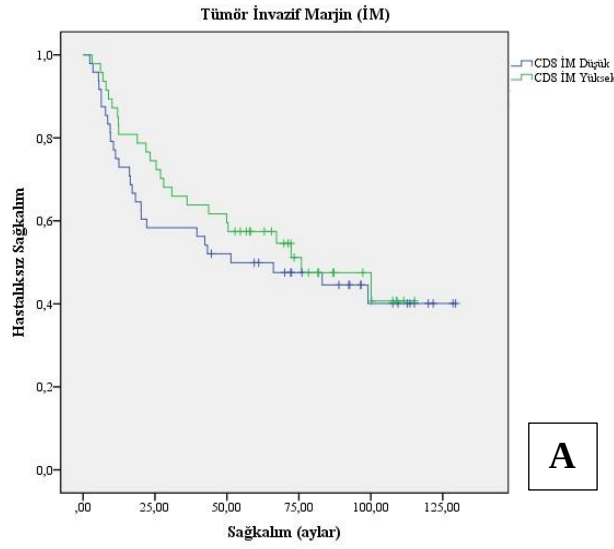


B

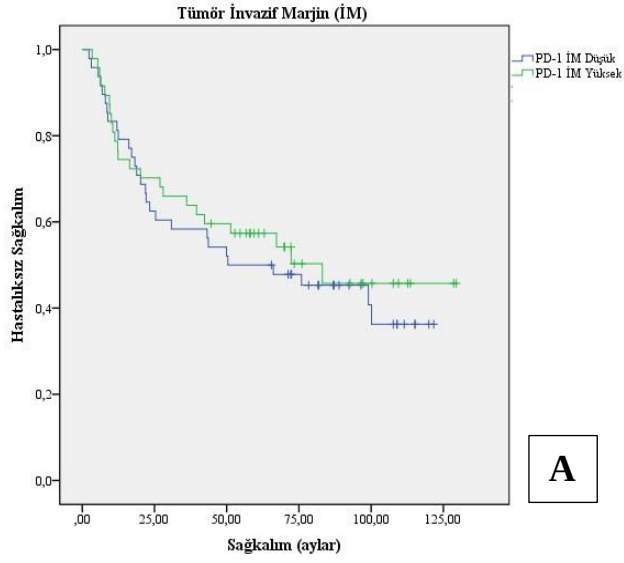


C

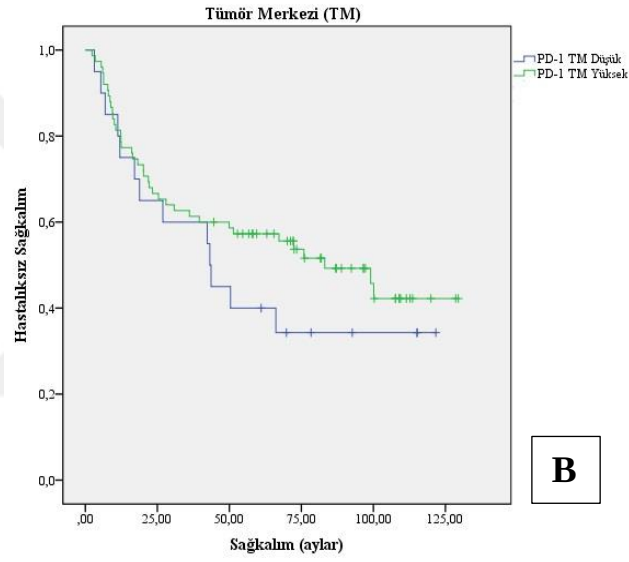
Şekil 4: CD3 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastaliksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi



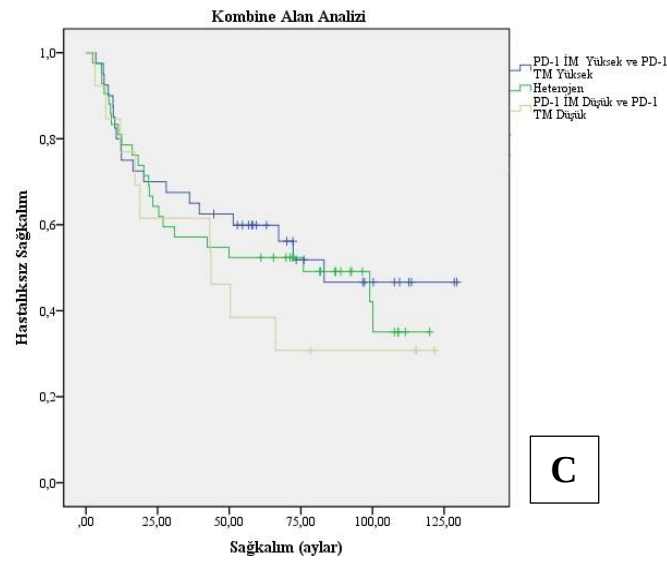
Şekil 5: CD8 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastaliksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi



A

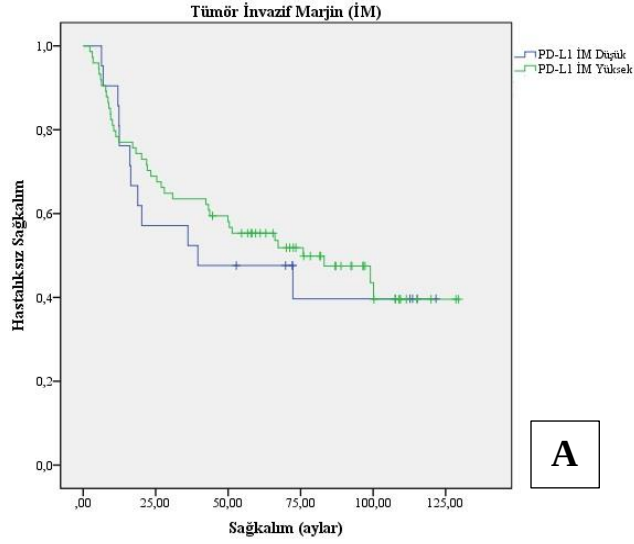


B

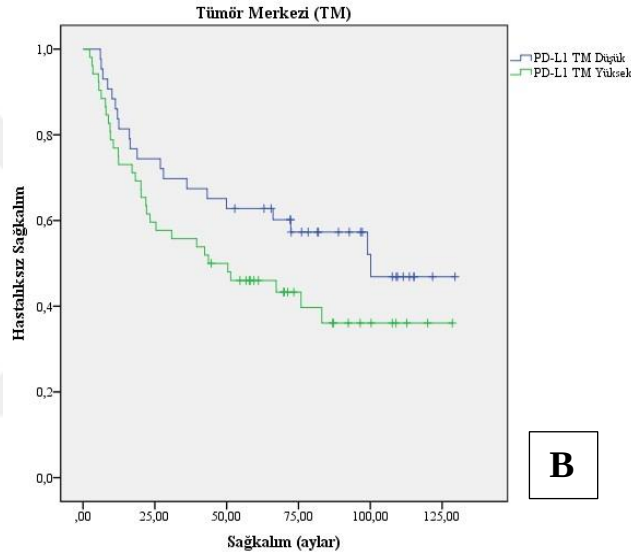


C

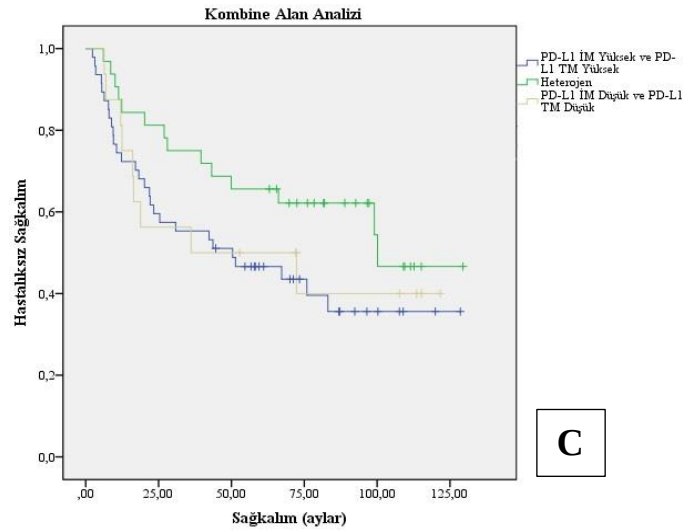
Şekil 6: PD-1 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastaliksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi



A



B

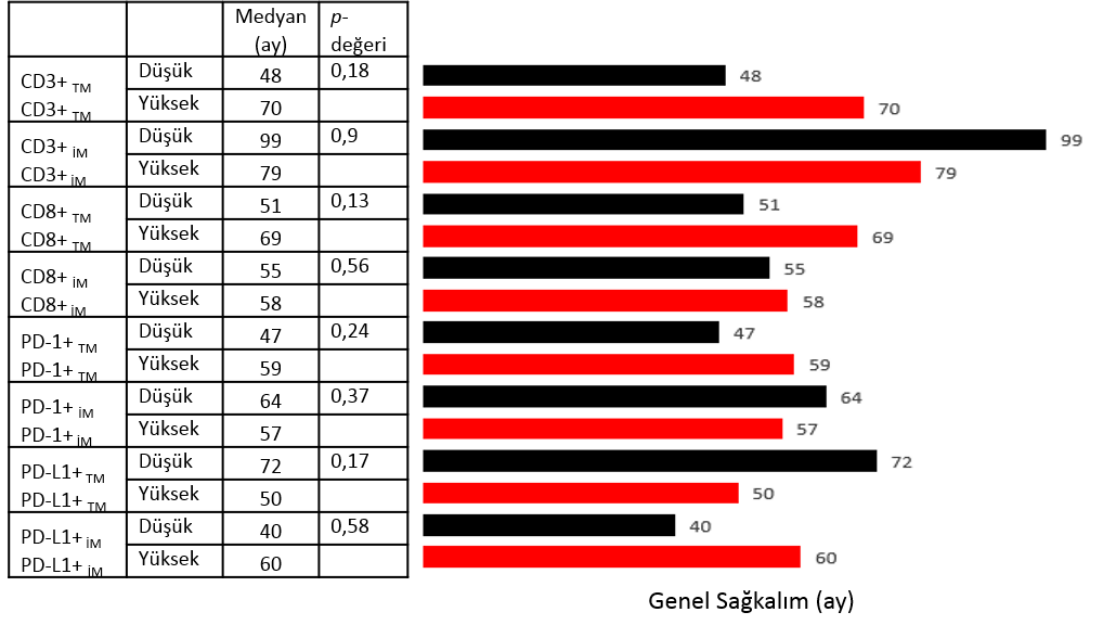


C

Şekil 7: PD-L1 (+) tümör-infiltrate eden lenfosit yoğunluğuna göre, tümör invazif marjindeki (A), tümör merkezindeki (B) ve her iki tümör alanındaki (C) hastalıksız sağkalım sürelerinin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi

Tüm hastalar için tümörün merkezindeki (TM) veya invazif marjindeki (İM) immün hücre yoğunluğuna göre genel sağkalım süreleri incelendi. Tümör merkezindeki CD3 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 48 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 70 ay, *p* değeri 0.18 saptanmıştır. İnvazif marjindeki CD3 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 99 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 79 ay, *p* değeri 0.9 saptanmıştır. Tümör merkezindeki CD8 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 51 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 69 ay, *p* değeri 0.13 saptanmıştır. İnvazif marjindeki CD8 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 55 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 58 ay, *p* değeri 0.56 saptanmıştır. Tümör merkezindeki PD-1 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 47 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 59 ay, *p* değeri 0.24 saptanmıştır. İnvazif marjindeki PD-1 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 64 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 57 ay, *p* değeri 0.37 saptanmıştır. Tümör merkezindeki PD-L1 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 72 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 50 ay, *p* değeri 0.17 saptanmıştır. İnvazif marjindeki PD-L1 infiltrasyonu düşük yoğunlukta olan hastalarda medyan genel sağkalım süresi 40 ay, yüksek yoğunlukta olan hastalarda 60 ay, *p* değeri 0.58 saptanmıştır. Tüm hastalar için her bir tümör bölgesindeki (TM veya İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluğu ile genel sağkalım (OS) süreleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 10).

Tablo 10: Her bir tümör bölgesindeki (TM veya İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluğuna göre tüm hastalar için medyan genel sağkalım (OS) süreleri*



*Yüksek yoğunluk kırmızı çubuklar ile gösterilirken düşük yoğunluk siyah çubuklar ile gösterilmiştir.

Her immün hücre grubu için ayrı ayrı olmak üzere tümörün merkezindeki ve invazif marjindeki infiltrasyonlar genel sağkalım açısından birlikte değerlendirildi. Her iki tümör bölgesinde her bir hücre grubunun hem yüksek yoğunlukta, hem düşük yoğunlukta ve hem de heterojen olduğu durumlar ile medyan genel sağkalım süreleri arasındaki ilişki incelendiğinde CD3 için *p* değeri 0.73, CD8 için *p* değeri 0.35, PD-1 için *p* değeri 0.42, PD-L1 için *p* değeri 0.31 saptanmış ve istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunmamıştır (Tablo 11).

Tablo 11: Her iki tümör bölgesindeki (TM ve İM) adaptif bağışıklık hücrelerinin yoğunluklarına göre tüm hastalar için medyan genel sağkalım (OS) süreleri

		Medyan	%95 CI (alt-üst sınır)		p-değeri
CD3 (+) İM ve CD3 (+) TM	Her ikisi yüksek	79,310			0,73
	Heterojen	99,055	57,506	140,605	
	Her ikisi düşük	43,236	0,000	105,128	
CD8 (+) İM ve CD8 (+) TM	Her ikisi yüksek	100,140			0,35
	Heterojen	79,310			
	Her ikisi düşük	43,236	0,000	95,283	
PD-1 (+) İM ve PD-1 (+) TM	Her ikisi yüksek				0,42
	Heterojen	79,014	23,522	134,507	
	Her ikisi düşük	50,398	6,686	94,111	
PD-L1 (+) İM ve PD-L1 (+) TM	Her ikisi yüksek	64,361	18,631	27,845	0,31
	Heterojen	100,140			
	Her ikisi düşük	40,706	31,237	0,000	

Tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) hastalıksız sağkalım süreleri ile ilişkisi ikili, üçlü ve dördü kombinasyonlar şeklinde analiz edildi. İmmün hücrelerden sadece PD-L1 infiltrasyonunun düşük olmasının hastalıksız sağkalımı olumlu yönde etkilediği görüldü. Bu sebeple yapılan ikili, üçlü ve dördü immün hücre kombinasyonlarında PD-L1 infiltrasyonunun düşük olduğu, PD-L1 hariç diğer immün hücrelerin yüksek infiltrasyonda olduğu durumlar gruplara dahil edildi.

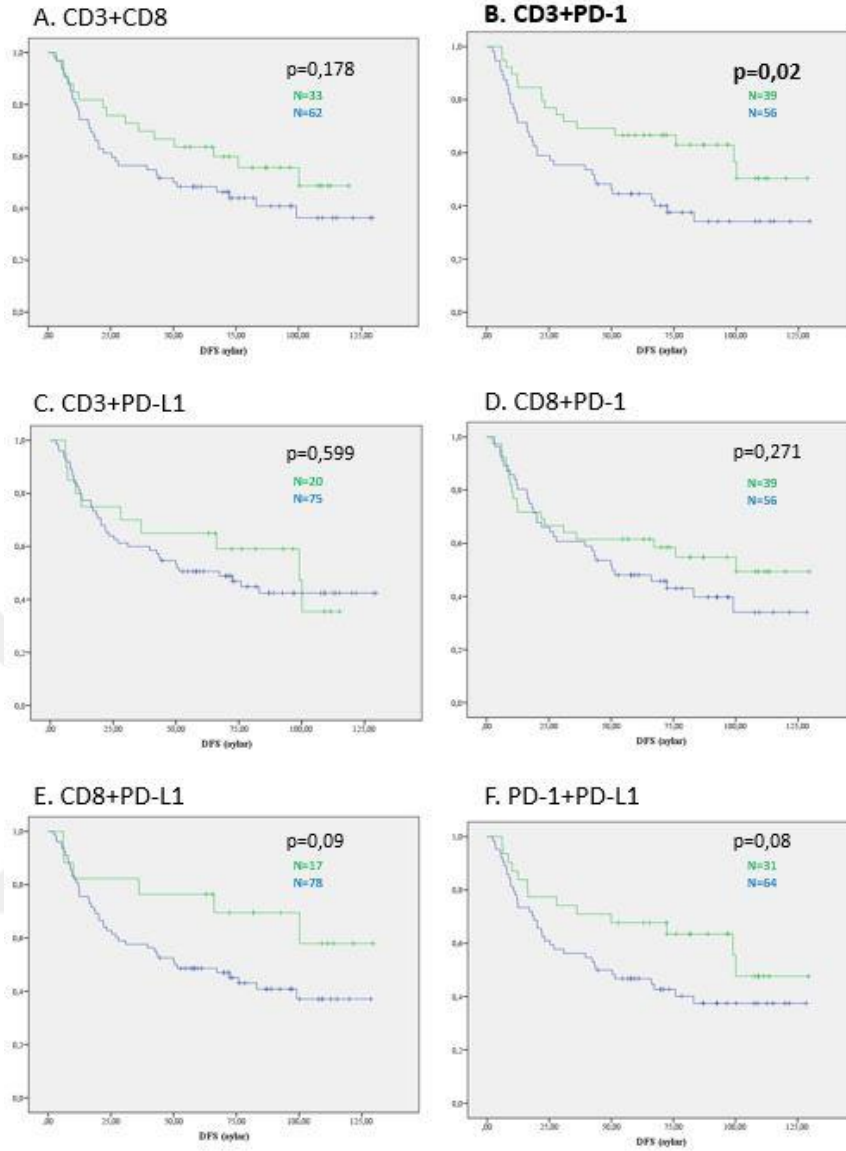
Yapılan analizler sonucu farklı ikili immün hücre kombinasyonları arasından sadece CD8 ve PD-1 infiltrasyonunun ikisinin birlikte yüksek oranda olduğu grupta *p* değeri 0.02 bulunmuş ve hastalıksız sağkalım ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 12, Şekil 8). Üçlü immün hücre gruplarının arasında ise CD3 ve CD8 infiltrasyonunun yüksek, PD-L1 infiltrasyonunun düşük olduğu grupta medyan hastalıksız sağkalım süresi 99.055 ay, *p* değeri 0.01 saptanmıştır. Yani tümör merkezinde tümörü infiltre eden lenfositlerden CD3 ve CD8 in yüksek, PD-L1 in düşük yoğunlukta olması ile hastalıksız sağkalım arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 12, Şekil 9).

Çalışmaya alınan dört immün hücre grubu bir arada değerlendirildiğinde ise; CD3, CD8 ve PD-1 in yüksek, PD-L1 in düşük infiltrasyonda olduğu durumda medyan hastalıksız sağkalım süresi 100.140 ay, *p* değeri 0.627 saptanmış ve hastalıksız sağkalım ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 12, Şekil 9).

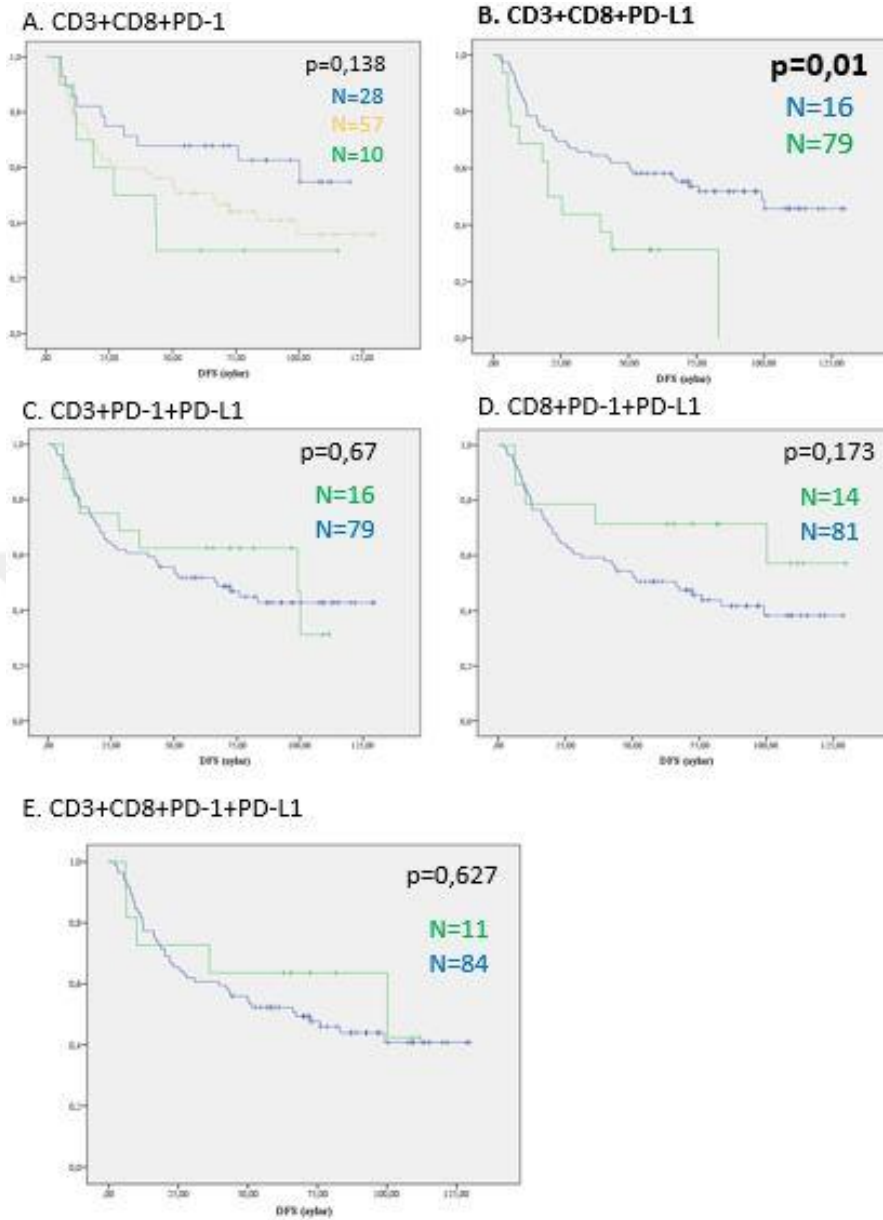
Tablo 12: Tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri

	Kombinasyonlar	Medyan	CI (alt sınır-üst sınır)		<i>p</i> -değeri
İki immün hücrenin birlikte karşılaştırılması	CD3 ve CD8 yüksek	100,140			0,178
	Diğerleri	49,938	5,742	94,135	
	CD3 ve PD-1 yüksek	Medyana ulaşamadı			0,02
	Diğerleri	43,236	14,887	71,585	
	CD3 yüksek ve PD-L1 düşük	99,055	59,962	138,149	0,599
	Diğerleri	67,253	33,946	100,559	
	CD8 ve PD-1 yüksek	100,140			0,271
	Diğerleri	50,398	19,347	81,450	
	CD8 yüksek ve PD-L1 düşük	Medyana ulaşamadı			0,09
	Diğerleri	50,398	19,461	81,336	
	PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	100,140			0,08
	Diğerleri	43,663	6,142	81,184	
Üç immün hücrenin birlikte karşılaştırılması	CD3, CD8 ve PD-1 yüksek	Medyana ulaşamadı			0,138
	Heterojen	66,136	33,590	98,681	
	CD3, CD8 ve PD-1 düşük	26,908	0,000	64,732	
	CD3 ve CD8 yüksek ve PD-L1 düşük	99,055			0,01
	Diğerleri	20,205	9,967	30,444	
	CD3 ve PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	99,055	33,649	164,462	0,67
	Diğerleri	67,253	33,791	100,715	
	CD8 ve PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	Medyana ulaşamadı			0,173
	Diğerleri	66,136	35,615	96,656	
	Dört immün hücrenin birlikte karşılaştırılması	100,140	0,000	217,442	0,627
	Diğerleri	67,253	31,535	102,970	

CI: Güven aralığı



Şekil 8: İki immün hücrenin birlikte analiz edildiği tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) eğrileri: Her iki hücre tipinde yüksek infiltrasyonun diğerlerinden ayrılmasıyla gruplar oluşturulmuştur. Sadece PD-L1'in düşük olmasının sağkalımı olumlu yönde etkilediğinin görülmesi üzerine PD-L1 olan kombinasyonlarda ikili gruplar PD-L1 düşük ve diğer faktör yüksek olacak şekilde oluşturulmuştur. Yeşil renk yüksek infiltrasyonu olan kombinasyonları (PD-L1 hariç, PD-L1 düşük infiltrasyon olarak gruplara alınmıştır), mavi renk geri kalan diğerlerini göstermektedir (A-F). Örneğin; yeşil renk yüksek CD3+ ve CD8+ , mavi renk yüksek/düşük CD3+/CD8+ veya düşük CD3+ ve düşük CD8+ olarak belirtilmiştir. Ayrıca CD8+PD-L1 kombinasyonu CD8 in yüksek, PD-L1 in düşük olduğunu göstermektedir.



Şekil 9: Üç immün hücrenin birlikte analiz edildiği tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) eğrileri: Tüm hücre tiplerinde yüksek infiltrasyon olduğu durum (sadece PD-L1 hariç; PD-L1 düşüklüğü kombinasyona alınmıştır), tüm hücre tiplerinde düşük infiltrasyon olduğu durum (sadece PD-L1 hariç; PD-L1 yüksekliği kombinasyona alınmıştır) ve karışık infiltrasyon seviyelerine göre gruplar oluşturulmuştur (A-D). PD-L1 durumu üçlü kombinasyonlarda ana faktör gibi görüldüğü için üçlü kombinasyonlar ikili gruplara ayrılarak analiz edilmiştir (örneğin; yüksek ve diğerleri). Son olarak da dört immün hücrenin kombinasyonu yapılmıştır (E) (yine kombinasyona PD-L1 düşük ve diğer üçünün yüksek olduğu durum alınmış ve YÜKSEK infiltrasyon olarak kabul edilmiştir ve diğer olasılıklara karşı bu durum karşılaştırılmıştır).

Tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) genel sağkalım süreleri ile ilişkisi ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlar şeklinde analiz edildi. İmmün hücrelerden sadece PD-L1 infiltrasyonunun düşük olmasının genel sağkalımı olumlu yönde etkilediği görüldü. Bu sebeple yapılan ikili, üçlü ve dörtlü immün hücre kombinasyonlarında PD-L1 infiltrasyonunun düşük olduğu, PD-L1 hariç diğer immün hücrelerin yüksek infiltrasyonda olduğu durumlar gruplara dahil edildi.

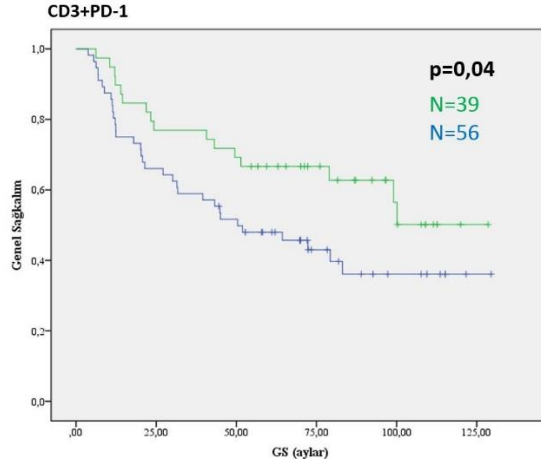
Tümör merkezinde ikili immün hücre grupları arasında sadece CD3 ve PD-1 in her ikisinin de yüksek infiltrasyonda olduğu durumda p değeri 0.04 bulunmuş, CD3 ve PD-1 yüksek yoğunlukta olması ile genel sağkalım arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 13, Şekil 10).

Üçlü immün hücre gruplarının arasında ise CD3 ve CD8 infiltrasyonunun yüksek, PD-L1 infiltrasyonunun düşük olduğu grupta medyan genel sağkalım süresi 100.140 ay, p değeri 0.005 saptanmıştır. Yani tümör merkezinde tümörü infiltre eden lenfositlerden CD3 ve CD8 in yüksek, PD-L1 in düşük yoğunlukta olması ile genel sağkalım arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır (Tablo 13, Şekil 11).

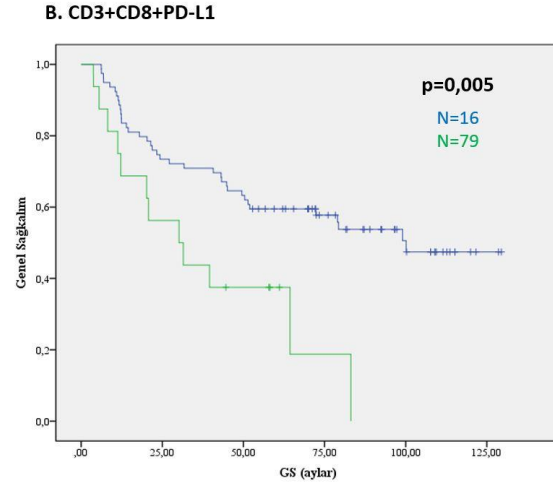
Çalışmaya alınan dört immün hücre grubu bir arada değerlendirildiğinde ise; CD3, CD8 ve PD-1 in yüksek, PD-L1 in düşük infiltrasyonda olduğu durumda medyan genel sağkalım süresi 100.140 ay, p değeri 0.7 saptanmış ve genel sağkalım ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 13).

Tablo 13: Tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) farklı kombinasyonlarına göre genel sağkalım (OS) süreleri

	Kombinasyonlar	Medyan	CI (alt sınır-üst sınır)		p-değeri
İki immün hücrenin birlikte karşılaştırılması	CD3 ve CD8 yüksek	100,140			0,25
	Diğerleri	64,361	25,260	103,463	
	CD3 ve PD-1 yüksek	Medyana ulaşılamadı			0,04
	Diğerleri	50,398	19,438	81,359	
	CD3 yüksek ve PD-L1 düşük	99,055	74,450	123,661	0,71
	Diğerleri	72,345	38,591	106,098	
	CD8 ve PD-1 yüksek	Medyana ulaşılamadı			0,13
	Diğerleri	51,943	17,468	86,417	
	CD8 yüksek ve PD-L1 düşük	Medyana ulaşılamadı			0,1
	Diğerleri	64,361	33,730	94,993	
	PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	100,140			0,12
	Diğerleri	51,417	14,248	88,585	
Üç immün hücrenin birlikte karşılaştırılması	CD3, CD8 ve PD-1 yüksek	Medyana ulaşılamadı			0,18
	Heterojen	72,345	37,928	106,762	
	CD3, CD8 ve PD-1 düşük	79,310	33,846	124,774	
	CD3 ve CD8 yüksek ve PD-L1 düşük	100,140			0,005
	Diğerleri	30,160	9,103	51,217	
	CD3 ve PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	99,055	40,801	157,310	0,78
	Diğerleri	79,014	46,269	111,759	
	CD8 ve PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	Medyana ulaşılamadı			0,173
	Diğerleri	72,345	42,785	101,905	
Dört immün hücrenin birlikte karşılaştırılması	CD3, CD8 ve PD-1 yüksek ve PD-L1 düşük	100,140	0,000	209,072	0,7
	Diğerleri	79,014	40,048	117,981	



Şekil 10: Tümör merkezindeki (TM) CD3 ve PD-1 in birlikte analiz edildiği genel sağkalım (OS) eğrisi: Her iki hücre tipinde yüksek infiltrasyonun (yeşil renk; yüksek CD3+ ve yüksek PD-1+) diğerlerinden (mavi renk; yüksek/düşük CD3+/PD-1+ veya düşük CD3+ ve düşük PD-1+) ayrılmasıyla gruplar oluşturulmuştur.



Şekil 11: Tümör merkezindeki (TM) CD3, CD8 ve PD-L1 in birlikte analiz edildiği genel sağkalım (OS) eğrisi: Mavi renk yüksek CD3+ ve CD8+ ve düşük PD-L1+ infiltrasyon olduğunu, yeşil renk ise yüksek PD-L1+ infiltrasyonu ve diğer iki immün hücrenin farklı kombinasyonlarda olduğu durumları göstermektedir.

Hastaliksız sağkalım için tek değişkenli analizlerde anlamlı bulunan değişkenler (tümör derecesi, operasyon tipi, genel evre, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, CD3+PD-1 immünskor ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor) ok değişkenli Cox regresyon analizine alındı. Genel evre hem T hem de N evresini kapsadığı için T ve N parametreleri analiz modellerine dahil edilmedi. CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 immünskorlar da ortak immün parametreleri içermesi nedeniyle analize beraber alınmadı ve her bir immünskorun ayrı ayrı yer aldığı ve diğer değişkenlerin ortak olduğu 2 model üzerinden Cox regresyon analizleri yapıldı. Model 1 sonucunda CD3+PD-1 immünskorun hastaliksız sağkalımı bağımsız bir şekilde etkilemediği (p değerı 0.069), sadece genel evrenin hastaliksız sağkalımı bağımsız bir şekilde etkilediği görölmüştür. Model 2 sonucunda ise hem tümör evresinin hem de CD3+CD8+PD-L1 immünskorun bağımsız ve anlamlı bir şekilde hastaliksız sağkalımı etkilediği (p değerı 0.001) görölmüştür (Tablo 14, şekil 12).

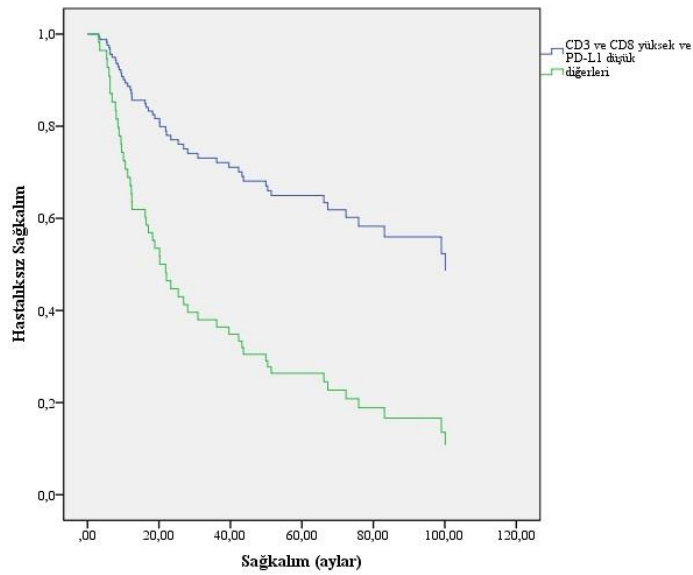
Evre 2 ve Evre 3, Evre 1 den sırasıyla 8.46 (p değerı 0.04) ve 18.58 (p değerı 0.004) kat daha fazla dönemsel ölüm riski getirmektedir. Evre arttıkça hastaliksız sağkalım süresinin istatistiksel olarak anlamlı derecede kısaldığı görölmektedir (Tablo 14, şekil 13).

Tablo 14: Hastaliksız sağkalım (DFS) için tek değişkenli ve çok değişkenli analizler

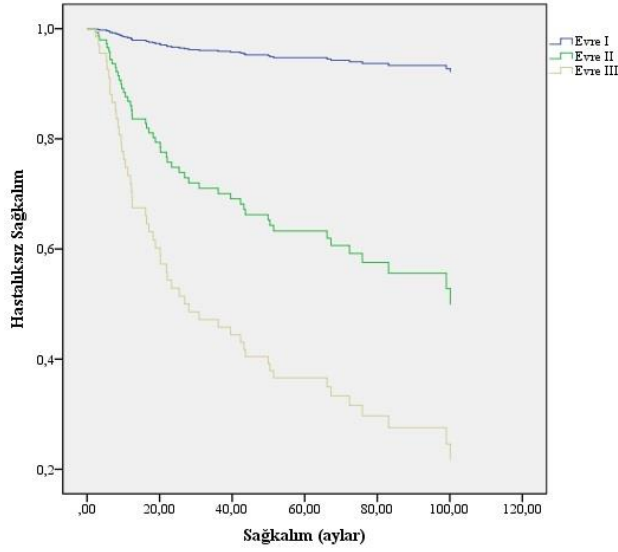
Değişken	Tek Değişkenli			Çok Değişkenli		
	HR	95% CI	p-değeri	HR	95% CI	p-değeri
Cinsiyet Erkek Kadın	1.000 0.718	0.38-1.34	0.30			
Yaş <60 yaş ≥60 yaş	1.000 1.641	0.93-2.86	0.82			
Vücut Kitle İndeksi Normal VKİ≥25	1.000 1.022	0.53-1.94	0.94			
Charlson Komorbidite İndeksi 2-4 5-8	1.000 0.74	0.42-1.3	0.3			
Tümör yerleşim Kardia Non-kardia	1.000 0.78	0.42-1.46	0.45			
Tümör histoloji İntestinal tip Non-intestinal tip	1.000 1.58	0.89-2.79	0.1			
Tümör derecesi İyi-orta Kötü-andiferansiye	1.000 1.82	0.97-3.44	0.051*			
Operasyon tipi Subtotal Total	1.000 1.78	1.01-3.12	0.044*			
T evresi T1-T2 T3-T4	1.000 4.87	1.75-13.57	0.001*			
N evresi N0-N1 N2-N3	1.000 3.009	1.62-5.58	0.001*			
Tümör evresi Evre 2 vs Evre 1 Evre 3 vs Evre 1	8.46 18.58	1.10-65.14 2.54-135.69	0.001* 0.04 0.004	7.506 19.108	0.975-57.807 2.612-139.764	0.001* 0.053 0.004
Perinöral invazyon Yok Var	1.000 2.68	1.42-5.07	0.002*			
Lenfovasküler invazyon Yok Var	1.000 2.62	1.17-5.84	0.01*			

HER2 durumu Negatif Pozitif	1.000 1.19	0.55-2.60	0.64			
Platin duyarlı (DFS > 1 yıl) Evet Hayır	1.000 0.85	0.53-1.84	0.2			
CD3+PD-1 CD3+PD-1 yüksek Diğerleri	1.000 1.972	1.089-3.57	0.02*	1.000 1.746	0.958-3.183	0,069
CD3+CD8+PD-L1 CD3+CD8 yüksek ve PD-L1 düşük Diğerleri	1.000 2.324	1.201-4.496	0.01*	1.000 3.089	1.574-6.062	0.001*
CEA Normal Yüksek	1.000 1.36	0.48-3.80	0.43			
CA19-9 Normal Yüksek	1.000 0.76	0.38-1.50	0.55			

HR: Hazard ratio, CI: Güven aralığı, HER2: Human epidermal growth factor receptor-2, DFS: Hastalıksız sağkalım, CEA: Karsinoembriyonik antijen, CA19-9: Kanseri antijeni 19-9



Şekil 12: CD3+CD8+PD-L1 immünskor ile hastalıksız sağkalım (DFS) arasındaki ilişki eğrisi (p değeri 0.001)



Şekil 13: Evre ile hastalıksız sağkalım (DFS) arasındaki ilişki eğrisi (p değeri 0.001)

Genel sağkalım için yapılan tek değişkenli analizlerde anlamlı bulunan değişkenler (operasyon tipi, genel evre, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, platin duyarlılığı, CD3+PD-1 immünskor ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor) çok değişkenli Cox regresyon analizine alındı. Genel evre hem T hem de N evresini kapsadığı için T ve N parametreleri analiz modellerine dahil edilmedi. CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 immünskorlar da ortak immün parametreleri içermesi nedeniyle analize beraber alınmadı ve her bir immünskorun ayrı ayrı yer aldığı ve diğer değişkenlerin ortak olduğu 2 model üzerinden Cox regresyon analizleri yapıldı. Model 1 sonucunda sadece platin duyarlılığının genel sağkalımı bağımsız bir şekilde anlamlı etkilediği (p değeri 0.000) görüldü. Model 2 sonucunda ise hem tümör evresinin hem de CD3+CD8+PD-L1 immünskorun bağımsız ve anlamlı bir şekilde hastalıksız sağkalımı etkilediği (p değeri 0.001) görülmüştür (Tablo 15).

Platin tedavisine duyarlı olma durumunun hastalıksız sağkalım ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmamışken (p değeri 0.2), genel sağkalım ile anlamlı derecede ilişkili olduğu görülmüştür (p değeri 0.000) (Tablo 14, Tablo 15).

Evre 2 ve Evre 3, Evre 1 den sırasıyla 8.173 (p değeri 0.04) ve 16.812 (p değeri 0.005) kat daha fazla dönemsel ölüm riski getirmektedir. Evre arttıkça genel sağkalım süresinin istatistiksel olarak anlamlı derecede kısaldığı görülmektedir (Tablo 15).

Tablo 15: Genel sağkalım (OS) için tek değişkenli ve çok değişkenli analizler

Değişken	Tek Değişkenli			Çok Değişkenli		
	HR	95% CI	p-değeri	HR	95% CI	p-değeri
Cinsiyet Erkek Kadın	1.000 0.78	0.414-1.472	0.44			
Yaş <60 yaş ≥60 yaş	1.000 1.664	0.94-2.946	0.08			
Vücut Kitle İndeksi Normal VKİ≥25	1.000 1.122	0.585-2.151	0.72			
Charlson Komorbidite İndeksi 2-4 5-8	1.000 1.486	0.84-2.626	0.17			
Tümör yerleşim Kardia Non-kardia	1.000 0.75	0.40-1.397	0.36			
Tümör histoloji İntestinal tip Non-intestinal tip	1.000 1.619	0.90-2.896	0.1			
Tümör derecesi İyi-orta Kötü-andiferansiye	1.000 1.739	0.919-3.291	0.89			
Operasyon tipi Subtotal Total	1.000 1.844	1.038-3.277	0.03*	1.000 2.511	1.279-4.932	0.008*
T evresi T1-T2 T3-T4	1.000 4.518	1.621-12.591	0.004*			
N evresi N0-N1 N2-N3	1.000 2.764	1.483-5.154	0.001*			
Tümör evresi Evre 2 vs Evre 1 Evre 3 vs Evre 1	8.173 16.812	1.062-62.88 2.30-122.88	0.003* 0.04 0.005	8.043 19.008	1.045-61.870 2.595-139.226	0.001* 0.053 0.004
Perinöral invazyon Yok Var	1.000 2.473	1.304-4.69	0.006*			
Lenfovasküler invazyon Yok Var	1.000 2.509	1.122-5.609	0.02*			

HER2 durumu Negatif Pozitif	1.000 0.976	0.431-2.213	0.95			
Platin duyarlı (DFS > 1yıl) Evet Hayır	1.000 0.447	0.242-0.824	0.01*	1.000 4.041	2.014-8.110	0.000*
CD3+PD-1 CD3+PD-1 yüksek Diğerleri	1.000 1.817	0,998-3.308	0.051*	1.000 1.746	0.958-3.183	0,069
CD3+CD8+PD-L1 CD3+CD8 yüksek ve PD-L1 düşük Diğerleri	1.000 2.524	1.299-4.905	0.006*	1.000 3.197	1.623-6.297	0.001*
CEA Normal Yüksek	1.000 0.824	0.14-1.641	0.58			
CA19-9 Normal Yüksek	1.000 1.338	0.477-3.751	0.58			

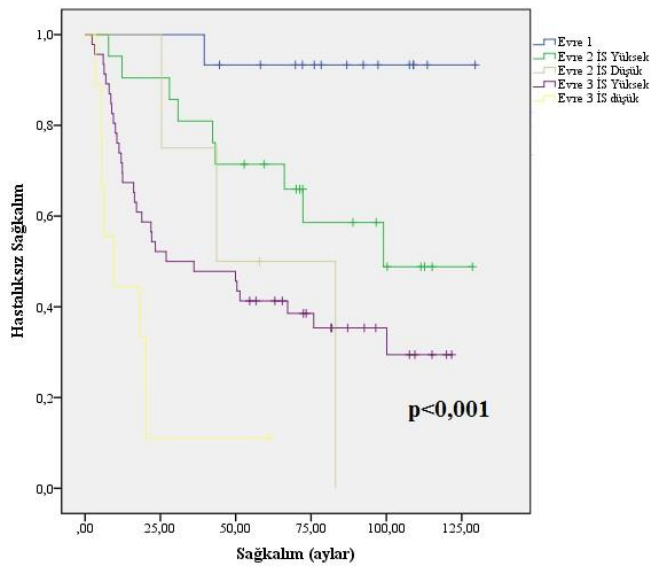
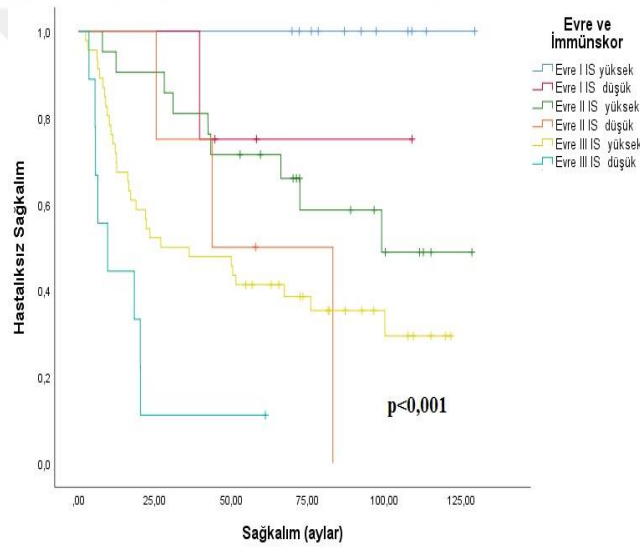
HR: Hazard ratio, CI: Güven aralığı, HER2: Human epidermal growth factor receptor-2, DFS: Hastalıksız sağkalım, CEA: Karsinoembriyonik antijen, CA19-9: Kanseri antijeni 19-9

Evre ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre hastalar hastalıksız sağkalım açısından yeniden evrelendiğinde; evrelerin immünskor durumuna göre birbirinden anlamlı bir şekilde ayrıldığı görüldü ($p<0,001$). Ama yeteri kadar olay gerçekleşmediği için sağkalım süreleri hesaplanamadı. Bakıldığında evre 1 hastaların immünskordan bağımsız olarak iyi hastalıksız sağkalım sürelerine sahip olduğunun görülmesi üzerine, evre 2 ve evre 3 hastalar immünskor durumlarına göre dört gruba ayrıldı ve en iyi hastalıksız sağkalıma evre 1 hastaların sahip olduğu ve en kötü hastalıksız sağkalıma ise evre 3 olup immünskor durumları düşük olan (CD3 ve CD8 düşük ve PD-L1 yüksek) hastaların sahip olduğu görüldü. Evre 2 immünskorları düşük ve evre 3 olup immünskorları yüksek olan hastaların ise benzer sağkalıma sahip olduğu görüldü (Tablo 16, Şekil 14).

Tablo 16: Evre ve İmmünskor (İS) durumlarına göre hastalıksız sağkalım (DFS) süreleri

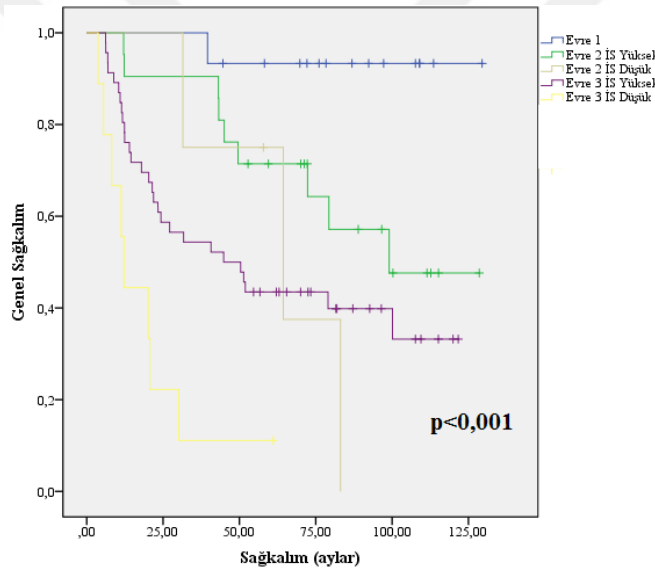
	Medyan (ay)	CI %95 (alt ve üst sınır)		p-değeri
Evre 1 İS'den bağımsız				<0,001
Evre 2 İS yüksek	99,055			
Evre 2 İS düşük	43,663	5,950	81,377	
Evre 3 İS yüksek	26,908	0,000	58,499	
Evre 3 İS düşük	9,528	0,120	18,935	

İS: İmmünskor



Şekil 14: Evre ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre hastalıksız sağkalım (DFS) eğrileri

Evre ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre hastalar genel sağkalım açısından yeniden evrelendiğinde; evrelerin immünskor durumuna göre birbirinden anlamlı bir şekilde ayrıldığı görüldü ($p<0,001$). Bakıldığında evre 1 hastaların immünskordan bağımsız olarak iyi genel sağkalım sürelerine sahip olduğu görülmesi üzerine, evre 2 ve evre 3 hastalar immünskor durumlarına göre dört gruba ayrıldı ve en iyi hastaliksız sağkalıma evre 1 hastaların sahip olduğu ve en kötü hastaliksız sağkalıma ise evre 3 olup immünskor durumları düşük olan (CD3 ve CD8 düşük ve PD-L1 yüksek) hastaların sahip olduğu görüldü. Evre 2 immünskorları düşük ve evre 3 olup immünskorları yüksek olan hastaların ise benzer sağkalıma sahip olduğu görüldü (Şekil 15, Tablo 17).



Şekil 15: Evre ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre genel sağkalım (OS) eğrisi

Tablo 17: Evre ve İmmünskor (İS) durumlarına göre genel sağkalım (OS) süreleri

	Medyan (ay)	CI %95 (alt ve üst sınır)		p-değeri
Evre 1 İS'den bağımsız				<0,001
Evre 2 İS yüksek	99,055			
Evre 2 İS düşük	64,361	15,130	113,592	
Evre 3 İS yüksek	44,846	17,368	72,324	
Evre 3 İS düşük	12,222	9,438	15,006	

Tümörün merkezinde (TM) ve invazif marjinde (İM) tümör-infiltrate eden lenfositler (TİL) ve genel sağkalım arasındaki ilişki analiz edildi. CD3 ve CD8 için; hem yaşayan hem de ölen hastalar için ayrı ayrı hem tümörün merkezinde hem de invazif marjinde mm² deki medyan hücre sayıları, PD-1 ve PD-L1 için de hem yaşayan hem de ölen hastalar için ayrı ayrı hem tümörün merkezinde hem de invazif marjinde medyan boyanma yüzdeleri hesaplandı. Sonuç olarak tümörü infiltrate eden lenfositler ile genel sağkalım arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 18).

Tablo 18: Tümörün merkezinde (TM) ve invazif marjinde (İM) tümör-infiltrate eden lenfositler (TİL) ve genel sağkalım arasındaki ilişki

TİL	Sağ	Ölü	<i>p</i> -değeri
CD3 İM	492,00	483,00	0,15
CD3 TM	604,50	541,00	0,13
CD8 İM	496,00	478,00	0,83
CD8 TM	497,50	388,00	0,57
PD-1 İM	10,50	8,00	0,24
PD-1 TM	13,00	11,00	0,38
PD-L1 İM	7,00	5,00	0,18
PD-L1 TM	0,50	5,00	0,51

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda; evre I-III opere mide kanserinde tanı anında histopatolojik özelliklerin ve tümörü infiltre eden lenfositlerin saptanması ile hem genel sağkalımın, hem de hastalıksız sağkalımın öngörülebilmesini ve aynı zamanda bu patolojik belirteçlerin tedavi yanıtına etkisinin belirlenebilmesini hedefledik. Bu amaçla toplam 95 mide kanseri tanılı hasta çalışmamıza dahil edilmiştir. Hem tümörün merkezinde, hem de invazif marjiniinde CD3+, CD8+, PD-1+ ve PD-L1+ immün boyanma oranları ayrı ayrı değerlendirilmiş, immünskorlar oluşturulmuş ve bunların çeşitli klinik ve patolojik parametrelerle, genel ve hastalıksız sağkalımla ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların 67' si erkek, 28' i kadındı, E/K oranı 2.3 olarak bulundu. Medyan hasta yaşı 60 idi. Bu bulgular mide kanserinin genel epidemiyolojisi ile uyumlu bulguları. Tümör 25 hastada (%26.3) kardiyada, 23 hastada (%24.2) korpusta, 47 hastada (%49.5) antrumda yerleşmişti. Lauren sınıflamasına göre olguların 42 si (%44.2) intestinal tipte, 39 u (%41.1) diffüz tipte ve 14 ü (%14.7) mikst tipteydi. Bilindiği gibi mide kanserlerinde intestinal tip kanserler (%70), diffüz tip kanserlere (%25) göre daha fazla oranda görülmektedir ve prognozları daha iyidir. Bizim çalışmamızda intestinal ve diffüz tip tümörlü hasta sayıları birbirine yakındı ve mikst tipte tümör sayısı fazlaydı. Hastaların prognozları bu ve buna benzer faktörlerden de etkilenmiş olabileceğinden, immün hücre infiltrasyonlarına tek tek bakıldığında sağkalım ile aralarında anlamlı derecede ilişki bulunamamış olabilir.

Hastalarda cinsiyet, yaş, vücut kitle indeksi, Charlson komorbidite indeksi, tümörün yerleşimi (kardiya/non-kardiya), tümörün histolojisi (intestinal/diffüz), HER2 pozitifliği, CEA ve CA19-9 düzeyleri ile hastalıksız ve genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptayamadık.

Mide kanserlerinde hemogram parametrelerinin prognoza etkisini ve tümörü infiltre eden lenfositlerle ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda bu parametrelerin farklı kombinasyon ve şekillerde CD3, CD8, PD-1 ve PD-L1 pozitifliği ile arasında pozitif veya negatif korelasyonların olduğu gösterilmiştir. Yamakoshi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada pre-operatif NLR (nötrofil/lenfosit oranı)' nin mide kanserinde sağkalım açısından bağımsız prognostik değeri olduğu gösterilmiş ve NLR artışının tümörün immün cevabını etkilediği ileri sürülmüştür (32). Bizim çalışmamızda pre-operatif NLR arttıkça sadece

tümör merkezindeki PD-L1 infiltrasyonunun arttığı görülmüştür. Post-operatif NLR ile TİL arasında anlamlı korelasyon görülmemiştir.

Hastalarda sağkalım ile operasyon tipi (total/subtotal), perinöral invazyon varlığı, lenfovasküler invazyon varlığı, T ile N evresi ve tümörün genel evresi arasında anlamlı ilişki olduğunu saptadık. Total gastrektomi yapılan hastalarda subtotal gastrektomi yapılan hastalara kıyasla daha fazla ölüm oranı görüldü. Bu durum hastalığın total gastrektomi yapılan hastalarda daha fazla ilerlemiş olması ile açıklanabilir. Yapılan bir çalışma mide kanserinde operasyon tipinden ziyade çıkarılan lenf nodu sayısının da uzun süreli sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir (33). Perinöral ve lenfovasküler invazyon varlığı beklenildiği şekilde artmış ölüm riski ile ilişkili bulundu. T ve N evresi ilerledikçe ve genel evre arttıkça ölüm riski de artmakta idi.

Tümörün derecesi (iyi-orta-kötü-andiferansiye) ilerledikçe hastalısız sağkalımın olumsuz etkilendiği görüldü, ancak genel sağkalım ile tümör derecesi arasında ilişki bulunmamadı.

Mide kanserinde TNM evrelemesine göre evre ilerledikçe prognozun kötüleştiğini bilmekteyiz. Bizim çalışmamızda da hastalarda T1-T2-T3-T4, N0-N1-N2-N3 ve Evre 1-2-3 sırasıyla sağkalımın azaldığı görülmüştür.

Tümörü infiltre eden lenfositlerin tümörün merkezinde veya invazif marjindeki yoğunlukları PD-1 hariç birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Özellikle CD3 ve CD8 arasında bu korelasyon daha yüksek oranda görülmüştür. Yani CD3 veya CD8 için infiltrasyon yoğunluğunun tümörün bir bölgesinde yüksek bulunduğu hastalarda, tümörün diğer bölgesinde ve diğer immün hücre için her iki bölgede de yüksek bulunduğu saptanmıştır.

İlk olarak 2006 yılında Galon ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kolorektal kanserli hastalarda tümörü infiltre eden immün hücrelerin tipine ve yerleşimine göre yoğunluğunun yüksek olması durumunda hastalığın nüksünün daha az olduğu ve sağkalımı olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (25). Daha sonra benzer çalışmalar diğer kanser türleri için de yapılmıştır ve tümörü infiltre eden lenfositlerin sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda tümörü infiltre eden lenfositler içinde; sadece tümör merkezindeki PD-1 infiltrasyonu ile hastalık nüksü arasında anlamlı ilişki görülmüştür. Bu durum hasta sayısının az olmasından kaynaklı

oluşmuş olabilir. Tümör merkezinde PD-1 infiltrasyonunun yüksek olduğu hastalarda daha az nüks olduğu izlenmiştir.

Bugüne dek yapılan birçok çalışma ile kolorektal kanserlerde, akciğer kanserlerinde, mide kanserlerinde, meme kanserlerinde, beyin kanserlerinde tümörü infiltre eden lenfositlerin yüksek yoğunlukta olmasının pozitif prognostik bir belirteç olduğu gösterilmiştir (29, 34-36).

Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mide kanserinde CD3 ve CD8 immünskorun hastalığın nüksü ve sağkalım ile ilişkisi araştırılmıştır. Sonuçlarda hem CD3 hem de CD8 için; immün hücre infiltrasyonunun yüksek yoğunlukta olduğu hastalarda nüksün ve ölümün daha az olduğu gösterilmiştir. İmmünskorun TNM ile birlikte prognoz tayininde ve tedavi yanıtını öngörmede kullanılabileceği öne sürülmüştür (29). Paulsen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise; küçük hücre dışı akciğer kanserinde PD-1 ve PD-L1 immünskorun sağkalım ile ilişkisi incelenmiştir. Hem PD-1, hem de PD-L1 infiltrasyonunun yüksek yoğunlukta olması pozitif prognostik faktör olarak bulunmuştur (35). Bizim çalışmamızda CD3, CD8, PD-1 ve PD-L1 in hem tümör merkezinde hem de invazif marjindeki yoğunlukları ile sağkalım arasında anlamlı ilişkili bulunamamıştır. Ancak immün hücrelerden sadece PD-L1 infiltrasyonunun düşük olmasının hastalıksız sağkalımı olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Literatürde immün hücrelerin yoğunluklarının yüksek veya düşük olmasının nüks ve sağkalımı olumlu veya olumsuz etkilediği örnek çalışmalar mevcuttur. Thompson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi, mide kanserli hastalarda yüksek PD-L1 ekspresyonunun sağkalımı olumsuz etkilediği gösterilmiştir (37).

Çalışmamızda tümör merkezindeki (TM) tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) hastalıksız ve genel sağkalım süreleri ile ilişkisi ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlar şeklinde incelenmiştir. Bu kombinasyonlarda aslında CD3, CD8 ve PD-1 için yüksek yoğunlukta olmak, PD-L1 için düşük yoğunlukta olmak hem hastalıksız, hem de genel sağkalım açısından pozitif prognostik faktör olarak görülmüş, ancak hasta sayısının yetersizliğinden dolayı sadece iki grupta istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptanmıştır. İkili kombinasyonlarda CD3 ve PD-1 infiltrasyon yoğunluğunun yüksek olduğu, üçlü kombinasyonlarda ise CD3 ve CD8 infiltrasyon yoğunluğunun yüksek, PD-L1 infiltrasyon yoğunluğunun düşük olduğu hasta gruplarında hem hastalıksız, hem de genel sağkalımın yüksek olduğu görülmüştür. Bu

sonuçlar; mide kanseri tanısı alan hastalarda tanı anında CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 immünskorların belirlenmesinin prognozu öngörmede kullanılabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda CD3+CD8+PD-L1 immünskorun (CD3 yüksek, CD8 yüksek, PD-L1 düşük) sağkalımı olumlu yönde etkilediğinin görülmesi üzerine; hastalar evre ile CD3+CD8+PD-L1 immünskor durumuna göre gruplar oluşturularak hastalıksız ve genel sağkalım açısından incelenmiştir. Evre 1 hastaların immünskordan bağımsız olarak iyi genel sağkalım sürelerine sahip olduğu görülmesi üzerine, evre 2 ve evre 3 hastalar immünskor durumlarına göre evre 2 immünskor yüksek, evre 2 immünskor düşük, evre 3 immünskor yüksek, evre 3 immünskor düşük olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır. Hem hastalıksız, hem de genel sağkalım açısından evrelerin birbirinden anlamlı şekilde ayrıldığı görülmüştür.

Evre 1-2-3 mide kanserlerinde tümörü infiltre eden lenfositlerin sadece sağkalım açısından değil, hastalara uygulanan tedaviye yanıt açısından da değeri incelenmiştir. Bu konuda daha önce yapılan çalışmalarla yüksek immün hücre infiltrasyonunun tedavi yanıtını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (29). Ancak çalışmamızda tümörü infiltre eden lenfositlerle, uygulanan kemoterapi ya da radyoterapiye alınan cevap ile arasında ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda en önemli kısıtlayıcı faktör, retrospektif çalışmalara özgü olan veri yetersizliğidir. Hastaların demografik, klinik ve patolojik bilgilerine ulaşmanın, patoloji arşivinden yeniden kesit alma ve boyanmaya uygun parafin blokları edinmenin güç olması ve en az 3 yıl süren düzenli takipli hasta verilerinin eksikliği sebebiyle çalışmamıza alınabilen hasta sayısı oldukça azalmıştır. Bu durum istatistiksel sonuçların etkinliğinin azalmasına sebep olmuş olabilir. Tümörü infiltre eden lenfositlerin prognostik ve prediktif değerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha geniş çapta, daha fazla sayıda prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Mide kanserinde prognozu belirlemek ve tedavi kararı vermek için çeşitli klinik ve patolojik parametreler kullanılmakta ve TNM sınıflaması ile evreleme yapılmaktadır. Ancak aynı evredeki mide kanserlerinde klinik olarak anlamlı farklı sonuçlar görülebilmektedir. Bu sebeple immün hücre infiltrasyonunun belirlenmesi önem kazanmıştır. TNM evrelemesine ek olarak immün değerlendirme yapılması önerilmektedir. Mide kanseri dokusundaki immün infiltrasyon klinik sonuçları öngörülebilir ve prognoz ile terapötik sonuç için bir belirteç olarak kullanılabilir.

Literatürde bugüne dek yapılan çalışmalar incelendiğinde; mide kanserinde tümörü infiltre eden lenfositlerin sağkalım açısından prognostik önemi olduğu anlaşılmıştır (37-39). Biz çalışmamızda CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 immünskor kombinasyonları ile sağkalım arasında güçlü korelasyon olduğunu gösterdik. Ancak hasta sayısının kısıtlılığından dolayı incelediğimiz tüm immün hücrelerde sağkalım açısından anlamlı sonuçlar elde edemedik.

Çalışmamızın sonuçlarına göre CD3+PD-1 ve CD3+CD8+PD-L1 immünskorları prognoz belirlemede etkili bulunmuştur. Evre ile immünskorlar birlikte değerlendirildiğinde ise; evre azaldıkça ve immünskor yükseldikçe sağkalımın belirgin olarak olumlu yönde etkilendiği gösterilmiştir.

İncelenen immün hücre infiltrasyonlarının tümörün merkezinde ya da invazif marjinde yüksek ya da düşük olması tedavi yanıtını etkilememiştir, yani prediktif önemi gösterilememiştir.

Tüm immün hücre tiplerinde anlamlı ve net sonuçlar elde edebilmek için daha fazla sayıda hastaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Yine de çalışmamız mide kanserlerinde tümörü infiltre eden lenfositlerin TNM evrelemesi ile beraber prognoz tayininde kullanılmasının etkili olduğunu destekler niteliktedir. İlerde tıpkı kolorektal kanserlerde olduğu gibi immün değerlendirmenin diğer kanser türlerinde de evreleme ve prognoz belirlemede birlikte kullanılması öngörülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
2. Galon J, Costes A, Pagès F, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 2006
3. Marliot F, Chen X, Kirilovsky A, et al. Analytical validation of the Immunoscore and its associated prognostic value in patients with colon cancer. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1):e000272.
4. Mlecnik B, Bifulco C, Bindea G, et al. Multicenter International Society for Immunotherapy of Cancer Study of the Consensus Immunoscore for the Prediction of Survival and Response to Chemotherapy in Stage III Colon Cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38(31):3638-3651
5. Globocan Cancer Fact Sheets 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>
6. National Cancer Institute (NIH) Cancer Stat Facts: Stomach Cancer. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>
7. Yalcin B, Zengin N, Aydın F, et al. The clinical and pathological features of patients with gastric cancer in Turkey: A Turkish Oncology Group Study. *Turk J Cancer*. 2006;36
8. Shah D, Bentrem D. Environmental and genetic risk factors for gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2022;125(7):1096-1103.
9. Hu B, Hajj NE, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3)
10. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and So-called Intestinal-type Carcinoma. An Attempt At A Histo-clinical Classification. *Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49
11. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg*. 1993;218(5):583-592
12. Morgenstern L. The Virchow-Troisier node: A historical note - The American Journal of Surgery. [https://www.americanjournalofsurgery.com/article/0002-9610\(79\)90353-2/pdf](https://www.americanjournalofsurgery.com/article/0002-9610(79)90353-2/pdf)
13. Thammineedi SR, Patnaik SC, Saksena AR, Nusrath S. Blumer's Shelf on Laparoscopy. *Indian J Surg Oncol*. 2022;13(2):412-414
14. Pellicano R, et al. Endoscopic ultrasound in the preoperative staging of gastric cancer: key messages for surgeons. *Minerva Chirurgica* 2015. <https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-surgery/article.php?cod=R06Y2015N06A0417>
15. De Potter T, Flamen P, Van Cutsem E, et al. Whole-body PET with FDG for the diagnosis of recurrent gastric cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29(4):525-529

16. Demirelli B, Babacan NA, Ercelep Ö, et al. Modified Glasgow Prognostic Score, Prognostic Nutritional Index and ECOG Performance Score Predicts Survival Better than Sarcopenia, Cachexia and Some Inflammatory Indices in Metastatic Gastric Cancer. *Nutr Cancer*. 2021;73(2):230-238
17. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-1474
18. Mide Kanseri Klinik Protokolü 2020. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü
19. Xie J, Fu L, Jin L. Immunotherapy of gastric cancer: Past, future perspective and challenges. *Pathol - Res Pract*. 2021;218:153322
20. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-148
21. Moore Jr. OS, Foote Jr. FW. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 1949;2(4):635-642
22. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-271
23. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*. 2018;391(10135):2128-2139
24. Zhang D, He W, Wu C, et al. Scoring System for Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Its Prognostic Value for Gastric Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:71
25. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-1964
26. Galon J, Fox BA, Bifulco CB, et al. Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J Transl Med*. 2016;14:273
27. Miksch RC, Schoenberg MB, Weniger M, et al. Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Neutrophils on Survival of Patients with Upfront Resection of Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2019;11(1):39
28. Bösmüller HC, Wagner P, Peper JK, et al. Combined Immunoscore of CD103 and CD3 Identifies Long-Term Survivors in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2016;26(4)
29. Jiang Y, Zhang Q, Hu Y, et al. ImmunoScore Signature: A Prognostic and Predictive Tool in Gastric Cancer. *Annals of Surgery*. 2018

30. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014;232(2):199
31. ESMO. Immunoscore Classification Significantly Associates with Time to Recurrence In Asian Patients with Early Stage Colon Cancer. <https://www.esmo.org/oncology-news/immunoscore-classification-significantly-associates-with-time-to-recurrence-in-asian-patients-with-early-stage-colon-cancer>
32. Yamakoshi Y, Tanaka H, Sakimura C, et al. Association between the preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and tertiary lymphoid structures surrounding tumor in gastric cancer. *Mol Clin Oncol.* 2021;14(4):76
33. Palaj J, Kečkėš Š, Waczulíková I, et al. The role of subtotal and total gastrectomy in the treatment of gastric cancer. *Neoplasma.* 2021;68(03):621-624
34. Pagès F, Galon J, Fridman WH. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):981-987
35. Paulsen EE, Kilvaer TK, Khanekhenari MR, et al. Assessing PDL-1 and PD-1 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Novel Immunoscore Approach. *Clin Lung Cancer.* 2017;18(2):220-233.e8
36. Baxevanis CN, et al. The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2019. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-019-02327-7>
37. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut.* 2017;66(5):794-801
38. Wen T, Wang Z, Li Y, et al. A Four-Factor Immunoscore System That Predicts Clinical Outcome for Stage II/III Gastric Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(7):524-534
39. Yan H, Chen Y, Yang Z, et al. An Immune Cell Signature Is Associated With Disease-Free Survival and Adjuvant Chemosensitivity of Patients With Resectable Gastric Cancer. *Front Immunol.* 2021;11