TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MESANENİN İNVAZİV ÜROTELYAL KARSİNOMLARINDA TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERİN İNTRATÜMÖRAL VE PERİTÜMÖRAL DAĞILIMI İLE İMMÜN FENOTİPİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

DR. HATİCE NEŞE DOĞAN

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

2026





TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MESANENİN İNVAZİV ÜROTELYAL KARSİNOMLARINDA TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERİN İNTRATÜMÖRAL VE PERİTÜMÖRAL DAĞILIMI İLE İMMÜN FENOTİPİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ

DR. HATİCE NEŞE DOĞAN

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. BÜŞRA YAPRAK BAYRAK

Etik Kurulu Proje No: 2026/193,
Karar No: KÜ GOKAEK-2026/06/44

2026

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER 1
TEŞEKKÜR 3
KISALTMALAR DİZİNİ 4
RESİMLER DİZİNİ 5
ŞEKİLLER DİZİNİ 6
TABLOLAR DİZİNİ 7
1. GİRİŞ ve AMAÇ 9
2. GENEL BİLGİLER 12
2.1. Mesane Embriyolojisi, Histolojisi ve Anatomisi 12
2.1.1. Mesane Embriyolojisi 12
2.1.2. Mesane Anatomisi 12
2.1.3. Mesane Histolojisi 14
2.1.3.1. Epitelyum 15
2.1.3.2. Lamina Propria 16
2.1.3.3. Muskularis Propria 17
2.1.3.4. Adventisya/Seroza 18
2.2. Mesane Tümörleri 19
2.2.1. Epidemiyoloji 19
2.2.2. Etiyoloji ve Risk faktörleri 20
2.2.3. Makroskopik Özellikler 21
2.2.4. Mikroskopik Özellikler ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Sınıflaması 22
2.2.5. İmmünohistokimya 25
2.2.6. Moleküler Patoloji ve Genetik 26
2.2.7. Evreleme 28
2.2.7.1 T Komponenti 29
2.2.7.2 N Komponenti 30
2.2.7.3. M Komponenti 31
2.3. Kas İnvaziv Olmayan Mesane Kanseri (Genel Bakış) 32
2.4. Kas İnvaziv Mesane Kanseri (MIUC) 34
2.4.1. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler 34
2.4.3. Tedavi Yaklaşımları 36
2.4.3.1. Radikal Sistektomi 36
2.4.3.2. (Neo)Adjuvan Kemoterapi 37
2.4.4. Prognozu Etkileyen Klinikopatolojik Faktörler (Tümör Boyutu, Lenfovasküler İnvazyon, Subtipler) 37
2.4.5. Nüks, Progresyon ve Metastaz 38
2.5. Tümör Mikroçevresi ve Kanser İmmünolojisi 38
2.5.1. Tümör Mikroçevresinin Bileşenleri 38
2.5.2. Tümör-İmmün Sistem Etkileşimi ve İmmün Kaçış 39
2.5.3. Mesane Kanserinde TME'nin Prognostik Önemi 39
2.6. Tümörü İnfiltre Eden Lenfositler (TIL) 39
2.6.1. Tanım ve Genel Özellikler 39
2.6.2. TIL'lerin İntratümöral ve Peritümöral (İnvaziv Marjin) Dağılımı 40
2.6.3. TIL Değerlendirme Yöntemleri ve Skorlama Sistemleri 40
2.6.4. Farklı Kanser Türlerinde TIL'lerin Prognostik Önemi 40

2.6.5. Mesane Kanserinde TIL'lerin Rolü ve Güncel Literatür ... 41
2.7. TIL İmmün Fenotipi ... 41
2.7.1. $CD4^+$ Yardımcı T Lenfositler ... 41
2.7.2. $CD8^+$ Sitotoksik T Lenfositler ... 41
2.7.3. $FOXP3^+$ Regülatuvar T Lenfositler (Treg) ... 42
2.7.4. $CD8^+/FOXP3^+$ Oranının Prognostik Önemi ... 42
2.7.5. İmmün Hücre Dengesi ve Tümör Progresyonu ... 42
2.8. Mesane Kanserinde TIL Dağılımı ve İmmün Fenotipe Dair Güncel Çalışmalar ... 43
3. GEREÇ ve YÖNTEM ... 44
3.1. Hasta Popülasyonu ve Olgu Seçimi ... 44
3.2. Çalışmanın Tipi/Türü ... 44
3.3. Araştırmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri ... 44
3.4. Veri Toplama Araçları ve Yöntemi ... 45
3.5. Hematoksilen & Eozin Değerlendirme ... 46
3.6. İmmünohistokimyasal Boyama ... 48
3.7. İmmünohistokimyasal Değerlendirme ... 49
3.7.1. CD4 Değerlendirmesi ... 49
3.7.2. CD8 Değerlendirmesi ... 52
3.7.3. FOXP3 Değerlendirmesi ... 53
3.8. İntratümöral ve Peritümöral TIL Dağılımının Değerlendirilmesi ... 56
3.9. Klinikopatolojik Verilerin Toplanması ... 56
3.10. İstatistiksel Analiz ... 56
4. BULGULAR ... 58
4.1. Tanımlayıcı Bulgular ... 58
4.2. İntratümöral vs Peritümöral Karşılaştırma ... 61
4.3. TIL Yoğunluğu/Oranlarının Demografik ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi ... 62
4.4. TIL Parametrelerinin Prognostik Veriler ile İlişkisi ... 73
4.5. Genel Sağkalım (OS) Analizleri ... 78
4.6. Neoadjuvan/Preoperatif Tedavi Durumunun TIL Parametreleri Üzerine Etkisi (Duyarlılık Analizi) ... 81
5. TARTIŞMA ... 85
6. SONUÇ ve ÖNERİLER ... 97
7. ÖZET ... 100
8. SUMMARY ... 102
9. KAYNAKLAR ... 104

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle mesleki gelişimime katkı sağlayan, bilimsel bakış açısı kazanmamda yol gösterici olan anabilim dalımızın öğretim üyelerine teşekkür ederim. Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi sürecinde katkı ve destek sağlayan başta tez danışmanım Doç. Dr. Büşra YAPRAK BAYRAK ve Dr. Öğr. Üyesi Bahar MEMİŞ olmak üzere tüm hocalarıma şükranlarımı sunarım.

Varlıklarıyla bana her zaman güven veren, emekleri ve fedakârlıklarıyla bugünlere ulaşmamda en büyük pay sahibi olan ailemin desteği, bu sürecin tamamlanmasında en önemli motivasyon kaynağım olmuştur. Onların her koşulda yanımda olduğunu bilmek, mesleki yolculuğum boyunca bana güç ve kararlılık vermiştir. Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sabırları, anlayışları ve destekleriyle bu uzun ve zorlu süreçte bana güç veren sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın hazırlanması sürecinde çeşitli aşamalarda emeği geçen ve katkıda bulunan kardeşim ve aynı zamanda meslektaşım olan Bağdagül Nur DOĞAN'a, tüm eğitim sürecinde her zaman desteklerini hissettiğim çok kıymetli Esra CİVRİZ, Semra UZUN ERKAL, Ayşe DÖNMEZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Hatice Neşe DOĞAN
Haziran 2026
Kocaeli

KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CAF	Kansere özgü fibroblastlar
CIS	Karsinoma in situ
CT	Bilgisayarlı tomografi
CUETO	Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EAU	European Association of Urology
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FFPE	Fikse edilmiş ve parafine gömülü
GC	Gemsitabin - sisplatin
H&E	Hematoksilen&Eozin
HGPUC	Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
HBYS	Hastane bilgi yönetim sistemi
HPF	Büyük büyütme alanı (high power field)
IHK	İmmünohistokimyasal
ITWG	Uluslararası TIL Çalışma Grubu
İT	İntratümöral
KRT 5/6	Keratin 5/6
KRT20	Keratin 20
KRT7	Keratin 7
LGPUC	Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
LVI	Lenfovasküler invazyon
MM	Muskularis mukoza
MP	Muskularis propria
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MVAC	Metotreksat, Vinblastin, Adriamisin, Sisplatin
NAC	Neoadjuvan kemoterapi
NBI	Dar bant görüntüleme (narrow band imaging)
NIUC	İnvaziv olmayan ürotelyal karsinom
NMIUC	Kas invaziv olmayan mesane kanseri
MIUC	Kas invaze mesane kanseri
OS	Genel sağkalım
PDD	Floresan sistoskopi (photodynamic diagnosis)
PFS	Progresyonsuz sağkalım
PT	Peritümöral
PUNLMP	Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIL	Tümörü infiltre eden lenfositler
TME	Tümör mikroçevresi
TNM	Tumor, Node, Metastasis sınıflaması
Treg	T regülatuar hücreleri
TUR	Transüretral rezeksiyon
TUR-M	Transüretral rezeksiyon – Mesane
UICC	Union for International Cancer Control
UTUC	Üriner trakt ürotelyal karsinom
WHO	World Health Organization

RESİMLER DİZİNİ

RESİM 1: MESANE LAMİNA PROPRİA TABAKASI. [18] 17
RESİM 2: MESANE KAS TABAKASI. [18] 18
RESİM 3: MESANE SEROZASI. [19] 19
RESİM 4: DÜŞÜK DERECELİ PAPİLLER ÜROTELYAL KARSİNOM (H&E 200).... 23
RESİM 5: YÜKSEK DERECELİ PAPİLLER ÜROTELYAL KARSİNOMDA BELİRGİN NÜKLEER PLEOMORFİZM (H&E 200). 23
RESİM 6: YÜKSEK DERECELİ PAPİLLER ÜROTELYAL KARSİNOMDA SKUAMÖZ DİFERANSİYASYON (H&E 400). 24
RESİM 7: ÜROTELYAL KARSİNOMA İN SİTU. 24
RESİM 8: İNVAZİV ÜROTELYAL KARSİNOMDA KERATİN 7 BOYANMA PATERNİ. 25
RESİM 9: DÜŞÜK DERECELİ NON İNVAZİV ÜROTELYAL KARSİNOMDA Kİ67 BOYANMA PATERNİ. 26
RESİM 10: İNTRATÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA TIL (X200, H&E) 47
RESİM 11: PERİTÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA TIL (X200, H&E) 47
RESİM 12: İNTRATÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA TIL (X200, H&E) 48
RESİM 13: PERİTÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA TIL (X200, H&E) 48
RESİM 14: İNTRATÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA CD4 POZİTİF TIL (X200) 50
RESİM 15: İNTRATÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA CD4 POZİTİF TIL (X200).. 50
RESİM 16: PERİTÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA CD4 POZİTİF TIL (X100)... 51
RESİM 17: PERİTÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA CD4 POZİTİF TIL (X100) 51
RESİM 18: İNTRATÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA CD8 POZİTİF TIL (X200) 52
RESİM 19: İNTRATÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA CD8 POZİTİF TIL (X200).. 52
RESİM 20: PERİTÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA CD8 POZİTİF TIL (X100)... 53
RESİM 21: PERİTÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA CD8 POZİTİF TIL (X100) 53
RESİM 22: İNTRATÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA FOXP3 POZİTİF TIL (X200) 54
RESİM 23: İNTRATÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA FOXP3 POZİTİF TIL (X200) 54
RESİM 24: PERİTÜMÖRAL YÜKSEK YOĞUNLUKTA FOXP3 POZİTİF TIL (X200) 55
RESİM 25: PERİTÜMÖRAL DÜŞÜK YOĞUNLUKTA FOXP3 POZİTİF TIL (X200). 55

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1: MESANE DUVAR KATMANLARININ ŞEMATİK KESİTİ VE GERM TABAKASI KÖKENLERİ: ÜROTELYUM (ENDODERM), LAMİNA PROPRİA VE MUSKULARİS PROPRİA/DETRUSOR (MEZODERM). 12
ŞEKİL 2: ERKEK MESANESİ VE ÜRETRASI. 13
ŞEKİL 3: MESANE VE SFİNKTERİN İNNERVASYONU. 14
ŞEKİL 4: MESANE DUVAR KATLARININ HİSTOLOJİSİ. 15
ŞEKİL 5: MESANE MUKOZASI. 16

TABLOLAR DİZİNİ

TABLO 1: MESANE KANSERİNDE RİSK FAKTÖRLERİ VE GÖRECELİ RİSKLER. 20
TABLO 2: WHO 2022 ÜROTELYAL NEOPLAZİLER SINIFLAMASI VE ÖZELLİKLERİ 24
TABLO 3: MESANE KANSERİNDE MOLEKÜLER YOLAKLAR VE GENETİK DEĞİŞİKLİKLER 28
TABLO 4: MESANE KANSERİ TNM SINIFLAMASI - T KOMPONENTİ (AJCC 8. BASKI) 30
TABLO 5: MESANE KANSERİ TNM SINIFLAMASI - N VE M KOMPONENTLERİ (AJCC 8. BASKI) 32
TABLO 6: KAS İNVAZİV OLMAYAN MESANE KANSERİNDE RİSK SINIFLANDIRMASI (EAU 2024 KILAVUZLARI) 33
TABLO 7: İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİKORLARIN ÖZELLİKLERİ 49
TABLO 8: OLGULARIN DEMOGRAFİK VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ (N=98) 58
TABLO 9: OLGULARIN TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERİN (TIL) İNTRATÜMÖRAL (İT) VE PERİTÜMÖRAL (PT) DAĞILIMI (N=98) 59
TABLO 10: OLGULARIN TAKİP VERİLERİ (N=98) 60
TABLO 11: $CD4^+$, $CD8^+$ VE $FOXP3^+$ TIL YOĞUNLUKLARI İLE ORANLARININ TANIMLAYICI İSTATİSTİKLERİ (N=98) 60
TABLO 12: $CD4^+$, $CD8^+$ VE $FOXP3^+$ TIL YOĞUNLUKLARININ İNTRATÜMÖRAL VE PERİTÜMÖRAL BÖLGELER ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI (N=98) 61
TABLO 13: CD4, CD8, FOXP3 (IT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ CİNSİYET İLE İLİŞKİSİ 62
TABLO 14: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ SİGARA ÖYKÜSÜ İLE İLİŞKİSİ 63
TABLO 15: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ DSÖ DERECESİ İLE İLİŞKİSİ 64
TABLO 16: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ PT1 (KAS İNVAZİV OLMAYAN) VS PT2-4 (KAS İNVAZİV) GRUPLARI ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI 65
TABLO 17: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ ORTA EVRE (PT2) VS İLERİ EVRE (PT3-4) GRUPLARI ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI (N=24 VS 66) 66
TABLO 18: İNTRATÜMÖRAL VE PERİTÜMÖRAL TIL PARAMETRELERİNİN PT EVRE GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI (PT1A VS PT2 VS PT3-4) 66
TABLO 19: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ LENF NODU DURUMU İLE İLİŞKİSİ 67
TABLO 20: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ LENFOVASKÜLER İNVAZYON DURUMU İLE İLİŞKİSİ 68
TABLO 21: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ PERİNÖRAL İNVAZYON DURUMU İLE İLİŞKİSİ 69
TABLO 22: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ TÜMÖR NEKROZU DURUMU İLE İLİŞKİSİ 69
TABLO 23: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) VE ORANLARININ SUBTİP HİSTOLOJİ İLE İLİŞKİSİ 70

TABLO 24: TIL PATERNİ (İNFLAMED/EXCLUDED/DESERT) İLE HİSTOPATOLOJİK PARAMETRELERİN İLİŞKİSİ 71
TABLO 25: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ TIL PATERNİ (İNFLAMED/EXCLUDED/DESERT) İLE İLİŞKİSİ 72
TABLO 26: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ TIL PATERNİ (İNFLAMED/EXCLUDED/DESERT) İLE İLİŞKİSİ DUNN'S POST-HOC TESTİ (BONFERRONİ DÜZELTMELİ 73
TABLO 27: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ NÜKS DURUMU İLE İLİŞKİSİ (N=7 VS 91) 74
TABLO 28: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ METASTAZ DURUMU İLE İLİŞKİSİ (N=28 VS 70) 75
TABLO 29: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ SAĞKALIM İLE İLİŞKİSİ (N=63 VS 35) 75
TABLO 30: YAŞ, TÜMÖR BOYUTU, TAKİP SÜRESİ VE OS İLE TIL PARAMETRELERİ ARASINDAKİ KORELASYON (SPEARMAN) 77
TABLO 31: TIL PATERNİ (İNFLAMED/EXCLUDED/DESERT) İLE PROGNOSTİK PARAMETRELERİN İLİŞKİSİ 78
TABLO 32: TIL PARAMETRELERİNE GÖRE (MEDYAN EŞİK) KAPLAN-MEİER OS ANALİZİ (N OLAY=63) 79
TABLO 33: GENEL SAĞKALIMIN (OS, N OLAY=63) COX REGRESYON ANALİZİ 80
TABLO 34: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ NEOADJUVAN/PREOPERATİF TEDAVİ DURUMU İLE İLİŞKİSİ (N=44 VS 54) 81
TABLO 35: TIL PATERNİNİN NEOADJUVAN/PREOPERATİF TEDAVİ DURUMUNA GÖRE DAĞILIMI 82
TABLO 36: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL YOĞUNLUK VE ORANLARININ SİSTEMİK NEOADJUVAN KEMOTERAPİ (NAK) DURUMU İLE İLİŞKİSİ (N=32 VS 54) 83
TABLO 37: TIL PATERNİNİN SİSTEMİK NAK DURUMUNA GÖRE DAĞILIMI 84

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane kanseri genitoüriner sistemin en sık görülen malignitelerindendir ve dünya genelinde önemli bir morbidite-mortalite kaynağıdır.[1] Tümörlerin yaklaşık %90'ını ürotelyal karsinomlar oluşturur, ancak klinik seyir hastadan hastaya belirgin şekilde değişir.[2] Aynı patolojik evredeki hastaların farklı sonuçlar yaşaması, evrelemenin tek başına yetmediğini ve tümör biyolojisini daha iyi yansıtan belirteçlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir.[1,2]

Prognoz bugün hâlâ büyük ölçüde TNM (Tumor, Node, Metastasis) evrelemesi ve histopatolojik parametrelerle belirlenir.[1] Oysa bu sistem tümörün biyolojik davranışını, özellikle de konağın immün yanıtını yansıtmakta yetersiz kalır. Tümör mikroçevresi ve immün hücre infiltrasyonu son yıllarda bu boşluğu doldurabilecek bir alan olarak öne çıkmıştır.[3] Kas invaziv mesane kanserinde $CD8^+$ T lenfosit yoğunluğunun sağkalımla ilişkisini gösteren erken çalışmalar, immün infiltrasyonun bağımsız bir prognostik parametre olabileceğine işaret etmiştir.[4]

Tümör mikroçevresi, tümör hücreleriyle stromal ve immün hücreler arasındaki etkileşimlerden oluşan dinamik bir yapıdır.[5] Bu yapının başlıca bileşenlerinden olan tümörü infiltre eden lenfositler (TIL'ler) tümör gelişimi, immün kaçış ve metastatik potansiyel üzerinde rol oynar. TIL varlığı genellikle antitümör yanıtın göstergesi sayılır ve birçok malignitede daha iyi sonuçlarla ilişkilendirilir.[5,6] Mesane kanserinde de $CD3^+$/FOXP3-negatif TIL'lerin invazyon sınırında yoğunlaşmasının daha uzun hastalıksız sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir.[3]

Ne var ki TIL'lerin prognostik anlamı sabit değildir; invazyon derinliğine ve incelenen hücre alt grubuna göre değişebilir.[7] Radikal sistektomi serilerinde $CD8^+$ TIL varlığı, organa sınırlı ve organ dışı yayılım gösteren hastalıkta farklı klinik anlamlar taşımıştır.[7] Bir tissue microarray çalışmasında yüksek FOXP3/CD3 ve FOXP3/CD8 oranları daha kısa genel sağkalımla ilişkili bulunmuş; bu da prognozu belirleyenin tek bir belirteç değil, alt gruplar arasındaki denge olduğunu düşündürmüştür.[8] Benzer şekilde $CD3^+$ ve $CD68^+$ infiltrasyonunun mesane kanseri alt tipine özgü seyrettiği ve kas invaziv tümörlerin gidişatını etkilediği bildirilmiştir.[9]

Bu dengenin iki ucunda $CD8^+$ sitotoksik T hücreleri ile $FOXP3^+$ regülatör T hücreleri (Treg) yer alır: ilki antitümör yanıtın temel efektörü, ikincisi ise çoğunlukla baskılayıcı bir rol üstlenir.[10] İkisi arasındaki oran, tümör progresyonu ve prognoz açısından belirleyici olabilir.[10] Nitekim $CD8^+/FOXP3^+$ oranının kas invaziv olmayan mesane kanserinde (NMIUC) rekürrens için bağımsız bir belirteç olduğu gösterilmiştir.[11] Buna karşın çalışmaların çoğu tek bir belirtece ya da tek bir bölgeye odaklanmış; intratümöral ve peritümöral infiltrasyonu birlikte ele alan seri sayısı sınırlı kalmıştır.[10,11]

Radikal sistektomi materyali, bu eksikliği gidermek için elverişli bir zemin sunar: hem intratümöral (İT) hem peritümöral (PT) (invaziv marjin) alanların geniş bir yüzeyde karşılaştırılmasına, $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ hücrelerin birlikte değerlendirilerek immün dengenin bütünlüklü görülmesine olanak tanır. Bu çalışmada da radikal sistektomi uygulanan mesane ürotelyal karsinomlu olgularda intratümöral ve peritümöral TIL dağılımı ile immün fenotipin (CD4, CD8, FOXP3) klinikopatolojik özellikler ve prognozla ilişkisi araştırılmıştır.

Araştırmanın hedefleri:

- Mesanenin invaziv ürotelyal karsinomlarında TIL'lerin intratümöral ve peritümöral dağılımını değerlendirmek.
- Bu lenfositlerin immün fenotipini ($CD4^+$, $CD8^+$, $FOXP3^+$) immünohistokimyasal olarak belirlemek.
- İntratümöral ve peritümöral TIL yoğunluklarının patolojik evre, tümör derecesi ve diğer klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini incelemek.
- Alt tiplerin mikroçevredeki dağılımının prognoz ve klinik seyirle bağlantısını ortaya koymak.
- İmmün infiltrasyonun mesane kanserinde olası bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek.

Araştırmanın varsayımları:

- TIL'lerin tümör mikroçevresindeki yoğunluğu ve dağılımı prognostik anlam taşır.

- Yüksek $CD8^+$ yoğunluğu daha güçlü bir antitümör yanıtı ve buna bağlı olarak daha iyi sonuçları yansıtabilir.
- Artmış $FOXP3^+$ Treg varlığı baskılayıcı bir mikroçevreye ve daha agresif tümör davranışına işaret edebilir.
- İntratümöral ve peritümöral lokalizasyonların prognostik etkileri birbirinden farklı olabilir.
- $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ hücrelerin birlikte değerlendirilmesi, tek bir belirtece kıyasla mikroçevreyi daha doğru yansıtabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Embriyolojisi, Histolojisi ve Anatomisi

2.1.1. Mesane Embriyolojisi

Mesane gelişimi, gestasyonun 4-7. haftaları arasında kloakanın ürogenital sinüs ve anorektal kanal olmak üzere iki ayrı bölüme ayrılmasıyla başlar. Ürogenital membran, ürogenital sinüsü dış ortamdan ayırır ve bu membranın rüptürü ile birlikte mesane dış dünya ile bağlantı kurar.[12] Mesane duvarının gelişimi, endodermal kökenli epitel tabakası ile mezodermal kökenli kas ve bağ dokusu tabakalarının koordineli bir şekilde organize olmasını gerektirir.[12] İnsan fetal mesane gelişimi gestasyonun 9-10. haftasında başlar ve düz kas hücrelerinin oluşumu, fetal mesane kavitesini çevreleyen mezenkimde Hedgehog proteinleri ve bunların sinyal iletim yolakları tarafından indüklenir. Gestasyonun ilerleyen dönemlerinde mesane duvar kalınlığı, cinsiyetten bağımsız olarak lineer büyüme paternleri aracılığıyla belirgin şekilde artar ve bu süreç boyunca ürotelyal epitel, lamina propria ve muskularis propria tabakaları farklılaşarak olgun yapılarını (Şekil 1) kazanır.[12] Embriyolojik gelişim sırasında mezenkim-epitel etkileşimleri, normal mesane gelişimi için kritik öneme sahiptir ve bu etkileşimlerin bozulması konjenital anomalilere yol açabilir.[12]

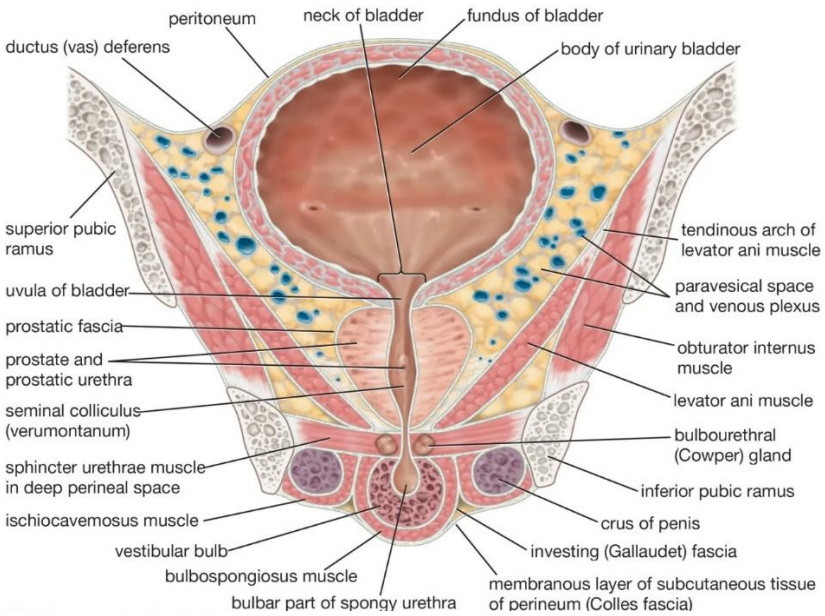


Şekil 1: Mesane duvar katmanlarının şematik kesiti ve germ tabakası kökenleri: ürotelyum (endoderm), lamina propria ve muskularis propria/detrusor (mezoderm).

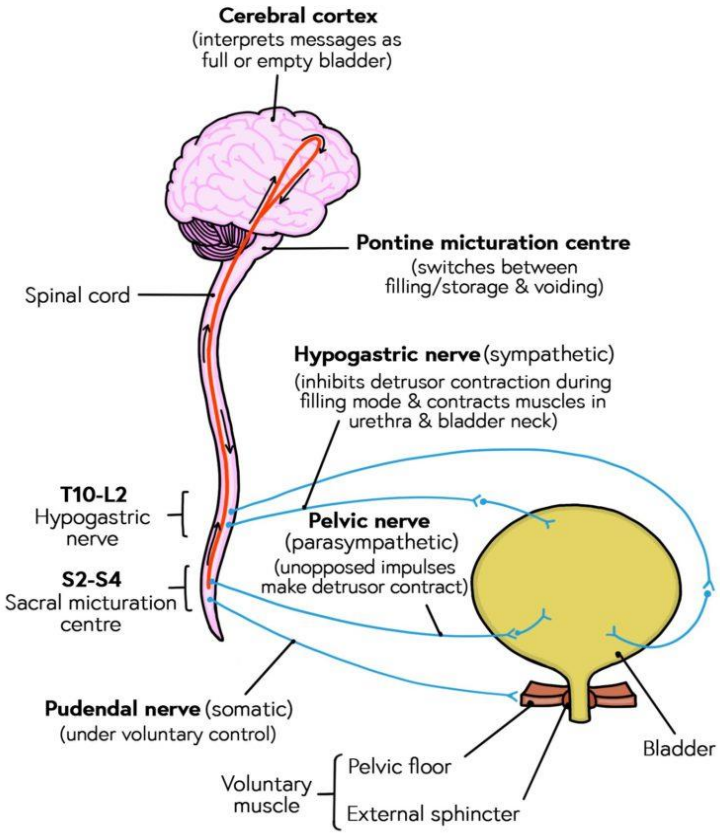
2.1.2. Mesane Anatomisi

Mesane, pelvik kavitede pubis simfizinin posteriorunda yerleşen kas yapılı bir organdır. Boş haldeyken tamamen pelvis içinde yer alırken, dolduğunda suprapubik bölgeye

doğru genişler. Mesane, superiorda periton ile örtülü (Şekil 2) olup bu bölgede seroza tabakası bulunur; inferior ve lateral yüzeyler ise periton dışı yerleşimli olup adventisya tabakası ile çevrilidir.[13] Erkeklerde mesane, anteriorda pubis simfizi ve retropubik boşluk (Retzius aralığı), posteriorda rektum ve seminal veziküller ile komşuluk gösterirken; kadınlarda posterior komşuluk uterus ve vajina ile kurulur. Mesane, lateral umbilikal ligamentler (oblitre umbilikal arterler) ve median umbilikal ligament (oblitre urakus) aracılığıyla ön karın duvarına bağlanır.[13] Mesane kan dolaşımı esas olarak internal iliak arterin dalları olan superior ve inferior vezikal arterler tarafından sağlanır. Venöz drenaj vezikal venöz pleksus aracılığıyla internal iliak vene gerçekleşir. Mesane innervasyonu, sempatik (hipogastrik sinir, T11-L2), parasempatik (pelvik sinir, S2-S4) ve somatik (pudendal sinir, S2-S4) lifler (Şekil 3) tarafından sağlanır.[14] Lenfatik drenaj, mesane duvarındaki zengin lenfatik ağdan başlayarak öncelikle obturator, internal iliak ve eksternal iliak lenf nodlarına, ardından common iliak ve paraaortik lenf nodlarına doğru ilerler; bu lenfatik drenaj paterni, invaziv mesane kanserinin evrelemesi ve tedavi planlaması açısından kritik öneme sahiptir.[13]



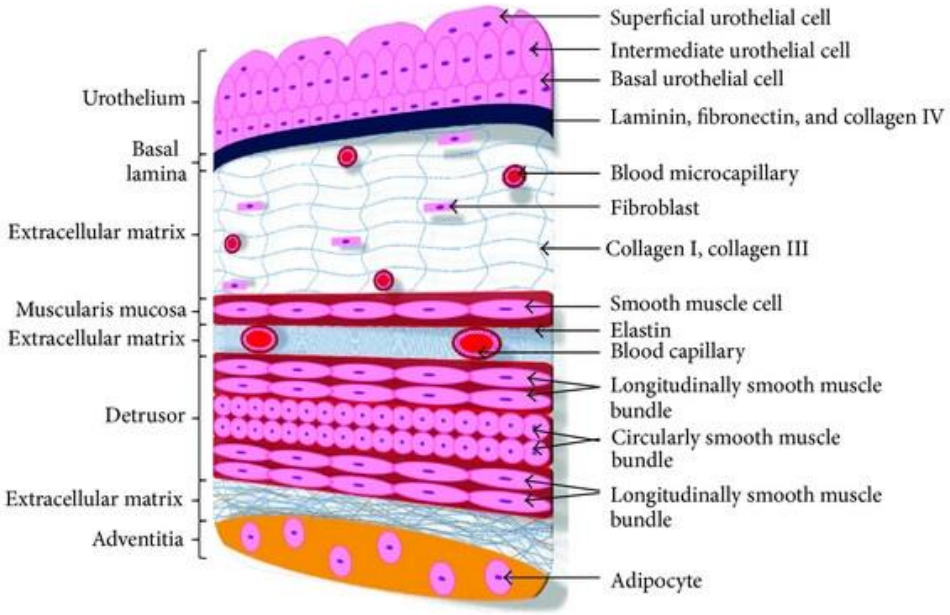
Şekil 2: Erkek mesanesi ve üretrası. [13]



Şekil 3: Mesane ve sfinkterin innervasyonu. [14]

2.1.3. Mesane Histolojisi

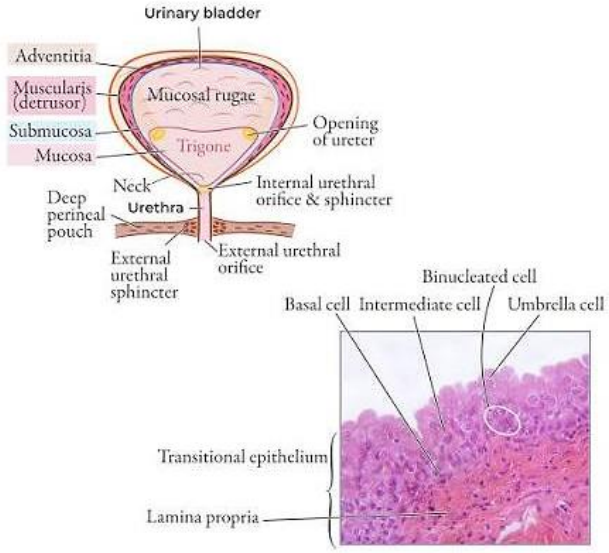
Mesane duvarı, içten dışa doğru dört ana histolojik tabakadan oluşur (Şekil 4): ürotelyal epitel (mukoza), lamina propria (submukoza), muskularis propria (detrusor kası) ve adventisya/seroza.[15] Bu tabakaların her biri, mesanenin depolama ve boşaltma fonksiyonlarında özel roller üstlenir ve histolojik organizasyonları, mesane kanserinin evrelemesi için temel oluşturur.[15] Ürotelyal epitel, idrarın toksik bileşenlerine karşı bariyer görevi görürken, lamina propria vasküler ve nöral yapıları içerir. Muskularis propria, mesane kontraksiyonundan sorumlu kalın düz kas tabakasıdır ve bu tabakanın invazyonu, kas invaziv mesane kanseri (MIUC) tanımını belirler.[15] En dış tabaka olan adventisya veya seroza, mesaneyi çevreleyen yapılardan ayırır ve bu tabakanın ötesine uzanan tümör invazyonu, ileri evre hastalığı gösterir.[15] Mesane duvarının histolojik katmanlarının doğru tanınması, özellikle transüretral rezeksiyon (TUR-M) materyallerinin patolojik değerlendirmesinde ve invazyon derinliğinin belirlenmesinde hayati önem taşır.



Şekil 4: Mesane duvar katlarının histolojisi. [15]

2.1.3.1. Epitelyum

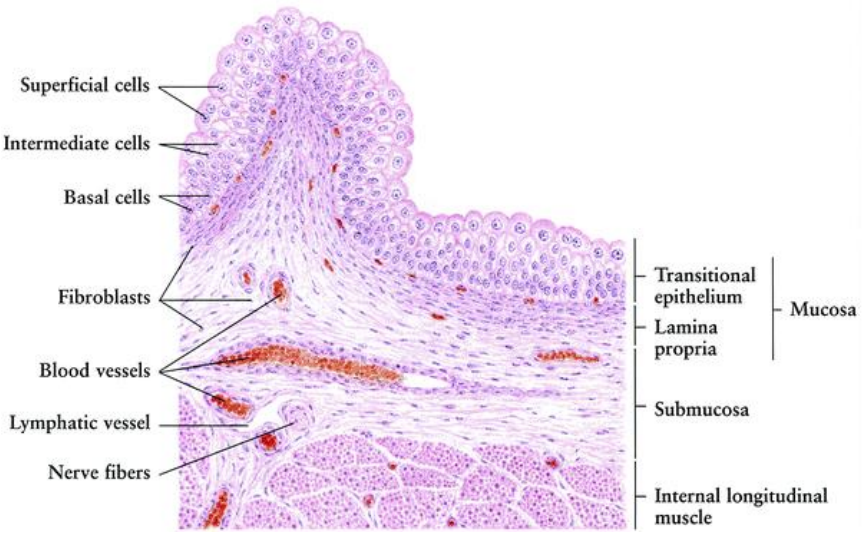
Mesane iç yüzeyini döşeyen ürotelyal epitel, geçiş epiteli (transitional epithelium) olarak da adlandırılır ve mesanenin doluluk durumuna göre 3-7 hücre tabakasından (Şekil 5**)** oluşan özelleşmiş bir epitel türüdür.[16] Ürotelyal epitel, bazalden apikale doğru üç ana hücre tipinden oluşur: bazal hücreler (küçük, kübik veya kolumnar, yüksek proliferatif kapasiteli), intermediyer hücreler (poligonal şekilli, çok katlı) ve yüzey şemsiye hücreleri (umbrella cells, geniş, poligonal, çok çekirdekli veya tek büyük çekirdekli).[16] Şemsiye hücreleri, apikal yüzeylerinde asimetrik ünit membran yapısı ve özelleşmiş uroplakin proteinleri içerir; bu yapı, idrarın toksik bileşenlerine ve yüksek ozmolaritesine karşı etkili bir geçirgenlik bariyeri oluşturur.[16] Ürotelyal hücreler, keratin 7 (KRT7), keratin 20 (KRT20), keratin 5/6 (KRT5/6), p63 ve GATA3 gibi karakteristik immünohistokimyasal belirteçler eksprese eder; bu belirteçler, ürotelyal karsinomların tanısında ve diğer epitelyal tümörlerden ayırt edilmesinde kullanılır.[16] Ürotelyal epitel, yalnızca bariyer fonksiyonu değil, aynı zamanda mekanosensör özellikler de gösterir ve mesane doluluk durumunu algılayarak afferent sinir uçlarına sinyal iletiminde rol oynar.[16] Bazal hücreler, ürotelyal epitel yenilenme ve onarımında kök hücre nişi olarak işlev görür ve bu hücrelerin disregülasyonu, ürotelyal karsinogenezin erken aşamalarında önemli rol oynar.[17]



Şekil 5: Mesane mukozası. [16]

2.1.3.2. Lamina Propria

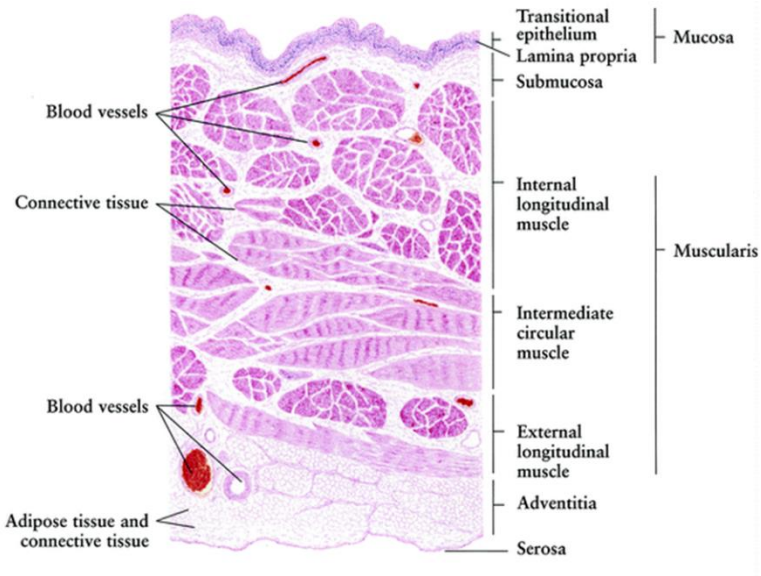
Lamina propria, ürotelyal epitelin hemen altında yer alan gevşek bağ dokusu tabakasıdır ve kan damarları, lenfatik damarlar, sinir lifleri, fibroblastlar, miyofibroblastlar ve immün hücreler (Resim 1) içerir. Bu tabaka, ürotelyal epitele beslenme ve immünolojik destek sağlar.[18] Lamina propria içinde, özellikle derin kesimlerinde, muskularis mukoza adı verilen ince, düzensiz düz kas demetleri bulunabilir; bu yapı, tüm bireylerde tutarlı olarak görülmez ve varlığı klinik evrelemede karışıklığa yol açabilir.[18] Muskularis mukozanın muskularis propria ile karıştırılması, özellikle yüzeyel TUR-M örneklerinde, tümörün yanlışlıkla kas invaziv olarak değerlendirilmesine neden olabilir.[18] Lamina propria ayrıca, Cajal benzeri interstisyel hücreler (interstitial cells of Cajal-like cells) içerir; bu hücreler, c-kit (CD117) pozitif olup mesane düz kas aktivitesinin modülasyonunda pacemaker benzeri roller üstlenebilir.[18] Klinik açıdan, lamina propria invazyonu (T1 evre), kas invaziv hastalığa progresyon riski taşıyan yüksek riskli yüzeyel mesane kanseri kategorisini tanımlar ve bu evredeki hastaların yakın takibi ve agresif tedavi stratejileri gerektirir.[18] Lamina propria içindeki vasküler ve lenfatik invazyon varlığı, prognostik açıdan olumsuz bir faktördür ve uzak metastaz riskini artırır.[18]



Resim 1: Mesane lamina propria tabakası. [18]

2.1.3.3. Muskularis Propria

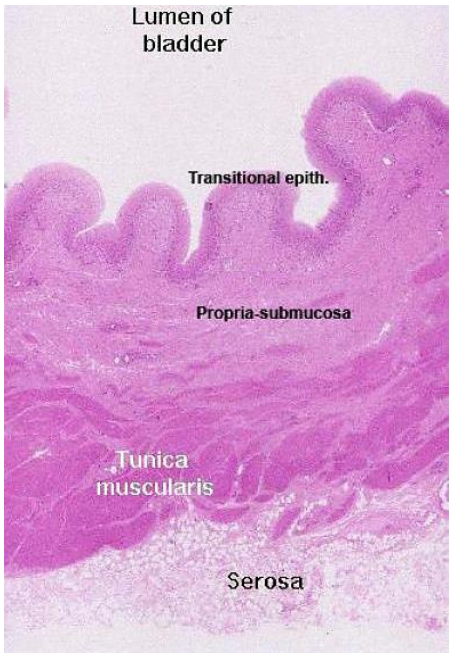
Muskularis propria (detrusor kası), mesane duvarının en kalın tabakasını oluşturur ve düz kas hücrelerinden oluşan üç ana tabakadan meydana gelir: iç longitudinal, orta sirküler ve dış longitudinal katmanlar (Resim 2). Ancak bu katmanlar, klasik gastrointestinal sistemdeki gibi keskin sınırlarla ayrılmış değildir; aksine, düz kas demetleri birbirleriyle iç içe geçmiş, spiral ve pleksiform bir organizasyon gösterir.[18] Detrusor kasının bu kompleks üç boyutlu organizasyonu, mesanenin tüm yönlerde eşit ve etkili bir şekilde kasılmasını sağlar ve idrar boşaltımı sırasında mesane çıkımının açılmasına katkıda bulunur.[18] Düz kas demetleri arasında, kollajen ve elastik liflerden oluşan bağ dokusu matriks bulunur; bu matriks, mesanenin elastikiyetini ve dolum sırasında genişleme kapasitesini destekler.[18] Muskularis propria tabakasının tümör tarafından invazyonu, mesane kanserinin kas invaziv (T2 evre) olarak sınıflandırılmasını belirler ve bu durum, radikal sistektomi veya radyoterapi gibi agresif tedavi modalitelerinin endikasyonunu oluşturur.[18] Detrusor kasının histolojik olarak doğru tanınması, özellikle TUR-M materyallerinde, muskularis mukoza ile karışıklığı önlemek ve doğru evreleme yapmak için kritik öneme sahiptir.[1]



Resim 2: Mesane kas tabakası. [18]

2.1.3.4. Adventisya/Seroza

Mesane duvarının en dış tabakası, mesanenin anatomik lokalizasyonuna bağlı olarak adventisya veya seroza olarak adlandırılır. Mesanenin periton ile örtülü olmayan inferior ve lateral yüzeylerinde adventisya tabakası bulunur; bu tabaka, gevşek bağ dokusu ve değişen miktarlarda adipoz dokudan oluşur.[19] Mesanenin superior yüzeyi ise periton ile örtülüdür ve bu bölgede seroza tabakası mevcuttur; seroza, mezotel hücreleri ile döşeli ince bir membrandır (Resim 3).[19] Adventisyal ve perivesikal yağ dokusu, mesaneyi çevreleyen pelvik organlardan ayırır ve mesane hareketliliğine olanak tanır. Klinik ve patolojik açıdan, tümörün muskularis propria tabakasını aşarak perivesikal yağ dokusuna (adventisya) invaze olması, T3 evre hastalığı tanımlar ve bu durum, kötü prognoz ile ilişkilidir.[1] T3 evre, tümörün perivesikal yağ dokusuna mikroskopik (T3a) veya makroskopik (T3b) invazyonuna göre alt gruplara ayrılabilir; makroskopik ekstravesikal kitle varlığı (T3b), daha kötü prognoz göstergesidir.[1] Tümörün komşu organları (prostat, uterus, vajina, pelvik duvar, abdominal duvar) direkt invaze etmesi veya peritoneal yüzeye uzanması, T4 evre hastalığı olarak sınıflandırılır ve bu durum, en ileri lokal evre hastalığı temsil eder.[1] Adventisya/seroza tabakasının histolojik değerlendirmesi, özellikle radikal sistektomi spesimenlerinde, doğru patolojik evreleme ve cerrahi sınır değerlendirmesi için esansiyeldir.[1]



Resim 3: Mesane serozası. [19]

2.2. Mesane Tümörleri

2.2.1. Epidemiyoloji

Mesane kanseri üriner sistemin en sık görülen tümörü ve dünyada en sık tanı konan dokuzuncu kanserdir; 2022'de tahmini 614.298 yeni vaka ve 220.596 ölüme yol açmıştır.[2] Yükün yaklaşık dörtte üçü (%75) erkeklerde görülür ve bu baskınlık tüm bölgelerde korunur. Beş yıllık sağkalım ABD'de %80 iken gelişmekte olan ülkelerde %40'ın altına iner.[2]

İnsidans coğrafyaya göre belirgin değişir: yaşa standardize hızlar (ASR, /100.000) en yüksek Avrupa'dadır (Güney Avrupa erkeklerde 28,7; Kuzey Avrupa 20,4), bunu Kuzey Amerika (18,0), Kuzey Afrika (16,3) ve Batı Asya (15,2) izler.[2] Türkiye, erkeklerde 22,6'lık ASR ve 6,6'lık erkek/kadın oranıyla dünyanın en yüksek değerleri arasındadır.[20] En sık histolojik tipler ürotelyal ve skuamöz hücreli karsinomdur. Birçok yüksek gelirli ülkede insidans ve mortalite gerilemektedir; bu eğilim kısmen tanı-tedavideki ilerlemeleri yansıtsa da kanser kayıt uygulamalarındaki farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır.[2] Klinik olarak hastalık kas invaziv olmayan (NMIUC) ve kas invaziv olmak üzere ikiye ayrılır.[21] Olguların yaklaşık %80'ini oluşturan NMIUC tedaviye yanıt verse de yüksek nüksle seyreder; MIUC'ye ilerlediğinde tedavi etkinliği sınırlanır ve prognoz kötüleşir.[21]

Türkiye'de mesane kanseri erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektal kanserlerin ardından dördüncü sıradadır.[20]

2.2.2. Etiyoloji ve Risk faktörleri

Mesane kanserinin etiyolojisinde çevresel, mesleki ve genetik faktörler rol oynamaktadır. Tütün kullanımı, mesane kanseri için en önemli risk faktörü olup, vakaların %50'sinden fazlasından sorumludur (

Tablo 1).[22-24] Sigara içenlerde mesane kanseri riski, içmeyenlere göre 2-4 kat artmıştır ve risk, günlük tüketilen sigara sayısı ve içme süresi ile doğru orantılıdır. Sigarayı bıraktıktan sonra risk azalmakla birlikte, tamamen ortadan kalkmamaktadır.[22-24]

Mesleki karsinojen maruziyeti, özellikle aromatik aminler (benzidin, β-naftilamın, 4-aminobifenil) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAH) uzun süreli maruziyet, mesane kanseri riskini önemli ölçüde artırmaktadır.[22-24] Boya, kauçuk, deri, tekstil, baskı ve petrokimya endüstrilerinde çalışanlar yüksek risk grubundadır.[22-24] Kronik mesane irritasyonu ve enflamasyonu da risk faktörü olarak kabul edilmektedir; özellikle *Schistosoma haematobium* enfeksiyonu, endemik bölgelerde skuamöz hücreli karsinoma yol açabilmektedir. Arsenik kontamine içme suyu, bazı coğrafi bölgelerde mesane kanseri insidansını artırmaktadır. [22-24]

Farmakolojik ajanlar arasında, siklofosfamid ve ifosfamid gibi alkilleyici kemoterapötik ilaçlar, mesane kanserine yatkınlık yaratmaktadır. Fenasetin içeren analjezikler de geçmişte mesane kanseri ile ilişkilendirilmiştir. [22-24] Pelvik radyoterapi öyküsü olan hastalarda da mesane kanseri riski artmıştır. Genetik yatkınlık açısından, ailesel mesane kanseri öyküsü, özellikle birinci derece akrabalarda hastalık varlığı, riski 2 kat artırmaktadır. [22-24]

Tablo 1: Mesane Kanserinde Risk Faktörleri ve Göreceli Riskler.

Risk Faktörü	Göreceli Risk	Açıklama
Tütün Kullanımı	2-4 kat	Vakaların %50'sinden sorumlu, doza bağımlı
Mesleki Maruziyet		
- Aromatik aminler	2-5 kat	Benzidin, β-naftilamın, 4-aminobifenil

- Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	1.5-3 kat	Boya, kauçuk, deri, tekstil endüstrileri
Kronik Enfeksiyon		
- *Schistosoma haematobium*	3-5 kat	Endemik bölgelerde, skuamöz hücreli karsinom
Kimyasal Maruziyet		
- Arsenik (içme suyu)	2-3 kat	Coğrafi varyasyon
İlaçlar		
- Siklofosfamid	2-4 kat	Kümülatif doza bağımlı
- Fenasetin	2-3 kat	Kronik kullanım
Radyoterapi	2-4 kat	Pelvik radyasyon öyküsü
Genetik Faktörler		
- Ailesel öykü	2 kat	Birinci derece akraba
- NAT2, GST polimorfizmleri	Değişken	Karsinojen metabolizması
Kronik Mesane İrritasyonu	1.5-2 kat	Kronik sistit, taşlar, kateter

2.2.3. Makroskopik Özellikler

Mesane tümörlerinin makroskopik görünümü, tümörün biyolojik davranışı ve prognozu hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ürotelyal karsinomlar, papiller veya düz (flat/sesil) olmak üzere iki ana morfolojik patern göstermektedir.[25] Papiller lezyonlar, mesane lümenine doğru ekzofitik büyüme gösteren, karnıbahar benzeri görünümde, yumuşak kıvamlı tümörlerdir ve genellikle düşük dereceli, kas invaziv olmayan tümörleri temsil etmektedir.[25] Bu lezyonlar genellikle ince bir sap ile mesane duvarına tutunmaktadır ve boyutları birkaç milimetreden birkaç santimetreye kadar değişebilmektedir.[25]

Düz veya sesil lezyonlar, mesane mukozasında plak benzeri kalınlaşma veya nodüler kitleler şeklinde izlenmekte olup, genellikle yüksek dereceli ve kas invaziv tümörleri temsil etmektedir.[25] Karsinoma in situ (CIS), makroskopik olarak normal görünebilir veya hafif eritemli, kadifemsi bir mukoza değişikliği şeklinde kendini gösterebilir.[25] Endofitik büyüme paterni gösteren tümörler, mesane duvarına invazyon göstermekte ve daha agresif klinik seyir izlemektedir.[25]

Tümörlerin rengi genellikle pembe-kırmızıdan gri-beyaza kadar değişmekte olup, nekroz alanları sarı-kahverengi görünüm alabilmektedir.[25] Yüzey özellikleri açısından, düşük dereceli papiller tümörler düzgün, kadifemsi bir yüzeye sahipken, yüksek dereceli tümörler düzensiz, ülsere ve nekrotik alanlar içerebilmektedir.[25] Tümörlerin mesane içindeki lokalizasyonu prognostik öneme sahiptir; lateral duvarlar ve trigon en sık tutulum bölgeleridir.[25] Multifokalite, mesane kanserinin karakteristik bir özelliği olup, vakaların

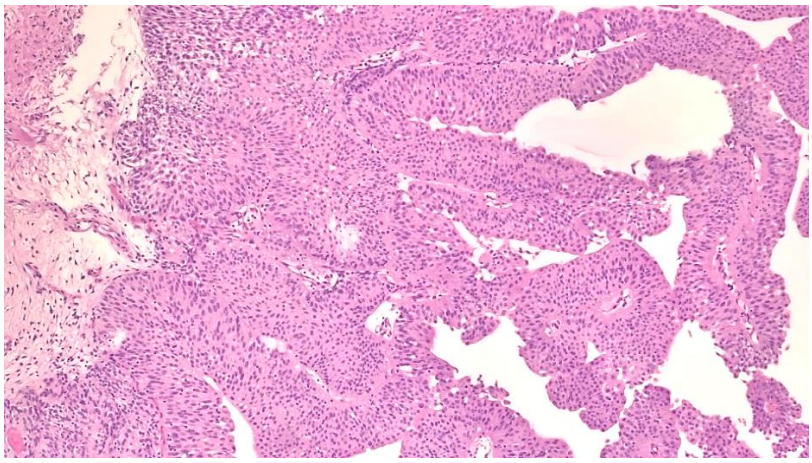
%30-40'ında eş zamanlı birden fazla tümör odağı izlenmektedir.[25] Multifokal tümörler, tek odaklı tümörlere göre daha yüksek nüks ve progresyon riski taşımaktadır.[25]

2.2.4. Mikroskopik Özellikler ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Sınıflaması

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization [WHO], DSÖ) tarafından 2022 yılında yayınlanan 5. baskı Üriner ve Erkek Genital Sistem Tümörleri Sınıflaması, ürotelyal neoplazilerin tanı ve derecelendirilmesinde güncel standartları belirlemektedir.[1] Bu sınıflama, 2016 yılındaki 4. baskının temel prensiplerini korumakla birlikte, moleküler ve prognostik verilere dayalı güncellemeler içermektedir.[26] DSÖ 2022 sınıflaması[1], ürotelyal neoplazileri benign lezyonlardan invaziv karsinoma kadar geniş bir spektrumda kategorize etmektedir (Tablo 2).

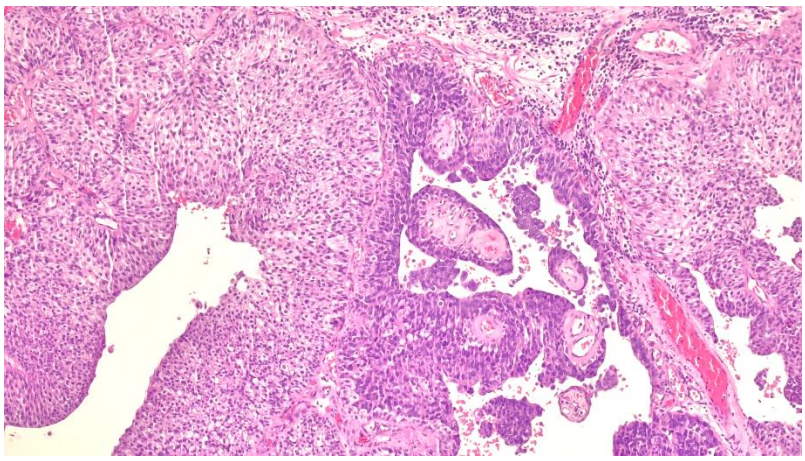
Papiller ürotelyal neoplaziler, sitolojik ve mimari özelliklerine göre derecelendirilmektedir. **Ürotelyal papillom**, normal ürotelyal hücrelerden oluşan, ince fibrovasküler kor etrafında düzenli papiller yapılar gösteren benign bir lezyondur.[1] **Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi (PUNLMP)**, normal ürotelden daha kalın epitele sahip olmakla birlikte, minimal sitolojik atipi ve korunmuş polarite göstermektedir.[1] PUNLMP, invazyon potansiyeli çok düşük olmakla birlikte, nüks edebilmektedir.

Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (LGPUC), hafif-orta derecede sitolojik atipi, nükleer pleomorfizm ve artmış mitotik aktivite göstermektedir.[1] Mimari düzen büyük ölçüde korunmuş olup, papiller yapılar belirgindir (Resim 4). Nükleer polarite kısmen kaybolmuştur ve kromatin artışı izlenmektedir. Düşük dereceli tümörler, yüksek nüks oranına (%50-70) sahip olmakla birlikte, progresyon riski düşüktür (%10-15).[1]



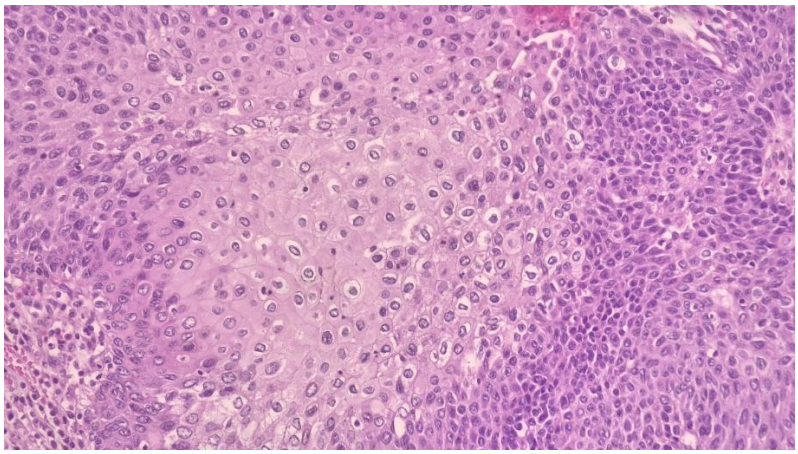
Resim 4: Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (H&E 200).

Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom (HGPUC) belirgin sitolojik atipi, nükleer pleomorfizm, artmış nükleer/sitoplazma oranı ve sık mitotik figürler ile karakterizedir.[1] Mimari düzen bozulmuş olup, papiller yapılar düzensizdir ve füzyon gösterebilmektedir.[1] Nükleer polarite kaybolmuştur, kromatin kaba ve düzensizdir, belirgin nükleol izlenmektedir (Resim 5).



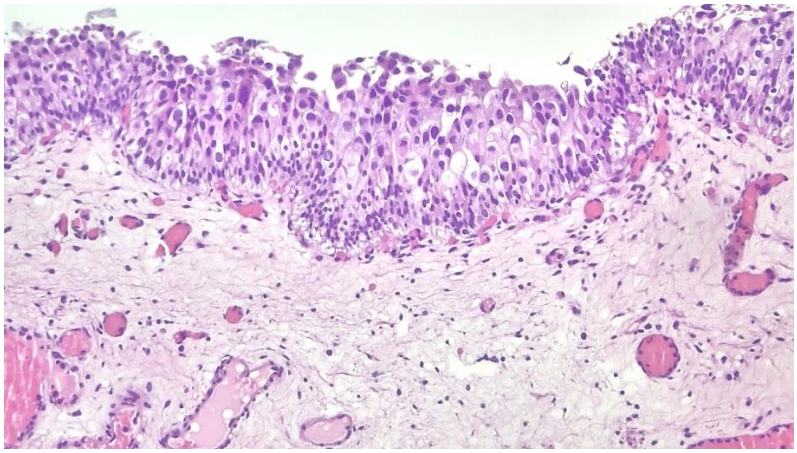
Resim 5: Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomda belirgin nükleer pleomorfizm (H&E 200).

Yüksek dereceli tümörler, hem yüksek nüks (%70-80) hem de yüksek progresyon riskine (%30-50) sahiptir[1] ve kas invaziv hastalığa ilerleyebilmektedir (Resim 6).[7]



Resim 6: Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomda skuamöz diferansiyasyon (H&E 400).

Karsinoma in situ, düz ürotelyal mukozada izlenen, yüksek dereceli sitolojik atipiye sahip, invaziv olmayan bir lezyondur.[1] CIS hücreleri, belirgin nükleer pleomorfizm, artmış nükleer/sitoplazma oranı ve sık mitoz göstermektedir (Resim 7). CIS, agresif bir lezyon olup, tedavi edilmediğinde vakaların %50-75'inde kas invaziv hastalığa progresyon göstermektedir.[1] CIS, primer (izole), sekonder (papiller tümör ile birlikte) veya konkomiton (invaziv karsinom ile birlikte) olarak sınıflandırılabilmektedir.



Resim 7: Ürotelyal Karsinoma in situ.

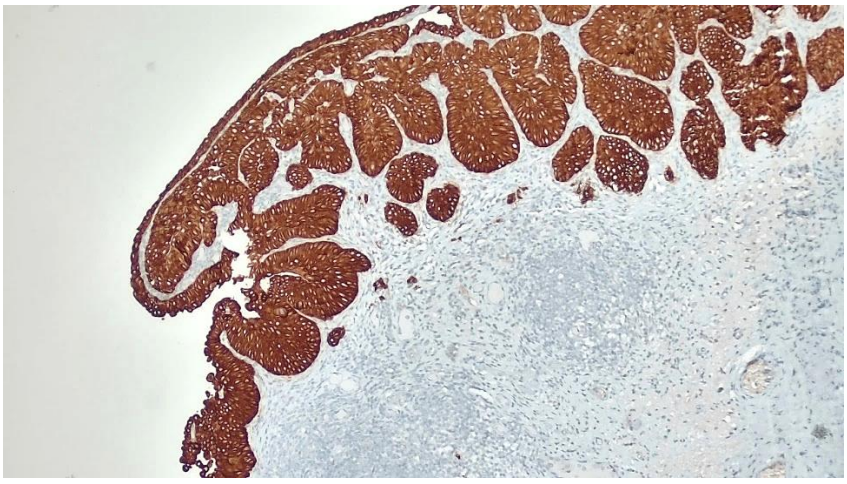
Tablo 2: WHO 2022 Ürotelyal Neoplaziler Sınıflaması ve Özellikleri

Kategori	Sitolojik Özellikler	Mimari Özellikler	Nüks Riski	Progresyon Riski
Ürotelyal Papillom	Normal ürotelyal hücreler	İnce fibrovasküler kor, düzenli papiller yapı	Minimal	Yok

PUNLMP	Minimal atipi, korunmuş polarite	Kalınlaşmış epitel, düzenli papiller yapı	%25-35	%5
Düşük Dereceli Karsinom	Hafif-orta atipi, artmış mitoz	Korunmuş mimari, düzenli papiller yapı	%50-70	%10-15
Yüksek Dereceli Karsinom	Belirgin atipi, pleomorfizm, sık mitoz	Bozulmuş mimari, düzensiz papiller yapı	%70-80	%30-50
Karsinoma in Situ (CIS)	Yüksek dereceli atipi, pleomorfizm	Düz mukoza, invazyon yok	%80-90	%50-75

2.2.5. İmmünohistokimya

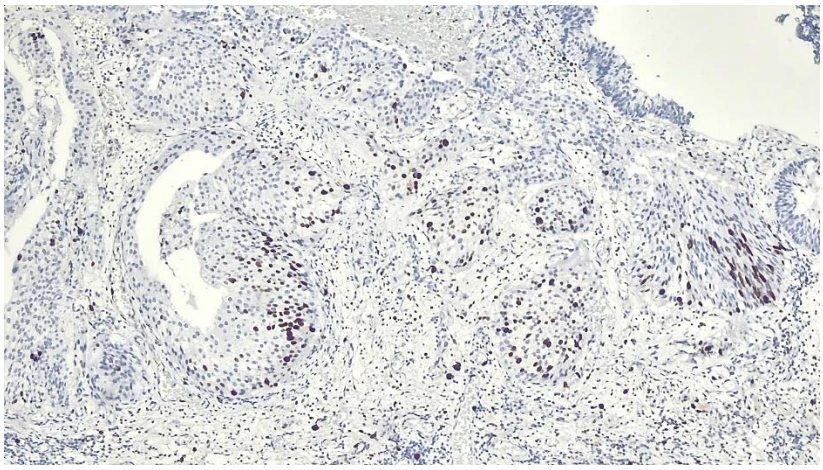
İmmünohistokimyasal (IHK) belirteçler, mesane tümörlerinin tanısında, ürotelyal diferansiyasyonun doğrulanmasında, ayırıcı tanıda ve prognostik değerlendirmede önemli rol oynamaktadır.[27-29] KRT7 ve KRT20, ürotelyal karsinomların tanısında en sık kullanılan belirteçlerdir. KRT7, ürotelyal karsinomların %90-100'ünde pozitif boyanma gösterirken, KRT20 tipik olarak üst ürotelyal tabakalarda "şemsiye hücre" paterni ile pozitiftir (%60-80). KRT7+/KRT20+ profili, ürotelyal orijini desteklemektedir. [27-29]



Resim 8: İnvaziv ürotelyal karsinomda keratin 7 boyanma paterni.

p63, ürotelyal diferansiyasyonun güçlü bir belirteci olup, ürotelyal karsinomların %80-90'ında nükleer pozitiflik göstermektedir. GATA3, ürotelyal karsinomlar için yüksek sensitivite (%80-95) ve spesifite gösteren bir transkripsiyon faktörüdür ve özellikle metastatik tümörlerin primer orijininin belirlenmesinde değerlidir. [27-29] Uroplakin II ve Uroplakin III, ürotelyal diferansiyasyona özgü membran proteinleri olup, ürotelyal karsinomların %60-70'inde pozitiftir; ancak sensitiviteleri düşük dereceli tümörlerde daha yüksektir. [27-29]

S100P, ürotelyal karsinomların %80-90'ında pozitif boyanma gösteren bir kalsiyum bağlayıcı proteindir ve ayırıcı tanıda yardımcıdır. [27-29] CD44, bir hücre yüzey glikoproteini olup, ekspresyonu, tümör progresyonu ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. [27-29] Ki-67, proliferasyon indeksini gösteren bir nükleer antijen olup, yüksek Ki-67 indeksi (%20'nin üzeri) yüksek dereceli tümörler ve kötü prognoz ile korele olmaktadır. [27-29]



Resim 9: Düşük dereceli non invaziv ürotelyal karsinomda Ki67 boyanma paterni.

p53, TP53 gen mutasyonlarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır; aşırı ekspresyon (diffüz güçlü nükleer boyanma) veya tam kayıp (null pattern), TP53 mutasyonunu düşündürmekte ve yüksek dereceli, kas invaziv tümörler ile ilişkili olmaktadır. [27-29] p53 aşırı ekspresyonu, kötü prognoz ve yüksek progresyon riski ile korele bulunmuştur. CIS tanısında KRT20 (bazal hücrelerde pozitiflik), CD44 (ekspresyon kaybı) ve p53 (aşırı ekspresyon) kombinasyonu yüksek tanısal değere sahiptir. [27-29]

Ayırıcı tanıda, ürotelyal karsinomun prostat adenokarsinomundan ayırt edilmesinde PSA ve PSAP (prostat için pozitif), kolorektal adenokarsinomdan ayırt edilmesinde CDX2 ve KRT7 (kolorektal için CDX2+/KRT7-), renal hücreli karsinomdan ayırt edilmesinde PAX8 belirteçleri kullanılmaktadır. [27-29]

2.2.6. Moleküler Patoloji ve Genetik

Mesane kanserinin moleküler patogenezi, iki ana yolak üzerinden gelişmektedir: düşük dereceli, kas invaziv olmayan yolak ve yüksek dereceli, kas invaziv yolak.[17,30] Bu "iki

yolak modeli", farklı moleküler değişikliklerin farklı klinik fenotiplere yol açtığını göstermektedir (Tablo 3).

Düşük dereceli, kas invaziv olmayan yolak, erken dönemde fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (fibroblast growth factor receptor 3 [**FGFR3]**) gen mutasyonları ile karakterizedir. [17,30] FGFR3 mutasyonları, düşük dereceli papiller tümörlerin %70-80'inde, Ta evre tümörlerin %60-70'inde saptanmaktadır.[17,30] Bu mutasyonlar, RAS-MAPK ve PI3K-AKT sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açarak hücre proliferasyonunu artırmaktadır. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (**PIK3CA**) mutasyonları da bu yolakta sık görülmekte (%15-25) ve FGFR3 mutasyonları ile birlikte bulunabilmektedir. [17,30] **RAS** gen ailesi mutasyonları (HRAS, KRAS, NRAS), düşük dereceli tümörlerin %10-15'inde izlenmektedir.[17,30] Bu yolaktaki tümörler, yüksek nüks oranına rağmen düşük progresyon riski göstermektedir.

Yüksek dereceli, kas invaziv yolak, tumor protein p53 (**TP53)** ve retinoblastoma 1 (**RB1)** tümör süpresör genlerindeki inaktivasyonlar ile karakterizedir. [17,30] TP53 mutasyonları, yüksek dereceli tümörlerin %50-60'ında, kas invaziv tümörlerin %60-70'inde saptanmaktadır.[9] RB1 inaktivasyonu, kas invaziv tümörlerin %30-40'ında izlenmektedir.[17,30] cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (**CDKN2A**) gen delesyonları veya mutasyonları, yüksek dereceli tümörlerin %40-50'sinde bulunmakta ve hücre siklusu kontrolünün kaybına yol açmaktadır. [17,30] **ERBB2** (HER2) gen amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, kas invaziv tümörlerin %10-15'inde saptanmakta ve kötü prognoz ile ilişkili olmaktadır. [17,30]

The Cancer Genome Atlas (TCGA) ve Consensus 2020 çalışmaları, kas invaziv mesane kanserlerini moleküler alt tiplere ayırmıştır: **luminal**, **bazal** ve **nöronal** alt tipler. [17] **Luminal alt tip** (%40-50), FGFR3 mutasyonları, ürotelyal diferansiyasyon belirteçleri (GATA3, uroplakin, KRT20) ekspresyonu ve daha iyi prognoz ile karakterizedir. [17,30] **Bazal alt tip** (%30-40), bazal/skuamöz diferansiyasyon belirteçleri (CK5/6, CK14, CD44, EGFR) ekspresyonu, TP53 ve RB1 mutasyonları, yüksek proliferasyon oranı ve kötü prognoz ile ilişkilidir. [17,30] **Nöronal alt tip** (%10-15), nöroendokrin diferansiyasyon belirteçleri ekspresyonu göstermektedir. [17,30] Bu moleküler sınıflandırma, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır; örneğin, FGFR3 mutasyonu

taşıyan tümörlerde FGFR inhibitörleri, bazal alt tipte immünoterapi daha etkili olabilmektedir. [17,30]

Tablo 3: Mesane Kanserinde Moleküler Yolaklar ve Genetik Değişiklikler

Yolak/Alt Tip	Başlıca Genetik Değişiklikler	Frekans	Klinik Özellikler
Düşük Dereceli Yolak			
- FGFR3 mutasyonları	RAS-MAPK aktivasyonu	%70-80 (Ta/düşük derece)	Yüksek nüks, düşük progresyon
- PIK3CA mutasyonları	PI3K-AKT aktivasyonu	%15-25	FGFR3 ile birlikte olabilir
- RAS mutasyonları	MAPK aktivasyonu	%10-15	Düşük dereceli tümörler
Yüksek Dereceli Yolak			
- TP53 mutasyonları	Hücre siklusu kontrolü kaybı	%50-70 (kas invaziv)	Yüksek progresyon, kötü prognoz
- RB1 inaktivasyonu	Hücre siklusu kontrolü kaybı	%30-40 (kas invaziv)	Agresif davranış
- CDKN2A delesyonu	Hücre siklusu kontrolü kaybı	%40-50	Yüksek dereceli tümörler
- ERBB2 amplifikasyonu	Tirozin kinaz aktivasyonu	%10-15 (kas invaziv)	Kötü prognoz, tedavi hedefi
Moleküler Alt Tipler (TCGA/Consensus)			
- Luminal	FGFR3 mut., GATA3+, CK20+	%40-50	Daha iyi prognoz, FGFR inhibitörü
- Bazal	TP53/RB1 mut., CK5/6+, EGFR+	%30-40	Kötü prognoz, immünoterapi
- Nöronal	Nöroendokrin belirteçler	%10-15	Değişken prognoz

2.2.7. Evreleme

Mesane kanserinin evrelemesi, tedavi planlaması ve prognoz tayininde kritik öneme sahiptir. American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union for International Cancer Control (UICC) tarafından geliştirilen TNM sınıflaması, 8. baskısı ile güncel standartları belirlemektedir.[1,31,32] TNM sistemi, primer tümörün lokal yayılım derinliğini (T) (Tablo 4), bölgesel lenf nodu tutulumunu (N) ve uzak metastaz varlığını (M) değerlendirerek (Tablo 5), hastalığın anatomik yaygınlığını objektif olarak tanımlamaktadır. Doğru evreleme, kas invaziv olmayan hastalık (Ta, Tis, T1) ile kas invaziv hastalık (T2-T4) arasındaki ayrımı sağlayarak, radikal sistektomi, mesane koruyucu tedavi veya sistemik kemoterapi gibi tedavi modalitelerinin seçimini yönlendirmektedir. [1,31,32]

2.2.7.1 T Komponenti

T komponenti, primer tümörün mesane duvarı katmanlarına invazyon derinliğini tanımlamaktadır ve en önemli prognostik faktördür. [1,31,32] Mesane duvarı, içten dışa doğru ürotelyal mukoza, lamina propria, muskularis propria (detrusor kası), perivesikal yağ dokusu ve serozadan oluşmaktadır.

Ta: Noninvaziv papiller karsinom. Tümör, lamina propriaya invazyon göstermeksizin ürotelyal mukoza ile sınırlıdır. Ta tümörler, genellikle düşük dereceli olup, TUR ile tedavi edilmektedir. Beş yıllık sağkalım oranı %95'in üzerindedir. [1,31,32]

Tis: Karsinoma in situ. Düz, yüksek dereceli, noninvaziv ürotelyal karsinom. CIS, agresif biyolojik davranış göstermekte ve tedavi edilmediğinde yüksek oranda (%50-75) kas invaziv hastalığa progresyon riski taşımaktadır. [1,31,32]

T1: Tümör, lamina propriaya invazyon göstermekte ancak muskularis propriaya ulaşmamaktadır. T1 tümörler, yüksek dereceli olma eğilimindedir ve progresyon riski (%30-50) nedeniyle yakın takip veya erken sistektomi gerektirebilmektedir. [1,31,32]

T2: Tümör, muskularis propriaya (detrusor kası) invazyon göstermektedir. T2a, muskularis proprianın iç yarısına (yüzeyel kas) invazyon; T2b, muskularis proprianın dış yarısına (derin kas) invazyon olarak tanımlanmaktadır. T2 hastalık, kas invaziv hastalığın başlangıcını temsil etmekte ve radikal sistektomi endikasyonu oluşturmaktadır. Beş yıllık sağkalım oranı %60-70'dir. [1,31,32]

T3: Tümör, perivesikal yağ dokusuna invazyon göstermektedir. T3a, mikroskopik perivesikal invazyon; T3b, makroskopik perivesikal kitle (ekstravesikal kitle) olarak tanımlanmaktadır. T3 hastalık, lokal ileri evre hastalığı temsil etmekte ve neoadjuvan kemoterapi sonrası radikal sistektomi önerilmektedir. Beş yıllık sağkalım oranı %40-50'dir. [1,31,32]

T4: Tümör, komşu organlara invazyon göstermektedir. T4a, prostat stroması, seminal vezikül, uterus veya vajinaya invazyon; T4b, pelvik duvar veya abdominal duvara on olarak tanımlanmaktadır. T4b hastalık, genellikle rezektabl olmayan hastalığı temsil etmekte ve palyatif tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. Beş yıllık sağkalım oranı %20'nin altındadır. [1,31,32]

Tablo 4: Mesane Kanseri TNM Sınıflaması - T Komponenti (AJCC 8. Baskı)

T Evresi	Tanım	İnvazyon Derinliği	5 Yıllık Sağkalım
Ta	Noninvaziv papiller karsinom	Mukoza ile sınırlı	>%95
Tis	Karsinoma in situ (CIS)	Düz, yüksek dereceli, noninvaziv	Değişken (tedaviye bağlı)
T1	Lamina propria invazyonu	Submukoza, kas invazyonu yok	%80-85
T2	Muskularis propria invazyonu	Detrusor kası	%60-70
- T2a	Yüzeyel kas invazyonu	İç yarı	%65-75
- T2b	Derin kas invazyonu	Dış yarı	%50-60
T3	Perivesikal yağ dokusu invazyonu	Ekstravesikal yayılım	%40-50
- T3a	Mikroskopik invazyon	Mikroskopik	%45-55
- T3b	Makroskopik invazyon	Makroskopik kitle	%30-40
T4	Komşu organ invazyonu	İleri lokal yayılım	<%20
- T4a	Prostat/uterus/vajina invazyonu	Pelvik organlar	%15-25
- T4b	Pelvik/abdominal duvar invazyonu	Duvar invazyonu	<%10

2.2.7.2 N Komponenti

N komponenti, bölgesel lenf nodu metastazlarını tanımlamaktadır ve mesane kanserinde önemli bir prognostik faktördür. Mesane kanseri için bölgesel lenf nodları, gerçek pelvik lenf nodlarını (hipogastrik, obturatör, eksternal iliak, presakral ve sakral lenf nodları) ve common iliak lenf nodlarını içermektedir. [1,31,32] Bu sınırların dışındaki lenf nodu tutulumları (örneğin, paraaortik lenf nodları) uzak metastaz (M1a) olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 5).

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur. Radikal sistektomi ile birlikte pelvik lenf nodu diseksiyonu (PLND) yapılan hastalarda, çıkarılan lenf nodu sayısı prognostik öneme sahiptir; en az 10-15 lenf nodunun çıkarılması önerilmektedir.

N1: Tek bölgesel lenf nodunda metastaz vardır. N1 hastalıkta, adjuvan kemoterapi veya immünoterapi düşünülmelidir. Beş yıllık sağkalım oranı %30-40'tır. [1,31,32]

N2: İki veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz vardır. N2 hastalık, daha kötü prognoz ile ilişkili olup, multimodal tedavi yaklaşımları gerekmektedir. Beş yıllık sağkalım oranı %20-30'dur. [1,31,32]

N3: Common iliak lenf nodlarında metastaz vardır. N3 hastalık, en ileri bölgesel lenf nodu tutulumunu temsil etmekte ve prognoz kötüdür. Beş yıllık sağkalım oranı %10-20'dir. [1,31,32]

Lenf nodu metastazı varlığı, mesane kanserinde en önemli prognostik faktörlerden biridir ve sağkalımı önemli ölçüde azaltmaktadır. [1,31,32] Lenf nodu pozitif hastalarda, sistektomi sonrası adjuvan kemoterapi sağkalım avantajı sağlayabilmektedir.

2.2.7.3. M Komponenti

M komponenti, uzak metastaz varlığını tanımlamaktadır ve mesane kanserinde en kötü prognostik faktördür. Metastatik mesane kanseri, genellikle palyatif tedavi yaklaşımları ile yönetilmektedir. [1,31,32]

M0: Uzak metastaz yoktur. Lokal veya lokal ileri hastalık, küratif tedavi yaklaşımlarına adaydır.

M1: Uzak metastaz vardır. M1 hastalık, iki alt kategoriye ayrılmaktadır:

M1a: Bölgesel lenf nodları dışındaki lenf nodlarında metastaz (örneğin, paraaortik, supraklaviküler, mediastinal lenf nodları). M1a hastalık, sınırlı metastatik yayılımı temsil etmekte ve agresif multimodal tedavi ile bazı hastalarda uzun süreli kontrol sağlanabilmektedir.

M1b: Diğer uzak organ metastazları (akciğer, karaciğer, kemik, beyin vb.). Mesane kanserinde en sık metastaz bölgeleri akciğer (%40-50), karaciğer (%30-40), kemik (%25-35) ve beyin (%5-10)'dir. [1,31,32] M1b hastalık, yaygın metastatik hastalığı temsil etmekte ve medyan sağkalım 12-15 ay civarındadır (Tablo 5).

Metastatik mesane kanserinde, platin bazlı kemoterapi (gemcitabin-cisplatin veya MVAC [Metotreksat, Vinblastin, Adriamisin, Sisplatin]) birinci basamak tedavi olarak kullanılmaktadır. [1,31,32] Son yıllarda, immün kontrol noktası inhibitörleri (pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab) ve FGFR inhibitörleri (erdafitinib), metastatik hastalıkta önemli tedavi seçenekleri olarak ortaya çıkmıştır. [1,31,32] Ancak, metastatik hastalıkta prognoz genel olarak kötü olup, 5 yıllık sağkalım oranı %5-10'dur. [1,31,32]

Tablo 5: Mesane Kanseri TNM Sınıflaması - N ve M Komponentleri (AJCC 8. Baskı)

Evre	Tanım	Tutulum Bölgesi	5 Yıllık Sağkalım
N Komponenti			
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok	-	T evresine bağlı
N1	Tek bölgesel lenf nodu metastazı	Hipogastrik, obturatör, eksternal iliak, presakral, sakral	%30-40
N2	Çoklu bölgesel lenf nodu metastazı	İki veya daha fazla bölgesel lenf nodu	%20-30
N3	Common iliak lenf nodu metastazı	Common iliak lenf nodları	%10-20
M Komponenti			
M0	Uzak metastaz yok	-	T ve N evresine bağlı
M1a	Bölgesel dışı lenf nodu metastazı	Paraaortik, supraklaviküler, mediastinal	%10-20
M1b	Diğer uzak organ metastazları	Akciğer (%40-50), karaciğer (%30-40), kemik (%25-35), beyin (%5-10)	%5-10

2.3. Kas İnvaziv Olmayan Mesane Kanseri (Genel Bakış)

NMIUC, mesane kanserinin tanı anında tüm vakaların yaklaşık %70-75'ini oluşturan heterojen bir hastalık grubudur.[33] NMIUC, tümörün lamina propriayı invaze etmediği veya sadece lamina propria ile sınırlı kaldığı, muskularis propriaya invazyon göstermeyen mesane tümörlerini kapsar ve patolojik olarak Ta (papiller tümör), T1 (lamina propria invazyonu) ve CIS olarak sınıflandırılır.[33] Bu hastalık grubunun en önemli klinik özellikleri yüksek nüks oranları (%50-70) ve kas invaziv hastalığa progresyon riski (yaklaşık %10-30) olup, bu nedenle risk sınıflandırması ve buna dayalı tedavi stratejileri kritik öneme sahiptir. [33]

Risk sınıflandırması için dünya çapında kabul görmüş çeşitli sistemler mevcuttur. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 2006 risk tabloları, tümör sayısı, boyutu, önceki nüks durumu, T evresi, eşlik eden CIS varlığı ve tümör derecesine dayalı olarak hastaları düşük, orta ve yüksek risk gruplarına ayırır ve 1 yıllık ve 5 yıllık nüks ve progresyon olasılıklarını tahmin eder.[34] European Association of Urology (EAU) kılavuzları ise daha basit bir sınıflandırma sunarak hastaları düşük, orta, yüksek ve çok yüksek risk kategorilerine ayırır.[35,36] Club Urológico Español de Tratamiento

Oncológico (CUETO) skorlama modeli, özellikle Bacillus Calmette-Guérin (BCG) tedavisi alan hastalarda EORTC'ye göre daha doğru tahminler sağlayabilmektedir.[37] **Tablo 6'da** EAU 2024 kılavuzlarına göre NMIUC risk sınıflandırması özetlenmiştir.[36]

Tablo 6: Kas İnvaziv Olmayan Mesane Kanserinde Risk Sınıflandırması (EAU 2024 Kılavuzları)

Risk Kategorisi	Tanım	5 Yıllık Nüks Riski	5 Yıllık Progresyon Riski
Düşük Risk	Tek, <3 cm, Ta, düşük dereceli, CIS yok	%15-40	<%1
Orta Risk	Ta/T1, düşük/yüksek dereceli, <3 cm, multipl veya nüks eden, CIS yok	%40-60	%1-5
Yüksek Risk	T1 yüksek dereceli, yüksek dereceli Ta (multipl, >3 cm, nüks eden), CIS	%60-80	%10-20
Çok Yüksek Risk	T1 yüksek dereceli + eşlik eden CIS, multipl/geniş T1 yüksek dereceli/nüks eden, CIS tek başına, lenfovasküler invazyon, subtipler, BCG başarısızlığı	>%80	%20-50

Tedavi stratejisi risk kategorisine göre belirlenir. Düşük riskli hastalarda TUR-M sonrası tek doz intravezikal kemoterapi (mitomisin C veya epirubicin) yeterli olabilirken, orta riskli hastalarda TUR-M sonrası indüksiyon intravezikal kemoterapi veya BCG tedavisi önerilmektedir.[36] Yüksek ve çok yüksek riskli hastalarda ise altın standart tedavi, TUR-M sonrası indüksiyon ve idame BCG immünoterapisidir; BCG tedavisi nüks oranlarını azaltmakta ve progresyonu önlemede intravezikal kemoterapiye üstünlük göstermektedir. İdame BCG tedavisi (3 yıla kadar) yüksek riskli hastalarda nüks riskini anlamlı şekilde azaltır. Ancak, BCG tedavisi alan hastaların %30-40'ında tedavi başarısızlığı gelişmekte ve bu durum nüks ve progresyon riskini artırmaktadır. [36] BCG yanıtsız (BCG-unresponsive) hastalık, BCG'ye tekrar yanıt verme olasılığı son derece düşük olan agresif bir alt grup olarak tanımlanmıştır ve bu hastalarda radikal sistektomi veya yeni immünoterapötik ajanlar (pembrolizumab gibi) düşünülmelidir.

Tam ve kaliteli TUR-M, NMIUC yönetiminin temel taşıdır. Özellikle yüksek dereceli tümörlerde ve ilk rezeksiyonda detrusor kası içermeyen örneklerde, rezidü tümör ve doğru evreleme için 2-6 hafta içinde tekrar TUR-M (re-TUR-M) yapılması önerilmektedir; re-TUR-M, rezidü tümör saptama oranını artırır ve evreleme doğruluğunu iyileştirir. [36] Floresan sistoskopi (photodynamic diagnosis, PDD) ve dar bant görüntüleme (narrow band imaging,

NBI) gibi gelişmiş görüntüleme teknikleri, özellikle CIS tespitinde tanı doğruluğunu artırabilir.

Sürveyans protokolleri risk kategorisine göre değişir. Yüksek riskli hastalarda ilk 2 yıl her 3-4 ayda bir sistoskopi ve idrar sitolojisi, 3-4. yıllarda 6 ayda bir, daha sonra yıllık takip önerilirken, düşük riskli hastalarda daha seyrek takip yeterli olabilir. [36] NMIUC'nin yüksek nüks ve progresyon potansiyeli nedeniyle yaşam boyu takip gereklidir.

2.4. Kas İnvaziv Mesane Kanseri (MIUC)

Kas invaziv mesane kanseri (MIUC), tümörün mesane duvarının muskularis propria tabakasını invaze ettiği, patolojik olarak T2 veya daha ileri evre (T2-T4) olarak sınıflandırılan mesane kanserini ifade eder. MIUC, tanı anında tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %20-25'ini oluştururken, NMIUC tanısı alan hastaların %10-30'unda hastalık ilerlemesi sonucu MIUC gelişebilmektedir.[38] NMIUC'den MIUC'ye geçiş, moleküler düzeyde önemli değişiklikler içerir; özellikle TP53, RB1 ve PTEN gibi tümör süpresör genlerdeki mutasyonlar, hücre döngüsü kontrolünün kaybı ve invaziv fenotipe geçişte rol oynar. MIUC, NMIUC'ye göre çok daha agresif bir seyir izler, erken dönemde lenf nodu ve uzak organ metastazı yapma riski yüksektir ve tedavi edilmediğinde 2 yıl içinde hastaların çoğu kaybedilir. [38] Bu nedenle, MIUC tanısı konulduğunda hızlı ve multidisipliner yaklaşım gerektiren acil bir klinik durumdur ve tedavi kararları hastanın performans durumu, komorbiditeleri ve hastalık evresi dikkate alınarak bireyselleştirilmelidir.

2.4.1. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler

Kas invaziv mesane kanseri, tanı anında tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %20-25'ini oluşturur ve geri kalan %75-80'lik kısım NMIUC olarak başlayıp bir kısmı ilerleyerek MIUC'ye dönüşür. MIUC, tipik olarak 6. ve 7. dekadda görülür ve erkeklerde kadınlara göre 3-4 kat daha sık izlenir.[39] En sık başvuru semptomu ağrısız makroskopik hematüridir (%80-90); diğer semptomlar arasında dizüri, sık idrara çıkma, pelvik ağrı ve ileri evrelerde hidronefroz ve obstrüktif semptomlar yer alır.[39] Hidronefroz varlığı, genellikle ileri lokal hastalığı (T3-T4) veya lenf nodu tutulumunu işaret eder ve kötü prognoz göstergesidir.

Tanı süreci, öncelikle sistoskopi ve TUR-M ile başlar. TUR-M, hem tanısal hem de evreleme amaçlı yapılır ve mümkün olduğunca tam rezeksiyon hedeflenir; ancak MIUC'de

TUR-M'nin amacı öncelikle doku tanısı ve doğru evreleme sağlamaktır.[39] TUR-M örneklerinde muskularis propria varlığı mutlaka değerlendirilmelidir, çünkü muskularis propria içermeyen örneklerde T2 hastalığı ekarte edilemez ve yanlış evreleme riski artar. Görüntüleme yöntemleri arasında bilgisayarlı tomografi ürografi (CT-ürografi) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) üst üriner sistem değerlendirmesi, lokal evreleme ve lenf nodu tutulumunun saptanması için kullanılır.[39] Uzak metastaz taraması için toraks bilgisayarlı tomografisi ve gerektiğinde kemik sintigrafisi yapılır.

Hastanın performans durumu (ECOG veya Karnofsky skoru) ve komorbiditeleri, tedavi kararlarında kritik rol oynar. Özellikle radikal sistektomi ve sisplatin bazlı kemoterapi için hasta seçiminde böbrek fonksiyonları (kreatinin klirensi >60 mL/dk), kardiyovasküler durum, nörolojik ve işitme fonksiyonları değerlendirilmelidir.[39] Sisplatin uygunluğu olmayan hastalarda alternatif kemoterapi rejimleri veya immünoterapi seçenekleri düşünülmelidir.

2.4.2. Lamina Propria, Muskularis Mukoza ve Muskularis Propria İnvazyonunun Prognostik Önemi

Mesane duvarının anatomik katmanları ve invazyon derinliği, mesane kanserinin prognozu ve tedavi yaklaşımını belirleyen en önemli faktörlerdendir; ürotelyal epitelin hemen altındaki gevşek bağ dokusu olan lamina propriayı invaze eden ancak kalın ve düzenli düz kas tabakasına (detrusor/muskularis propria, MP) ulaşmayan tümörler T1, MP'yi invaze edenler ise T2 evre olarak tanımlanır ve lamina propria içinde yer alan ince, düzensiz, kesintili ve tüm mesanelerde saptanamayabilen muskularis mukoza (MM) lifleri T1 alt evrelemesinde anatomik bir referans noktası olarak kullanılmaktadır.[40] T1 alt evrelemesi için önerilen başlıca sistemler, Younes ve ark.'nın (1990) MM üstünü T1a/altını T1b olarak ayıran, Angulo ve ark.'nın (1995) invazyon derinliğini mikrometrik olarak <1.5 mm T1a/≥1.5 mm T1b biçiminde ölçen ve van der Aa ve ark.'nın (2005) MM üstü/düzeyi/altı şeklinde üç kategoriye (T1m1/T1m2/T1m3) ayıran sistemleridir; bu yöntemler nüks ve progresyon riskini öngörmeyi amaçlar ve derin invazyon gösteren olgularda nüks oranları %60-80'e, progresyon oranları %30-50'ye ulaşabilmektedir; nitekim güncel meta-analiz verileri MM invazyonunun progresyon riskinde belirgin artışla (HR: 2.65) ilişkili olduğunu,

EAU kılavuzları[36] ve DSÖ sınıflamasınca[1] önerilmesine karşın MM'nin histolojik olarak her zaman net tanımlanamaması, TUR-MT örneklerinde sıklıkla kesintili veya yok oluşu ve değerlendirmedeki subjektivite nedeniyle T1 alt evrelemesinin rutin pratikte halen standartlaşmadığını ortaya koymaktadır.[40] MP invazyonu (T2 evre), MIUC tanımının temel kriteri olup tedavi yaklaşımını radikal biçimde değiştirir ve yüzeyel yarı için T2a/derin yarı için T2b olarak alt sınıflandırılabilirse de bu ayrımın prognostik değeri tartışmalıdır[40]; TUR-M örneklerinde ince, düzensiz ve kesintili MM lifleri ile kalın, düzenli ve organize MP demetleri arasındaki ayrım kritik öneme sahip olmakla birlikte koterizasyon artefaktı, küçük doku parçaları ve yönlendirme sorunları nedeniyle her zaman kolay değildir ve deneyimli üropatoloji değerlendirmesi gerektirir.[40]

2.4.3. Tedavi Yaklaşımları

Kas invaziv mesane kanseri tedavisi multidisipliner ve bireyselleştirilmiş bir yaklaşım gerektirir; lokalize MIUC'de (T2-T4a, N0-N1, M0) standart tedavi sisplatin bazlı neoadjuvan kemoterapinin (NAC) ardından radikal sistektomi ve pelvik lenf nodu diseksiyonu iken, cerrahiye uygun olmayan veya cerrahiyi reddeden seçilmiş hastalarda trimodal tedavi (maksimal TUR-M + kemoradyoterapi) ile mesane koruyucu yaklaşım, metastatik hastalıkta (M1) ise sisplatin bazlı kemoterapi veya PD-1/PD-L1 inhibitörleri uygulanır; güncel EAU kılavuzları MIUC yönetiminde multidisipliner değerlendirmenin ve paylaşılan karar vermenin önemini vurgulamaktadır.[41]

2.4.3.1. Radikal Sistektomi

Radikal sistektomi lokalize MIUC'de altın standart olup erkeklerde radikal sistoprostatektomi, kadınlarda anterior pelvik ekzenterasyon şeklinde uygulanır; açık, laparoskopik veya robot yardımlı tekniklerin onkolojik sonuçları benzerdir ve eksternal/internal iliak ile obturator nodları içeren bilateral standart pelvik lenf nodu diseksiyonu hem evreleme hem terapötik amaçla ameliyatın ayrılmaz parçasıdır. Faz 3 SWOG S1011 çalışması, lokalize MIUC'de genişletilmiş lenfadenektominin standart diseksiyona kıyasla anlamlı sağkalım avantajı sağlamadığını, buna karşılık komplikasyon ve perioperatif mortalite riskini artırdığını göstermiş ve standart bilateral lenfadenektomiyi bakım standardı olarak yerleştirmiştir.[42,43] Üriner diversiyon ileal konduit, ortotopik

neomesane veya kutanöz üreterostomi olarak yapılabilir; perioperatif mortalite %2-8, cerrahi marjin pozitifliği kötü prognoz göstergesidir ve 5 yıllık nükssüz sağkalım pT2N0'da %60-70, pT3N0'da %40-50, pT4 veya pN+ hastalarda %20-35 arasında değişir. [42,43]

2.4.3.2. (Neo)Adjuvan Kemoterapi

Sisplatin bazlı NAC, mikrometastatik hastalığın tedavisi ve patolojik downstaging yoluyla sağkalımı artırmayı amaçlayan standart yaklaşımdır; en sık MVAC ve GC (Gemsitabin, Sisplatin) rejimleri kullanılır (GC daha iyi tolere edilir), yaklaşık %5 mutlak sağkalım faydası sağlar ve patolojik tam yanıt (ypT0N0) elde eden %20-40 hastada prognoz belirgin biçimde iyidir. Sisplatin uygunluğu kreatinin klirensi >60 mL/dk ve ECOG 0-1 gerektirir; adjuvan kemoterapi yüksek riskli (pT3-4 ve/veya pN+) hastalarda uygulanmakla birlikte hastaların %30-50'si postoperatif nedenlerle alamadığından NAC tercih edilir. Son yıllarda perioperatif immünoterapi öne çıkmıştır: faz 3 NIAGARA çalışması, sisplatine uygun MIUC hastalarında neoadjuvan gemsitabin-sisplatine perioperatif durvalumab eklenmesinin olaysız sağkalım (HR 0.68) ve genel sağkalımda anlamlı iyileşme sağladığını göstererek olası yeni bir standart tanımlamıştır.[44]

2.4.4. Prognozu Etkileyen Klinikopatolojik Faktörler (Tümör Boyutu, Lenfovasküler İnvazyon, Subtipler)

MIUC prognozu çok sayıda klinikopatolojik faktörle belirlenir: tümör boyutu bağımsız bir faktördür ve özellikle ≥3 cm tümörler daha ileri evre, lenf nodu metastazı ve kötü sağkalımla ilişkilidir; lenfovasküler invazyon (LVI) MIUC'de %20-45 oranında görülür, lenf nodu metastazıyla güçlü ilişki gösterir ve bağımsız olarak nüks ile kansere özgü sağkalımı olumsuz etkiler; DSÖ 2022 sınıflamasındaki histolojik subtipler tüm olguların yaklaşık %20-25'inde bulunur ve skuamöz/glandüler diferansiyasyon saf ürotelyal karsinoma benzer seyrederken mikropapiller, plazmositoid, sarkomatoid, nested ve küçük hücreli subtipler erken metastaz ve kemoterapi direnci ile agresif davranış gösterir.[1] Geniş bir radikal sistektomi serisinde histolojik subtipli/divergan diferansiyasyonlu olgular daha yüksek kas invazyonu ve LVI oranlarına sahip olmuş, hem subtip varlığı hem de LVI çok değişkenli analizde bağımsız olarak daha kötü genel ve metastazsız sağkalımla ilişkili bulunmuştur (5 yıllık genel sağkalım %48.1'e karşı %73.1).[45,46]

2.4.5. Nüks, Progresyon ve Metastaz

Radikal sistektomi sonrası nüks önemli bir sorundur; hastaların yaklaşık %30-50'sinde, çoğunlukla ilk iki yılda nüks gelişir, lokal nüks %5-15, uzak metastaz %50'ye kadar çıkabilir ve en sık akciğer, karaciğer, kemik ve lenf nodlarında görülür. Nüks ve metastaz riski patolojik evre ve lenf nodu durumuyla güçlü ilişki gösterir; pN+ hastalarda 5 yıllık hastalığa özgü sağkalım %15-35'te kalır ve sürveyans özellikle ilk iki yılda yoğunlaştırılmalı, üst üriner sistem ve üretral nüks açısından da takip yapılmalıdır. Çağdaş gerçek dünya verilerinde radikal sistektomi yapılan MIUC hastalarında 5 yıllık nüks oranı %45.2, genel sağkalım %48.2 olarak bildirilmiş ve nüks gelişen hastalarda mortalite 4.4 kat yüksek bulunmuştur; perioperatif tedavi kullanımındaki artışa rağmen nüks yükü yüksek kalmaktadır.[47]

2.5. Tümör Mikroçevresi ve Kanser İmmünolojisi

Tümör mikroçevresi (TME), malign hücrelerin yanı sıra stromal ve immün hücreleri, vasküler yapıları ve ekstrasellüler matriksi barındıran dinamik bir ekosistemdir ve tümör gelişimi, progresyonu, metastaz ile tedavi yanıtını biçimlendiren etkileşimlerin sahnesidir; içindeki immün hücreler tümöre karşı hem koruyucu yanıt oluşturabilir hem de büyümeyi destekleyebilir. TME'nin kanser büyümesi, metastaz ve tedavi yanıtındaki belirleyici rolü giderek daha fazla kanıtlanmaktadır, bu nedenle mesane kanseri gibi immünojenik tümörlerde mikroçevrenin karakterizasyonu prognostik biyobelirteç geliştirme ve immünoterapi tasarımı açısından değerlidir.[48]

2.5.1. Tümör Mikroçevresinin Bileşenleri

TME, tümör hücreleri dışında kansere özgü fibroblastları (CAF), endotel hücrelerini, perisitleri ve geniş bir immün repertuvarı ($CD4^+$/$CD8^+$ T, B,NK,MDSC) içerir; tümör ilişkili makrofajlar antitümör M1 ile tümör destekleyici M2 fenotipleri arasında polarize olur ve bu denge progresyonu etkiler; kollajen, fibronektin ve proteoglikanlardan oluşan matriks hücre etkileşimlerini düzenlerken sitokinler (IL-2, IL-10, TGF-β, IFN-γ) ve kemokinler (CCL2, CCL22, CXCL12) immün hücre göçünü yönlendirir; bu bileşenlerin dengesi tümörün immün kaçışı ile eliminasyonu arasındaki kaderi belirler.[49]

2.5.2. Tümör-İmmün Sistem Etkileşimi ve İmmün Kaçış

İmmün gözetim kavramı bugün eliminasyon, denge ve kaçış aşamalarından oluşan kanser immünoeditingi olarak tanımlanır: eliminasyonda tümör yok edilir, denge fazında taraflar dinamik dengede kalır, kaçış fazında ise tümör immün yanıttan sıyrılarak klinik olarak belirginleşir; immünoediting, immün sistemin immünojenik antijenlerden yoksun tümör varyantlarını seçtiği üç fazlı bir süreçtir ve kaçış mekanizmaları MHC sınıf I down-regülasyonu, PD-L1/PD-1 ve CTLA-4 kontrol noktaları, IDO aktivitesi, TGF-β salgısı ile Treg/MDSC infiltrasyonunu kapsayarak Hanahan ve Weinberg'in "immün yıkımdan kaçış" özelliğiyle örtüşür.[50]

2.5.3. Mesane Kanserinde TME'nin Prognostik Önemi

Yüksek mutasyon yükü ve neoantijen ekspresyonu mesane kanserini immünojenik kılar; TME kompozisyonuna göre tümörler immün çöl, immün dışlanmış ve immün inflame fenotiplerine ayrılır ve PD-L1 ekspresyonu olguların yaklaşık %30-40'ında görülerek kontrol noktası inhibitörü yanıtını öngörmede kullanılır. Bazal/$CD8^+$ yoğun "sıcak" tümörler immünoterapiye daha iyi yanıt verirken, immün hücre infiltrasyonundan yoksun "soğuk" tümörler yanıtsız kalır; yüksek stromal TIL yoğunluğu ve tersiyer lenfoid yapıların varlığı daha iyi sağkalım ve immünoterapi yanıtıyla ilişkilidir.[51]

2.6. Tümörü İnfiltre Eden Lenfositler (TIL)

TIL'ler, tümör stroması ve hücre yuvaları içindeki lenfosit popülasyonlarını ifade eder ve konağın tümöre karşı immün yanıtının morfolojik bir göstergesi kabul edilir; hematoksilen&eozin (H&E) kesitlerinde dahi değerlendirilebilen TIL'ler immünohistokimya ile alt tiplerine ayrılarak daha ayrıntılı karakterize edilebilir ve melanom, küçük hücreli dışı akciğer, mesane, meme ve over dahil birçok solid tümörde olumlu prognozun güvenilir bir belirteci olarak öne çıkar; bu özellikleriyle maliyet-etkin ve tekrarlanabilir bir biyobelirteç olarak rutin patolojiye entegre edilebilir.[52]

2.6.1. Tanım ve Genel Özellikler

TIL'ler stromal ve intratümöral kompartmanlarda yerleşir, ağırlıklı olarak T lenfositlerden oluşmakla birlikte B ve NK hücreleri de içerir; popülasyon heterojendir (aktif efektör ile tükenmiş fenotipteki hücreler bir aradadır), yoğunluk tümör tipine, moleküler alt

tipe ve mutasyon yüküne göre geniş bir aralıkta değişir ve yüksek yoğunluk genellikle güçlü antitümör yanıt ile daha iyi prognozla ilişkilendirilir; hücrelerin fonksiyonel durumu PD-1, TIM-3 LAG-3 gibi tükenme belirteçleriyle değerlendirilir ve bu, immünoterapi yanıtını öngörmede rol oynar.[52]

2.6.2. TIL'lerin İntratümöral ve Peritümöral (İnvaziv Marjin) Dağılımı

TIL'lerin anatomik yerleşimi prognostik anlamlarını doğrudan etkiler; intratümöral, stromal/peritümöral ve invaziv marjin kompartmanları ayrı ayrı değerlendirilir ve Galon'un İmmünoskoru tümör merkezi ile invaziv marjindeki $CD3^+/CD8^+$ yoğunluğunu birleştirerek prognostik bir skor üretir. İmmünoskor, kolorektal kanserde sıklıkla klasik TNM evrelemesinden daha güçlü, bağımsız bir prognostik değer taşır; invaziv marjindeki yüksek $CD8^+$ yoğunluğu progresyonun kontrol altında tutulduğuna işaret eder ve kompartmanların prognostik ağırlığı tümör tipine göre değiştiğinden her kanser için ayrı değerlendirme gerekir.[53]

2.6.3. TIL Değerlendirme Yöntemleri ve Skorlama Sistemleri

En yaygın yaklaşım H&E kesitlerinde stromal TIL'lerin kapladığı alanın yüzde olarak skorlanmasıdır; Uluslararası TIL Çalışma Grubu ve Salgado ve ark. meme kanseri için standardizasyon kılavuzları yayımlamış, immünohistokimya ile CD3/CD8/FOXP3 alt tiplemesi ve dijital patoloji gözlemciler arası uyumu artırmıştır; Galon'un İmmünoskoru tümör merkezi ve invaziv marjinde $CD3^+/CD8^+$ yoğunluğunu birleştirerek 0-4 arası bir skor üretir; yine de farklı tümörler ve laboratuvarlar arasında standardizasyon süregelen bir sorundur.[53]

2.6.4. Farklı Kanser Türlerinde TIL'lerin Prognostik Önemi

TIL'lerin prognostik değeri immünojenik tümörlerde güçlüdür: meme kanserinde (özellikle üçlü negatif ve HER2-pozitif) yüksek TIL daha iyi sağkalım ve kemoterapi yanıtıyla, kolorektal kanserde İmmünoskor TNM'den bağımsız nüks azalmasıyla, melanomda hem prognoz hem kontrol noktası inhibitörü yanıtıyla, küçük hücreli dışı akciğerde yüksek $CD8^+$ infiltrasyonu uzamış sağkalımla, over kanserinde ise intratümöral $CD8^+$ yoğunluğu bağımsız prognozla ilişkilidir; meta-analizler TIL'lerin yalnızca prognostik değil prediktif değer de taşıdığını ortaya koyar.[52]

2.6.5. Mesane Kanserinde TIL'lerin Rolü ve Güncel Literatür

Mesane kanserinde genel eğilim, yüksek TIL (özellikle $CD8^+$) yoğunluğunun olumlu prognozla bağlantılı olduğu yönündedir ve klinik anlam invazyon derinliğine göre değişir: NMIUC'de TIL kompozisyonu BCG yanıtını öngörür, MIUC'de yüksek yoğunluk neoadjuvan kemoterapi yanıtını ve sağkalımı olumlu etkiler. Radikal sistektomi sonrası yüksek TIL ekspresyonu daha iyi genel sağkalım (birleştirilmiş HR 0.65) ve nükssüz sağkalımla (HR 0.48) ilişkili bulunmuş, $CD8^+$ ve intratümöral TIL'ler en güçlü belirteçler olarak öne çıkmıştır; ancak meta-analizler standardize değerlendirme protokollerine duyulan ihtiyacı vurgular.[54]

2.7. TIL İmmün Fenotipi

TIL'lerin yalnızca toplam yoğunluğu değil immünfenotipik kompozisyonu da prognoz açısından belirleyicidir; immün fenotipleme popülasyonu $CD4^+$ yardımcı, $CD8^+$ sitotoksik ve $FOXP3^+$ regülatuvar T hücrelerine ayırarak her alt grubun fonksiyonunu tanımlar ve bu alt tipler arasındaki denge antitümör immünite ile immünosüpresyon arasındaki etkileşimi yansıtır; değerlendirme immünohistokimya, flow sitometri, multipleks immünfloresan ve spatial transkriptomik ile yapılabilir, oransal değerlendirme (örneğin $CD8^+/FOXP3^+$) tek başına hücre sayılarından daha güçlü prognostik bilgi sağlayabilir.[54]

2.7.1. $CD4^+$ Yardımcı T Lenfositler

$CD4^+$ yardımcı T hücreleri Th1, Th2, Th17 ve foliküler yardımcı alt gruplara ayrılan heterojen bir popülasyondur; Th1 hücreleri IFN-γ ve IL-2 ile sitotoksik T hücrelerini aktive ederek güçlü antitümör yanıt oluşturur ve genellikle olumlu prognozla ilişkilendirilirken Th2 baskınlığı (IL-4, IL-5, IL-13) zayıf antitümör yanıtla bağlantılıdır. $CD4^+$ T hücreleri tümör immünitesinde hem pro- hem antitümör roller üstlenir ve her alt grubun hastalık prognozuyla ilişkisi farklı, kimi zaman tutarsızdır; mesane kanserinde $CD4^+$ TIL'lerin rolü içerdikleri Treg bileşeni nedeniyle karmaşıktır ve Th1/Th2 dengesi yanıtın etkinliğini belirler.[55]

2.7.2. $CD8^+$ Sitotoksik T Lenfositler

$CD8^+$ sitotoksik T lenfositler antitümör immünitenin temel efektörüdür ve perforin-granzim salınımı ileFas-FasL etkileşimiyle apoptoz indükler; ancak kronik antijen uyarısı ve immünosüpresif mikroçevre, PD-1, TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonuyla tanımlanan tükenme

durumuna yol açar; $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerinin TME içindeki varlığı çok sayıda solid tümörde olumlu prognozun yerleşmiş bir belirtecidir ve mesane kanserinde özellikle intratümöral ve invaziv marjindeki $CD8^+$ infiltrasyonu daha iyi sağkalımla ilişkilidir ve kontrol noktası inhibitörü yanıtını öngörmede prediktif değer taşır.[52]

2.7.3. $FOXP3^+$ Regülatuvar T Lenfositler (Treg)

$FOXP3^+$ Treg'ler $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ fenotipiyle tanımlanır ve IL-10/TGF-β salgısı, CTLA-4 ekspresyonu ve efektör T hücre baskılanması yoluyla güçlü immünosüpresif etki gösterir; tümöre göçleri çoğunlukla CCL22/CCR4 aksı üzerinden gerçekleşir ve çoğu kanserde yüksek Treg infiltrasyonu kötü prognozla ilişkilidir.[51] Mesane kanserinde ise Treg ve MDSC gibi immünosüpresif hücreler özellikle MIUC'de baskın bir mikroçevre oluşturur; buna karşılık Winerdal ve ark. (2011) yüksek $FOXP3^+$ infiltrasyonunu paradoksal olarak daha iyi sağkalımla ilişkilendirmiş, bunu Treg'lerin MMP2 ekspresyonunu baskılayarak invaziviteyi azaltması ve aşırı inflamasyonu sınırlamasıyla açıklamıştır.[4]

2.7.4. $CD8^+/FOXP3^+$ Oranının Prognostik Önemi

$CD8^+/FOXP3^+$ oranı sitotoksik yanıt ile immünosüpresyon arasındaki dengeyi nicel olarak yansıtır ve tek başına hücre sayılarından daha güçlü prognostik bilgi sağlayabilir; kolorektal kanserde yüksek oran daha iyi sağkalımla ilişkili bulunmuş, renal hücreli karsinomda Teke ve ark. (2020) oranın hem peritümöral hem intratümöral bölgede ayrı ayrı prognostik değer taşıdığını göstermiştir. Mesane kanserinde $CD8^+/FOXP3^+$ oranı, NMIUC'de tümör nüksünün bağımsız bir öngörücüsü olarak tanımlanmıştır; yüksek oran efektör yanıtın immünosüpresif mekanizmalara üstün geldiğini gösterir ve genellikle daha iyi klinik sonuç ile immünoterapi yanıtıyla bağdaştırılır.[7]

2.7.5. İmmün Hücre Dengesi ve Tümör Progresyonu

Mikroçevredeki immün denge tümör progresyonu ve tedavi yanıtı açısından dinamik ve belirleyicidir; efektör hücreler ($CD8^+$ CTL, Th1, M1 makrofaj, NK) ile baskılayıcı hücreler (Treg, MDSC, M2 makrofaj) arasındaki denge tümörün kaçışını veya eliminasyonunu yönlendirir ve $CD8^+$/Treg ile M1/M2 oranları bu fonksiyonel durumu yansıtır; dengenin baskılayıcı yönde bozulması progresyon ve metastazı kolaylaştırır ve

immünosüpresif ortam kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini sınırlayarak immünoterapi direncine katkıda bulunur.[51]

2.8. Mesane Kanserinde TIL Dağılımı ve İmmün Fenotipe Dair Güncel Çalışmalar

Mesane kanserinde yalnızca TIL varlığının değil anatomik dağılımının (intratümöral vs peritümöral) ve immün fenotipin de prognostik önem taşıdığı giderek netleşmektedir: Sun ve ark. (2023)[3] invaziv marjinde yüksek $CD3^+$ yoğunluğu ve FOXP3 negatifliğini daha iyi hastalıksız sağkalımla, Winerdal ve ark. (2011)[4] $FOXP3^+$ Treg'leri paradoksal olarak daha iyi sağkalımla, Teke ve ark. (2020)[5] $CD8^+/FOXP3^+$ oranını hem peritümöral hem intratümöral düzeyde prognozla, Eich ve ark.[6] ise MIUC'de neoadjuvan kemoterapi öncesi $CD8^+$/Treg oranını patolojik yanıtla ilişkilendirmiştir. Han ve ark. (2025)[7], NMIUC'de $CD8^+/FOXP3^+$ oranının tümör nüksünün bağımsız bir öngörücüsü olduğunu ve yüksek oranın daha düşük nüks riskiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur; ne var ki MIUC'de intratümöral ve peritümöral bölgelerde çoklu belirteci (CD3, CD4, CD8, FOXP3) bir arada inceleyen çalışmalar sınırlıdır ve bu boşluk, söz konusu parametreleri çok boyutlu olarak ele alan bu tezin gerekçesini oluşturur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Popülasyonu ve Olgu Seçimi

Çalışma grubu, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2018-2024 yılları arasındaki 7 yıllık dönem içerisinde radikal sistektomi uygulanmış ve histopatolojik inceleme sonucunda invaziv ürotelyal karsinom (pT1-pT4) tanısı almış hastalar oluşturmaktadır. Olgulara ait formalin ile fikse edilmiş, parafine gömülü (FFPE) doku blokları ve histolojik preparatlar Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edilmiştir.

Çalışma protokolü, Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Proje No: 2026/193, Karar No: KÜ GOKAEK-2026/06/44).

3.2. Çalışmanın Tipi/Türü

Araştırma, retrospektif ve tek merkezli bir kohort çalışması olarak planlanmıştır. Çalışma kapsamında hastalardan yeni biyolojik örnek alınmamış, herhangi bir girişim uygulanmamış ve hastalarla doğrudan iletişim kurulmamıştır; tüm veriler mevcut patoloji arşiv materyalleri ve hastane bilgi yönetim sistemi (HBYS) kayıtlarından elde edilmiştir.

3.3. Araştırmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri

Dahil Etme Kriterleri

- 2018-2024 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde radikal sistektomi uygulanmış olmak.
- Radikal sistektomi materyalinin histopatolojik incelemesinde invaziv ürotelyal karsinom tanısı almış olmak (pT1-pT4).
- Patoloji arşivinde formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülü (FFPE) doku bloklarının mevcut olması.
- İmmünohistokimyasal inceleme yapılmasına olanak sağlayacak yeterli tümör dokusu içeren blokların bulunması.

- Klinik ve patolojik verilere hasta dosyaları ve hastane bilgi sistemi üzerinden erişilebilir olması.
- Histopatolojik preparatların yeniden değerlendirme için uygun ve yeterli kalitede olması.

Dışlama Kriterleri

- Histopatolojik inceleme için yeterli tümör dokusu içermeyen radikal sistektomi materyalleri.
- İmmünohistokimyasal değerlendirme yapılmasına uygun parafin blok veya histolojik preparatı bulunmayan olgular.
- Yaygın nekroz, ciddi artefakt veya doku kaybı nedeniyle immünohistokimyasal değerlendirme yapılamayan örnekler.
- Primer mesane tümörü dışındaki malignitelerin mesaneye metastazı olarak değerlendirilen olgular.
- Ürotelyal karsinom dışındaki primer mesane tümörleri (örn. skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom vb.).
- Klinik veya patolojik verilere hasta dosyaları veya hastane bilgi sistemi üzerinden ulaşılamayan olgular.
- Patoloji preparatlarının yeniden değerlendirilmesi sırasında tanısal belirsizlik bulunan veya kesin invaziv ürotelyal karsinom tanısı doğrulanamayan olgular.

Bu kriterleri karşılayan toplam yaklaşık 100 olgunun çalışmaya dahil edilmesi planlanmıştır. Çalışmanın retrospektif ve arşiv temelli niteliği nedeniyle, ilgili dönem içerisindeki uygun tüm ardışık olgular örnekleme dahil edilmiş; ayrıca bir güç analizi temelli örneklem büyüklüğü hesaplaması yapılmamıştır.

3.4. Veri Toplama Araçları ve Yöntemi

Çalışma kapsamındaki tüm veriler, araştırmacılar tarafından oluşturulan bir Olgu Rapor Formu aracılığıyla standart bir formatta kaydedilmiştir. Veri toplama sürecinde Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi HBYS kullanılarak hastaların yaşı, cinsiyeti, sigara öyküsü, tanı tarihi, uygulanan tedaviler (neoadjuvan/adjuvan), takip süresi, nüks durumu, metastaz durumu ve sağkalım durumu kaydedilmiştir.

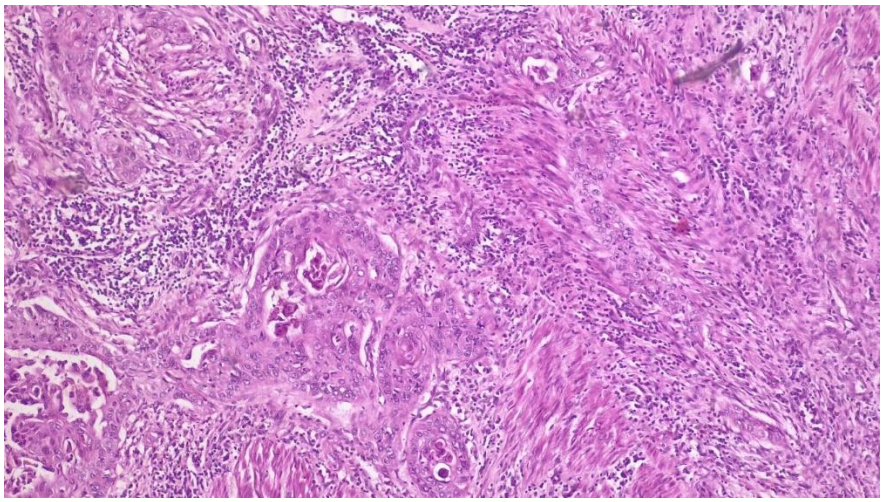
Rutin patolojik değerlendirmeden elde edilen değişkenler arasında tümör evresi (pT), lenf nodu durumu (pN), tümör derecesi (DSÖ sınıflaması), tümör boyutu, lenfovasküler invazyon varlığı, perinöral invazyon varlığı, cerrahi sınır durumu ve tümör alt tipi/subtip histoloji yer almıştır. Bu değişkenlerin büyük bölümü rutin patoloji raporlarında yer alan parametreler olup, TIL alt gruplarının immün fenotipik analizi ve intratümöral/peritümöral dağılımının sayısal değerlendirilmesi ise araştırmaya özgü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5. Hematoksilen & Eozin Değerlendirme

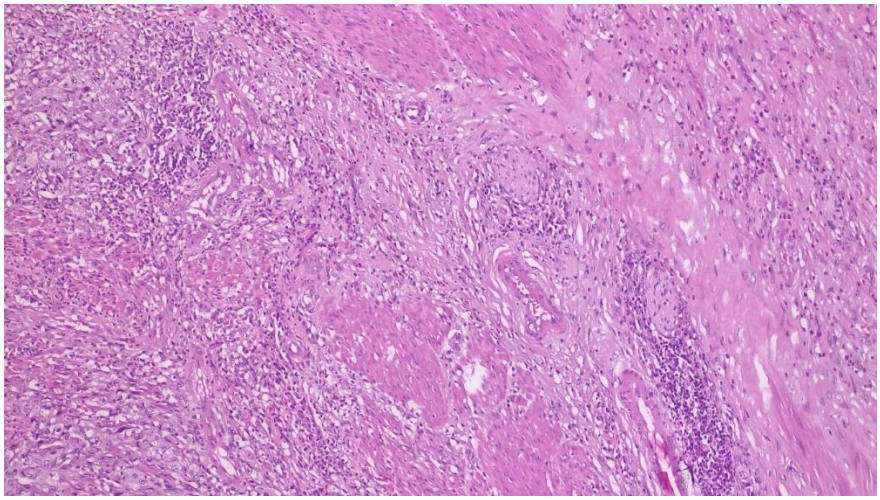
Seçilen olgulara ait histolojik preparatlar, gerekli arşiv çalışması sonrasında iki patolog tarafından yeniden değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede tümör tanısı, CIS varlığı, invazyon derinliği (lamina propria, muskularis mukoza, muskularis propria tutulumu), lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve nekroz varlığı belirlenmiştir.

İmmünohistokimyasal kesitler değerlendirilmeden önce H&E boyalı kesitler taranarak tümör alanları belirlenmiş; intratümöral bölge (tümör adaları içinde ve tümör hücreleri arasındaki stroma) ile peritümöral/invaziv marjin bölgesi (tümörün invazyon sınırını çevreleyen, tümöre bitişik stromal alan) ayrı ayrı tanımlanmıştır. Birden fazla bloğa sahip olgularda, invaziv tümör komponentini en iyi temsil eden ve ısıl artefakt içermeyen bloklar immünohistokimyasal çalışma için seçilmiştir.

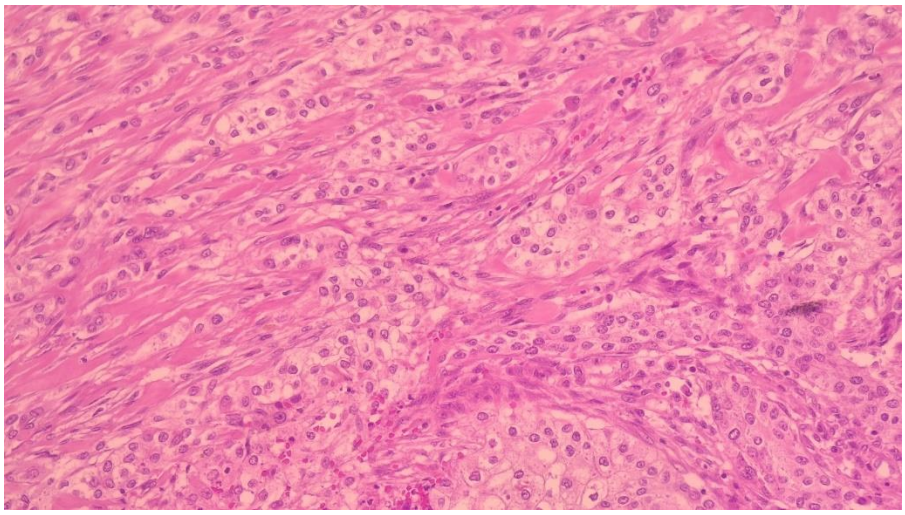
İmmün infiltrasyonun mekânsal dağılımına göre her olgu üç TIL paterninden birine atanmıştır: intratümöral yoğunluğun yüksek olduğu olgular "*Inflamed*" (Resim 10), peritümöral yoğunluğun yüksek olmasına karşın intratümöral infiltrasyonun düşük kaldığı olgular "*Excluded*" (Resim 11), her iki kompartmanda da infiltrasyonun düşük olduğu olgular ise "*Desert*" (Resim 12, Resim 13) paterni olarak sınıflandırılmıştır (sırasıyla 0, 1 ve 2 olarak kodlanmıştır).[56] Bu sınıflama, immün hücrelerin tümöre erişimini yansıtması bakımından prognostik bir gradasyon öngörür: İnflamed patern genellikle daha olumlu, Excluded patern ara, Desert patern ise daha olumsuz klinik seyirle ilişkilendirilir.[56]



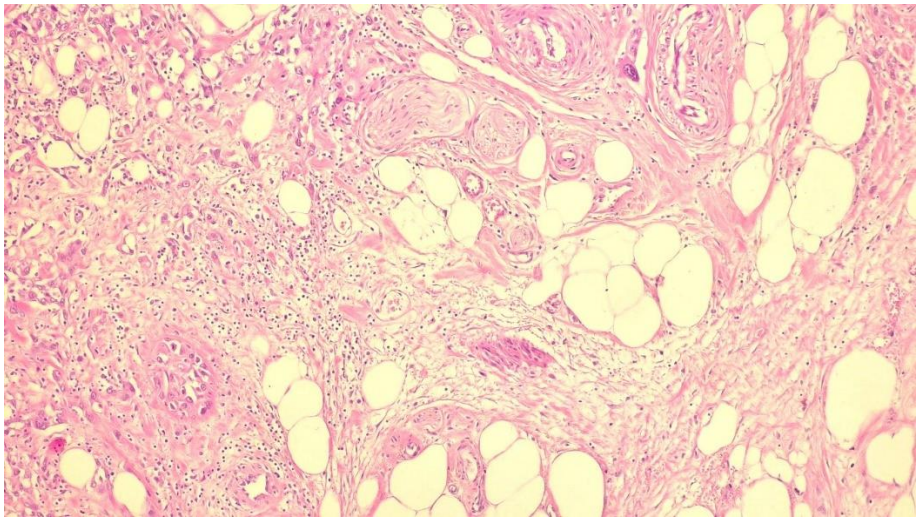
Resim 10: İntratümöral yüksek yoğunlukta TIL (x200, H&E)



Resim 11: Peritümöral yüksek yoğunlukta TIL (x200, H&E)



Resim 12: İntratümöral düşük yoğunlukta TIL (x200, H&E)



Resim 13: **Peritümöral düşük yoğunlukta TIL (x200, H&E)**

3.6. İmmünohistokimyasal Boyama

Seçilen parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alınarak CD4, CD8 ve FOXP3 antikorları kullanılarak immünohistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir. Boyamalar ROCHE / BenchMark ULTA IHC Stainer cihazında,üretici firmanın önerdiği protokollere uygun şekilde yapılmıştır. Pozitif dış kontrol olarak her üç belirteç için de tonsil dokusu kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan antikorların özellikleri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan antikorların özellikleri

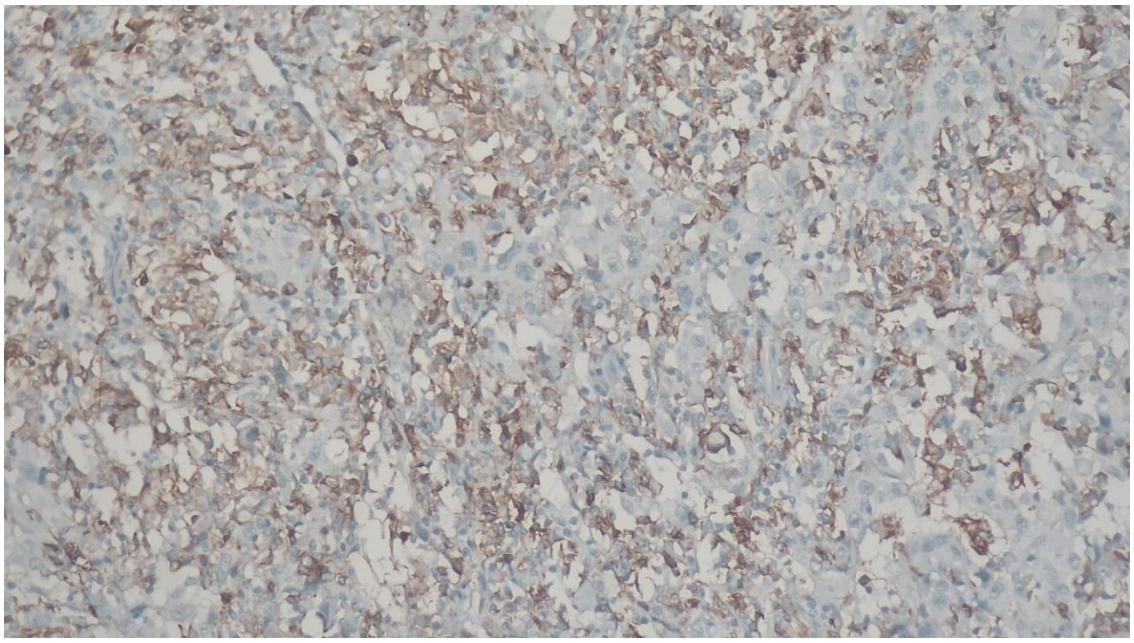
Antikor	Klon	Antijen Açığa Çıkarma Yöntemi/Süresi	Dış Kontrol	Tedarikçi
CD4	4B12	Antigen Retrieval Solüsyonu; ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) ile CC1 Standart protokolü	Tonsil	ROCHE Diagnostics, Tucson AZ - USA
CD8	C8/144B	Antigen Retrieval Solüsyonu; ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) ile CC1 Standart protokolü]	Tonsil	ROCHE Diagnostics, Tucson AZ - USA
FOXP3	D2W8E	Antigen Retrieval Solüsyonu; ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) ile CC1 Standart protokolü	Tonsil	ROCHE Diagnostics, Tucson AZ - USA

3.7. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

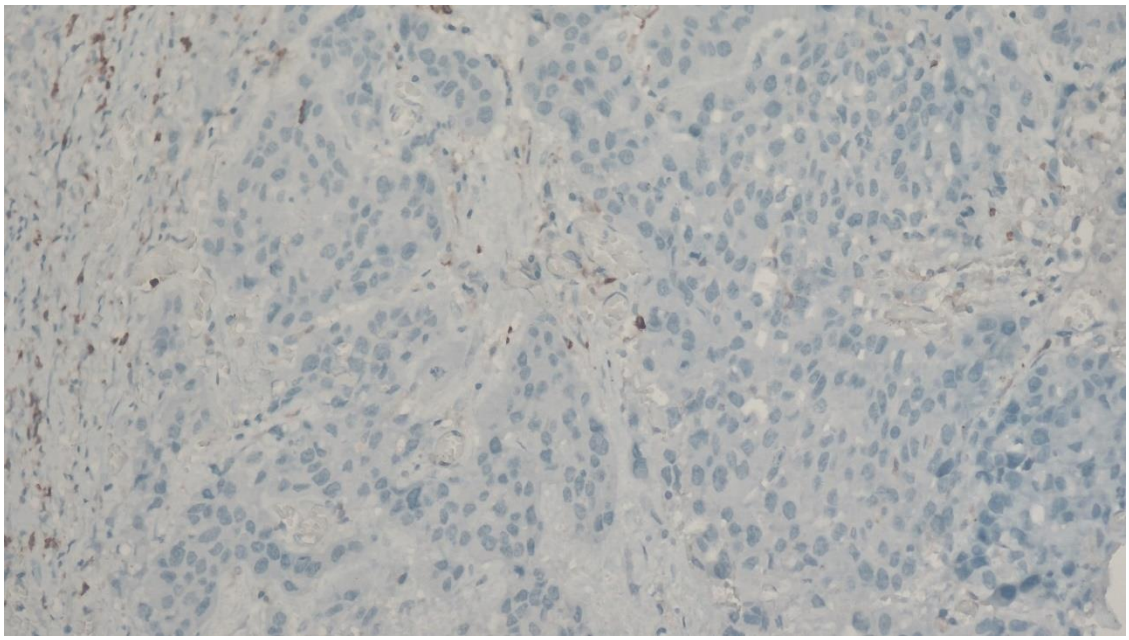
İmmünohistokimya ile boyanmış tüm preparatlar, ışık mikroskobunda (×400 büyütmede) iki patolog tarafından bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Her olguda intratümöral ve peritümöral alanlarda beş farklı büyük büyütme alanı (high power field, HPF) seçilerek pozitif boyanan lenfositler sayılmış ve elde edilen değerlerin ortalaması alınarak olgu bazında yoğunluk hesaplanmıştır. Gözlemciler arası uyumsuzluk durumunda, ortak mikroskop başında değerlendirme yapılarak fikir birliğine varılmıştır.

3.7.1. CD4 Değerlendirmesi

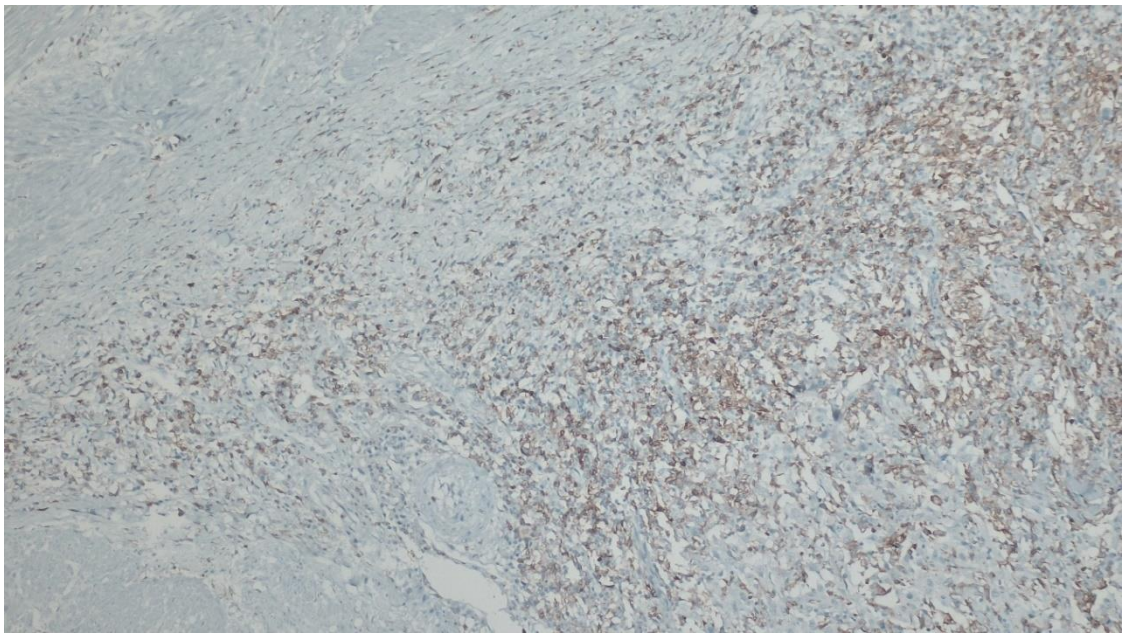
İntratümöral ve peritümöral alanlardaki $CD4^+$ lenfositler ayrı ayrı sayılarak her bölge için ortalama $CD4^+$ TIL yoğunluğu (hücre/HPF) belirlenmiştir (Resim 14, Resim 15, Resim 16, Resim 17).



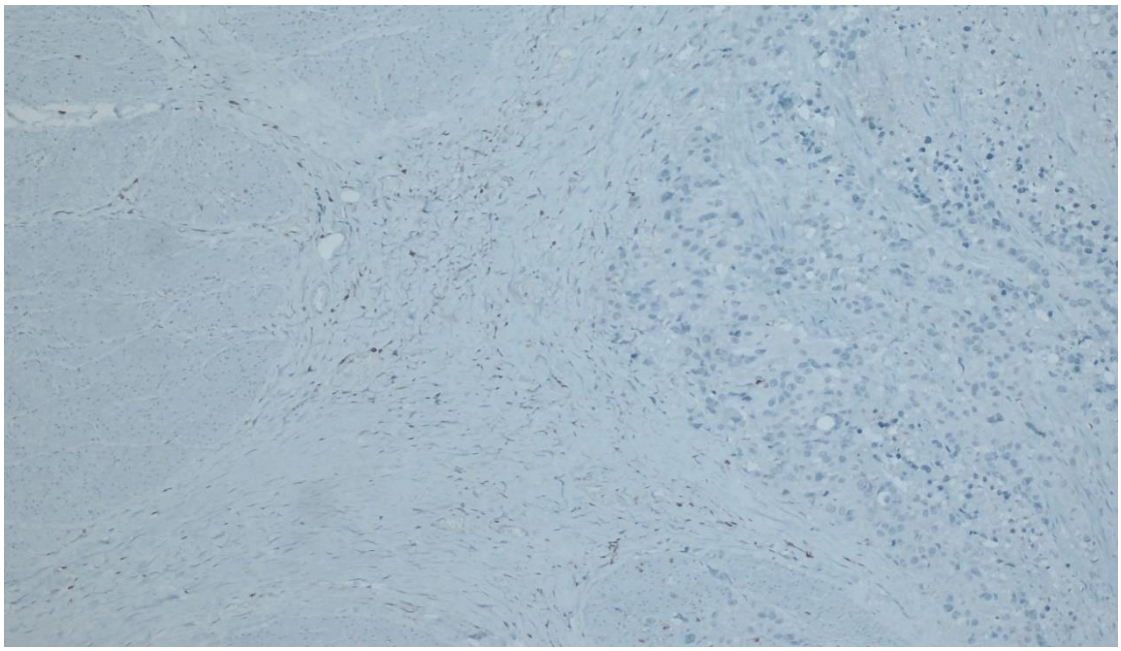
Resim 14: İntratümöral yüksek yoğunlukta CD4 pozitif TIL (x200)



Resim 15: İntratümöral düşük yoğunlukta CD4 pozitif TIL (x200)



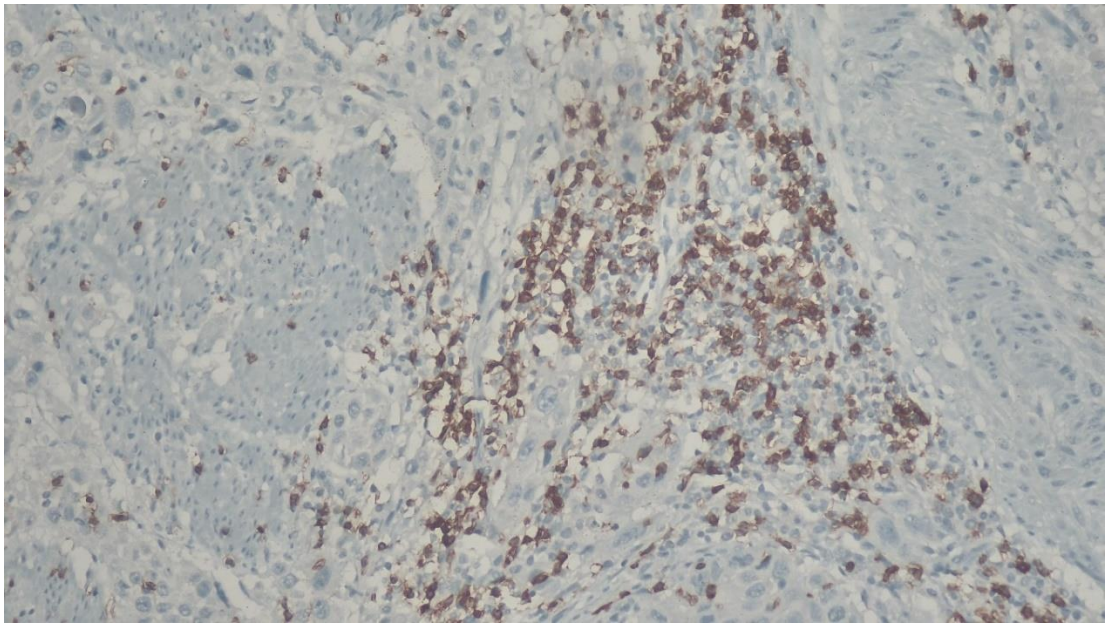
Resim 16: Peritümöral yüksek yoğunlukta CD4 pozitif TIL (x100)



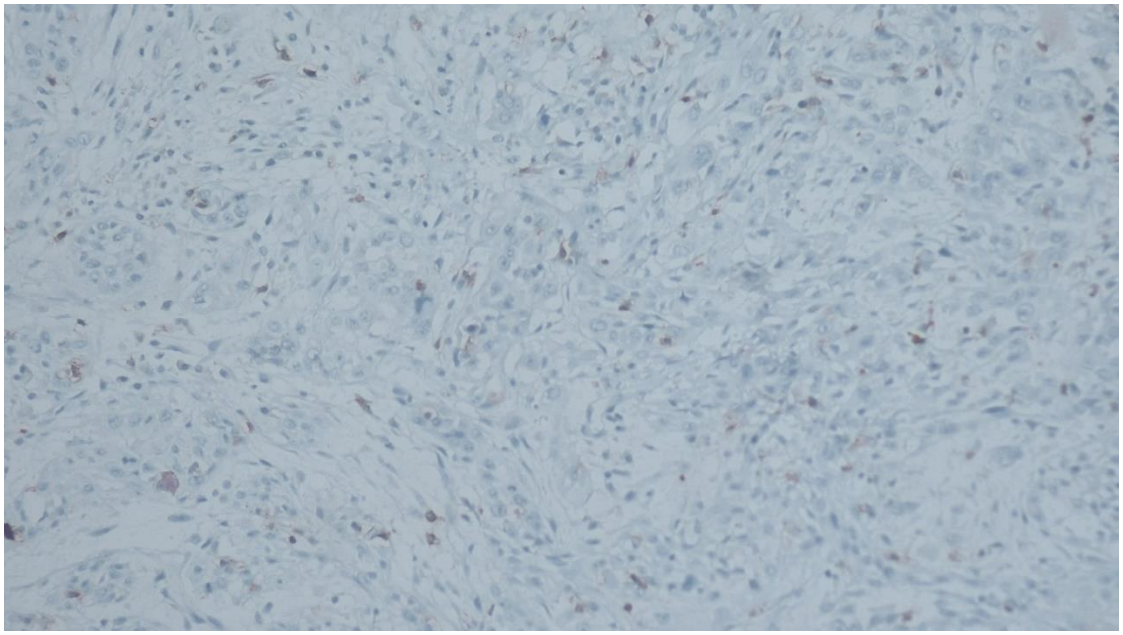
Resim 17: Peritümöral düşük yoğunlukta CD4 pozitif TIL (x100)

3.7.2. CD8 Değerlendirmesi

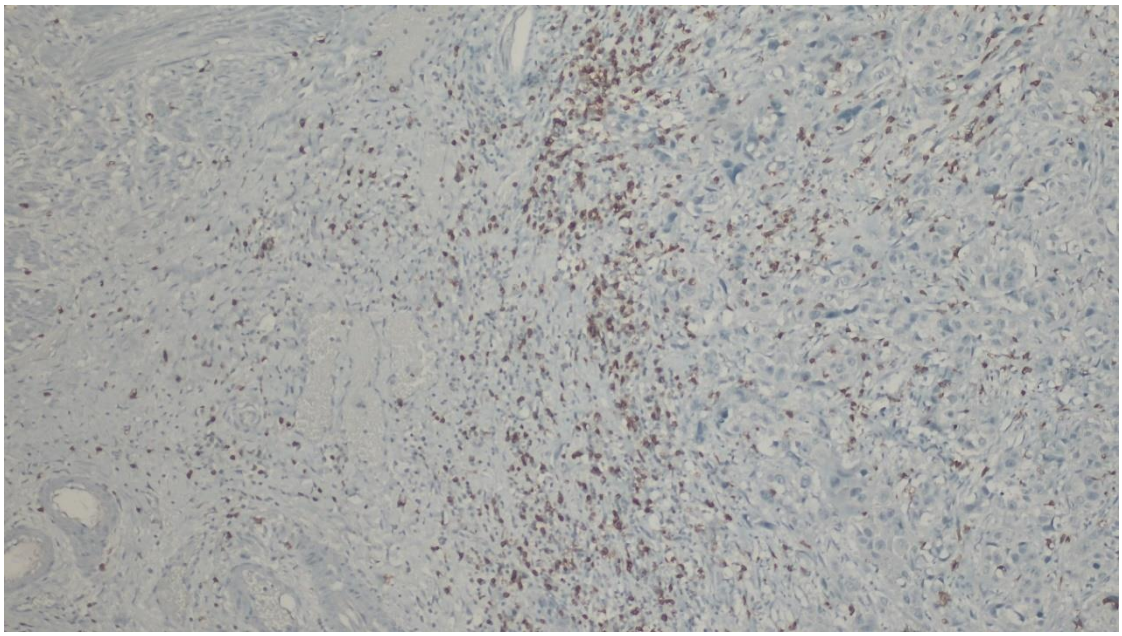
İntratümöral ve peritümöral alanlardaki $CD8^+$ lenfositler ayrı ayrı sayılarak her bölge için ortalama $CD8^+$ TIL yoğunluğu (hücre/HPF) belirlenmiştir (Resim 18, Resim 19, Resim 20, Resim 21).



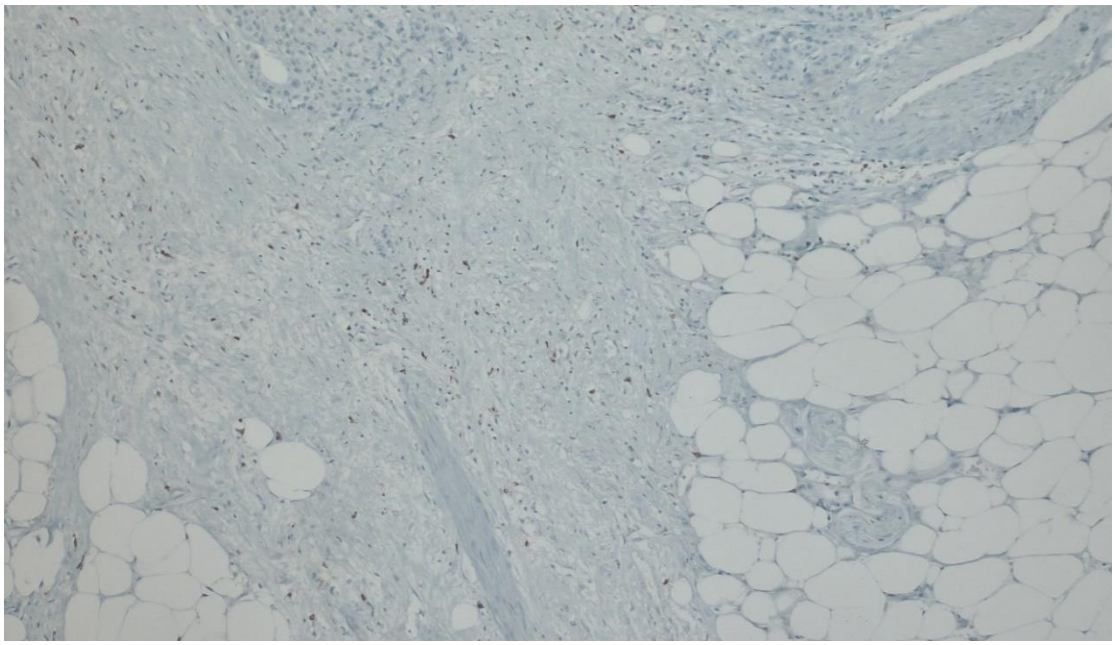
Resim 18: İntratümöral yüksek yoğunlukta CD8 pozitif TIL (x200)



Resim 19: İntratümöral düşük yoğunlukta CD8 pozitif TIL (x200)



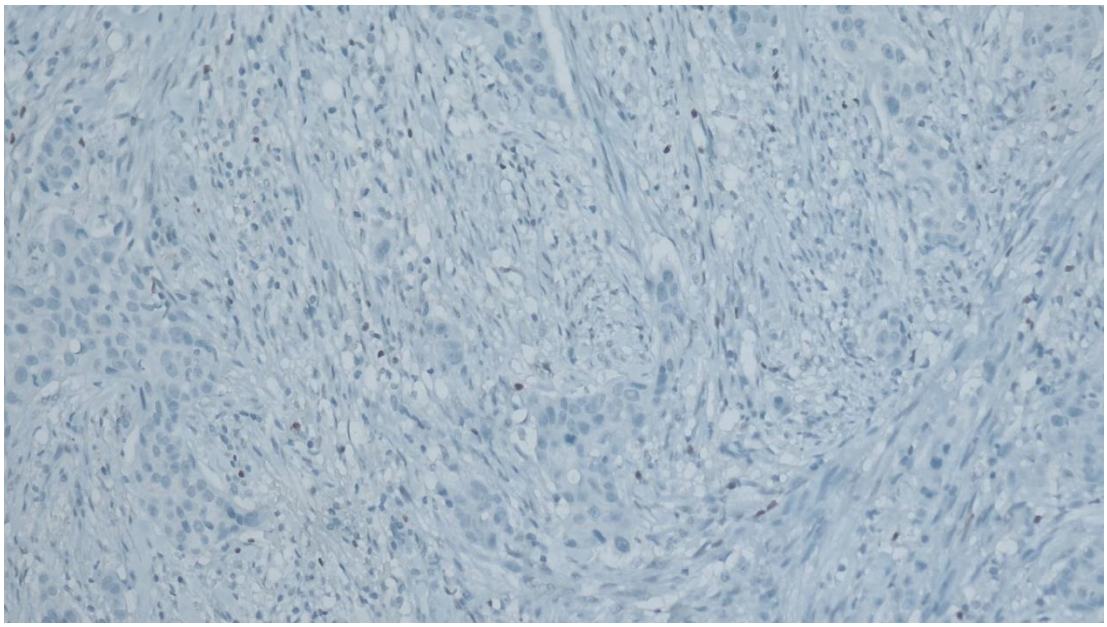
Resim 20: Peritümöral yüksek yoğunlukta CD8 pozitif TIL (x100)



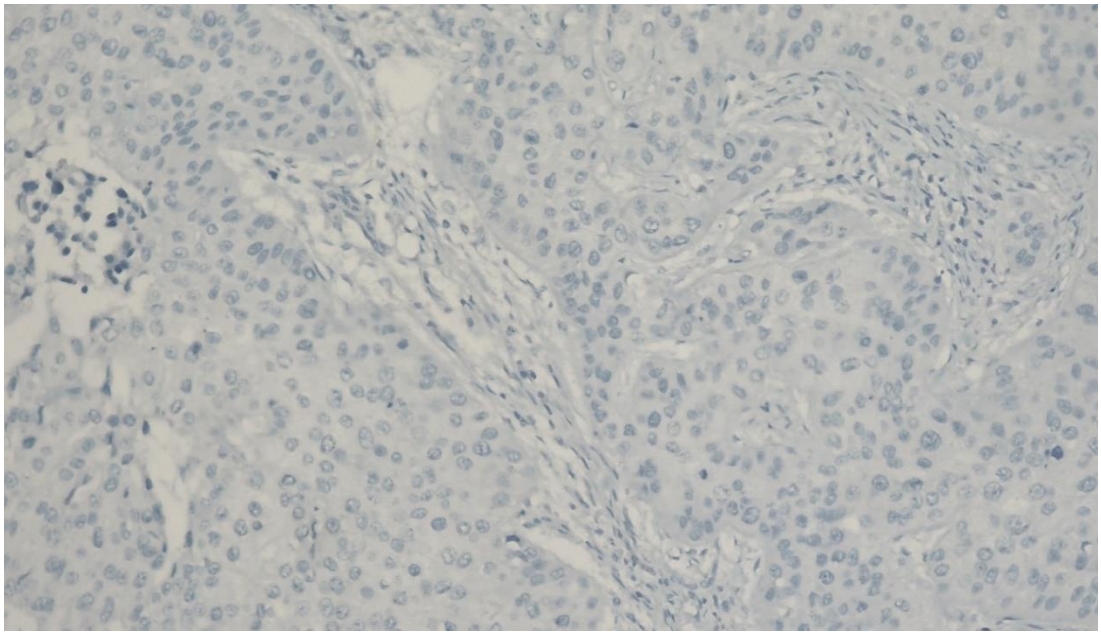
Resim 21: Peritümöral düşük yoğunlukta CD8 pozitif TIL (x100)

3.7.3. FOXP3 Değerlendirmesi

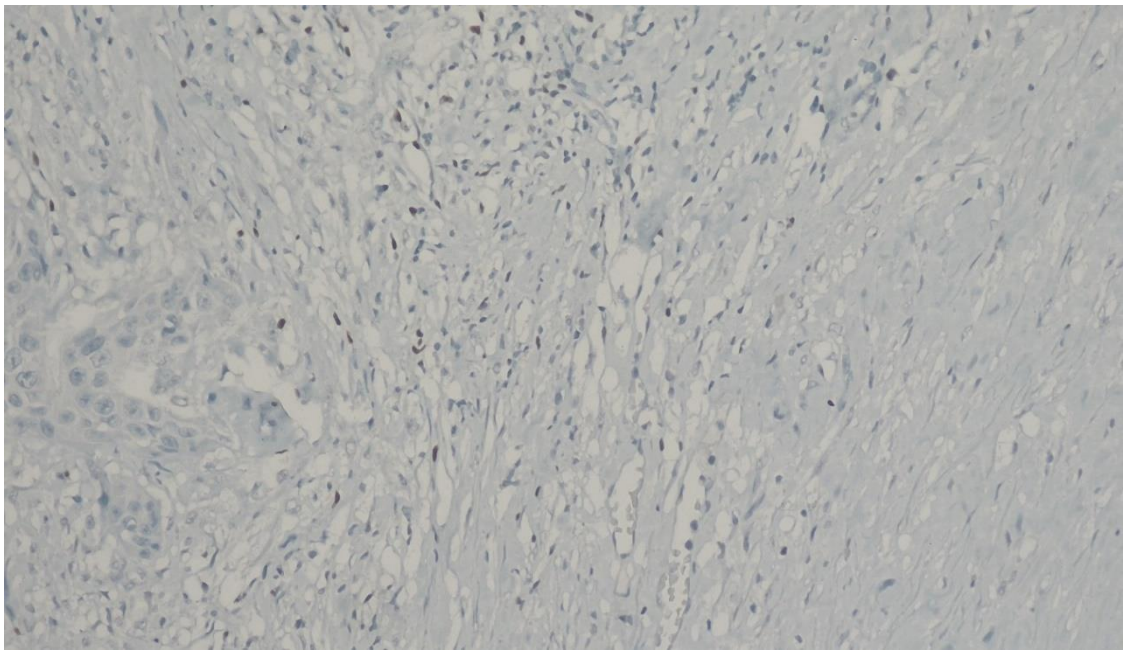
FOXP3^{+} lenfositler, nükleer boyanma gösteren hücreler pozitif kabul edilerek intratümöral ve peritümöral alanlarda ayrı ayrı sayılmış ve her bölge için ortalama FOXP3^{+} TIL yoğunluğu (hücre/HPF) belirlenmiştir (Resim 22, Resim 23, Resim 24, Resim 25).



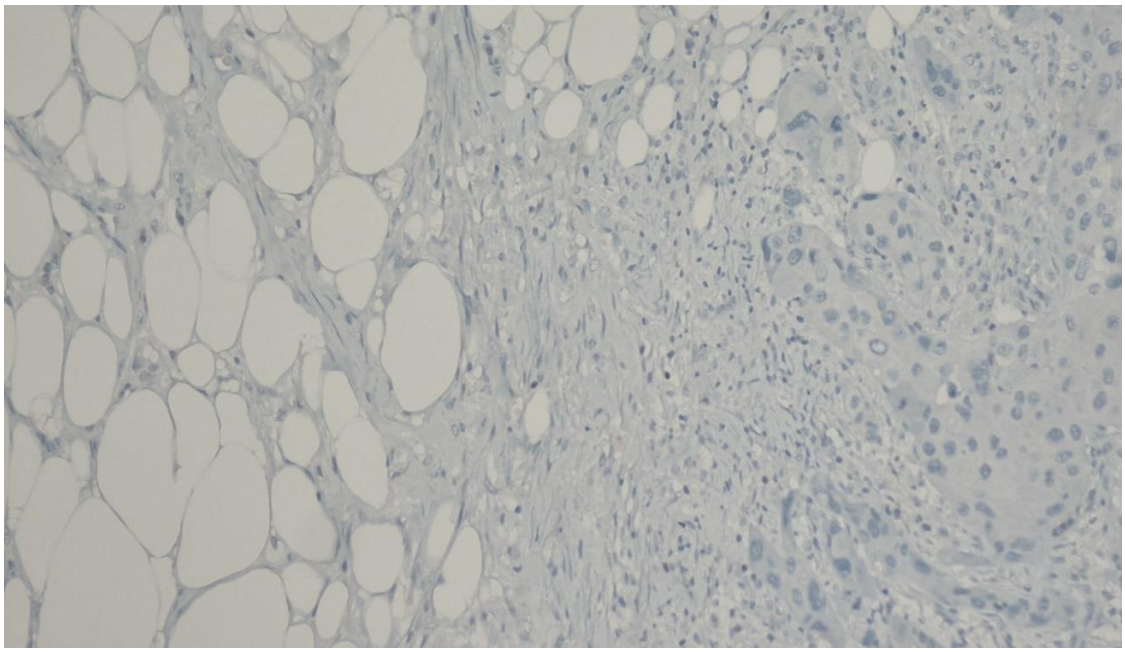
Resim 22: İntratümöral yüksek yoğunlukta FOXP3 pozitif TIL (x200)



Resim 23: İntratümöral düşük yoğunlukta FOXP3 pozitif TIL (x200)



Resim 24: Peritümöral yüksek yoğunlukta FOXP3 pozitif TIL (x200)



Resim 25: Peritümöral düşük yoğunlukta FOXP3 pozitif TIL (x200)

Elde edilen $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL yoğunluk değerlerinden yararlanılarak her olgu için intratümöral ve peritümöral CD8/FOXP3 oranı ile CD4/CD8 oranı hesaplanmıştır.

3.8. İntratümöral ve Peritümöral TIL Dağılımının Değerlendirilmesi

TIL'lerin intratümöral ve peritümöral dağılımı, tümör adaları arasında ve tümör hücrelerine doğrudan komşu stromada yer alan lenfositler (intratümöral) ile tümörün invazyon sınırını çevreleyen stromal alandaki lenfositler (peritümöral/invaziv marjin) ayrı ayrı değerlendirilerek belirlenmiştir. Lamina propria yerleşimli olup doğrudan tümöre komşu olmayan inflamatuar hücreler değerlendirmeye alınmamıştır. Her iki bölgedeki $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ lenfosit yoğunlukları birbirleriyle ve klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılmıştır.

3.9. Klinikopatolojik Verilerin Toplanması

Çalışmaya dahil edilen tüm olgulara ait aşağıdaki klinikopatolojik veriler Olgu Rapor Formu'na kaydedilmiştir:

- Yaş, cinsiyet, sigara öyküsü
- Lezyon lokalizasyonu
- Tümör evresi (pT), lenf nodu durumu (pN)
- WHO derecesi (low-grade/high-grade)
- İnvazyon derinliği (lamina propria, muskularis mukoza, muskularis propria tutulumu)
- Tümör boyutu
- Lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon varlığı
- Cerrahi sınır durumu
- Subtip varlığı
- Takip süresi, nüks durumu, progresyon durumu, metastaz durumu ve sağkalım durumu

3.10. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler GraphPad Prism istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler, sürekli değişkenler için ortalama ± standart sapma veya medyan (minimum-maksimum), kategorik değişkenler için sayı ve yüzde (%)

olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov veya Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirilmiştir.

Normal dağılım gösteren iki bağımsız grup arasındaki karşılaştırmalarda Student t testi, normal dağılım göstermeyen veriler için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İkiden fazla grubun karşılaştırılmasında, normal dağılım koşullarının sağlandığı durumlarda tek yönlü ANOVA (post hoc Tukey testi), normal dağılım sağlanmadığında ise Kruskal-Wallis testi (post hoc Bonferroni/Dunn's çoklu karşılaştırma testi) uygulanmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki-kare testi veya gerekli durumlarda Fisher'in kesin testi ile değerlendirilmiştir.

Sürekli değişkenler arasındaki ilişkiler, normal dağılım gösteren verilerde Pearson korelasyon analizi, normal dağılım göstermeyen verilerde Spearman korelasyon analizi ile incelenmiştir. Prognostik faktörlerin belirlenmesi amacıyla uygun durumlarda lojistik regresyon analizi yapılmıştır.

Çalışmanın primer sonlanım noktası, intratümöral ve peritümöral bölgelerdeki TIL yoğunluğu ile immün fenotipinin ($CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ lenfositler) patolojik evre ve diğer klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkisinin belirlenmesidir. Sekonder sonlanım noktaları ise TIL alt gruplarının klinik ve patolojik değişkenlerle olan ilişkisi ile immün hücre alt tiplerinin oranlarının (CD8/FOXP3 oranı, CD4/CD8 oranı) prognostik parametrelerle ilişkilerinin değerlendirilmesidir. Tüm istatistiksel analizlerde %95 güven aralığında çalışılmış olup $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan 98 olgu değerlendirmeye alınmıştır.

4.1. Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 98 olgunun demografik ve klinikopatolojik özellikleri Tablo 8'de özetlenmiştir. Olguların yaş ortalaması 58,9±8,5 (medyan 59,5; dağılım 41-85) olup kohort belirgin şekilde erkek baskınlığı göstermektedir (%86,7 erkek, %13,3 kadın). Olguların büyük çoğunluğu yüksek dereceli ürotelyal karsinom (%96,9) ve kas invaziv evrede (pT2-4: %91,8) tanı almıştır; pN durumu değerlendirildiğinde olguların %33,7'sinde (n=33) lenf nodu metastazı saptanmıştır. Lenfovasküler invazyon (LVI) olguların %57,1'inde, perinöral invazyon (PNI) ise %54,1'inde pozitif bulunmuştur. Subtip histoloji (%8,2) ve skuamöz diferansiasyon (%9,2) görece az sayıda olguda izlenmiştir.

Tablo 8: Olguların Demografik ve Klinikopatolojik Özellikleri (n=98)

Değişken	Kategori	n (%) / Ort±SS (medyan, min-maks)
Yaş	—	58,9±8,5 (medyan 59,5, 41-85)
Cinsiyet	Erkek / Kadın	85 (%86,7) / 13 (%13,3)
Sigara öyküsü	Var / Yok	8 (%8,2) / 90 (%91,8)
Tek/Multipl	Tek / Multipl	94 (%95,9) / 4 (%4,1)
Tümör boyutu (cm)	—	4,11±2,80 (medyan 3,50; 0,1-14,0)
CIS	Var / Yok	38 (%38,8) / 60 (%61,2)
DSÖ derecesi	Düşük dereceli / Yüksek derceli	3 (%3,1) / 95 (%96,9)
pT	1a/2a/2b/3/4	8(%8,2)/16(%16,3)/8(%8,2)/40(%40,8)/26(%26,5)
pN	0 / + (1+2+3 birleşik)	65 (%66,3) / 33 (%33,7)
M Evresi	M0 / M1	70 (%71,4) / 28 (%28,6)
LVI	Var / Yok	56 (%57,1) / 42 (%42,9)

Değişken	Kategori	n (%) / Ort±SS (medyan, min-maks)
PNI	Var / Yok	53 (%54,1) / 45 (%45,9)
Cerrahi sınır	İntakt / Tümörlü	95 (%96,9) / 3 (%3,1)
Tümör nekrozu	Var / Yok	24 (%24,5) / 74 (%75,5)
Subtip	Var / Yok	8 (%8,2) / 90 (%91,8)
Skuamöz diferansiasyon	Var / Yok	9 (%9,2) / 89 (%90,8)
Pozitif LN sayısı	—	1,07±2,03 (medyan 0,00; 0,00-9,00)
Ekstranodal yayılım (ENE)	Var / Yok	23 (%23,5) / 75 (%76,5)

Tablo 9'da olguların H&E kesitlerinde değerlendirilen genel TIL yoğunluğu ve TIL paterni dağılımı sunulmuştur. Olguların %48,0'i düşük, %27,6'sı orta ve %24,5'i yüksek genel TIL yoğunluğu göstermiştir. TIL paterni sınıflamasına göre olguların %39,8'i İnflamed, %32,7'si Excluded ve %27,6'sı Desert paterni olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 9: Olguların Tümörü İnfiltre Eden Lenfositlerin (TIL) İntratümöral (İT) ve Peritümöral (PT) Dağılımı (n=98)

Değişken	Kategori	n (%) / Ort±SS (medyan, min-maks)
TIL_Genel (H&E)	Düşük/Orta/Yüksek	47(%48,0)/27(%27,6)/24(%24,5)
TIL_IT (H&E)	—	165,20±92,13 (medyan 150; 15-350)
TIL_PT (H&E)	—	145,70±87,24 (medyan 120; 20-380)
TIL Paterni	İnflamed/Excluded/Desert	39(%39,8)/32(%32,7)/27(%27,6)

Olguların takip verileri Tablo 10'da sunulmuştur. Medyan takip süresi 24 ay (dağılım 1-168 ay) olarak hesaplanmıştır. Takip sürecinde 7 olguda (%7,1) nüks, 28 olguda (%28,6) metastaz/progresyon saptanmış; 63 olgu (%64,3) takip sonunda eksitus olmuştur. Medyan genel sağkalım (OS) 16,0 ay olarak bulunmuştur.

Tablo 10: Olguların Takip Verileri (n=98)

Değişken	Kategori	n (%) / Ort±SS (medyan, min-maks)
Takip süresi (ay)	—	35,72±33,29 (medyan 24; 1-168)
Nüks	Var / Yok	7 (%7,1) / 91 (%92,9)
Metastaz	Var / Yok	28 (%28,6) / 70 (%71,4)
Sağkalım	Eksitus / Sağ	63 (%64,3) / 35 (%35,7)
Genel Sağkalım (ay)	—	25,31±24,53 (medyan 16,0; 0,0-103)

$CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL yoğunlukları ile bunlardan türetilen oranların tanımlayıcı istatistikleri Tablo 11'de verilmiştir. Tüm parametreler sağa çarpık dağılım göstermektedir (ortalama değerlerin medyandan belirgin yüksek olması); özellikle $FOXP3^+$ hücre sayıları düşük ve değişken bulunmuş olup (medyan 1,00, maksimum 41,0-43,3), bu durum $FOXP3^+$ regülatör T hücre popülasyonunun olguların büyük kısmında seyrek, az sayıda olguda ise belirgin arttığını düşündürmektedir.

Tablo 11: $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL Yoğunlukları ile Oranlarının Tanımlayıcı İstatistikleri (n=98)

Parametre	Ortalama±SS	Medyan (min-maks)
$CD4^+$_IT	92,20±49,78	88,55 (6,0-194,6)
$CD4^+$_PT	86,22±50,09	80,40 (12,0-240,0)
$CD8^+$_IT	63,89±43,49	53,80 (3,0-170,0)
$CD8^+$_PT	53,29±40,50	38,30 (3,0-197,6)
$FOXP3^+$_IT	3,82±6,45	1,00 (0,0-41,0)
$FOXP3^+$_PT	2,70±5,53	1,00 (0,0-43,3)
$CD8^+$/$FOXP3^+$_IT	34,00±41,01	18,50 (0,0-250,0)
$CD8^+$/$FOXP3^+$_PT	25,46±31,73	12,50 (0,0-137)
$CD4^+$/$CD8^+$_IT	1,85±0,99	2,00 (0,00-5,00)
$CD4^+$/$CD8^+$_PT	2,06±1,38	2,00 (0,0-7,00)

Parametre	Ortalama±SS	Medyan (min-maks)
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	51,76±75,53	34,50 (0,0-637)
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	42,17±47,84	21,50 (0,0-193)

4.2. İntratümöral vs Peritümöral Karşılaştırma

$CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL yoğunluklarının intratümöral ve peritümöral bölgeler arasındaki dağılımı sonuçları Tablo 12'de sunulmuştur. $CD8^+$ TIL yoğunluğu intratümöral bölgede (medyan 53,80) peritümöral bölgeye göre (medyan 38,30) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0015). Benzer şekilde $FOXP3^+$ TIL yoğunluğu da intratümöral bölgede anlamlı şekilde daha yüksektir (p=0,0182). $CD4^+$ TIL yoğunluğu için intratümöral ve peritümöral bölgeler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,136). $CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$ ve $CD4^+/FOXP3^+$ oranları da IT ve PT bölgeler arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu bulgular, sitotoksik ($CD8^+$) ve regülatör ($FOXP3^+$) T hücre alt gruplarının tümör dokusu içine doğru tercihli bir birikim eğilimi gösterdiğini, buna karşın $CD4^+$ yardımcı T hücrelerinin her iki kompartmanda daha homojen dağıldığını ortaya koymaktadır.

Tablo 12: $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL Yoğunluklarının İntratümöral ve Peritümöral Bölgeler Arasında Karşılaştırılması (n=98)

Belirteç	İntratümöral [medyan (min-maks)]	Peritümöral [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$	88,55 (6,0 – 133,4)	80,40 (12,0 – 240)	0,136
$CD8^+$	53,80 (3,0 – 170,0)	38,30 (3,0 – 197,6)	0,0015
$FOXP3^+$	1,00 (0,0 – 41,0)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,0182
$CD8^+/FOXP3^+$	18,50 (0,0 – 250,0)	12,50 (0,0 – 137,0)	0,266
$CD4^+/CD8^+$	2,00 (0,0 – 5,00)	2,00 (0,0 – 7,0)	0,224
$CD4^+/FOXP3^+$	34,50 (0,0 – 637,0)	21,50 (0,0 – 193)	0,618

4.3. TIL Yoğunluğu/Oranlarının Demografik ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi

Cinsiyet ile $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 13'de sunulmuştur. Kadın olgularda $CD4^+$_IT (123,3 vs 86,80) ve $CD8^+$_IT (96,00 vs 50,00) yoğunlukları sayısal olarak erkek olgulara göre belirgin yüksek olmakla birlikte, küçük örneklem büyüklüğü (kadın n=13) nedeniyle bu farklar istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (sırasıyla p=0,090 ve p=0,089). Hiçbir TIL parametresinde cinsiyetle anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tablo 13: CD4, CD8, FOXP3 (IT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Cinsiyet ile İlişkisi

Parametre	Erkek (n=85) [medyan (min-maks)]	Kadın (n=13) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	86,80 (10,0 – 194,6)	123,3 (6,0 – 186,2)	0,090
$CD4^+$_PT	77,25 (12,0 – 240)	89,6 (36,6 – 169,4)	0,224
$CD8^+$_IT	50,00 (3,0 – 170,0)	96,00 (5,0 – 128,6)	0,089
$CD8^+$_PT	37,00 (3,0 – 145)	46,80 (15,2 – 197,6)	0,142
$FOXP3^+$_IT	1,00 (0,0 – 24,8)	1,00 (1,0 – 41,0)	0,412
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 24,0)	1,00 (1,0 – 43,3)	0,415
$CD8^+$/$FOXP3^+$_IT	18,00 (0,0 – 250,0)	38,00 (2,0 – 110,0)	0,137
$CD8^+$/$FOXP3^+$_PT	13,00 (0,0 – 137,0)	5,00 (0,0 – 123,0)	0,625
$CD4^+$/$CD8^+$_IT	2,00 (0,0 – 5,0)	1,00 (1,0 – 4,0)	0,487
$CD4^+$/$CD8^+$_PT	2,00 (0,0 – 7,0)	2,00 (1,0 – 3,0)	0,835
$CD4^+$/$FOXP3^+$_IT	33,00 (0,0 – 637,0)	58,00 (4,0 – 162)	0,150
$CD4^+$/$FOXP3^+$_PT	22,00 (0,0 – 193)	9,00 (0,0 – 119)	0,356

Sigara öyküsü ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 14'de sunulmuştur. Sigara içen olgularda (n=8) tüm $CD4^+$ ve $CD8^+$ yoğunlukları sayısal olarak daha düşük olma eğilimindedir; $CD8^+$/$FOXP3^+$_IT oranı sigara içenlerde (medyan 7,00) içmeyenlere göre

(medyan 19,50) sınırda anlamlılığa yaklaşan şekilde daha düşüktür (p=0,059). Ancak hiçbir parametrede istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşılmamıştır.

Tablo 14: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Sigara Öyküsü ile İlişkisi

Parametre	Sigara+ (n=8) [medyan (min-maks)]	Sigara– (n=90) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	63,30 (18,0 – 135)	92,10 (6,0 – 194,6)	0,179
$CD4^+$_PT	52,73 (22,0 – 150,6)	85,25 (12,0 – 240,0)	0,197
$CD8^+$_IT	34,60 (8,0 – 129,6)	56,60 (3,0 – 170,0)	0,200
$CD8^+$_PT	31,60 (10,0 – 110,0)	40,80 (3,0 – 197,6)	0,236
$FOXP3^+$_IT	2,00 (0,0 – 17,4)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,744
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 4,4)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,320
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	7,00 (0,0 – 39,0)	19,50 (0,0 – 250,0)	0,059
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	27,0 (0,0 – 43,0)	12,0 (0,0 – 137,0)	0,916
$CD4^+/CD8^+$_IT	2,00 (1,0 – 2,0)	2,00 (0,0 – 5,0)	0,824
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,50 (0,0 – 6,0)	2,00 (0,0 – 7,0)	0,835
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	11,00 (0,0 – 68,0)	35,50 (0,0 – 637,0)	0,077
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	40,00 (0,0 – 84,0)	19,50 (0,0 – 193,0)	0,751

DSÖ derecesi (düşük dereceli / yüksek dereceli) ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 15'de sunulmuştur. Peritümöral $CD4^+$ yoğunluğu düşük dereceli olgularda (medyan 128,60) high-grade olgulara göre (medyan 77,80) anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur (p=0,028). Buna karşılık intratümöral $FOXP3^+$ yüksek dereceli olgularda (medyan 1,00) düşük dereceli olgulara göre (medyan 0,00) anlamlı şekilde daha yüksektir (p=0,040). $CD4^+/FOXP3^+$_PT oranı da düşük dereceli grupta sınırda anlamlılığa yaklaşan şekilde yüksektir (p=0,051). Düşük dereceli grubun yalnızca 3 olgudan oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda, bu sonuçlar istatistiksel güç açısından sınırlı kabul edilmeli ve keşifsel düzeyde yorumlanmalıdır.

Tablo 15: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının DSÖ Derecesi ile İlişkisi

Parametre	Low-grade (n=3) [medyan (min-maks)]	High-grade (n=95) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	103,00 (43,2 – 170,8)	87,50 (6,0 – 194,6)	0,709
$CD4^+$_PT	128,60 (126,4 – 240,0)	77,80 (12,0 – 225,6)	0,028
$CD8^+$_IT	57,80 (14,0 – 60,4)	52,60 (3,0 – 170,0)	0,540
$CD8^+$_PT	60,00 (47,0 – 120,0)	37,80 (3,0 – 197,6)	0,178
$FOXP3^+$_IT	0,00 (0,0 – 1,0)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,040
$FOXP3^+$_PT	2,00 (1,0 – 3,0)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,467
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	0,00 (0,0 – 60,0)	19,00 (0,0 – 250,0)	0,287
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	40,00 (24,0 – 60,0)	12,00 (0,0 – 137,0)	0,127
$CD4^+/CD8^+$_IT	3,00 (2,0 – 3,0)	2,00 (0,0 – 5,0)	0,057
$CD4^+/CD8^+$_PT	2,00 (2,0 – 3,0)	2,00 (0,0 – 7,0)	0,446
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	0,00 (0,0 – 103,0)	35,00 (0,0 – 637,0)	0,326
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	80,00 (64,0 – 126,0)	20,00 (0,0 – 193,0)	0,051

Tümörün kas invazyon durumuna göre (pT1a kas invaziv olmayan vs pT2-4 kas invaziv) yapılan karşılaştırma Tablo 16'da sunulmuştur. Dikkat çekici şekilde, $CD4^+$_IT (p=0,035), $CD8^+$_IT (p=0,022) ve $FOXP3^+$_IT (p=0,018) yoğunlukları kas invaziv olmayan pT1a grubunda kas invaziv pT2-4 grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, çalışmanın başlangıç hipotezinde öngörülen "yüksek TIL = erken/iyi seyirli hastalık" varsayımının tam tersi yönündedir; tümör evresi ilerledikçe intratümöral immün hücre infiltrasyonunun azalmak yerine arttığı görülmektedir. Peritümöral parametrelerde ve oranlarda ($CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+/FOXP3^+$) pT grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 16: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının pT1 (Kas İnvaziv Olmayan) vs pT2-4 (Kas İnvaziv) Grupları Arasında Karşılaştırılması

Parametre	pT1a (n=8) [medyan (min-maks)]	pT2-4 (n=90) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	30,60 (6,0 – 162,2)	90,80 (10,0 – 194,6)	0,035
$CD4^+$_PT	109,1 (46,25 – 240,0)	78,00 (12,0 – 225,6)	0,186
$CD8^+$_IT	17,50 (5,00 – 110,0)	56,60 (3,0 – 170,0)	0,022
$CD8^+$_PT	40,20 (12,0 – 133,0)	38,30 (3,00 – 197,6)	0,767
$FOXP3^+$_IT	1,00 (0,0 – 1,0)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,018
$FOXP3^+$_PT	1,50 (0,0 – 9,6)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,965
$CD8^+$/$FOXP3^+$_IT	14,50 (0,0 – 110,0)	18,50 (0,0 – 250,0)	0,700
$CD8^+$/$FOXP3^+$_PT	5,00 (0,0 – 133,0)	13,00 (0,0 – 137,0)	0,450
$CD4^+$/$CD8^+$_IT	2,00 (1,0 – 3,0)	2,00 (0,0 – 5,0)	>0,999
$CD4^+$/$CD8^+$_PT	3,00 (1,0 – 4,0)	2,00 (0,0 – 7,0)	0,115
$CD4^+$/$FOXP3^+$_IT	13,50 (0,0 – 162,0)	35,00 (0,0 – 637,0)	0,621
$CD4^+$/$FOXP3^+$_PT	14,00 (0,0 – 193,0)	22,50 (0,0 – 158,0)	0,708

Kas invazyonu kazanımının ötesinde, evre ilerlemesinin TIL üzerine etkisini ayrıştırmak amacıyla kas invaziv olgular orta evre (pT2, n=24) ve gerçek ileri evre (pT3-4, n=66) olarak ayrıca karşılaştırıldı (Tablo 17). Hiçbir TIL yoğunluğu veya oranında iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (tüm p>0,05); medyan değerler büyük ölçüde örtüşmekteydi (örn. $CD8^+$_İT 56,60'a karşı 56,75; $CD4^+$/$CD8^+$_İT 1,54'e karşı 1,56). Üç evre grubunun (pT1a, pT2, pT3-4) birlikte ele alındığı analizde de hiçbir parametre istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (tüm p>0,05, en düşük p=0,060; Tablo 18). Bununla birlikte intratümöral $CD4^+$ ve $CD8^+$ yoğunluklarında belirgin bir örüntü dikkat çekmekteydi: artışın büyük bölümü pT1a→pT2 geçişinde gerçekleşmekte, pT2 sonrasında değerler platoya yaklaşmaktaydı ($CD8^+$_İT 17,50→56,60→56,75; $CD4^+$_İT 30,60→87,15→97,00). $FOXP3^+$_İT bu örüntüden ayrılarak asıl artışını pT3-4'te yapmakta (1,00→1,00→1,50), peritümöral $CD4^+$ yoğunluğu ise evre ilerledikçe kademeli biçimde azalmaktaydı (109,10→96,42→76,92). En

azından sitotoksik ve yardımcı T hücrelerinin intratümöral yoğunluğu açısından bu görünüm, immün infiltrasyondaki değişimin sürekli evre ilerlemesinden çok kas invazyonu eşiğinin kazanılmasına bağlı eşik-tipi bir geçiş olduğunu ve kohortumuzda bifazik örüntünün gerileyen kolunun gözlenmediğini düşündürmektedir. Ne var ki üç-gruplu karşılaştırmaların hiçbirinin anlamlılığa ulaşmaması ve özellikle pT1a grubunun küçük olması (n=8), bu örüntülerin yalnızca betimleyici düzeyde yorumlanmasını gerektirmektedir.

Tablo 17: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Orta Evre (pT2) vs İleri Evre (pT3-4) Grupları Arasında Karşılaştırılması (n=24 vs 66)

Parametre	pT2 (n=24) [medyan (min-maks)]	pT3-4 (n=66) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_İT	87,15 (20,0 – 170,8)	97,00 (10,0 – 194,6)	0,638
$CD4^+$_PT	96,42 (18,0 – 166,0)	76,92 (12,0 – 225,6)	0,333
$CD8^+$_İT	56,60 (8,0 – 170,0)	56,75 (3,0 – 166,4)	0,841
$CD8^+$_PT	37,50 (13,2 – 141,6)	39,30 (3,0 – 197,6)	0,877
$FOXP3^+$_İT	1,00 (0,0 – 24,8)	1,50 (0,0 – 41,0)	0,836
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 24,0)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,880
$CD8^+/FOXP3^+$_İT	16,60 (0,0 – 250,0)	19,60 (0,0 – 166,4)	0,271
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	12,32 (0,0 – 88,6)	13,07 (0,0 – 136,8)	0,825
$CD4^+/CD8^+$_İT	1,54 (0,5 – 5,1)	1,56 (0,2 – 4,6)	0,898
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,57 (0,0 – 6,5)	1,57 (0,5 – 7,0)	0,924
$CD4^+/FOXP3^+$_İT	29,02 (0,0 – 637,0)	35,55 (0,0 – 194,6)	0,254
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	24,92 (0,0 – 147,2)	22,33 (0,0 – 158,0)	0,898

Mann-Whitney U testi; anlamlılık sınırı p<0,05.

Tablo 18: İntratümöral ve Peritümöral TIL Parametrelerinin pT Evre Gruplarına Göre Dağılımı (pT1a vs pT2 vs pT3-4)

Parametre	pT1a (n=8) medyan	pT2 (n=24) medyan	pT3-4 (n=66) medyan	p (KW)
$CD4^+$_İT	30,60	87,15	97,00	0,101
$CD4^+$_PT	109,10	96,42	76,92	0,261
$CD8^+$_İT	17,50	56,60	56,75	0,075
$CD8^+$_PT	40,20	37,50	39,30	0,943

FOXP3⁺_İT	1,00	1,00	1,50	0,060
FOXP3⁺_PT	1,50	1,00	1,00	0,988
CD8⁺/FOXP3⁺_İT	14,70	16,60	19,60	0,498
CD8⁺/FOXP3⁺_PT	5,41	12,32	13,07	0,730
CD4⁺/CD8⁺_İT	1,74	1,54	1,56	0,949
CD4⁺/CD8⁺_PT	2,61	1,57	1,57	0,266
CD4⁺/FOXP3⁺_İT	13,45	29,02	35,55	0,455
CD4⁺/FOXP3⁺_PT	13,97	24,92	22,33	0,926

Kruskal-Wallis testi. Değerler medyandır. İntratümöral yoğunluklardaki artış pT1a→pT2 geçişinde yoğunlaşmakta, pT2 sonrası platoya ulaşmaktadır.

Lenf nodu durumu (pN0 vs pN+, pN1+pN2+pN3 birleştirilerek) ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 19'da sunulmuştur. Hiçbir parametrede pN durumu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (tüm p>0,05); tüm karşılaştırmalarda p değerleri 0,170 ile 0,904 arasında değişmektedir.

Tablo 19: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Lenf Nodu Durumu ile İlişkisi

Parametre	pN0 (n=65) [medyan (min-maks)]	pN+ (n=33) [medyan (min-maks)]	p
CD4⁺_IT	92,00 (6,0 – 188,6)	86,80 (10,0 – 194,6)	0,475
CD4⁺_PT	78,20 (12,0 – 240,0)	84,00 (12,4 – 169,4)	0,525
CD8⁺_IT	56,00 (3,0 – 170,0)	52,20 (5,0 – 140,5)	0,904
CD8⁺_PT	36,80 (3,0 – 145,0)	42,80 (3,0 – 197,6)	0,636
FOXP3⁺_IT	1,00 (0,0 – 20,8)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,794
FOXP3⁺_PT	1,00 (0,0 – 24,0)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,279
CD8⁺/FOXP3⁺_IT	18,00 (0,0 – 250,0)	20,00 (0,0 – 125,3)	0,334
CD8⁺/FOXP3⁺_PT	12,81 (0,0 – 133,0)	11,53 (0,0 – 136,8)	0,577
CD4⁺/CD8⁺_IT	1,56 (0,2 – 5,1)	1,62 (0,8 – 4,3)	0,851
CD4⁺/CD8⁺_PT	1,58 (0,0 – 7,0)	1,78 (0,7 – 6,7)	0,594
CD4⁺/FOXP3⁺_IT	33,00 (0,0 – 637,0)	44,80 (0,0 – 194,6)	0,170

Parametre	pN0 (n=65) [medyan (min-maks)]	pN+ (n=33) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	18,60 (0,0 – 192,8)	29,67 (0,0 – 158,0)	0,327

Lenfovasküler invazyon ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 20'de sunulmuştur. Hiçbir parametrede LVI durumu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (tüm p>0,05).

Tablo 20: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Lenfovasküler İnvazyon Durumu ile İlişkisi

Parametre	LVI+ (n=56) [medyan (min-maks)]	LVI– (n=42) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	79,30 (10,0 – 194,6)	93,90 (6,0 – 188,6)	0,991
$CD4^+$_PT	76,92 (12,0 – 225,6)	86,35 (12,8 – 240,0)	0,495
$CD8^+$_IT	47,20 (3,0 – 166,4)	59,10 (5,0 – 170,0)	0,462
$CD8^+$_PT	39,00 (3,0 – 145,0)	37,80 (3,0 – 197,6)	0,714
$FOXP3^+$_IT	1,00 (0,0 – 24,8)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,563
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 21,2)	1,50 (0,0 – 43,3)	0,227
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	18,75 (0,0 – 166,4)	18,22 (0,0 – 250,0)	0,926
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	13,80 (0,0 – 136,8)	9,58 (0,0 – 133,0)	0,845
$CD4^+/CD8^+$_IT	1,59 (0,2 – 4,3)	1,56 (0,5 – 5,1)	0,315
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,57 (0,5 – 7,0)	1,76 (0,0 – 6,5)	0,821
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	34,62 (0,0 – 194,6)	34,50 (0,0 – 637,0)	0,527
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	27,71 (0,0 – 158,0)	16,78 (0,0 – 192,8)	0,664

Perinöral invazyon ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 21'de sunulmuştur. Hiçbir parametrede istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır; $CD4^+/FOXP3^+$_PT oranı PNI

negatif olgularda (medyan 34,30) PNI pozitif olgulara göre (medyan 15,57) sayısal olarak yüksek olup sınırda anlamlılığa yaklaşmıştır (p=0,068).

Tablo 21: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Perinöral İnvazyon Durumu ile İlişkisi

Parametre	PNI+ (n=53) [medyan (min-maks)]	PNI– (n=45) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	87,50 (6,0 – 188,6)	89,60 (10,0 – 194,6)	0,450
$CD4^+$_PT	77,40 (12,0 – 240,0)	85,00 (15,0 – 225,6)	0,423
$CD8^+$_IT	56,00 (5,0 – 170,0)	52,20 (3,0 – 166,4)	0,946
$CD8^+$_PT	38,60 (3,0 – 143,2)	37,80 (3,0 – 197,6)	0,875
$FOXP3^+$_IT	1,00 (0,0 – 20,8)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,571
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 24,0)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,401
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	18,00 (0,0 – 250,0)	19,07 (0,0 – 166,4)	0,898
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	8,69 (0,0 – 136,8)	19,31 (0,0 – 123,0)	0,174
$CD4^+/CD8^+$_IT	1,52 (0,2 – 5,1)	1,64 (0,7 – 3,8)	0,533
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,53 (0,0 – 6,5)	1,85 (0,7 – 7,0)	0,329
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	28,00 (0,0 – 637,0)	35,80 (0,0 – 194,6)	0,458
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	15,57 (0,0 – 192,8)	34,30 (0,0 – 158,0)	0,068

Tümör nekrozu varlığı ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 22'de sunulmuştur. Hiçbir parametrede istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır; intratümöral $FOXP3^+$ yoğunluğu en düşük p değerine sahip olup (p=0,096) anlamlılığa ulaşmamıştır.

Tablo 22: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Tümör Nekrozu Durumu ile İlişkisi

Parametre	Nekroz+ (n=24) [medyan (min-maks)]	Nekroz– (n=74) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	97,90 (10,0 – 186,2)	87,15 (6,0 – 194,6)	0,846

Parametre	Nekroz+ (n=24) [medyan (min-maks)]	Nekroz– (n=74) [medyan (min-maks)]	p
CD4⁺_PT	89,95 (15,0 – 240,0)	77,33 (12,0 – 192,8)	0,319
CD8⁺_IT	56,40 (3,0 – 166,4)	52,40 (5,0 – 170,0)	0,980
CD8⁺_PT	45,70 (12,0 – 145,0)	37,40 (3,0 – 197,6)	0,166
FOXP3⁺_IT	1,00 (0,0 – 18,6)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,096
FOXP3⁺_PT	1,00 (0,0 – 9,4)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,553
CD8⁺/FOXP3⁺_IT	15,70 (0,0 – 166,4)	20,00 (0,0 – 250,0)	0,210
CD8⁺/FOXP3⁺_PT	25,05 (0,0 – 123,0)	9,77 (0,0 – 136,8)	0,194
CD4⁺/CD8⁺_IT	1,54 (0,7 – 3,8)	1,59 (0,2 – 5,1)	0,501
CD4⁺/CD8⁺_PT	1,47 (0,7 – 7,0)	1,82 (0,0 – 6,7)	0,406
CD4⁺/FOXP3⁺_IT	26,50 (0,0 – 173,4)	37,65 (0,0 – 637,0)	0,264
CD4⁺/FOXP3⁺_PT	34,65 (0,0 – 140,0)	18,77 (0,0 – 192,8)	0,258

Subtip ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 23'te sunulmuştur. Subtip içeren olgularda (n=8) peritümöral FOXP3⁺ yoğunluğu (medyan 0,00) içermeyen olgulara göre (medyan 1,00) anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur (p=0,021). Buna ek olarak, intratümöral CD4⁺/FOXP3⁺ oranı subtipli olgularda (medyan 55,67) anlamlı şekilde daha yüksektir (p=0,045). Subtip+ grubun yalnızca 8 olgudan oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda bu iki anlamlı bulgu keşifsel düzeyde değerlendirilmelidir.

Tablo 23: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) ve Oranlarının Subtip Histoloji ile İlişkisi

Parametre	Subtip+ (n=8) [medyan (min-maks)]	Subtip– (n=90) [medyan (min-maks)]	p
CD4⁺_IT	101,60 (49,0 – 173,4)	87,15 (6,0 – 194,6)	0,417
CD4⁺_PT	76,00 (17,6 – 225,6)	80,40 (12,0 – 240,0)	0,770
CD8⁺_IT	39,70 (15,0 – 166,4)	55,50 (3,0 – 170,0)	0,841
CD8⁺_PT	32,30 (7,0 – 145,0)	39,30 (3,0 – 197,6)	0,496

Parametre	Subtip+ (n=8) [medyan (min-maks)]	Subtip– (n=90) [medyan (min-maks)]	p
FOXP3⁺_IT	1,50 (1,0 – 4,0)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,893
FOXP3⁺_PT	0,00 (0,0 – 3,0)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,021
CD8⁺/FOXP3⁺_IT	20,00 (15,0 – 166,4)	17,69 (0,0 – 250,0)	0,270
CD8⁺/FOXP3⁺_PT	0,00 (0,0 – 136,8)	12,98 (0,0 – 133,0)	0,138
CD4⁺/CD8⁺_IT	2,40 (1,0 – 3,7)	1,56 (0,2 – 5,1)	0,171
CD4⁺/CD8⁺_PT	2,36 (1,1 – 4,0)	1,58 (0,0 – 7,0)	0,183
CD4⁺/FOXP3⁺_IT	55,67 (28,4 – 173,4)	32,40 (0,0 – 637,0)	0,045
CD4⁺/FOXP3⁺_PT	0,00 (0,0 – 152,4)	23,88 (0,0 – 192,8)	0,166

TIL paterni (İnflamed/Excluded/Desert) sınıflamasının kategorik klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi Tablo 24'te sunulmuştur. LVI varlığı ile TIL paterni arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,0059); Desert paterninde LVI pozitiflik oranı (%81,5), İnflamed (%53,8) ve Excluded (%40,6) paternlerine göre belirgin yüksektir. pN durumu ile ilişki sınırda anlamlılığa yaklaşmıştır (p=0,055); Desert paterninde pN+ oranı (%48,1) diğer paternlerden yüksektir. WHO derecesi ve PNI ile TIL paterni arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tablo 24: TIL Paterni (İnflamed/Excluded/Desert) ile Histopatolojik Parametrelerin İlişkisi

Parametre	İnflamed (n=39)	Excluded (n=32)	Desert (n=27)	p
WHO derecesi (Yüksek, n/%)	37 (%94,9)	31 (%96,9)	27 (%100)	0,493
LVI (+, n/%)	21 (%53,8)	13 (%40,6)	22 (%81,5)	0,0059
PNI (+, n/%)	22 (%56,4)	16 (%50,0)	15 (%55,6)	0,851
pN (+, n/%)	14 (%35,9)	6 (%18,8)	13 (%48,1)	0,055

TIL paterninin $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ yoğunlukları ile ilişkisi sonuçları Tablo 25'de sunulmuştur. $CD4^+$_İT, $CD4^+$_PT ve $CD8^+$_İT parametrelerinde üç patern grubu arasında çok güçlü anlamlı farklılıklar saptanmıştır (her üçü için $p<0,0001$); $CD8^+$_PT ($p=0,0006$) ve $FOXP3^+$_IT ($p=0,031$) için de anlamlı farklılık mevcuttur. Bonferroni düzeltmeli Dunn's post-hoc testi sonuçlarına göre: İnflamed paterndeki olgular hem $CD4^+$_İT hem $CD8^+$_İT açısından Excluded ve Desert paternlerine göre anlamlı şekilde daha yüksek değerlere sahiptir; buna karşılık $CD4^+$_PT açısından en yüksek değerler -tanımı gereği beklenen şekilde- Excluded paterninde izlenmektedir (Excluded vs Desert $p<0,0001$). Bu bulgular, TIL paterni sınıflamasının altta yatan gerçek hücresel yoğunlukları tutarlı şekilde yansıttığını doğrulamakta olup, esasen sınıflamanın kendi tanımından (intratümöral/peritümöral yoğunluk eşiklerine dayalı) beklenen bir iç-tutarlılık bulgusu niteliğindedir.

Tablo 25: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının TIL Paterni (İnflamed/Excluded/Desert) ile İlişkisi

Parametre	İnflamed (n=39) [medyan (min-maks)]	Excluded (n=32) [medyan (min-maks)]	Desert (n=27) [medyan (min-maks)]	p (KW)
$CD4^+$_IT	127,00 (25,0 – 194,6)	66,50 (6,0 – 173,4)	56,00 (10,0 – 190,0)	<0,0001
$CD4^+$_PT	89,60 (12,0 – 158,4)	103,65 (22,0 – 240,0)	46,00 (12,4 – 140,8)	<0,0001
$CD8^+$_IT	101,00 (15,0 – 170,0)	43,80 (5,0 – 166,4)	29,20 (3,0 – 94,4)	<0,0001
$CD8^+$_PT	47,00 (3,0 – 141,6)	54,80 (17,6 – 197,6)	29,00 (3,0 – 61,8)	0,0006
$FOXP3^+$_IT	2,00 (0,0 – 24,8)	1,00 (0,0 – 41,0)	1,00 (0,0 – 8,8)	0,031
$FOXP3^+$_PT	2,00 (0,0 – 9,4)	1,00 (0,0 – 43,3)	1,00 (0,0 – 4,0)	0,156
$CD8^+$/$FOXP3^+$_IT	36,33 (0,0 – 125,3)	17,69 (0,0 – 250,0)	17,00 (0,0 – 93,0)	0,116

Parametre	İnflamed (n=39) [medyan (min-maks)]	Excluded (n=32) [medyan (min-maks)]	Desert (n=27) [medyan (min-maks)]	p (KW)
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	12,81 (0,0 – 136,8)	30,70 (0,0 – 133,0)	10,65 (0,0 – 51,5)	0,496
$CD4^+/CD8^+$_IT	1,45 (0,2 – 3,5)	1,64 (0,6 – 5,1)	1,87 (0,8 – 4,6)	0,113
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,56 (0,5 – 7,0)	1,85 (0,0 – 4,4)	1,78 (0,6 – 6,7)	0,971
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	39,50 (0,0 – 194,6)	35,40 (0,0 – 637,0)	27,85 (0,0 – 190,0)	0,269
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	22,67 (0,0 – 152,4)	27,02 (0,0 – 192,8)	18,95 (0,0 – 107,0)	0,429

Anlamlı bulunan 5 parametre için Dunn's post-hoc testi (Bonferroni düzeltmeli) sonuçları aşağıda sunulmuştur (Tablo 26):

Tablo 26: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının TIL Paterni (İnflamed/Excluded/Desert) ile İlişkisi Dunn's post-hoc testi (Bonferroni düzeltmeli

Parametre	İnflamed vs Excluded	İnflamed vs Desert	Excluded vs Desert
$CD4^+$_IT	p=0,0001 (İ>E)	p<0,0001 (İ>D)	p=1,000 (fark yok)
$CD4^+$_PT	p=0,138 (fark yok)	p=0,0087 (İ>D)	p<0,0001 (E>D)
$CD8^+$_IT	p=0,0001 (İ>E)	p<0,0001 (İ>D)	p=0,856 (fark yok)
$CD8^+$_PT	p=0,570 (fark yok)	p=0,0198 (İ>D)	p=0,0004 (E>D)
$FOXP3^+$_IT	p=0,512 (fark yok)	p=0,0263 (İ>D)	p=0,623 (fark yok)

İ=İnflamed, E=Excluded, D=Desert.

4.4. TIL Parametrelerinin Prognostik Veriler ile İlişkisi

Nüks durumu ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 27'de sunulmuştur. İntratümöral $CD4^+$ yoğunluğu nüks gelişen olgularda (medyan 151,60) nüks gelişmeyen olgulara göre (medyan 84,40) anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0010). Bu sonuç, beklenen

yönün (yüksek TIL = düşük nüks riski) tam tersine işaret etmekte ve Tablo 16'daki pT evresi ile ilişkili bulguyla tutarlı bir örüntü oluşturmaktadır; ileri evre/agresif tümörlerde hem $CD4^+$_İT yoğunluğunun hem de nüks riskinin birlikte arttığı izlenmektedir. $CD4^+/FOXP3^+$_İT oranı da nüks gelişen olgularda sınırda anlamlılığa yaklaşan şekilde yüksektir (p=0,084). Diğer parametrelerde anlamlı ilişki saptanmamıştır. Nüks grubunun yalnızca 7 olgudan oluştuğu göz önünde bulundurulmalı, bu bulgular düşük istatistiksel güçle sınırlı kabul edilmelidir.

Tablo 27: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Nüks Durumu ile İlişkisi (n=7 vs 91)

Parametre	Nüks+ (n=7) [medyan (min-maks)]	Nüks– (n=91) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	151,60 (115,0 – 190,0)	84,40 (6,0 – 194,6)	0,0010
$CD4^+$_PT	77,80 (12,8 – 140,8)	82,60 (12,0 – 240,0)	0,777
$CD8^+$_IT	92,00 (45,0 – 116,4)	52,20 (3,0 – 170,0)	0,164
$CD8^+$_PT	23,00 (3,0 – 92,2)	38,60 (3,0 – 197,6)	0,236
$FOXP3^+$_IT	2,00 (1,0 – 14,2)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,320
$FOXP3^+$_PT	3,00 (0,0 – 7,2)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,245
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	50,40 (6,5 – 93,0)	18,00 (0,0 – 250,0)	0,288
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	12,81 (0,0 – 64,2)	11,53 (0,0 – 136,8)	0,718
$CD4^+/CD8^+$_IT	2,04 (1,3 – 3,5)	1,56 (0,2 – 5,1)	0,183
$CD4^+/CD8^+$_PT	2,39 (1,1 – 7,0)	1,58 (0,0 – 6,7)	0,159
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	75,80 (13,2 – 190,0)	33,95 (0,0 – 637,0)	0,084
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	13,86 (0,0 – 140,0)	22,00 (0,0 – 192,8)	1,000

Metastaz/progresyon durumu ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 28'de sunulmuştur. Hiçbir parametrede istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır; peritümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı metastazlı olgularda (medyan 1,92) metastazsız olgulara göre (medyan 1,47) sayısal olarak yüksek olup sınırda anlamlılığa yaklaşmıştır (p=0,062).

Tablo 28: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Metastaz Durumu ile İlişkisi (n=28 vs 70)

Parametre	Met+ (n=28) [medyan (min-maks)]	Met– (n=70) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	94,40 (18,0 – 190,0)	88,55 (6,0 – 194,6)	0,504
$CD4^+$_PT	77,20 (12,4 – 153,2)	84,50 (12,0 – 240,0)	0,601
$CD8^+$_IT	57,85 (7,0 – 116,4)	53,80 (3,0 – 170,0)	0,640
$CD8^+$_PT	39,30 (3,0 – 120,0)	38,30 (3,0 – 197,6)	0,301
$FOXP3^+$_IT	1,50 (0,0 – 19,2)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,877
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 9,3)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,987
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	15,20 (0,0 – 93,0)	19,75 (0,0 – 250,0)	0,185
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	13,54 (0,0 – 120,0)	11,52 (0,0 – 136,8)	0,579
$CD4^+/CD8^+$_IT	1,63 (0,9 – 4,6)	1,54 (0,2 – 5,1)	0,162
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,92 (0,7 – 6,7)	1,47 (0,0 – 7,0)	0,062
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	29,90 (0,0 – 190,0)	37,65 (0,0 – 637,0)	0,361
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	31,40 (0,0 – 153,2)	19,97 (0,0 – 192,8)	0,384

Sağkalım durumu (eksitus vs sağ) ile TIL parametreleri arasındaki ilişki Tablo 29'da sunulmuştur. İntratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı eksitus olan olgularda (medyan 1,65) sağ kalan olgulara göre (medyan 1,30) sınırda anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0499). Bu bulgu, ileride sunulacak çok değişkenli Cox regresyon analizinde (Tablo 33) bağımsız prognostik faktör olarak da doğrulanmıştır. Diğer parametrelerde anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Tablo 29: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Sağkalım ile İlişkisi (n=63 vs 35)

Parametre	Eksitus (n=63) [medyan (min-maks)]	Sağ (n=35) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_IT	102,00 (10,0 – 194,6)	86,80 (6,0 – 170,8)	0,120

Parametre	Eksitus (n=63) [medyan (min-maks)]	Sağ (n=35) [medyan (min-maks)]	p
$CD4^+$_PT	77,40 (12,0 – 225,6)	87,20 (18,0 – 240,0)	0,315
$CD8^+$_IT	58,50 (3,0 – 166,4)	50,00 (5,0 – 170,0)	0,838
$CD8^+$_PT	37,80 (3,0 – 145,0)	42,60 (3,0 – 197,6)	0,273
$FOXP3^+$_IT	1,00 (0,0 – 19,2)	1,00 (0,0 – 41,0)	0,752
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,0 – 9,4)	1,00 (0,0 – 43,3)	0,133
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	18,00 (0,0 – 166,4)	19,70 (0,0 – 250,0)	0,651
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	13,33 (0,0 – 123,0)	10,65 (0,0 – 136,8)	0,958
$CD4^+/CD8^+$_IT	1,65 (0,2 – 4,6)	1,30 (0,5 – 5,1)	0,0499
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,67 (0,5 – 7,0)	1,56 (0,0 – 6,7)	0,625
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	35,80 (0,0 – 194,6)	23,05 (0,0 – 637,0)	0,253
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	28,50 (0,0 – 158,0)	18,60 (0,0 – 192,8)	0,955

Yaş, tümör boyutu, takip süresi ve OS ile TIL parametreleri arasındaki ilişkiler korelasyon analizi ile değerlendirilmiş, sonuçlar Tablo 30'da sunulmuştur. Tümör boyutu arttıkça peritümöral $CD4^+$ yoğunluğunun (r=-0,29, p=0,004), peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranının (r=-0,20, p=0,047) ve peritümöral $CD4^+/FOXP3^+$ oranının (r=-0,26, p=0,011) anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu örüntü, büyük tümörlerde peritümöral bölgedeki immün hücre infiltrasyonunun -özellikle $FOXP3^+$ alt grubuna göre normalize edilen oranların- zayıfladığını düşündürmektedir. Ayrıca peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı, genel sağkalım süresiyle zayıf-orta düzeyde ancak anlamlı pozitif korelasyon göstermiştir (r=0,21, p=0,041); bu bulgu, yüksek $CD8^+/FOXP3^+$ oranının daha uzun sağkalımla ilişkili olabileceği yönündeki çalışma hipotezini destekler niteliktedir. Yaş ve takip süresi ile hiçbir TIL parametresi arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

Tablo 30: Yaş, Tümör Boyutu, Takip Süresi ve OS ile TIL Parametreleri Arasındaki Korelasyon (Spearman)

Parametre	Yaş	Tümör boyutu (cm)	Takip (ay)	OS (ay)
$CD4^+$_IT	r=-0,01 p=0,938	r=-0,12 p=0,254	r=-0,11 p=0,268	r=0,00 p=0,976
$CD4^+$_PT	r=-0,07 p=0,509	r=-0,29 p=0,004	r=-0,03 p=0,744	r=0,11 p=0,282
$CD8^+$_IT	r=0,09 p=0,353	r=-0,11 p=0,275	r=-0,03 p=0,785	r=0,06 p=0,546
$CD8^+$_PT	r=0,04 p=0,678	r=-0,16 p=0,111	r=0,10 p=0,313	r=0,17 p=0,086
$FOXP3^+$_IT	r=0,17 p=0,094	r=-0,09 p=0,364	r=-0,09 p=0,362	r=-0,08 p=0,448
$FOXP3^+$_PT	r=-0,09 p=0,352	r=-0,14 p=0,173	r=-0,09 p=0,369	r=-0,09 p=0,402
$CD8^+$/$FOXP3^+$_IT	r=0,05 p=0,629	r=-0,05 p=0,596	r=0,02 p=0,837	r=0,10 p=0,338
$CD8^+$/$FOXP3^+$_PT	r=-0,04 p=0,711	r=-0,20 p=0,047	r=0,09 p=0,370	r=0,21 p=0,041
$CD4^+$/$CD8^+$_IT	r=-0,09 p=0,381	r=0,16 p=0,120	r=-0,14 p=0,181	r=-0,19 p=0,058
$CD4^+$/$CD8^+$_PT	r=-0,18 p=0,071	r=-0,07 p=0,470	r=-0,15 p=0,142	r=-0,08 p=0,444
$CD4^+$/$FOXP3^+$_IT	r=0,01 p=0,888	r=0,01 p=0,942	r=-0,04 p=0,687	r=0,06 p=0,581
$CD4^+$/$FOXP3^+$_PT	r=-0,11 p=0,274	r=-0,26 p=0,011	r=0,04 p=0,671	r=0,18 p=0,076

TIL paterninin nüks, sağkalım ve metastaz durumu ile ilişkisi Tablo 31'de sunulmuştur. Nüks oranı TIL paternleri arasında anlamlı farklılık göstermiştir (p=0,031); nüks olgularının büyük çoğunluğu (6/7) İnflamed paterninde yer almaktadır. Bu sonuç, hipotezde öngörülen "İnflamed = iyi seyirli" varsayımıyla doğrudan çelişmekte olup, Tablo 16 ve Tablo 27'deki $CD4^+$_İT bulgularıyla birlikte değerlendirildiğinde tutarlı bir örüntünün parçasıdır: bu kohortta yüksek intratümöral T hücre infiltrasyonu (ve buna bağlı İnflamed sınıflaması), beklenenin aksine daha kötü değil daha sık nüks ile ilişkilenmektedir. Sağkalım durumu da TIL paterni ile anlamlı ilişki göstermiştir (p=0,041); eksitus oranı en yüksek İnflamed paterninde (%74,4), en düşük ise Excluded paterninde (%46,9) izlenmiştir. Metastaz durumu ile TIL paterni arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,279).

Tablo 31: TIL Paterni (İnflamed/Excluded/Desert) ile Prognostik Parametrelerin İlişkisi

Parametre	İnflamed (n=39)	Excluded (n=32)	Desert (n=27)	p
Nüks (+, n/%)	6 (%15,4)	0 (%0)	1 (%3,7)	0,031
Sağkalım (Eks, n/%)	29 (%74,4)	15 (%46,9)	19 (%70,4)	0,041
Metastaz (+, n/%)	12 (%30,8)	6 (%18,8)	10 (%37,0)	0,279

4.5. Genel Sağkalım (OS) Analizleri

TIL parametrelerinin OS üzerindeki etkisi, her parametre için kohort medyanının eşik (cut-off) olarak alındığı medyan-split yöntemiyle Kaplan-Meier analizi ve Log-rank testi kullanılarak değerlendirilmiş, sonuçlar Tablo 32'de sunulmuştur (n olay=63). İntratümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı medyanın üzerinde olan olgularda medyan OS 30 ay iken, medyanın altında olan olgularda 16 ay olarak hesaplanmış; bu fark sınırda anlamlılığa ulaşmıştır (p=0,052). Bu bulgu, Tablo 30'daki korelasyon analizi sonucuyla birlikte değerlendirildiğinde, çalışmanın temel hipotezini (yüksek $CD8^+/FOXP3^+$ oranının daha iyi prognozla ilişkili olduğu) destekleyen en güçlü sinyali oluşturmaktadır. TIL paterni (3 grup) için de sınırda anlamlılık izlenmiştir (p=0,092). Diğer parametrelerde ($CD4^+$_İT, $CD4^+$_PT, $CD8^+$_İT, $CD8^+$_PT, $FOXP3^+$_İT, $FOXP3^+$_PT, $CD4^+/CD8^+$_İT, $CD4^+/CD8^+$_PT, $CD4^+/FOXP3^+$_İT, $CD4^+/FOXP3^+$_PT) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 32: TIL Parametrelerine Göre (Medyan Eşik) Kaplan-Meier OS Analizi (n olay=63)

Parametre	Medyan OS Yüksek grup	Medyan OS Düşük grup	Log-rank p
$CD4^+$_IT	17 ay	20 ay	0,684
$CD4^+$_PT	23 ay	17 ay	0,293
$CD8^+$_IT	22 ay	17 ay	0,999
$CD8^+$_PT	22 ay	17 ay	0,603
$FOXP3^+$_IT	19 ay	18 ay	0,423
$FOXP3^+$_PT	22 ay	17 ay	0,447
$CD8^+/FOXP3^+$_IT	30 ay	16 ay	0,052
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	23 ay	17 ay	0,500
$CD4^+/CD8^+$_IT	15 ay	26 ay	0,129
$CD4^+/CD8^+$_PT	19 ay	18 ay	0,833
$CD4^+/FOXP3^+$_IT	17 ay	19 ay	0,987
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	22 ay	17 ay	0,977
TIL Paterni (3 grup)	—	—	0,092

"Yüksek grup" ve "Düşük grup" tanımı: Her parametre için olguların kendi medyan değeri eşik (cut-off) olarak alınmış; medyan değerin üzerinde veya eşit olan olgular "Yüksek" grubu, medyan değerin altında kalan olgular ise "Düşük" grubu oluşturmaktadır. Her iki grup için Kaplan-Meier yöntemiyle medyan genel sağkalım (OS) süresi (ay) hesaplanmış ve iki grubun sağkalım eğrileri Log-rank testi ile karşılaştırılmıştır.

Genel sağkalımın bağımsız prognostik faktörlerini belirlemek amacıyla Cox orantısal hazard regresyon analizi yapılmış, sonuçlar Tablo 33'de sunulmuştur. Tek değişkenli analizde yaş (HR=1,043, p=0,016), pN durumu (HR=1,698, p=0,039) ve LVI varlığı (HR=2,439, p=0,0015) genel sağkalım için anlamlı risk faktörleri olarak belirlenmiştir; PNI varlığı (p=0,071) ve peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı (p=0,096) sınırda anlamlılığa yaklaşmıştır. Klinik temelli Model A'da (yaş, pT, pN, LVI, $CD4^+/CD8^+$_İT) yaş (HR=1,058, p=0,0025), LVI varlığı (HR=2,324, p=0,0087) ve intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı (HR=1,312, p=0,0448)

genel sağkalım için bağımsız prognostik faktörler olarak saptanmıştır. $CD4^+/CD8^+$_İT oranındaki her 1 birimlik artış, ölüm riskinde %31 artışla ilişkilendirilmiştir; bu sonuç, $CD8^+$ baskınlığının (düşük CD4/CD8 oranı) daha iyi sağkalımla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. PNI ve peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranının dahil edildiği istatistiksel seçime dayalı Model B'de ise $CD4^+/CD8^+$_İT oranının bağımsız anlamlılığı kaybolmuştur (p=0,122); bu durum, sonucun modele dahil edilen kovaryatlara duyarlı olduğunu ve örneklem büyüklüğü (n olay=63) ile değişken sayısı dengesinin sınırlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 33: Genel Sağkalımın (OS, n olay=63) Cox Regresyon Analizi

Tek Değişken	HR (%95 GA)	p
Yaş	1,043 (1,008-1,079)	0,016
pT (≥T2 vs T1)	3,703 (0,903-15,185)	0,069
pN (+ vs 0)	1,698 (1,026-2,811)	0,039
LVI (+ vs –)	2,439 (1,405-4,233)	0,0015
PNI (+ vs –)	0,632 (0,384-1,040)	0,071
CD4/CD8_IT	1,226 (0,955-1,575)	0,110
CD8/FOXP3_PT	0,993 (0,985-1,001)	0,096

Çok değişkenli; Model A (klinik temelli: yaş, pT, pN, LVI, CD4/CD8_IT)

Değişken	HR (%95 GA)	p
Yaş	1,058 (1,020-1,097)	0,0025
pT (≥T2 vs T1)	2,714 (0,657-11,210)	0,168
pN (+ vs 0)	1,217 (0,684-2,166)	0,503
LVI (+ vs –)	2,324 (1,238-4,362)	0,0087
CD4/CD8_IT	1,312 (1,006-1,710)	0,0448

Çok değişkenli; Model B (PNI ve CD8/FOXP3_PT dahil, p<0,20)

Değişken	HR (%95 GA)	p
Yaş	1,059 (1,020-1,099)	0,0027
pT (≥T2 vs T1)	2,489 (0,582-10,638)	0,219
pN (+ vs 0)	1,310 (0,721-2,381)	0,376
LVI (+ vs –)	2,009 (0,990-4,078)	0,053
PNI (+ vs –)	0,800 (0,440-1,454)	0,464
CD8/FOXP3_PT	0,995 (0,986-1,005)	0,343
CD4/CD8_IT	1,253 (0,941-1,668)	0,122

4.6. Neoadjuvan/Preoperatif Tedavi Durumunun TIL Parametreleri Üzerine Etkisi (Duyarlılık Analizi)

Her türlü preoperatif tedavi öyküsü bulunan olgularla (n=44) hiç tedavi almamış olgular (n=54) karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki tek anlamlı fark $CD4^+$ kompartmanındadır: peritümöral $CD4^+$ TIL yoğunluğu tedavi alan grupta anlamlı olarak daha düşüktür (medyan 75,90'a karşı 93,05; p=0,041) ve intratümöral $CD4^+$ yoğunlukta da aynı yönde sınırda bir fark izlenir (p=0,050, Tablo 34). Buna karşılık $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ yoğunlukları, $CD8^+/FOXP3^+$ ve $CD4^+/CD8^+$ oranları ile çalışmamızda bağımsız prognostik değer taşıyan intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı iki grup arasında anlamlı farklılık göstermez (tüm p>0,05). TIL paterni dağılımı da tedavi durumundan etkilenmemiştir (p=0,343, Tablo 35).

Tablo 34: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Neoadjuvan/Preoperatif Tedavi Durumu ile İlişkisi (n=44 vs 54)

Parametre	Tedavi (+) (n=44) [medyan (min–maks)]	Tedavi (–) (n=54) [medyan (min–maks)]	p
$CD4^+$_İT	71,90 (6,00 – 186,20)	102,50 (10,00 – 194,60)	**0,050**
$CD4^+$_PT	75,90 (12,00 – 169,40)	93,05 (12,75 – 240,00)	0,041

$CD8^+$_İT	44,80 (3,00 – 125,20)	58,15 (5,00 – 170,00)	0,119
$CD8^+$_PT	36,00 (3,00 – 197,60)	42,70 (3,00 – 145,00)	0,449
$FOXP3^+$_İT	1,00 (0,00 – 41,00)	1,00 (0,00 – 24,80)	0,449
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,00 – 43,30)	1,00 (0,00 – 9,30)	0,848
$CD8^+/FOXP3^+$_İT	14,11 (0,00 – 250,00)	19,90 (0,00 – 166,40)	0,114
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	7,42 (0,00 – 123,00)	18,78 (0,00 – 136,80)	0,191
$CD4^+/CD8^+$_İT	1,54 (0,24 – 4,28)	1,63 (0,51 – 5,11)	0,705
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,54 (0,00 – 6,67)	1,72 (0,68 – 7,00)	0,190
$CD4^+/FOXP3^+$_İT	26,43 (0,00 – 637,00)	38,40 (0,00 – 194,60)	0,067
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	15,55 (0,00 – 137,00)	32,72 (0,00 – 192,80)	0,097

Mann-Whitney U testi; anlamlılık sınırı p<0,05. Tedavi (+) grubu sistemik kemoterapi ve intravezikal BCG/diğer ajanları birlikte içerir.

Tablo 35: TIL Paterninin Neoadjuvan/Preoperatif Tedavi Durumuna Göre Dağılımı

TIL Paterni	Tedavi (+) (n=44) n (%)	Tedavi (–) (n=54) n (%)	p
Inflamed	14 (%31,8)	25 (%46,3)	0,343
Excluded	16 (%36,4)	16 (%29,6)	
Desert	14 (%31,8)	13 (%24,1)	

Ki-kare testi.

Karıştırıcı etkiyi daha net ortaya koymak amacıyla, yalnızca sistemik platin bazlı NAK alan olgular (n=32) tümüyle tedavi-naif olgularla (n=54) karşılaştırıldı; intravezikal tedavi alan olgular buradaki analizin dışında bırakıldı. Bu daha katı tanımla da tek anlamlı fark $CD4^+$ kompartmanında izlendi: intratümöral $CD4^+$ TIL yoğunluğu NAK grubunda anlamlı olarak daha düşüktü (medyan 70,10'a karşı 102,50; p=0,035). $CD8^+$ ve $FOXP3^+$

yoğunlukları, $CD8^+/FOXP3^+$ ve $CD4^+/CD8^+$ oranları ile bağımsız prognostik intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı yine anlamlı farklılık göstermedi (tüm p>0,05, Tablo 36); TIL paterni dağılımı da farksızdı (p=0,125, Tablo 37). Her iki tanımda da elde edilen ortak sonuç, neoadjuvan tedavinin ölçülebilir etkisinin $CD4^+$ kompartmanıyla sınırlı kaldığı, çalışmamızın temel prognostik göstergelerinin ise tedavi durumundan bağımsız olduğudur.

Tablo 36: CD4, CD8, FOXP3 (İT/PT) TIL Yoğunluk ve Oranlarının Sistemik Neoadjuvan Kemoterapi (NAK) Durumu ile İlişkisi (n=32 vs 54)

Parametre	Sistemik NAK (+) (n=32) [medyan (min–maks)]	Tedavi-naif (n=54) [medyan (min–maks)]	p
$CD4^+$_İT	70,10 (6,00 – 158,00)	102,50 (10,00 – 194,60)	**0,035**
$CD4^+$_PT	77,40 (12,00 – 169,40)	93,05 (12,75 – 240,00)	0,170
$CD8^+$_İT	47,40 (3,00 – 125,20)	58,15 (5,00 – 170,00)	0,133
$CD8^+$_PT	36,90 (12,00 – 197,60)	42,70 (3,00 – 145,00)	0,886
$FOXP3^+$_İT	1,00 (0,00 – 41,00)	1,00 (0,00 – 24,80)	0,649
$FOXP3^+$_PT	1,00 (0,00 – 43,30)	1,00 (0,00 – 9,30)	0,956
$CD8^+/FOXP3^+$_İT	14,11 (0,00 – 250,00)	19,90 (0,00 – 166,40)	0,155
$CD8^+/FOXP3^+$_PT	7,42 (0,00 – 120,00)	18,78 (0,00 – 136,80)	0,234
$CD4^+/CD8^+$_İT	1,46 (0,24 – 3,79)	1,63 (0,51 – 5,11)	0,514
$CD4^+/CD8^+$_PT	1,42 (0,00 – 3,85)	1,72 (0,68 – 7,00)	0,064
$CD4^+/FOXP3^+$_İT	23,05 (0,00 – 637,00)	38,40 (0,00 – 194,60)	0,068
$CD4^+/FOXP3^+$_PT	9,25 (0,00 – 137,00)	32,72 (0,00 – 192,80)	0,115

Mann-Whitney U testi; anlamlılık sınırı p<0,05. NAK grubu yalnızca sistemik platin bazlı kemoterapi (Gemsitabin/Sisplatin/Karboplatin/Paklitaksel) alan olguları içerir; yalnız intravezikal BCG/diğer ajan alan 12 olgu bu analizden dışlanmıştır.

Tablo 37: TIL Paterninin Sistemik NAK Durumuna Göre Dağılımı

TIL Paterni	Sistemik NAK (+) (n=32) n (%)	Tedavi-naif (n=54) n (%)	p
Inflamed	8 (%25,0)	25 (%46,3)	0,125
Excluded	15 (%46,9)	16 (%29,6)	
Desert	9 (%28,1)	13 (%24,1)	

Ki-kare testi.

5. TARTIŞMA

5.1. Bulguların Genel Değerlendirmesi

Bu çalışmada, kas invaziv ağırlıklı (%91,8 pT2-4) ve büyük çoğunlukla yüksek dereceli (%96,9) 98 mesane ürotelyal karsinom olgusunda $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ TIL'lerin intratümöral ve peritümöral kompartmanlardaki dağılımı ile bunlardan türetilen oranların ($CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+/FOXP3^+$) klinikopatolojik parametreler ve sağkalımla ilişkisi araştırıldı. Medyan 24 aylık takipte olguların %64,3'ü kaybedildi; medyan genel sağkalım 16 ay olarak hesaplandı.

En dikkat çekici bulgu, başlangıç hipotezinin ("yüksek TIL = iyi prognoz, erken evre hastalık") sistematik olarak doğrulanmamasıdır. Aksine $CD4^+$_İT, $CD8^+$_İT ve $FOXP3^+$_İT yoğunlukları kas invaziv olmayan (pT1a) olgularda kas invaziv (pT2-4) olgulardan anlamlı derecede düşüktü; nüks gelişenlerde ise $CD4^+$_İT yoğunluğu anlamlı şekilde yüksekti. Aynı yönde, TIL paterninde "*Inflamed*" grup (klasik immün-onkoloji beklentisinin tersine) hem en yüksek nüks hem de en yüksek eksitus oranıyla ilişkiliydi; en düşük eksitus oranı "*Excluded*" paterninde görüldü.

Hipotezi destekleyen en tutarlı sinyal ise mutlak hücre yoğunluklarından değil, sitotoksik/regülatör T hücre dengesini yansıtan oranlardan geldi. Peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı genel sağkalımla zayıf-orta düzeyde pozitif korelasyon gösterdi, intratümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı medyan eşiğine göre ayrılan gruplar arasında sınırda anlamlı bir sağkalım farkı yarattı ve en önemlisi, çok değişkenli Cox analizinde intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı yaş ve LVI ile birlikte genel sağkalım için bağımsız bir prognostik faktör olarak belirlendi; oranın artması ($CD8^+$ baskınlığının azalması) ölüm riskini yükseltti. Buna karşın $CD4^+$ dışındaki tek tek belirteçlerin ($CD8^+$, $FOXP3^+$) mutlak değerleri hemen hiçbir sağkalım sonlanımıyla anlamlı ilişki vermedi (evre ve derece dışında).

Aşağıda bu bulgular sırasıyla (i) İT-PT dağılım farkı ve periferik kan kompartmanıyla ilişkisi, (ii) TIL yoğunluğu ile tümör evresi/invazyonu arasındaki ters yönlü ilişki, (iii) TIL paterninin prognostik paradoksu ve olası hücreler-arası mekanizması, (iv) CD8/FOXP3 ve CD4/CD8 oranlarının bağımsız prognostik değeri, (v) diğer klinikopatolojik ilişkiler ve (vi) yöntemsel hususlar başlıkları altında güncel literatürle karşılaştırmalı olarak ele alınmaktadır.

5.2. İntratümöral-Peritümöral Dağılım Farkı

Çalışmamızda $CD8^+$ (p=0,0015) ve $FOXP3^+$ (p=0,0182) yoğunlukları intratümöral bölgede peritümörale göre anlamlı derecede yüksekti; $CD4^+$ ise iki kompartman arasında anlamlı fark göstermedi (p=0,136). Bu örüntü, sitotoksik ve regülatör T hücre alt gruplarının tümör epiteli içine doğru tercihli bir birikim eğiliminde olduğunu, $CD4^+$ yardımcı T hücrelerinin ise her iki kompartmanda daha homojen dağıldığını düşündürür.

Bu bulgu, TIL'lerin mekânsal dağılımının mutlak yoğunluktan bağımsız prognostik bilgi taşıdığını gösteren çalışmalarla uyumludur. Drachneris ve ark., BCG immünoterapisi alan non-musküler invaziv papiller ürotelyal karsinom hastalarında $CD8^+$ hücrelerin epitel veya stroma kompartmanlarındaki mutlak yoğunluğunun herhangi bir prognostik etki göstermediğini, buna karşın epitel–stroma ara yüzü boyunca hesaplanan $CD8^+$ yoğunluk gradient'inin (*center of mass* ve *immunodrop*) nüks-serbest sağkalım için bağımsız prognostik değer taşıdığını bulmuştur.[57] de Andrea ve ark. da atezolizumabla tedavi edilen ileri evre ürotelyal karsinom olgularında CD8, PD-1, TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonunu tümör, stroma ve tüm doku kompartmanlarında ayrı ayrı çoklu kantitatif immünofloresan ile değerlendirmiş ve yanıtla ilişkinin kompartmana özgü olduğunu göstermiştir.[58] Chen ve ark. ise üst üriner yol ürotelyal karsinomunda $PD\text{-}L1^+$ immün hücreler, stromal $PD\text{-}1^+$ TIL'ler ve intratümöral $CD8^+$ TIL'lerin birbirinden farklı kompartmanlarda yer aldığını ve bunları birleştiren bir sınıflayıcının sağkalımı öngördüğünü ortaya koymuştur.[59] Bu çalışmaların ortak mesajı, İT/PT ayrımının teknik bir ayrıntı değil, biyolojik olarak farklı iki mikroçevreyi (tümör epiteli içi vs. çevresi) yansıttığıdır.[41,60,61]

Öte yandan Uluslararası TIL Çalışma Grubu'nun standardizasyon önerilerinde, tekrarlanabilirlik kaygısıyla stromal TIL değerlendirmesi önceliklendirilmekte, intratümöral değerlendirmenin daha güç tekrarlanabilir olduğu belirtilmektedir.[62] Bu açıdan hem İT hem PT kompartmanların ayrı ayrı ve sistematik değerlendirilmiş olması çalışmamızın metodolojik bir gücüdür; ancak intratümöral sayımların gözlemciler arası değişkenliğe daha açık olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Bu kompartman temasını periferik dolaşıma taşıyan veriler de mevcuttur. Desgrandchamps ve ark., non-kas invaziv mesane kanserinde dolaşımdaki $CD8^+$ T hücrelerinin immün kontrol noktası reseptörü ILT2'yi eksprese eden alt grubunun ($CD8^+ILT2^+$) tümör nüksü için bağımsız bir prediktif faktör olduğunu, yüksek oranlı hastalarda 2 yıllık nükssüz sağkalımın %83'ten %12'ye gerilediğini göstermiştir.[63] Bu, dolaşımdaki efektör hücre havuzunun fonksiyonel/baskılayıcı durumunun lokal antitümör yanıtla ilişkili olduğunu ve çalışmamızdaki İT/PT farkının da periferden tümör

mikroçevresine işleyen daha geniş bir immün trafik ekseninin parçası olabileceğini düşündürür. Bu nedenle gelecekteki çalışmalarda periferik kan örneklemesinin dokuya dayalı İT/PT değerlendirmesine eklenmesi, immün yanıtın kompartmanlar arası dinamiğini daha bütüncül gösterebilir.

5.3. Tümör Evresi/İnvazyonu ile TIL Yoğunluğu Arasındaki Ters Yönlü İlişki

Çalışmamızın belki de en tartışmaya açık bulgusu, $CD4^+$_İT, $CD8^+$_İT ve $FOXP3^+$_İT yoğunluklarının kas invaziv olmayan (pT1a, n=8) olgularda kas invaziv (pT2-4, n=90) olgulara göre anlamlı şekilde düşük olmasıdır (sırasıyla p=0,035; p=0,022; p=0,018). Bu sonuç, "ilerlemiş hastalıkta immün infiltrasyonun azaldığı ve bunun immün toleransı/kaçışı yansıttığı" klasik paradigmaya doğrudan terstir.

Bu paradigmayı en net temsil eden çalışma Jóźwicki ve ark.'nın (2016) öncül serisidir; daha ileri, metastaz yapan, non-klasik diferansiasyon ve daha agresif doku invazyon tipi (nested/styloid/dispersive) gösteren tümörlerde $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$, $CD25^+$ ve $FoxP3^+$ TIL sayıları azalmış, düşük $CD4^+$ TIL sayısı kötü prognozla ilişkilenmiştir.[64] Aynı çalışmada düşük TIL sayısı, ileri evre (pT3-pT4), non-klasik diferansiasyon, agresif invazyon tipi, metastaz varlığı ve daha yüksek ölüm riskiyle bir arada görülmüş ve immün tolerans gelişimi olarak yorumlanmıştır.[64] Bizim kohortumuzda ise (intratümöral kompartmanda) tam ters yönde bir ilişki saptandı; bu klasik "düşük TIL = kötü prognoz" çizgisi, kohortumuzda $CD4^+$_İT yüksekliğinin nüksle ilişkilenmesiyle (p=0,0010) doğrudan çelişir. Jóźwicki ve ark.[64] yalnızca intratümöral değerlendirme yapmış ve daha küçük, daha homojen bir kohort kullanmışken, bizim çalışmamız hem İT hem PT kompartmanını ayrı ayrı değerlendirmiş ve kas invaziv ağırlıklı, daha heterojen bir kohort (n=98) içermektedir. Yine de iki çalışma ortak bir sonuçta buluşur: TIL yoğunluğu ile tümör agresifliği arasındaki ilişki basit, doğrusal ve evrensel değildir; kompartmana, hücre alt tipine ve sonlanıma göre yön değiştirebilir.

Görünürdeki bu çelişki çeşitli faktörlerle açıklanabilir. Birincisi örneklem dengesizliğidir: pT1a grubumuz yalnızca 8 olgudan oluşmakta ve immün infiltrasyonun doğal olarak düşük olduğu erken/yüzeyel lezyonları temsil ediyor olabilir. İkincisi ve daha açıklayıcı olanı, Hassan ve ark.'nın (2023)[65] gösterdiği bifazik örüntüdür: non-invaziv (NIUC) tümörlerden non-musküler invaziv (NMIUC) tümörlere geçişte düşük dereceli tümörlerde $CD8^+$ sayısı anlamlı artmış (p=0,045), invaziv tümörlerde (MIUC) genel lenfosit sayısı NIUC'a göre yükselmiş (yüksek dereceli p=0,005; düşük dereceli p=0,052); buna karşın NMIUC'dan MIUC'a geçişte özellikle düşük dereceli tümörlerde $CD8^+$ sayısı

azalmıştır (p=0,052).[65] Bizim pT1a–pT2-4 karşılaştırmamız bu eğrinin yükselen kolunu yakalamıştır; immün infiltrasyondaki artış esas olarak kas invazyonunun kazanıldığı pT1a→pT2 geçişinde gerçekleşmektedir. Nitekim orta evre (pT2, n=24) ile gerçek ileri evre (pT3-4, n=66) olgular ayrıca karşılaştırıldığında hiçbir TIL parametresinde anlamlı fark saptanmamış (tüm p>0,05; Tablo 17), üç gruplu analizde de değerlerin pT2 sonrası platoya ulaştığı görülmüştür. Bu bulgu, kohortumuzda bifazik örüntünün gerileyen kolunun bulunmadığını; immün yeniden şekillenmenin sürekli evre ilerlemesinden çok, kas invazyonu eşiğine bağlı eşik-tipi bir değişim olduğunu düşündürmektedir.

Üçüncü açıklama "adaptif immün direnç" kavramından gelir. Baras ve ark. (2016)[66], kas invaziv ürotelyal karsinomda TIL yoğunluğunun tümör PD-L1 ekspresyonuyla güçlü korelasyon gösterdiğini ve bunun adaptif immün direnç mekanizmasıyla uyumlu olduğunu, ancak tümör hücresi PD-L1 ekspresyonunun yanıtın anlamlı bir öngörücüsü olmadığını bildirmiştir; de Andrea ve ark. (2025)[58] da kontrol noktası moleküllerinin (PD-1, TIM-3, LAG-3) intratümöral $CD8^+$ hücreler üzerindeki ekspresyonunu tedavi yanıtıyla ilişkilendirmiştir. Bu çerçevede yüksek intratümöral TIL yoğunluğu, mutlaka etkili bir immün yanıtı değil; tümörün immün baskıyı tetiklediği, PD-1/PD-L1 ekseni üzerinden kontra-regülasyon geliştirdiği, aktif ama nihayetinde etkisiz kalan bir mücadeleyi de yansıtıyor olabilir. Bu yorum, yüksek $CD4^+$_İT yoğunluğunun nüksle ilişkilenmesi ve "Inflamed" paternin paradoksal olarak kötü prognozla bağdaşmasıyla tutarlıdır.

Periferik kan düzeyinde de benzer bir "daha fazla lenfosit ≠ daha iyi prognoz" örüntüsü bildirilmiştir. Desgrandchamps ve ark. (2018)[63], dolaşımdaki $CD8^+ILT2^+$ T hücre oranını non-kas invaziv mesane kanserinde nüks için bağımsız bir prediktif faktör olarak tanımlamış; yüksek oranlı hastalarda 2 yıllık nükssüz sağkalım %12'ye gerilemiştir. Bu, dolaşımdaki efektör hücre fazlalığının her zaman etkili bir antitümöral yanıtı yansıtmadığını, aksine bu hücrelerin tümöre yeterince göç edemediği disfonksiyonel bir durumu işaret edebileceğini düşündürür ve kohortumuzdaki $CD4^+$_İT–nüks ilişkisiyle kavramsal olarak örtüşür.

Olkhov-Mitsel ve ark. (2020)[67], MIUC'de sistektomi sonrası hızlı relaps (2 yıl içinde) gelişen hastalarda $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ yoğunluklarının anlamlı düşük, FOXP3'ün ise anlamsız olduğunu bildirmiştir; yazarlar ayrıca PD-1 ekspresyonunun yüksek, KLRB1 ve HLA-DQA1 ekspresyonunun düşük olmasını hızlı relapsla ilişkilendirerek T hücre-aracılı immün kaçışı öne çıkarmıştır. Klasik "düşük TIL = kötü prognoz" çizgisini

doğrudan destekleyen bu sonuçla kohortumuzun ters yönü, örneklem farkının ötesinde "relaps" tanımıyla da ilgilidir: Olkhov-Mitsel ve ark. yalnızca 2 yıl içindeki hızlı relapsı incelerken, bizim nüks tanımımız takip süresince herhangi bir zamanda gelişen olayları kapsar; bu fark, TIL–prognoz ilişkisinin zamana bağlı doğasının iki kohortta farklı yakalanmış olabileceğini düşündürür.

Son olarak, Stakhovskyi ve ark.[68]'nın 42 pT2-3N0M0 MIUC olgusunda, tümörü infiltre eden $CD8^+$, $FOXP3^+$, $CD68^+$ yoğunluklarının ve PD-L1 durumunun sağkalımı etkilemediği, buna karşın yüksek $CD163^+$ yoğunluğu ve PMN infiltrasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu; olguların çoğunda immün desert veya immün excluded TIME izlendiği gösterilmiştir. Bu tablo, MIUC'de $CD8^+$ T hücrelerinin tümöre penetrasyonunun veya etkin sitotoksik aktivitesinin ciddi biçimde kısıtlandığını gösterir ve bizim "Inflamed patern = beklenen yönde koruma yok" bulgumuzun tek bir çalışmaya özgü olmadığını destekler; ayrıca PD-L1'in tek başına prognostik biyobelirteç sayılmaması gerektiği mesajını güçlendirir.

5.4. TIL Paterni (Inflamed/Excluded/Desert) ve Prognostik Paradoks

Çalışmamızda "Inflamed" patern olguların %15,4'ünde nüksle ilişkiliydi (yedi nüksün altısı bu gruptaydı), "Excluded" paternde ise hiç nüks görülmedi (p=0,031); sağkalımda da Inflamed patern en yüksek eksitus oranına (%74,4), Excluded patern en düşük orana (%46,9) sahipti (p=0,041). Bu sonuç, immün-onkolojide yerleşik "sıcak (inflamed) tümör = olumlu prognoz/immünoterapi yanıtı" paradigmasıyla doğrudan çelişir.

Bununla birlikte, mutlak TIL yoğunluğunun ürotelyal karsinomdaki prognostik değeri literatürde tutarsızdır. Eich ve ark. (2019), non-kas invaziv ürotelyal karsinomun tümör immün mikroçevresini değerlendirmiştir;[6] bu çalışmada mutlak $CD8^+$ yoğunluğunun klinik sonlanımlarla tutarlı bir ilişki vermediği bildirilmiştir. Krpina ve ark., soliter düşük dereceli non-kas invaziv ürotelyal karsinomda yüksek $CD3^+$ ve $CD8^+$ TIL sayısını (beklenenin aksine) nüksle ilişkili bulmuştur ($CD3^+$ ve $CD8^+$ TIL düzeyleri nüks gelişen grupta anlamlı yüksek; p=0,0001 ve p=0,0002);[69] bu, bizim "Inflamed = daha fazla nüks" bulgumuzla doğrudan paraleldir. Almeida Rodrigues ve ark. (2023) ürotelyal karsinomlarda CD8 hücre yoğunluğu, GSK-3β ve PD-L1 ekspresyonunu birlikte değerlendirmiş ve CD8'in tek başına değil, ancak PD-L1/GSK-3β ile birlikte değerlendirildiğinde anlam kazandığını ileri sürmüştür.[70] Baras ve ark. (2016) ise daha çarpıcı biçimde, neoadjuvan kemoterapi öncesi biyopsilerde toplam TIL, $CD8^+$ veya Treg

yoğunluğunun tek başına yanıtla ilişkili olmadığını; yalnızca CD8/Treg oranının anlamlı prediktif değer taşıdığını göstermiştir.[66]

Bu çalışmaların ortak vurgusu, mutlak hücre yoğunluğunun (ve buna dayalı Inflamed/Excluded/Desert gibi kategorik sınıflamaların) ürotelyal karsinomda her zaman güvenilir bir prognostik gösterge olmayabileceği; infiltratın bileşiminin ve işlevsel durumunun (efektör/regülatör dengesi, kontrol noktası ekspresyonu) en az yoğunluk kadar belirleyici olduğudur. Nitekim kohortumuzdaki sınıflama, alttaki hücresel yoğunlukları doğru yansıtsa da (Tablo 25'deki güçlü iç-tutarlılık, $p<0,0001$) klinik sonlanımı beklenen yönde öngörmemiştir.

Paradoksu mekanistik düzeyde açıklayabilecek en güçlü kanıt, Liang ve ark.'nın (2022) üst üriner yol ürotelyal karsinomunda yürüttüğü tek hücreli RNA dizileme çalışmasıdır;[71] tümörleri bazal ve luminal alt tiplere ayıran yazarlar, immünosüpresif makrofajların ve tükenmiş (exhausted) T hücre alt gruplarının bazal alt tipte zenginleştiğini ve bunlar arasında güçlenmiş etkileşimler bulunduğunu, immünosüpresif makrofajları yakalayan bir gen imzasının (Macro-C3 skoru) sonuçları yerleşik alt tiplerden daha iyi öngördüğünü göstermiştir.[71] Başka bir deyişle "Inflamed" görünüm, bazı tümörlerde etkili bir yanıtı değil, makrofaj kaynaklı sinyallerle rekrute edilmiş fakat işlevsel olarak baskılanmış bir $CD8^+$ popülasyonunu yansıtabilir. Bu model, kohortumuzdaki yüksek nüks/eksitus oranlarını ve $CD4^+$_İT–nüks ilişkisini açıklayabilecek bir makrofaj–T hücre crosstalk mekanizması sunar.

Bu mekanizmaya popülasyon düzeyinde dolaylı destek, Lv ve ark.'nın (2020) TCGA ve GEO kohortlarını CIBERSORT ile analiz ettiği çalışmadan gelir;[72] LASSO ile belirlenen altı prognostik immün hücreden M0 makrofaj, M2 makrofaj ve nötrofil kötü prognostik (hazard) faktörlerken, $CD8^+$ T hücre ve bellek-aktive $CD4^+$ T hücre koruyucu bulunmuş; yüksek TIICS skoru daha kötü sağkalımla ilişkilenmiştir.[72] Bu da bizdeki "ileri evrede artmış intratümöral T hücre infiltrasyonu" paradoksunun izole bir lenfosit fenomeni değil, makrofaj baskın bir myeloid kompartmanla birlikte değerlendirildiğinde anlam kazanan daha geniş bir immün yeniden şekillenmenin parçası olabileceğini düşündürür.

Ouyang ve ark. (2024), ürotelyal mesane karsinomunda tümör ilişkili nötrofillerin COX-2/PGE2 ekseni üzerinden kanser hücrelerinde IDO1 ekspresyonunu artırarak $CD8^+$ T hücre işlevini baskıladığını; yüksek nötrofil infiltrasyonunun immün kontrol noktası blokajına daha kötü yanıtı öngördüğünü ve COX-2 inhibitörü selekoksibin ICB etkinliğini artırdığını göstermiştir.[73] Bu sonuç, tek tek CD8 veya FOXP3 yoğunluklarının başarısız

kaldığı yerde oransal göstergelerin sinyal üretmesiyle kavramsal olarak örtüşür (bkz. 5.5) ve myeloid-lenfoid dengesinin ürotelyal karsinomda immün fonksiyonu belirleyen asıl eksenlerden biri olabileceğini destekler.

Bunu MIUC dokusunda doğrudan gösteren Stakhovskyi ve ark., 42 olguluk kohortlarında $CD8^+$ TIL'in aksine yüksek $CD163^+$ M2-makrofaj yoğunluğu ve polimorfnükleer lökosit infiltrasyonunun kötü prognozla bağımsız ilişki gösterdiğini bildirmiştir.[68] Bu, MIUC'de immün kaçışın $CD8^+$ yetersizliğinden çok M2 makrofaj ve nötrofil ağırlıklı doğal immünite baskınlığına dayandığını düşündürür ve Lv ve ark.'nın[72] bulgularıyla tutarlıdır. Bu çalışmaların ortak çıkarımı pratik bir öneriye işaret eder: kohortumuzdaki paradoksun myeloid kompartmanla bağlantısını sınamak için, mevcut IT/PT lenfosit panelinin myeloid belirteçlerle (CD68, CD163, PD-L1, IDO1) genişletilmesi prognostik modelin gücünü artırabilir.

5.5. $CD8^+$/$FOXP3^+$ ve $CD4^+$/$CD8^+$ Oranlarının Bağımsız Prognostik Değeri:

Çalışmamızın en tutarlı bulgusu, mutlak hücre yoğunluklarının değil, sitotoksik/regülatör T hücre oranlarının prognostik değer taşımasıdır. Peritümöral $CD8^+$/$FOXP3^+$ oranı genel sağkalımla anlamlı pozitif korelasyon gösterdi (r=0,21; p=0,041), intratümöral $CD8^+$/$FOXP3^+$ oranı medyan-split Kaplan-Meier analizinde sınırda anlamlı bir ayrım yarattı (30 ay vs 16 ay; p=0,052) ve intratümöral $CD4^+$/$CD8^+$ oranı çok değişkenli Cox analizinde yaş ve LVI ile birlikte bağımsız prognostik faktör çıktı (HR=1,312; %95 GA 1,006-1,710; p=0,0448).

Horn ve ark. (2015), 149 hastalık invaziv mesane kanseri kohortunda tek tek belirteçlerin (CD3, CD8, FOXP3, CD45R0) hiçbirinin sağkalımla ilişkili olmadığını, buna karşılık FOXP3/CD3 (HR=1,29; p=0,016) ve FOXP3/CD8 oranının (HR=1,32; p=0,013) daha kısa sağkalımla ilişkili olduğunu ve FOXP3/CD8'in pT-pN için düzeltilmiş analizde bağımsızlığını koruduğunu (HR=1,32; p=0,018) bulmuştur.[10] Onların yüksek FOXP3/CD8 ile kötü prognoz ilişkisi, bizim yüksek CD8/FOXP3 ile iyi prognoz bulgumuzla aynı biyolojik yöndedir; oran yalnızca ters çevrilmiştir. Sun ve ark. (2023) da 64 invaziv olguda invaziv kenarda $FoxP3^+$ TIL'i bağımsız kötü prognostik faktör bulmuş (HR=10,11; p=0,006) ve CD4-yüksek/CD8-yüksek fenotipte olumlu prognoz eğilimi gözlemiştir;[3] bu, bizde CD4/CD8 oranı yükseldikçe (CD8 baskınlığı azaldıkça) prognozun kötüleşmesiyle yön bakımından uyumludur. Benzer bir oran sinyali ürotelyal karsinom dışında da görülür: Sheu ve ark. (1999), serviks karsinomunda tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4/CD8 oranının tersine dönmesini (CD8 lehine) hızlı tümör büyümesi ve lenf nodu metastazıyla

anlamlı biçimde ilişkilendirmiştir,[74] yani CD8 baskınlığı farklı tümörlerde tekrarlayan bir imza olarak karşımıza çıkar.

Burada dikkat edilmesi gereken biyolojik karmaşıklık, FOXP3'ün gerçek regülatör T hücrelerini mi yoksa aktive efektör hücreleri mi işaretlediğidir. Winerdal ve ark. (2011), 37 kas invaziv olguda FOXP3$^+$ TIL infiltrasyonunun beklenmedik biçimde daha iyi sağkalımla, tümör hücrelerindeki FOXP3 ekspresyonunun ise kötü sağkalımla ilişkili olduğunu bulmuş; bunu, insan T hücrelerinde FOXP3'ün aktivasyon sırasında geçici yükselmesiyle, yani FOXP3$^+$ TIL'lerin bir kısmının gerçek Treg değil aktive efektör hücre olabileceğiyle açıklamıştır.[4] Bizim kohortumuzda FOXP3$^+$ yoğunluğunun tek başına hiçbir sağkalım sonlanımıyla ilişki göstermemesi (Tablo 29) bu ikili doğayla bağlantılı olabilir; FOXP3'ün Treg-bağlılığını epigenetik yöntemlerle (promoter demetilasyonu) veya ek yüzey belirteçleriyle (CD25, CD127, Helios) doğrulamak bu belirsizliği giderebilir.

Tekil yoğunlukların yetersiz kaldığı, oran ya da kompozit göstergelerin öne çıktığı bu örüntü farklı yöntemlerde de tekrarlanır. Baras ve ark. (2016), neoadjuvan kemoterapi öncesi toplam TIL, CD8$^+$ veya Treg yoğunluğunun tek başına yanıtla ilişkili olmadığını; yalnızca CD8/Treg oranının prediktif değer taşıdığını göstermiştir.[66] Holm ve ark. (2022), atezolizumab alan metastatik hastalarda klinik yanıtı belirleyenin neoantijen-reaktif CD8$^+$ T hücrelerinin (NART) mutlak frekansı değil, sayıca çeşitlenmesi ve fenotipik kalitesi (PD-1$^+$Ki67$^+$ efektör fenotip, yüksek CD39) olduğunu göstermiştir.[75] Luo ve ark. (2020) altı proteinlik kompozit bir risk skorunun bağımsız prognostik değer taşıdığını,[76] Elias ve ark. (2026) ise bir B hücresi–CD8 T hücresi gen imzasının (B8T) tekil belirteçlerden daha güçlü prognostik/prediktif değer taşıdığını bildirmiştir.[77] Bütün bu çalışmalarda olduğu gibi bizde de CD8, CD4 veya FOXP3 yoğunlukları tek başına sinyal üretmezken oranları üretti; prognostik güç tekil belirteçten çok birlikte değerlendirilen kompozisyonda toplanmaktadır.

Aynı sonuç tek tek hücre sayımı yapan ürotelyal serilerde de doğrulanır. Eich ve ark. (2019), NMIUC'de tek başına CD8$^+$ veya FOXP3$^+$'in klinik sonlanımla tutarlı ilişki vermediğini;[6] Tsai ve ark., 73 yüzeysel olguda FOXP3$^+$ TIL'in tek değişkenli analizde progresyonla ilişkiliyken çok değişkenli analizde bağımsızlığını yitirdiğini[78] bulmuştur. Buna karşılık Sharma ve ark. (2007), 69 olguda intratümöral CD8$^+$ TIL ≥8 olan kas invaziv hastalarda medyan DFS'i 52 ay, <8 olanlarda 13 ay bulmuş (P<0,001); ancak bu ilişki yalnızca kas invaziv hastalıkta geçerli olup evreyle anlamlı etkileşim göstermiştir (P=0,04).[8] Yani mutlak CD8$^+$ sayısı bile ancak evreye özgü koşullarda anlam

kazanmaktadır. Onların aksine bizde intratümöral $CD8^+$ tek başına anlamlı çıkmadı; sinyali oranlar taşıdı, dolayısıyla $CD8^+$ TIL'in değeri Treg baskısından bağımsız değerlendirilemez.

İki kompartmanı ve iki belirteci birleştiren yaklaşımın üstünlüğünü en açık gösteren çalışma, Teke ve ark.'nın (2020)[5] böbrek hücreli karsinomda geliştirdiği "İmmünolojik Profil (IP)" skorudur: peritümöral ve intratümöral $CD8^+$/$FoxP3^+$ hücreler birlikte skorlandığında IP-güçlü hastalarda 5 yıllık OS %100, IP-zayıfta %62,5 bulunmuş (P=0,006) ve IP-zayıf, TNM'den bağımsız kötü PFS öngörücüsü olmuştur (HR=8,64; P=0,042); oysa tek başına intratümöral $CD8^+$, $FoxP3^+$ veya CD8/FoxP3 oranı anlamlı değildi. İmmünoterapi bağlamında Sakatani ve ark. (2022), pembrolizumab alan 26 ileri evre hastada yüksek $CD8^+$ TIL'i olumlu objektif yanıt ve daha uzun sağkalımla (OS için HR=0,17; p=0,0034) ilişkili bulurken, düşük $CD8^+$/düşük IFN-γ birlikteliğini ("soğuk" fenotip) kötü prognozla ilişkilendirmiş; PD-L1'i ise hiçbir sonlanımla ilişkili bulmamıştır.[79] Tüm bu çalışmalar bizim bulgumuzla aynı yöndedir: mutlak yoğunluklar yetersiz kalırken peritümöral CD8/FOXP3 ve intratümöral CD4/CD8 oranları gibi kompozit/oransal göstergeler tutarlı prognostik sinyal üretmektedir.

5.6. Diğer Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkiler

Tümör derecesi ile ilişkide peritümöral $CD4^+$ yoğunluğu düşük dereceli olgularda yüksek, intratümöral $FOXP3^+$ ise yüksek dereceli olgularda fazla bulundu (n=3 düşük dereceli olgu ile sınırlı güçte). Bu, Almeida Rodrigues ve ark.'nın (2023)[70] yüksek dereceli tümörlerde CD8/GSK-3β/PD-L1 ekspresyonunu ve Hassan ve ark.'nın (2023)[65] nötrofil sayısı ile NLR'nin arttığını gösteren bulgularıyla aynı temaya işaret eder: yüksek dereceli tümörler sayıca daha fazla değil, niteliksel olarak daha "dengesiz" (kontrol noktası ve Treg ekspresyonu artmış, NLR yüksek) bir mikroçevreye sahip olabilir.

Lenfovasküler invazyonda Desert paterninin en yüksek LVI pozitifliğine (%81,5) sahip olması, Jóźwicki ve ark.'nın (2016)[64] agresif invazyon tipindeki (nested/styloid/dispersive) tümörlerde $CD8^+$, $CD20^+$, $CD25^+$ ve $FoxP3^+$ TIL'leri anlamlı düşük bulmasıyla yön bakımından tutarlıdır; ve düşük immün infiltrasyonun lokal agresif büyümeyle birlikte seyrettiğini gösterir. Liang ve ark. (2022)[71] ise agresif bazal alt tipte immünosüpresif makrofajların ve tükenmiş (exhausted) $CD8^+$ T hücre alt gruplarının zenginleştiğini ve aralarındaki etkileşimlerin güçlendiğini göstermiştir. İki bulgu birlikte, agresif fenotipte immün hücrelerin yalnızca sayıca azalmadığını, mevcut hücrelerin işlevsel olarak da baskılanabileceğini düşündürür.

Buna karşılık pN durumu ve metastaz/progresyon ile hiçbir TIL parametresi anlamlı ilişki göstermedi; bu, Jóźwicki ve ark.'nın[64] metastatik tümörlerde TIL yoğunluğunu düşük bulan sonucuyla örtüşmez. Fark, olay sayısındaki kısıtlılıkla (metastaz+ n=28) açıklanabileceği gibi, kohortumuzun zaten ağırlıklı ileri evre/yüksek dereceli olgulardan oluşmasının (Tablo 8) evreler-arası TIL farklarını saptama gücünü azaltmasından da kaynaklanabilir. Benzer bir güç sorunu Papadopoulou ve ark.'nın (2022)[80] platin bazlı kemoterapi alan ürotelyal kohortunda da görülür: PD-L1 ekspresyonu CD8 ve genel TIL yoğunluğuyla pozitif korele bulunmuş (5.3'teki adaptif immün direnç çerçevesini destekler), ancak ne DDR mutasyonları, ne TIL, ne PD-L1/CD8, ne de alt tip sağkalımla anlamlı ilişki göstermiştir. Bizde CD4/CD8_İT oranının anlamlılığını yitirmesi gibi (bkz. 5.5, 5.7), orta büyüklükteki tek merkezli ürotelyal kohortlar TIL/PD-L1 temelli sağkalım analizlerinde sistematik olarak sınırlı güçle karşılaşmakta; alan, çok merkezli ve daha büyük örneklemli doğrulamaya ihtiyaç duymaktadır.

Subtip ile peritümöral FOXP3 arasında saptadığımız ters ilişki (Tablo 23), Phé ve ark.'nın (2015)[81] bildirdiği bulgularla kısmen çelişebilir. Fark, iki çalışmanın farklı popülasyon ve kompartman tanımlarını yansıtıyor olabilir: bizim subtip+ grubumuz n=8 ile sınırlı olup nested, mikropapiller ve plazmasitoid gibi skuamöz dışı subtipleri de içerir. Bu nedenle bulgu küçük grup gücüyle ihtiyatla yorumlanmalı ve skuamöz diferansiasyonun ayrı ele alınacağı daha büyük kohortlarda doğrulanmalıdır.

Standart PD-L1'in ötesindeki kontrol noktası moleküllerinin değeri iki çalışmada belirginleşir. Tsai ve ark.[78], 308 hastalık transkriptom analizinde CD276 (B7-H3) ve TIM-3 ekspresyonunun ileri evre ve kötü prognozla ilişkili olduğunu (mortalite için HR sırasıyla 3,5 ve 5,5), kombine yüksek ekspresyonun evre ve dereceden bağımsız en yüksek mortalite riskini öngördüğünü göstermiş; PD-L1, PD-1 ve CTLA-4'ün ise sağkalımla anlamlı ilişki vermediğini bulmuştur. Aynı çalışmada[78] erken evre tümörler "soğuk" (az CD8/Treg infiltrasyonlu) iken, geç evre tümörlerin yaklaşık %30'unda yüksek $CD8^+$ infiltrasyona yüksek PD-1 ve FOXP3 ekspresyonunun eşlik etmesi, bizim "Inflamed patern = paradoksal kötü prognoz" gözlemimize mekanistik boyut katar: geç evredeki yüksek $CD8^+$ TIL, etkin aktiviteden çok tükenmiş/baskılanmış bir fenotipi yansıtıyor olabilir.

Zhong ve ark.[82], 251 hastalık UTUC serisinde (3 bağımsız kohort) tümör hücresinde yüksek IDO1 ekspresyonunu kötü genel ve hastalıksız sağkalımla ilişkilendirmiş; IDO1-yüksek tümörlerde $CD4^+$, $CD8^+$ ve $Foxp3^+$ T hücre infiltrasyonu ile Foxp3/CD8 oranının arttığını, yani IDO1'in immünoevazif bir kontekstle birlikte

seyrettiğini göstermiştir. Her iki çalışmada da PD-L1 tek başına sağkalımla ilişkisizken alternatif kontrol noktaları (CD276, TIM-3, IDO1) güçlü bağımsız değer taşımıştır; bizde de mutlak CD8/FOXP3 yetersiz kalırken efektör/regülatör dengesi sinyal ürettiğinden, gelecekteki çalışmalarda bu moleküllerin PD-L1'e ek olarak değerlendirilmesi mikroçevrenin daha kapsamlı karakterizasyonuna katkı sağlayabilir.

5.7. Yöntemsel Hususlar ve Sınırlılıklar

Uluslararası TIL Çalışma Grubu'nun (ITWG) standardize morfolojik değerlendirme önerileri çerçevesinde,[62] çalışmamızın TIL'leri hem intratümöral hem peritümöral kompartmanda ayrı ayrı ve standardize bir protokolle değerlendirmiş olması metodolojik bir güçtür. Ancak aynı çerçevenin vurguladığı gibi, görsel TIL değerlendirmesinde belirli bir gözlemciler-arası değişkenlik kaçınılmazdır ve özellikle intratümöral/düşük stromal içerikli alanlarda aynı yoğunluk farklı algılanabildiğinden, intratümöral değerlendirmenin tekrarlanabilirliği stromal değerlendirmeye göre daha kısıtlı olabilir; bu, İT/PT karşılaştırmalarımızı yorumlarken akılda tutulmalıdır.

Diğer başlıca sınırlılıklar şunlardır: (i) bazı alt grup analizlerinin (nüks n=7, düşük dereceli n=3, subtip n=8) düşük örneklem nedeniyle keşifsel düzeyde kalması, (ii) çok değişkenli Cox modellerinde olay sayısının sınırlı oluşunun (n=63) model seçimine duyarlılık yaratması (Model A'da anlamlı olan CD4/CD8_İT oranının Model B'de anlamlılığını yitirmesi), (iii) tek merkezli, kesitsel-retrospektif tasarımın nedensel çıkarımı sınırlaması. Bu kısıtlılıklar, Horn ve ark. (2015) ile Baras ve ark.'nın (2016) da vurguladığı, alandaki ortak bir metodolojik sorunu yansıtır: orta büyüklükteki tek merkezli ürotelyal kohortlar, tekil belirteçler yerine oran/kompozit göstergeler anlam taşısa bile, sağkalım analizlerinde sınırlı istatistiksel güçle karşılaşmaktadır.[10,66]

Güncel literatür yöntemsel açıdan da yeni olanaklar sunmaktadır. Xie ve ark., kas invaziv yüksek dereceli ürotelyal karsinomda CD8, FOXP3 ve Granzyme B'yi aynı anda değerlendiren üç kromojenli bir multipleks IHC (mIHC) assayı geliştirmiş ve dijital görüntü analiziyle (QuPath) tekli boyama ile multipleks boyama ve manuel ile dijital sayım arasındaki uyumu değerlendirmiştir.[83] Bu yaklaşım sınırlı biyopsi materyalinde birden fazla belirteci eş zamanlı değerlendirmeye ve hücreler arası mekânsal ilişkileri korumaya olanak tanır; bizim yoğunluk sayımlarımızdaki olası gözlemciler arası değişkenlik düşünüldüğünde, mIHC + dijital analiz kombinasyonu gelecekteki prospektif çalışmalarda standardizasyona katkı sağlayabilir. Xie ve ark.'nın[83] CD8/Granzyme B/FOXP3 panelini

bir immün-onkoloji biyobelirteç iş akışı olarak konumlandırması da, bizim önerdiğimiz çok belirteçli kompozit yaklaşımla aynı doğrultudadır.

Yöntem çeşitliliği bu noktada genişletilebilir. Liang ve ark.'nın (2022) tek hücreli RNA dizilemesi, IHC tabanlı yoğunluk ölçümünün yakalayamadığı hücresel heterojenliği (örn. aynı $CD8^+$ popülasyonundaki tükenmiş/aktive alt kümeler) ve hücreler-arası iletişim ağlarını ortaya koyabilir;[71] Holm ve ark.'nın (2022) DNA barkod-etiketli pMHC multimer teknolojisi ise periferik kanda antijen-spesifik T hücre yanıtlarının boyut ve fenotipini eş zamanlı izleyebilir.[75] Bu yöntemlerin standart IHC paneline eklenmesi, özellikle "yüksek yoğunluk ama kötü prognoz" paradoksunun mekanistik temelini aydınlatmak için yararlı olacaktır. Ayrıca Desgrandchamps ve ark.'nın (2018)[63] gösterdiği periferik kan–doku ekseni ışığında, preoperatif periferik kan lenfosit profilinin doku TIL değerlendirmesine eklenmesi hem daha az invaziv bir prognostik araç geliştirmeye hem de immün hücre trafiğinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Bir diğer sınırlılık, kohortun neoadjuvan/preoperatif tedavi öyküsü açısından homojen olmamasıdır; olguların yaklaşık yarısı (n=44) sistemik platin bazlı kemoterapi (n=32) veya intravezikal BCG dâhil preoperatif tedavi (n=12) almıştır. Sisplatin bazlı tedavi ve BCG, immünojenik hücre ölümü ve lokal immün aktivasyon yoluyla tümör mikroçevresini ve TIL kompozisyonunu değiştirebilir. Bu nedenle yürütülen duyarlılık analizinde (Tablo 34, Tablo 36), tedavi alan olgularla tedavi-naif olgular tüm TIL parametreleri açısından karşılaştırıldı. Hem geniş tanımda (her tür preoperatif tedavi, n=44 vs 54) hem de yalnızca sistemik kemoterapinin esas alındığı katı tanımda (n=32 vs 54) gruplar arasındaki tek anlamlı fark $CD4^+$ kompartmanındaydı (peritümöral $CD4^+$ p=0,041; intratümöral $CD4^+$ p=0,035); buna karşın $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ yoğunlukları, $CD8^+/FOXP3^+$ ve (bu çalışmada bağımsız prognostik değer taşıyan) intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı ile TIL paterni dağılımı tedavi durumundan etkilenmedi (tüm p>0,05). Bu, çalışmanın temel prognostik göstergelerinin tedavi heterojenliğinden büyük ölçüde bağımsız olduğunu desteklemekle birlikte, $CD4^+$ yoğunluğuna dayalı yorumların tedavi durumu göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ağırlıklı olarak kas invaziv (%91,8 pT2-4) ve yüksek dereceli (%96,9) 98 mesane invaziv ürotelyal karsinom olgusunda $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ tümörü infiltre eden lenfositlerin (TIL) intratümöral ve peritümöral dağılımı ile bunlardan türetilen oranların ($CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+/FOXP3^+$) klinikopatolojik parametreler ve genel sağkalım ile ilişkisi araştırılmıştır. Elde edilen başlıca sonuçlar ve bunlara dayanan öneriler aşağıda özetlenmiştir.

Sitotoksik ($CD8^+$) ve regülatör ($FOXP3^+$) T lenfositlerin yoğunluğu intratümöral bölgede peritümöral bölgeye göre anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuş (sırasıyla p=0,0015 ve p=0,0182), $CD4^+$ yardımcı T lenfositler ise iki kompartman arasında benzer dağılım göstermiştir. Bu bulgu, intratümöral ve peritümöral bölgelerin biyolojik olarak ayrı iki immün mikroçevreyi temsil ettiğini ve TIL değerlendirmesinin bu iki kompartmanın ayrı ayrı ele alınmasıyla daha bilgilendirici hâle geldiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmanın en dikkat çekici sonucu, klasik "yüksek TIL = erken evre/iyi prognoz" varsayımının bu kohortta desteklenmemiş olmasıdır. İntratümöral $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ yoğunlukları kas invaziv olmayan (pT1a) olgularda kas invaziv (pT2-4) olgulara göre anlamlı şekilde daha düşük saptanmış (sırasıyla p=0,035; p=0,022; p=0,018); yüksek intratümöral $CD4^+$ yoğunluğu nüks ile ilişkili bulunmuş (p=0,0010); "İnflamed" TIL paterni ise en yüksek nüks (p=0,031) ve en yüksek mortalite (%74,4; p=0,041) oranlarıyla ilişkilenmiştir. Bu paradoksal örüntü, yüksek intratümöral infiltrasyonun her zaman etkin bir antitümöral yanıtı yansıtmayabileceğini; adaptif immün direnç, T hücre tükenmesi (exhaustion) ve myeloid kaynaklı immünosüpresyon gibi mekanizmalarla işlevsel olarak baskılanmış bir immün infiltratı da temsil edebileceğini düşündürmektedir.

Buna karşılık, mutlak hücre yoğunluklarının aksine, sitotoksik/regülatör T hücre dengesini yansıtan oranlar tutarlı ve bağımsız prognostik bilgi taşımıştır. Peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı genel sağkalımla anlamlı pozitif korelasyon göstermiş (r=0,21; p=0,041), intratümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı medyan eşiğine göre ayrılan gruplar arasında sınırda anlamlı bir sağkalım farkı yaratmış (30 aya karşı 16 ay; p=0,052) ve en önemlisi, intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı çok değişkenli Cox regresyon analizinde yaş ve lenfovasküler invazyon ile birlikte genel sağkalım için bağımsız bir prognostik faktör olarak doğrulanmıştır (HR=1,312; p=0,0448). Bu sonuç, $CD8^+$ baskınlığının (düşük $CD4^+/CD8^+$ oranı) daha iyi sağkalımla ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Ancak söz

konusu bağımsızlığın farklı kovaryatların dâhil edildiği modelde (Model B) kaybolması (p=0,122), bulgunun sınırlı olay sayısına (n=63) bağlı istatistiksel güç kısıtlılığı çerçevesinde ihtiyatla yorumlanması gerektiğini göstermektedir.

Klasik klinikopatolojik değişkenler arasında ileri yaş (HR=1,058; p=0,0025) ve lenfovasküler invazyon varlığı (HR=2,324; p=0,0087) genel sağkalım için güçlü ve bağımsız risk faktörleri olarak belirlenmiştir. TIL paterni ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptanmış; Desert paterninde lenfovasküler invazyon pozitifliği en yüksek oranda (%81,5; p=0,0059) izlenerek düşük immün infiltrasyonun agresif lokal büyüme paternleriyle birlikte seyrettiği gösterilmiştir. Buna karşılık tek tek mutlak TIL yoğunluklarının lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve uzak metastaz ile anlamlı bir ilişkisi izlenmemiştir.

Bütün olarak değerlendirildiğinde bu çalışma, invaziv mesane ürotelyal karsinomunda prognostik gücün tek bir belirtecin mutlak yoğunluğunda değil, immün infiltratın bileşiminde ve sitotoksik/regülatör dengesinde yattığını; immün değerlendirmenin oran/kompozit temelli ve çok kompartmanlı (intratümöral + peritümöral) bir yaklaşımla yapılmasının prognostik değeri artırabileceğini desteklemektedir.

Bu sonuçlar ışığında aşağıdaki öneriler geliştirilmiştir:

(i) İnvaziv ürotelyal karsinomda TIL temelli prognostik değerlendirmelerde, tek tek mutlak yoğunluklar yerine ya da bunların yanı sıra sitotoksik/regülatör dengesini yansıtan oransal göstergelerin ($CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$) öncelikli olarak kullanılması önerilir.

(ii) Lenfoid panelin myeloid belirteçlerle (CD68, CD163, PD-L1, IDO1 ve nötrofil belirteci CD66b) genişletilmesi, bu çalışmada gözlenen "yüksek infiltrasyon–kötü prognoz" paradoksunun altında yatabilecek myeloid kaynaklı immünosüpresyon mekanizmalarının test edilmesine olanak sağlayacaktır.

(iii) $FOXP3^+$ hücrelerin gerçek regülatör T hücresi mi yoksa aktive efektör T hücresi mi olduğunun ek yüzey belirteçleri (CD25, CD127, Helios) veya epigenetik yöntemlerle (FOXP3 promoter demetilasyon analizi) doğrulanması, FOXP3 temelli sonuçların yorumlanmasındaki belirsizliği azaltacaktır.

(iv) Multipleks immünohistokimya (mIHC) ve dijital görüntü analizi (ör. QuPath) yöntemlerinin kullanılması, özellikle intratümöral sayımlarda gözlemciler arası değişkenliği azaltarak standardizasyona ve hücreler arası mekânsal ilişkilerin korunmasına katkı sağlayabilir.

(v) Standart PD-L1 değerlendirmesinin ötesinde, prognostik değeri güçlü bildirilen alternatif immün kontrol noktası moleküllerinin (CD276/B7-H3, TIM-3) değerlendirmeye eklenmesi düşünülmelidir.
(vi) Preoperatif periferik kan lenfosit profilinin doku temelli TIL değerlendirmesine eklenmesi, hem daha az invaziv bir prognostik araç geliştirilmesine hem de immün hücre trafiğinin kompartmanlar arası dinamiğinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.
(vii) Çalışmanın tek merkezli, retrospektif tasarımı ve bazı alt gruplardaki sınırlı olgu sayısı (nüks n=7, düşük dereceli grup n=3, subtip n=8) göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen bulguların çok merkezli, daha büyük örneklemli ve ileriye dönük (prospektif) çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

7. ÖZET

Mesanenin İnvaziv Ürotelyal Karsinomlarında Tümörü İnfiltre Eden Lenfositlerin İntratümöral ve Peritümöral Dağılımı İle İmmün Fenotipinin Prognostik Önemi

Amaç: Bu çalışmada, invaziv mesane ürotelyal karsinomunda $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ tümörü infiltre eden lenfositlerin (TIL) intratümöral ve peritümöral dağılımı ile bunlardan türetilen oranların ($CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$) klinikopatolojik parametreler ve genel sağkalım ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2018-2024 yılları arasında radikal sistektomi uygulanmış ve invaziv ürotelyal karsinom (pT1-pT4) tanısı almış 98 olgu retrospektif olarak değerlendirildi. Olgulara ait parafin bloklara CD4, CD8 ve FOXP3 immünohistokimyasal boyamaları uygulanarak intratümöral ve peritümöral bölgelerdeki pozitif lenfosit yoğunlukları (hücre/büyük büyütme alanı) iki patolog tarafından bağımsız olarak değerlendirildi; $CD8^+/FOXP3^+$ ve $CD4^+/CD8^+$ oranları hesaplandı. TIL dağılımı ayrıca İnflamed/Excluded/Desert paterni olarak sınıflandırıldı. İstatistiksel analizlerde Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis, Ki-kare, Spearman korelasyon, Kaplan-Meier (Log-rank) ve Cox regresyon testleri kullanıldı; $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Olguların yaş ortalaması 58,9±8,5 olup %86,7'si erkek, %96,9'u yüksek dereceli ve %91,8'i kas invaziv evrede idi. Medyan takip süresi 24 ay, medyan genel sağkalım 16 ay olarak hesaplandı. $CD8^+$ ($p=0,0015$) ve $FOXP3^+$ ($p=0,0182$) yoğunlukları intratümöral bölgede peritümöral bölgeye göre anlamlı şekilde yüksekti. İntratümöral $CD4^+$, $CD8^+$ ve $FOXP3^+$ yoğunlukları kas invaziv olmayan olgularda kas invaziv olgulara göre anlamlı derecede daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0,035$; $p=0,022$; $p=0,018$). İntratümöral $CD4^+$ yoğunluğu nüks gelişen olgularda anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,0010$) ve İnflamed patern en yüksek nüks ($p=0,031$) ile mortalite ($p=0,041$) oranlarıyla ilişkiliydi. Peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranı genel sağkalımla pozitif korelasyon gösterdi ($r=0,21$; $p=0,041$). Çok değişkenli Cox regresyon analizinde yaş (HR=1,058), lenfovasküler invazyon (HR=2,324) ve intratümöral $CD4^+/CD8^+$ oranı (HR=1,312; $p=0,0448$) genel sağkalım için bağımsız prognostik faktörler olarak belirlendi. Tek tek mutlak TIL yoğunluklarının lenf nodu durumu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve metastaz ile anlamlı ilişkisi saptanmadı.

Sonuç: İnvaziv mesane ürotelyal karsinomunda tek tek mutlak TIL yoğunlukları tutarlı bir prognostik değer taşımazken, sitotoksik/regülatör T hücre dengesini yansıtan oranlar

(özellikle intratümöral $CD4^+/CD8^+$ ve peritümöral $CD8^+/FOXP3^+$ oranları) bağımsız prognostik bilgi sağlamış; $CD8^+$ baskınlığı daha iyi sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular, ürotelyal karsinomda immün değerlendirmenin tek belirteç yoğunluğundan çok, oran/kompozit temelli ve çok kompartmanlı yaklaşımlara dayanması gerektiğini desteklemektedir.
Anahtar Sözcükler: Mesane ürotelyal karsinomu, tümörü infiltre eden lenfositler, CD8, FOXP3, CD4/CD8 oranı, immün fenotip, prognoz

8. SUMMARY

The Prognostic Significance of the Intratumoral and Peritumoral Distribution and Immune Phenotype of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Invasive Urothelial Carcinomas of the Bladder

Objective: This study aimed to determine the relationship between the intratumoral and peritumoral distribution of $CD4^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) [together with the ratios derived from them ($CD8^+/FOXP3^+$, $CD4^+/CD8^+$)] and clinicopathological parameters and overall survival in invasive urothelial carcinoma of the bladder.

Materials and Methods: Ninety-eight patients who underwent radical cystectomy at Kocaeli University Faculty of Medicine between 2018 and 2024 and were diagnosed with invasive urothelial carcinoma (pT1–pT4) were evaluated retrospectively. CD4, CD8, and FOXP3 immunohistochemical staining was performed on the patients' paraffin blocks, and the densities of positive lymphocytes (cells/high-power field) in the intratumoral and peritumoral regions were assessed independently by two pathologists; the $CD8^+/FOXP3^+$ and $CD4^+/CD8^+$ ratios were calculated. The TIL distribution was additionally classified as an Inflamed/Excluded/Desert pattern. The Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis, chi-square, Spearman correlation, Kaplan-Meier (log-rank), and Cox regression tests were used for statistical analyses; $p<0.05$ was considered significant.

Results: The mean age of the patients was 58.9±8.5 years; 86.7% were male, 96.9% had high-grade tumors, and 91.8% were at the muscle-invasive stage. The median follow-up was 24 months, and median overall survival was 16 months. $CD8^+$ ($p=0.0015$) and $FOXP3^+$ ($p=0.0182$) densities were significantly higher in the intratumoral region than in the peritumoral region. Intratumoral $CD4^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ densities were significantly lower in non-muscle-invasive cases than in muscle-invasive cases ($p=0.035$, $p=0.022$, and $p=0.018$, respectively). Intratumoral $CD4^+$ density was significantly higher in patients who developed recurrence ($p=0.0010$), and the Inflamed pattern was associated with the highest rates of recurrence ($p=0.031$) and mortality ($p=0.041$). The peritumoral $CD8^+/FOXP3^+$ ratio showed a positive correlation with overall survival ($r=0.21$; $p=0.041$). In multivariate Cox regression analysis, age (HR=1.058), lymphovascular invasion (HR=2.324), and the intratumoral $CD4^+/CD8^+$ ratio (HR=1.312; $p=0.0448$) were identified as independent prognostic factors for overall survival. No significant association was found between

individual absolute TIL densities and lymph node status, lymphovascular invasion, perineural invasion, or metastasis.

Conclusion: While individual absolute TIL densities did not carry consistent prognostic value in invasive urothelial carcinoma of the bladder, ratios reflecting the cytotoxic/regulatory T-cell balance (particularly the intratumoral $CD4^+/CD8^+$ and peritumoral $CD8^+/FOXP3^+$ ratios) provided independent prognostic information, with $CD8^+$ predominance associated with better survival. These findings support the view that immune assessment in urothelial carcinoma should rely on ratio-/composite-based and multi-compartment approaches rather than on the density of a single marker.

Key Words: Bladder urothelial carcinoma, tumor-infiltrating lymphocytes, CD8, FOXP3, CD4/CD8 ratio, immune phenotype, prognosis

9. KAYNAKLAR

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Urinary and male genital tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2026.06.24]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 8). Available from: https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/36.
2. Filho AM, Briganti A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. May 2026;89(5):426–436. doi:10.1016/j.eururo.2025.12.011
3. Sun ZJ, Zhao JW, Zhao M, et al. CD3 high and FoxP3 - tumor-infiltrating lymphocytes in the invasive margin as a favorable prognostic marker in patients with invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Anticancer Drugs*. Aug 1 2023;34(7):844–851. doi:10.1097/cad.0000000000001468
4. Winerdal ME, Marits P, Winerdal M, et al. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int*. Nov 2011;108(10):1672–8. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.10020.x
5. Teke K, Yaprak Bayrak B, Yuksekkaya M, et al. Prognostic value of immunological profile based on $CD8^+$ and $FOXP3^+$ T lymphocytes in the peritumoral and intratumoral subsites for renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol*. Dec 2020;52(12):2289–2299. doi:10.1007/s11255-020-02592-x
6. Eich ML, Chaux A, Guner G, et al. Tumor immune microenvironment in non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Hum Pathol*. Jul 2019;89:24–32. doi:10.1016/j.humpath.2019.04.003
7. Han K, Wang F, Wang R, Kong Q. The CD8(+)/Foxp3(+) ratio, but not the number of OX40(+) TILs, is an independent predictor of tumor recurrence in non-muscle-invasive bladder cancer: a retrospective study. *PeerJ*. 2025;13:e20322. doi:10.7717/peerj.20322
8. Sharma P, Shen Y, Wen S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 6 2007;104(10):3967–72. doi:10.1073/pnas.0611618104
9. Zhang S, Wang J, Zhang X, Zhou F. Tumor-infiltrating $CD8^+$ lymphocytes predict different clinical outcomes in organ- and non-organ-confined urothelial carcinoma of the bladder following radical cystectomy. *PeerJ*. 2017;5:e3921. doi:10.7717/peerj.3921
10. Horn T, Laus J, Seitz AK, et al. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol*. Feb 2016;34(2):181–7. doi:10.1007/s00345-015-1615-3
11. Sjödahl G, Lövgren K, Lauss M, et al. Infiltration of $CD3^+$ and $CD68^+$ cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urol Oncol*. Aug 2014;32(6):791–7. doi:10.1016/j.urolonc.2014.02.007
12. Pradidarcheep W, Wallner C, Dabhoiwala NF, Lamers WH. Anatomy and histology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(202):117–48. doi:10.1007/978-3-642-16499-6_7
13. Encyclopædia Britannica. Male urinary bladder and urethra [Internet]. Chicago: Encyclopædia Britannica, Inc.; [access 21 July 2026]. Adresses: https://www.britannica.com/science/urinary-bladder#/media/1/619820/121134.
14. How the bladder and sphincter are innervated [Internet]. In: Understanding Continence Promotion: Effective Management of Bladder and Bowel Dysfunction in Adults. FutureLearn; [accessed 2026 Jun 21]. Available from: https://www.futurelearn.com/info/courses/understanding-continence-promotion/0/steps/46074. Licensed under CC BY-NC 4.0.

15. Orabi H, Bouhout S, Morissette A, Rousseau A, Chabaud S, Bolduc S. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: advances from bench to patients. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:154564. doi:10.1155/2013/154564
16. Urinary bladder. ditki Medical & Biological Sciences (Draw It to Know It). Accessed June 21, 2026. https://ditki.com/course/histology/glossary/gross-anatomic-microscopic-structure/urinary-bladder.
17. Guo CC, Lee S, Lee JG, et al. Molecular profile of bladder cancer progression to clinically aggressive subtypes. *Nat Rev Urol*. Jul 2024;21(7):391–405. doi:10.1038/s41585-023-00847-7
18. Mak RH VA, Shipley WU. Urinary bladder. In: Rubin P, Constine LS, Marks LB, eds. Adverse Late Effects of Cancer Treatment. Volume 2: Normal Tissue Specific Sites and Systems. Springer; 2014. doi:10.1007/978-3-540-75863-1_18.
19. HES. M. Urinary. Veterinary Histology. Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University. Accessed June 21, 2026. https://vetmansoura.com/Histology/urinary/.
20. Ferlay J EM, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. . Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.who.int/today, accessed [24 June 2026].
21. Liu J, Shi Z, Li Y, et al. High-resolution transcriptome atlas of bladder cancer highlights the functional myeloid subsets in modulating immune microenvironment. *EBioMedicine*. Jul 2025;117:105801. doi:10.1016/j.ebiom.2025.105801
22. Guo Y, Zhang Y, Mao S, et al. Risk of subsequent primary cancers in bladder cancer survivors. *Clin Exp Med*. Oct 26 2024;24(1):247. doi:10.1007/s10238-024-01502-0
23. Zhang D, Ren J, Ye J, et al. Bladder cancer risk factors: a comprehensive umbrella review of meta-analyses. *Int J Surg*. Jan 1 2026;112(1):1479–1503. doi:10.1097/js9.0000000000003371
24. Lopez-Beltran A, Cookson MS, Guercio BJ, Cheng L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. *Bmj*. Feb 12 2024;384:e076743. doi:10.1136/bmj-2023-076743
25. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol*. Mar 2018;15(3):143–154. doi:10.1038/nrurol.2018.2
26. Guo CC, Shen SS, Czerniak B. Recent Advances in the Classification of Bladder Cancer - Updates from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of the Urinary and Male Genital Tumors. *Bladder Cancer*. 2023;9(1):1–14. doi:10.3233/blc-220106
27. Gupta G, Gupta R, Pasricha S, et al. Molecular stratification of high-grade urothelial carcinoma by immunohistochemistry with its histomorphological and clinical correlation. *Indian J Pathol Microbiol*. Oct–Dec 2022;65(4):832–838. doi:10.4103/ijpm.ijpm_95_21
28. Paner GP, Kamat A, Netto GJ, et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Current Issues in Bladder Cancer. Working Group 2: Grading of Mixed Grade, Invasive Urothelial Carcinoma Including Histologic Subtypes and Divergent Differentiations, and Non-Urothelial Carcinomas. *Am J Surg Pathol*. Jan 1 2024;48(1):e11–e23. doi:10.1097/pas.0000000000002077
29. Fernández MI, Brausi M, Clark PE, et al. Epidemiology, prevention, screening, diagnosis, and evaluation: update of the ICUD-SIU joint consultation on bladder cancer. *World J Urol*. Jan 2019;37(1):3–13. doi:10.1007/s00345-018-2436-y

30. Puente J, Rodríguez-Vida A, Sevillano E, et al. SEOM-SOGUG clinical guideline for urothelial cancer (2025). *Clin Transl Oncol*. Nov 2025;27(11):4142–4159. doi:10.1007/s12094-025-04045-2
31. Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. Mar 2017;67(2):93–99. doi:10.3322/caac.21388
32. Bertero L, Massa F, Metovic J, et al. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch*. Apr 2018;472(4):519–531. doi:10.1007/s00428-017-2276-y
33. Ghodoussipour S, Bivalacqua T, Bryan RT, et al. A Systematic Review of Novel Intravesical Approaches for the Treatment of Patients with Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. Jul 2025;88(1):33–55. doi:10.1016/j.eururo.2025.02.010
34. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, et al. Risk Stratification Tools and Prognostic Models in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Critical Assessment from the European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel. *Eur Urol Focus*. May 15 2020;6(3):479–489. doi:10.1016/j.euf.2018.11.005
35. Taylor J, Becher E, Steinberg GD. Update on the guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*. Feb 2020;125(2):197–205. doi:10.1111/bju.14915
36. Gontero P, Birtle A, Capoun O, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ)-A Summary of the 2024 Guidelines Update. *Eur Urol*. Dec 2024;86(6):531–549. doi:10.1016/j.eururo.2024.07.027
37. Krajewski W, Aumatell J, Subiela JD, et al. Accuracy of the CUETO, EORTC 2016 and EAU 2021 scoring models and risk stratification tables to predict outcomes in high-grade non-muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Urol Oncol*. Nov 2022;40(11):491.e11–491.e19. doi:10.1016/j.urolonc.2022.06.008
38. McNall S, Hooper K, Sullivan T, Rieger-Christ K, Clements M. Treatment Modalities for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: An Updated Review. *Cancers (Basel)*. May 11 2024;16(10)doi:10.3390/cancers16101843
39. Lidagoster S, Ben-David R, De Leon B, Sfakianos JP. BCG and Alternative Therapies to BCG Therapy for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Curr Oncol*. Feb 16 2024;31(2):1063–1078. doi:10.3390/curroncol31020079
40. Piccolini A, Moretto S, Fasulo V, et al. Prognostic Role of Different T1 Substaging Systems on Recurrence and Progression in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol*. Apr 2026;9(2):459–471. doi:10.1016/j.euo.2025.10.012
41. van der Heijden AG, Bruins HM, Carrion A, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2025 Guidelines. *Eur Urol*. May 2025;87(5):582–600. doi:10.1016/j.eururo.2025.02.019
42. Lerner SP, Tangen C, Svatek RS, et al. Standard or Extended Lymphadenectomy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *N Engl J Med*. Oct 3 2024;391(13):1206–1216. doi:10.1056/NEJMoa2401497
43. Crocerossa F, Autorino R, Carbonara U, Cantiello F, Damiano R, Mir MC. Extent of lymph node dissection and impact on survival in radical cystectomy for advanced bladder cancer. *Curr Opin Urol*. Nov 1 2022;32(6):607–613. doi:10.1097/mou.0000000000001035

44. Powles T, Catto JWF, Galsky MD, et al. Perioperative Durvalumab with Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Bladder Cancer. *N Engl J Med*. Nov 14 2024;391(19):1773–1786. doi:10.1056/NEJMoa2408154
45. Chu CE, Chen Z, Whiting K, et al. Clinical Outcomes, Genomic Heterogeneity, and Therapeutic Considerations Across Histologic Subtypes of Urothelial Carcinoma. *Eur Urol*. Nov 2025;88(5):472–481. doi:10.1016/j.eururo.2025.04.008
46. Sahin KC, Simsekoglu MF, Ozden SB, et al. Histologic subtypes and divergent differentiations of urothelial carcinoma: Prognostic implications and clinical insights. *Surg Oncol*. Feb 2026;64:102344. doi:10.1016/j.suronc.2025.102344
47. Squires P, Coutinho F, Tepsick JG, et al. Real-world treatment patterns, recurrence, and overall survival of patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy in U.S. oncology practice. *Urol Oncol*. Mar 2026;44(3):110982. doi:10.1016/j.urolonc.2025.12.018
48. T AS, Gupta S, Kiyawat P, Darshan Y, Sambhav K, Shamshadali SS. Tumor Microenvironment in Cancer Biology: A Comprehensive Review of Stromal, Immune, and Vascular Components Driving Malignancy. *Cureus*. Dec 2025;17(12):e100320. doi:10.7759/cureus.100320
49. Racacho KJ, Shiau YP, Villa R, et al. The tumor immune microenvironment: implications for cancer immunotherapy, treatment strategies, and monitoring approaches. *Front Immunol*. 2025;16:1621812. doi:10.3389/fimmu.2025.1621812
50. Tufail M, Jiang CH, Li N. Immune evasion in cancer: mechanisms and cutting-edge therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther*. Jul 31 2025;10(1):227. doi:10.1038/s41392-025-02280-1
51. Di Spirito A, Balkhi S, Vivona V, Mortara L. Key immune cells and their crosstalk in the tumor microenvironment of bladder cancer: insights for innovative therapies. *Explor Target Antitumor Ther*. 2025;6:1002304. doi:10.37349/etat.2025.1002304
52. Kraja FP, Jurisic VB, Hromić-Jahjefendić A, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in cancer immunotherapy: from chemotactic recruitment to translational modeling. *Front Immunol*. 2025;16:1601773. doi:10.3389/fimmu.2025.1601773
53. Feliciangeli E, Albaladejo-González A, García-Rodríguez J, et al. Clinical and immunopathological evaluation and its comparison with IHC consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Sci Rep*. Jul 1 2025;15(1):21626. doi:10.1038/s41598-025-04962-w
54. Kawada T, Yanagisawa T, Rajwa P, et al. The Prognostic Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes After Radical Cystectomy for Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Genitourin Cancer*. Apr 2024;22(2):535–543.e4. doi:10.1016/j.clgc.2024.01.008
55. Montauti E, Oh DY, Fong L. CD4(+) T cells in antitumor immunity. *Trends Cancer*. Oct 2024;10(10):969–985. doi:10.1016/j.trecan.2024.07.009
56. de Biase D, Lenzi J, Ceccarelli C, et al. Spatial Cancer-Immune Phenotypes Predict Shorter Recurrence-Free Survival in the No Specific Molecular Profile Molecular Subtype of Endometrial Carcinoma. *Mod Pathol*. Jan 2025;38(1):100624. doi:10.1016/j.modpat.2024.100624
57. Drachneris J, Rasmusson A, Morkunas M, et al. $CD8^+$ Cell Density Gradient across the Tumor Epithelium-Stromal Interface of Non-Muscle Invasive Papillary Urothelial Carcinoma Predicts Recurrence-Free Survival after BCG Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. Feb 14 2023;15(4)doi:10.3390/cancers15041205
58. de Andrea CE, Abengozar-Muela M, Arranz J, et al. Association of PD-1, LAG-3 and TIM-3 expression on intratumoral CD8 T-cells with response to atezolizumab in a

Real-World-Evidence biomarker study for advanced urothelial carcinoma patients. *Oncoimmunology*. Dec 2025;14(1):2538687. doi:10.1080/2162402x.2025.2538687
59. Chen J, Zhong W, Yang M, et al. Development and validation of a PD-L1/PD-1/CD8 axis-based classifier to predict cancer survival of upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *Cancer Immunol Immunother*. Sep 2021;70(9):2657–2668. doi:10.1007/s00262-020-02827-x
60. Galassi C, Chan TA, Vitale I, Galluzzi L. The hallmarks of cancer immune evasion. *Cancer Cell*. Nov 11 2024;42(11):1825–1863. doi:10.1016/j.ccell.2024.09.010
61. Enneli D, Baglan T. The Many Faces of Urothelial Carcinomas: An Update From Pathology to Clinical Approach and Challenges in Practice. *Urol Res Pract*. May 2023;49(3):147–161. doi:10.5152/tud.2023.23023
62. 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*. Feb 2015;26(2):259–71. doi:10.1093/annonc/mdu450
63. Desgrandchamps F, LeMaoult J, Goujon A, et al. Prediction of non-muscle-invasive bladder cancer recurrence by measurement of checkpoint HLAG's receptor ILT2 on peripheral CD8(+) T cells. *Oncotarget*. Sep 4 2018;9(69):33160–33169. doi:10.18632/oncotarget.26036
64. Jóźwicki W, Brożyna AA, Siekiera J, Slominski AT. Changes in Immunogenicity during the Development of Urinary Bladder Cancer: A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. Feb 25 2016;17(3):285. doi:10.3390/ijms17030285
65. Hassan WA, ElBanna AK, Noufal N, El-Assmy M, Lotfy H, Ali RI. Significance of tumor-associated neutrophils, lymphocytes, and neutrophil-to-lymphocyte ratio in non-invasive and invasive bladder urothelial carcinoma. *J Pathol Transl Med*. Mar 2023;57(2):88–94. doi:10.4132/jptm.2022.11.06
66. Baras AS, Drake C, Liu JJ, et al. The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Oncoimmunology*. May 2016;5(5):e1134412. doi:10.1080/2162402x.2015.1134412
67. Olkhov-Mitsel E, Hodgson A, Liu SK, et al. Can immune markers help identify fast relapse in patients with muscle invasive bladder cancer? *Pathol Res Pract*. Nov 2020;216(11):153200. doi:10.1016/j.prp.2020.153200
68. Stakhovskyi O, Kobyliak N, Voylenko O, Stakhovskyi E, Ponomarchuk R, Sulaieva O. Immune Microenvironment of Muscular-Invasive Urothelial Carcinoma: The Link to Tumor Immune Cycle and Prognosis. *Cells*. May 31 2022;11(11)doi:10.3390/cells11111802
69. Krpina K, Babarović E, Jonjić N. Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes with bladder cancer recurrence in patients with solitary low-grade urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. Oct 2015;467(4):443–8. doi:10.1007/s00428-015-1808-6
70. Almeida Rodrigues AK, Silva PG, Nogueira C, et al. Expression of tumoral GSK3-β, PD-L1, and CD8 cell density in urothelial carcinomas, association with tumor grade and overall survival. *Am J Clin Exp Immunol*. 2023;12(5):87–97.
71. Liang Y, Tan Y, Guan B, et al. Single-cell atlases link macrophages and CD8(+) T-cell subpopulations to disease progression and immunotherapy response in urothelial carcinoma. *Theranostics*. 2022;12(18):7745–7759. doi:10.7150/thno.77281
72. Lv Y, Jin P, Chen Z, Zhang P. Characterization of hazard infiltrating immune cells and relative risk genes in bladder urothelial carcinoma. *Am J Transl Res*. 2020;12(11):7510–7527.

73. Ouyang Y, Zhong W, Xu P, et al. Tumor-associated neutrophils suppress CD8(+) T cell immunity in urothelial bladder carcinoma through the COX-2/PGE2/IDO1 Axis. *Br J Cancer*. Mar 2024;130(5):880–891. doi:10.1038/s41416-023-02552-z
74. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer*. Oct 15 1999;86(8):1537–43. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19991015)86:8<1537::aid-cncr21>3.0.co;2-d
75. Holm JS, Funt SA, Borch A, et al. Neoantigen-specific CD8 T cell responses in the peripheral blood following PD-L1 blockade might predict therapy outcome in metastatic urothelial carcinoma. *Nat Commun*. Apr 11 2022;13(1):1935. doi:10.1038/s41467-022-29342-0
76. Luo Q, Zhang X. Construction of Protein-related Risk Score Model in Bladder Urothelial Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2020;2020:7147824. doi:10.1155/2020/7147824
77. Elias R, Aragaki AK, Hoffman-Censits JH, Hahn NM, McConkey DJ, Johnson BA, 3rd. Intratumoral Expression of a Composite B Cell / CD8 T Cell Biomarker Stratifies Overall Survival by Circulating Tumor DNA Status and Benefit From Adjuvant Immunotherapy in High-Risk Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *J Urol*. Mar 2026;215(3):294–304. doi:10.1097/ju.0000000000004828
78. Tsai CY, Chi HC, Wu RC, et al. Combination Biomarker of Immune Checkpoints Predict Prognosis of Urothelial Carcinoma. *Biomedicines*. Dec 22 2021;10(1)doi:10.3390/biomedicines10010008
79. Sakatani T, Kita Y, Fujimoto M, et al. IFN-Gamma Expression in the Tumor Microenvironment and CD8-Positive Tumor-Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Urothelial Cancer Patients Receiving Pembrolizumab. *Cancers (Basel)*. Jan 6 2022;14(2)doi:10.3390/cancers14020263
80. Papadopoulou K, Koliou GA, Tsimiliotis D, et al. Investigation of prognostic biomarkers in patients with urothelial carcinoma treated with platinum-based regimens. *Urol Oncol*. Dec 2022;40(12):538.e15–538.e24. doi:10.1016/j.urolonc.2022.07.007
81. Phé V, Rouprêt M, Cussenot O, Chartier-Kastler E, Gamé X, Compérat E. Forkhead box protein P3 (Foxp3) expression serves as an early chronic inflammation marker of squamous cell differentiation and aggressive pathology of urothelial carcinomas in neurological patients. *BJU Int*. Apr 2015;115 Suppl 6:28–32. doi:10.1111/bju.13044
82. Zhong W, Yang M, Cheng S, et al. Identification of an IDO1-based immune classifier for survival prediction of upper tract urothelial carcinoma. *Cancer Sci*. Mar 2022;113(3):852–863. doi:10.1111/cas.15253
83. Xie Y, Olkhov-Mitsel E, Alminawi S, Slodkowska E, Downes MR. Development of a multiplex immuno-oncology biomarker and digital pathology workflow for assessment of urothelial carcinoma. *Pathol Res Pract*. Oct 2021;226:153607. doi:10.1016/j.prp.2021.153607