

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MESANE KANSERİ HASTALARINDA PD-1 VE PD-L1
EKSPRESYONLARININ PROGNOSTİK ÖNEMİNİN İNCELENMESİ

SÜMEYYE DURUR

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ HATİCE SEVİM NALKIRAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RİZE-2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisanüstü Eğitim Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20.09.2021
Sümeyye DURUR

TEŞEKKÜR

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimim süresince bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında ve tamamlanmasında beni destekleyen ve cesaretlendiren, akademik yaklaşımları ve mesleki tecrübeleri ile aynı çatı altında çalışmaktan dolayı kendimi şanslı hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN'a;

Bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM'a ve Arş. Gör. Dr. İhsan NALKIRAN'a;

Patolojik örneklerin temininde yardımcı olan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Recep BEDİR'e ve Üroloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Hakkı UZUN'a;

RNA izolasyonu için gerekli FFPE dokulardan kesitlerin alınmasında yardımcı olan Yusuf EKİNCİ'ye;

Şu anda çok uzak şehirlerde olsak da her daim yanımda olduğunu hissettiren, birlikte ağlayıp birlikte güldüğüm, aramızda kan bağı olmasa da can bağı olan canım dostum Sedef KARAMAN'a

Yüksek lisans dönemim boyunca yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Fatimatüzzehra ŞİPŞAK, Ayşe Nur AKMEHMET ve İnşirah YILDIZ'a;

Hayatım boyunca tüm zorluklara rağmen beni hep destekleyen, yanımda olan, merhameti, sevgisi ve dualarıyla beni sarıp sarmalayan canım annem ve babama;

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca her koşulda moral ve motivasyonumu yükselten, evimin neşe kaynağı canım kardeşlerim Rümeysa ve Esra'ya;

Yaptığım her işte beni destekleyen, her zorlukta yanımda olan, sevgisi ve merhameti ile her daim huzur ve mutluluk veren, canıma can katan yol arkadaşım Enes KAPLAN'a;

Çalışmalarım sırasında beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a

Yüksek Lisans Tezimi TYL-2020-1203 nolu proje ile destekleyen BAP Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Sümeyye DURUR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

x

ÖZET

xiv

ABSTRACT

xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Mesane Kanseri

3

2.1.1. Epidemiyoloji

3

2.1.2. Etiyoloji

4

2.1.3. Histoloji

7

2.1.3.1. Epitelyum

7

2.1.3.2. Lamina Propria

8

2.1.3.3. Muskularis Propria

8

2.1.3.4. Serosa/Adventisya

8

2.1.4. Histopatolojik İnceleme

9

2.1.5. Mesane Kanseriinde Evreleme ve Derecelendirme

9

2.1.6. Moleküler Patoloji

12

2.1.7. Hücre Orijini ve Klonalite

14

2.1.8. Tanı

15

2.1.9. Mesane Kanseri Tedavi/Yönetimi

16

2.2. Kanserde İmmünoterapiler

19

2.3. Kanser ve İmmün Sistem

19

2.3.1. İmmün Kontrol Noktaları

21

2.3.1.1. PD-1/PD-L1 Yolu

21

2.3.1.2.	İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri	22
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1.	Materyal	27
3.1.1.	Alet ve Cihazlar	27
3.1.2.	Kimyasal Malzemeler	29
3.1.3.	Çözeltiler	30
3.2.	Yöntem	33
3.2.1.	Macherey-Nagel Nucleospin® RNA İzolasyon Kiti FFPE Dokudan RNA İzolasyon Protokolü	33
3.2.2.	FFPE Dokudan RNA İzolasyonu İçin Optimizasyon Çalışmaları	34
3.2.3.	Optimize Edilmiş RNA İzolasyon Protokolü	34
3.2.4.	Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA Kalitesinin Kontrolü	35
3.2.5.	cDNA Sentezi	36
3.2.6.	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR)	37
3.2.7.	İmmünohistokimyasal İnceleme	40
3.2.8.	İstatistiksel Analiz	42
4.	BULGULAR	43
4.1.	FFPE Dokudan RNA İzolasyon Çalışmaları	43
4.2.	Klinikopatolojik Özellikler	44
4.3.	PD-L1 ve PD-1 Genlerinin qRT-PCR Kullanılarak Gerçekleştirilen Gen Ekspresyon Analizi	45
4.3.1.	PD-L1 Ekspresyonunun Kanser Evresi ve Tümör Derecesi ile İlişkisi	46
4.4.	PD-L1 Ekspresyonu, Kanser Evresi, Tümör Derecesi ile Genel Sağkalım İlişkisi	47
4.5.	İmmünohistokimyasal Boyama için Denemeler	50
5.	TARTIŞMA	52
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	58
	EKLER	70
EK 1.	Bilimsel Araştırma İzni	71
EK 2.	Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Mesane kanserinin TNM sınıflandırması	10
Tablo 2.	1973 ve 2004/2016 WHO derecelendirme sistemleri	12
Tablo 3.	İleri veya metastatik mesane kanseri hastalar için mevcut FDA onaylı İKNİ'ler	26
Tablo 4.	RNA izolasyon protokolünün optimizasyonunda kullanılan lizis solüsyonlar	34
Tablo 5.	Reaksiyon bileşen ve hacimleri	37
Tablo 6.	Thermal cycler koşulları	37
Tablo 7.	qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve hacimleri	39
Tablo 8.	qRT-PCR için çalışma protokolü	39
Tablo 9.	Hastalara ait klinikopatolojik özellikler	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	2020 yılında en yaygın görülen 10 kanserin her iki cinsiyette yeni vaka ve ölüm dağılımı	3
Şekil 2.	Dünya bölgelerine ve ülkelere göre mesane kanserinin her iki cinsiyet için yeni vaka sayıları	4
Şekil 3.	Mesane histolojisi	8
Şekil 4.	Mesane kanseri patogenezinin potansiyel yolları	14
Şekil 5.	İlerlemiş mesane kanserinin tedavi ve yönetimi	19
Şekil 6.	Mesane kanseri tedavisinde kontrol noktası inhibitörlerinin etki mekanizması	25
Şekil 7.	FFPE doku bloklarından elde edilen RNA'lara ait agaroz jel görüntüleri	45
Şekil 8.	Kanser evresine göre PD-L1 ekspresyonu kat-değişimi	47
Şekil 9.	Tümör derecesine göre PD-L1 ekspresyonu kat-değişimi	48
Şekil 10.	Tümör derecesi ile genel sağkalım ilişkisi	49
Şekil 11.	Tümör evresi ile genel sağkalım ilişkisi	49
Şekil 12.	PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım ilişkisi	50
Şekil 13.	Tonsil doku örneğinde İHK denemeleri sonucunda non-spesifik PD-L1 boyaması	51

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AR	Antigen Retrieval
ARL11	ADP Ribosylation Factor Like GTPase 11
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CAB39L	Calcium Binding Protein 39 Like
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CIS	Carcinoma In Situ
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organization of Research and Treatment of Cancer
EUA	European Association of Urology
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GLOBOCAN	Global Cancer
GSTM1	Glutathione S-Transferase Mu 1
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IDO-1	Indoleamine 2, 3-Dioxygenase 1
ISUP	International Society of Urologic Pathology
ITIM	Tyrosine-Based Inhibitory Motif
ITM2B	Integral Membrane Protein 2B
IVU	Intravenous Urography
İHK	İmmünohistokimya
İKNİ	İmmün Kontrol Noktası İnhibitör
KİMK	Kas-İnvaziv Mesane Kanseri

KİOMK	Kas-İnvaziv Olmayan Mesane Kanseri
LOH	Loss of Heterozygosity
LPAR6	Lysophosphatidic Acid Receptor 6
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLNR	Motilin Receptor
MRI	Magnetic resonance imaging
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerase
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PET-CT	Positron Emission Tomography and Computed Tomography
PGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinases
PIK3CA	PI3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm Of Low Malignant Potential
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RAF	Ras Associated Factor
RAS	Rat Sarcoma Virus
RB1	Retinoblastoma Protein 1
STAG2	Stromal Antigen 2
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20
TCR	T-Cell Receptor
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TNM	Tumor/Node/Metastasis
TP53	Tumor Protein 53
TUR	Trans Urethral Resection
UICC	The Union for International Cancer Control
USG	Ultrasonography
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

Simgeler

%	Yüzde
µl	Mikrolitre

μM	Mikromolar
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
pH	Power of Hydrogen
rpm	Revolutions Per Minute
V	Volt
μg	Mikrogram

Formüller

DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
PBS	Fosfat Tamponu
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit

ÖZET

Mesane Kanseri Hastalarında PD-1 ve PD-L1 Ekspresyonlarının Prognostik Öneminin İncelenmesi

Mesane kanseri, dünya çapında en yaygın görülen ilk 10 kanser arasındadır. Ülkemizde mesane kanseri; kanserler arasında en yaygın 6. kanser olup insidans ve mortalitesi erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 6 kat fazladır. İleri veya metastatik mesane kanserli hastaların standart tedavi yöntemleri ile medyan genel sağkalımı tanıdan itibaren yaklaşık 15 aydır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, PD-L1/PD-1 moleküllerinin immün baskılama ve tümörlerin immün-kaçış mekanizmalarında önemli araçlar olduğu belirtilmektedir. Ayrıca PD-L1'in, mesane kanseri de dahil çeşitli malignitelerde yüksek seviyede eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, mevcut mesane kanseri hasta kohortuna ait tümör dokularında PD-L1/PD-1 ekspresyon seviyelerinin prognostik öneminin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, PD-L1/PD-1 ekspresyonlarının tümör derecesi, kanser evresi alt gruplarındaki değişimi ve genel sağkalım ile ilişkisi incelendi. Mesane kanseri tanısı almış 48 hastanın parafin bloklarından monofazik fenol ve guanidin izotiyosiyanat metodu ile elde edilen RNA'lar kullanılarak qRT-PCR yöntemiyle gen ekspresyon seviyeleri belirlendi. İmmünohistokimyasal inceleme için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Yüksek dereceli tümör grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmış PD-L1 ekspresyonu görüldü ($p<0.05$). Ancak PD-L1 ekspresyon seviyesi kanser evreleri (pTa, pT1, pT2) arasında anlamlı bir fark göstermedi. Ayrıca; tümör derecesi, kanser evresi ve PD-L1 ekspresyonu alt grupları arasında genel sağkalımdaki fark anlamlı bulunmadı. PD-1 için amplifikasyon kanserli dokuda sınırlı sayıda gözlemlendiğinden gruplar arası analizler gerçekleştirilemedi. İmmünohistokimyasal inceleme için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları non-spesifik boyanma ile sonuçlandı. Sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak, mevcut mesane kanseri hasta kohortumuzda PD-L1'in yüksek ekspresyonunun tümörün agresifliği ve tümör derecesi ile ilişkili bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Ayrıca tümör dokularında yüksek PD-L1 ekspresyonu belirlenen mesane kanseri hastalarında, standart tedaviye alternatif anti-PD-L1 immünoterapi seçeneğinin önerilmesi konusunda rasyonel bir temel sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mesane Kanseri, PD-L1, PD-1, Gen Ekspresyonu, Kanser İmmünoterapisi

ABSTRACT

Investigation of the Prognostic Importance of Expressions of PD-1 and PD-L1 in Bladder Cancer Patients

Bladder cancer is among the ten most common cancers worldwide. It is the 6th most common cancer and its incidence and mortality is approximately 4 times higher in men than in women in Turkey. The median overall survival of patients with advanced or metastatic bladder cancer treated with standard therapy is approximately 15 months from diagnosis. In some recent studies, it has been stated that PD-L1/PD-1 molecules are important mediators in immune suppression and immune-escape mechanisms of tumors. It has been reported that PD-L1 is highly expressed in various malignancies, including bladder cancer. In this study, it was aimed to investigate the prognostic significance of PD-L1/PD-1 expression levels in tumor tissues of the current bladder cancer patient cohort. In this context, the variation of PD-L1/PD-1 expressions in tumor grade and stage subgroups and their relationship with overall survival were examined. RNA isolation was performed from FFPE tumor tissues of 48 patients diagnosed with bladder cancer using the monophasic phenol and guanidine isothiocyanate method. Total RNA was converted to cDNA and gene expression levels were analyzed by qRT-PCR. Optimization experiments were performed for immunohistochemical examination. Statistically significantly increased PD-L1 expression was observed in the high-grade tumor group ($p < 0.05$). However, no significant difference in PD-L1 expression was found among the three tumor stages (pTa, pT1, pT2). In addition, the difference in overall survival was not significant between tumor grade, tumor stage, and PD-L1 expression subgroups. We were unable to perform PD-1 gene amplification analysis between groups since the expression was observed in a limited number of tumor tissues. Optimization studies performed for immunohistochemical examination resulted in non-specific staining. In line with the previous literature, our results showed that high expression of PD-L1 in bladder cancer may be a biomarker associated with tumor aggressiveness and tumor grade. In addition, these results may provide a rational basis for recommending anti-PD-L1/PD-1 immunotherapy as an alternative to standard therapy in bladder cancer patients with high PD-L1 expression in tumor tissues.

Keywords: Bladder Cancer, PD-L1, PD-1, Gene Expression, Cancer Immunotherapy

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya genelinde en yaygın görülen kanserlerden biri olan mesane kanseri, yüksek morbidite ve mortalite riski ile ilişkili, sıklıkla nüks eden bir kanser türüdür (Yeung vd., 2014; Babjuk vd., 2019). Mesane kanserinin etiyolojisinde sigara kullanımı, mesleki maruziyetler, içme suyundaki arsenik, ırk ve etnik köken, artan yaş ve cinsiyet gibi birçok risk faktörü bulunmaktadır. Sigara kullananlarda mesane kanseri riski 2-4 kat artmaktadır (Freedman vd., 2011). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'na göre mesane kanseri insidansı erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 4 kat daha fazladır.

Mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ı epitelyum tabakasından gelişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) mesanenin ürotelyal karsinomunu histopatolojik olarak düşük dereceli ve yüksek dereceli tümörler olarak sınıflandırmakla birlikte, mesane kanserinin farklı moleküler yollarlar üzerinden gelişen kas invaziv mesane kanseri (KİMK) ve kas invaziv olmayan mesane kanseri (KİOMK) olarak adlandırılan iki ana gruplaması mevcuttur. İlk tanı anında hastaların yaklaşık %20'si KİMK ve metastatik mesane kanseri, %80'i ise KİOMK tanısı almaktadır (Tran vd., 2020).

Mesane kanserinin tedavisi; kemoterapi, radyoterapi, cerrahi uygulamalar ve yenilikçi immünoterapötik yöntemleri içermektedir. KİOMK'da düşük riskli hasta gruplarının tedavisinde mesane tümörünün transüretal rezeksiyonu (TURBT) ve intravezikal kemoterapi, orta ve yüksek riskli grupta Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immünoterapisi uygulanmaktadır (Babjuk vd., 2019). KİMK'lerde altın standart tedavi yöntemi radikal sistektomidir. Genellikle evre II-III olan hastalarda sisplatin+radikal sistektomi veya TURBT+kemoterapi+radyoterapi kombinasyon tedavileri önerilir (Chang vd., 2017). Metastatik mesane kanseri hastalarında MVAC ve GC gibi sisplatin bazlı kemoterapi kombinasyonları uygulanmaktadır. Platin bazlı kemoterapiye uygun olmayan hastalar için immün kontrol noktası inhibitörleri adı verilen anti-PD-L1/PD-1 immünoterapileri önerilmektedir. FDA tarafından platin bazlı kemoterapi sırasında veya sonrasında ileri ve metastatik mesane kanseri hastaları için Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab, Avelumab ve Durvalumab adlı anti-PD-L1/PD-1 kontrol noktası inhibitör tedavileri onaylanmış durumdadır (Kaseb ve Aeddula, 2019; Witjes vd., 2021).

Birçok kanser türünde eksprese edilen immün kontrol noktalarında görevli PD-L1 ve PD-1 moleküllerinin kanser hücrelerinin immün-baskılama ve immün-kaçış mekanizmalarında önemli rollerinin olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2009; La-Beck vd.,

2015). Tümör hücre yüzeyinde eksprese edilen PD-L1'in T hücre yüzeyinde ve diğ r immün hücre yüzeylerinde eksprese olan PD-1 reseptörüne bağlanması ile T hücrelerinin aktivasyonu baskılanarak, tümör hücrelerinin immün sistem savunma mekanizmalarından kaçış yoluna aracılık edilir (La-Beck vd., 2015).

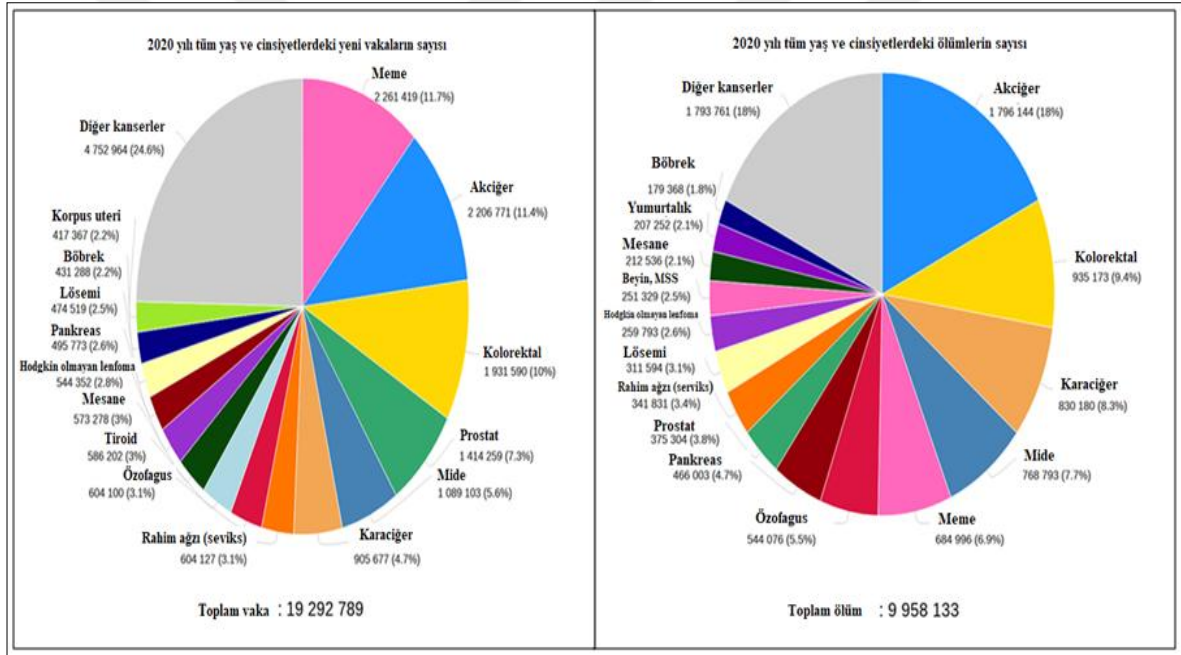
Literatürde çeşitli kanser türlerinde PD-L1 ve PD-1 ekspresyonu ile ilgili tartışmalı veriler mevcut olduğundan bu alanda daha fazla çalışma yapılması önem taşımaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışma ile, mesane kanseri hastalarına ait tümör dokularında PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyon seviyeleri belirlenerek, prognostik rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Mesane kanseri hastalarındaki PD-L1 ve PD-1'in ekspresyon seviyelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar, standart tedaviye düşük yanıt veren hastalar için anti-PD-L1/PD-1 antikorlarıyla uygulanan immünoterapi seçeneğine uygun hasta grubunun tanımlanmasına katkı sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

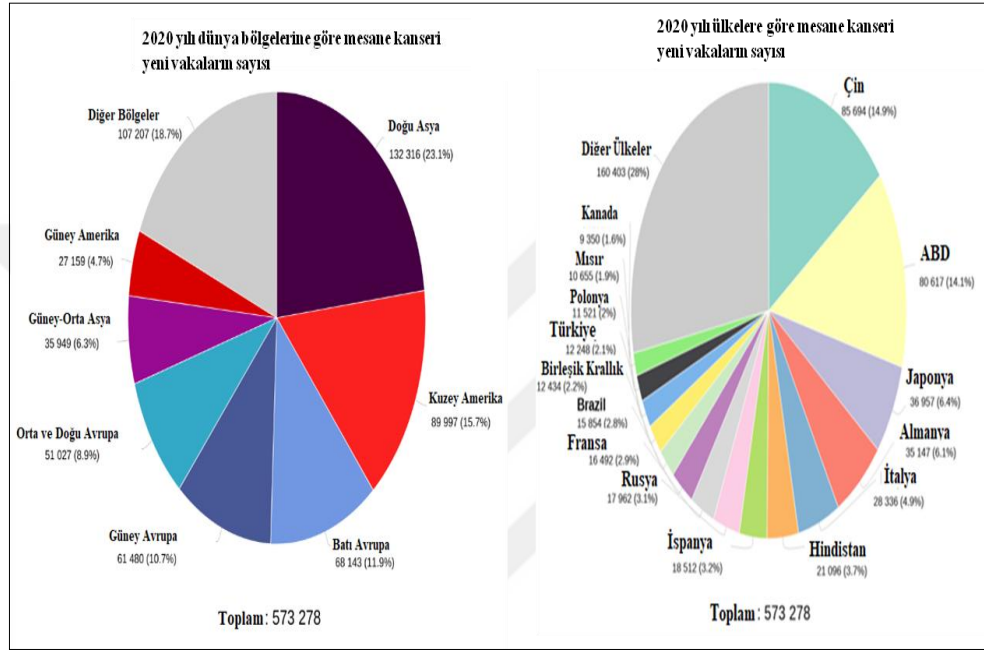
Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı [International Agency for Research on Cancer (IARC)] tarafından en son yayımlanan GLOBOCAN 2020 kanser insidansı ve mortalitesi ile ilgili küresel kanser yükü verilerine göre, yaklaşık 19.3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser nedeni ile ölümün meydana geldiği rapor edilmiştir. Dünya genelinde 573 278 (%3) yeni vaka ve 212 536 (%2.1) ölüm ile mesane kanseri en yaygın görülen ilk 10 kanser arasında yer almaktadır (Şekil 1) (Sung vd., 2021).



Şekil 1. 2020 yılında en yaygın görülen 10 kanserin her iki cinsiyette yeni vaka ve ölüm dağılımı (GLOBOCAN 2020 veritabanı)

Dünya genelinde Doğu Asya, Kuzey Amerika, Batı ve Güney Avrupa mesane kanserinin en yaygın olduğu bölgelerdir ve 2020 yılı itibarıyla yeni vaka sayısının en yüksek olduğu ülkeler arasında Çin, ABD, Japonya ve Almanya ilk sıralarda yer almaktadır. Türkiye, %2.1'lik (12 248 vaka) bir oranla dünya genelinde mesane kanserinin en yaygın olduğu 12. ülke konumundadır (Şekil 2). IARC'nin verilerine göre mesane kanseri dünya genelinde, erkeklerde en yaygın 6. kanserdir (440 864 vaka, %4.4). Bu oran mesane kanserinin kadınlardaki insidansı ile (132 414, %1.3) kıyaslandığında erkeklerde

yaklaşık 4 kat daha yaygın olduğu bildirilmiştir. 2020 verilerine göre, Türkiye’de mesane kanseri tüm kanserler arasında 12 248 (%5.2) yeni vaka oranı ile 6. en yaygın kanserdir ve 3 771 ölüm oranı ile kanser kaynaklı ölümlerde 11. sıradadır. Türkiye’de, erkeklerde görülen en yaygın 4. kanserdir (10 476, %7.9) ve erkekler kadınlardan yaklaşık 6 kat daha fazla mesane kanseri riski taşımaktadır.



Şekil 2. Dünya bölgelerine ve ülkelere göre mesane kanserinin her iki cinsiyet için yeni vaka sayıları (GLOBOCAN 2020 veritabanı)

2.1.2. Etiyoloji

Mesane kanserinin gelişimi ve ilerlemesi açısından etiyojisinde önemli rol oynayan birçok risk faktörü bulunmaktadır. En önemli risk faktörleri arasında sigara kullanımı, mesleki maruziyetler, içme suyundaki arsenik, ırk ve etnik köken, artan yaş, cinsiyet, kronik mesane tahrişi ve enfeksiyonları, genetik ve aile öyküsü yer almaktadır.

Sigara Kullanımı

Sigara kullanımı, mesane kanseri için en yaygın risk faktörüdür ve sigara kullananlarda kullanmayanlara göre mesane kanseri riski yaklaşık olarak 2-4 kat artmaktadır (Zeegers vd., 2000; Kirkali vd., 2005; Freedman vd., 2011). Sigara kullanımının mesane kanserindeki tüm vakaların yaklaşık %50'sinden sorumlu olduğu ve erkeklerde mesane kanseri vakalarının %50-65, kadınlarda ise %20-35'i ile ilişkili olduğu

bildirilmiştir (Freedman vd., 2011). Sigara kullanımına başlama yaşı mesane kanserinin heterojenitesini tetikleyebilecek en güçlü faktörlerden birisidir (Sun vd., 2017). Sigara kullanım yoğunluğu ve süresinin artması ile mesane kanseri riski artarken, sigara kullanımını bırakmak mesane kanseri riskini 1-4 yıl içerisinde >%30 ve 25 yıl sonrasında ise %60'a kadar düşürdüğü rapor edilmiştir (Freedman vd., 2011; Bassett vd., 2012; Sun vd., 2017).

Mesleki Maruziyetler

Mesane kanserinin etiyolojisinde yer alan en önemli diğer risk faktörü ise mesleki maruziyettir. Boya, tekstil, deri, kauçuk, plastik vb. sektörlerde çalışan kişilerde mesane kanseri riskinin arttığı rapor edilmiştir (Siemiatycki vd., 2004). Mesleki olarak kanserojen özellikteki kimyasallara beş yıldan daha uzun süre maruz kalmış bireylerin kanser kaynaklı ölüm oranının daha yüksek olduğu ve tüm mesane kanseri vakalarının %5-25'inin mesleki maruziyet kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Siemiatycki vd., 2004; Olfert vd., 2006). Boya endüstrisinde kullanılan benzidin ve beta-naftilamin gibi aromatik aminler, organik maddelerin yakılmasını içeren işlerde kullanılan poliaromatik hidrokarbonlar, tekstil, deri ve kauçuk imalatında kullanılan orto-toluen ve benzidin bazlı aromatik amin boyalar mesane kanseri gelişme riskini artıran kimyasallar olarak bilinmektedirler. 2021 Mart ayında yayımlanan bir çalışmada, artan mesane kanseri riskinden orto-toluidinin sorumlu olduğu ve hem mesane kanseri hastalarında hem de aromatik aminlere maruz kalan hasta olmayan işçilerde, mesane lezyonu ile ilişkili semptomların prevalansının, bu kimyasallara maruz kalmayan işçilerinkinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Nakano vd., 2021). Ayrıca rafine kimyasallar ve kömür katranı ürünlerinin üretiminde, kömür gazlaştırma ve alüminyum üretiminde çalışanlar, boyacılar, makineciler, saç boyalarına aşırı maruz kalan kuaförler ve ressamalar mesane kanseri görülme riskiyle ilişkili olabilecek meslekler arasında yer almaktadırlar (Olfert vd., 2006; Scélo ve Brennan, 2007; Redondo-Gonzalez vd., 2015; American Cancer Society, 2019).

İçme Suyundaki Arsenik

WHO ve IARC, arsenik ve arsenik bileşiklerinin halk sağlığı açısından en önemli 10 kimyasaldan biri olduğunu ve içme suyundaki arseniğin insanlar için kanserojen olduğunu belirtmektedir. WHO'nun içme suyundaki önerilen mevcut arsenik limiti 10 µg/L'dir ve arseniğe uzun süreli maruz kalmak mesane ve akciğer kanserleri için önemli bir risk faktörüdür. Hindistan, Bangladeş, Şili gibi ülkeler içme suyu kaynağında bulunan

yüksek oranda arsenik konsantrasyonu yüzünden risk altındadırlar. Arseniğe maruz kalmanın mesane kanserinin nüksetmesi ve ilerlemesinde önemli bir risk faktörü olduğu, yüksek arsenik kontaminasyonunun daha yüksek evre ve daha agresif eğilimli mesane kanserine sebep olduğu bildirilmiştir (Pal vd., 2020). Bir meta analiz çalışması, 50 µg/L arseniğe maruz kalan popülasyonlarda mesane kanseri insidansını %83 olarak belirtmiş ve içme suyunda 10 µg/L'den fazla arseniğe maruz kalmanın mesane kanseri riskini yaklaşık %40 artırabileceğini bildirmektedir (Saint-Jacques vd., 2014).

İrk ve Etnik Köken

Mesane kanseri geliştirme riski ile ilgili araştırılan bir diğer değişken de ırk ve etnik köken farklılıklarıdır. Mesane kanserinde etnik kökenler (Beyaz, Siyahi, Amerikan Kızılderili/Alaska Yerlisi, Asyalı/Pasifik Adalı) arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, Siyahi ve Amerikan Kızılderili/Alaska Yerlisi mesane kanseri hastalarının diğer etnik kökene sahip kişilere oranla hayatta kalma olasılıklarının daha kötü olduğu ve Asyalı/Pasifik Adalıların en yüksek hayatta kalma oranına sahip oldukları bildirilmiştir (Fang vd., 2020). Amerikan Kanser Topluluğu'na göre, Beyazların mesane kanseri geliştirme riski Afrikalı Amerikalılar ve Hispaniklere göre yaklaşık 2 kat daha fazladır. Ayrıca, mesane kanseri hastalarında 5 yıllık sağkalım oranları da etnik kökenler arasında değişkenlik göstermektedir (Siyahilerde %70.2, Hispaniklerde %80.7, Asyalı/Pasifik Adalılarda %81.9, Beyazlarda %82.8) (Yee vd., 2011).

Artan Yaş ve Cinsiyet

Mesane kanseri riskinin cinsiyet ve yaş ile ilişkili olduğu yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. IARC'ye göre mesane kanseri insidansı erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 4 kat fazladır. Artan yaş ile beraber mesane kanseri riski de artmaktadır ve hastaların %90'ı 55 yaş, %80'i 65 yaş üzerinde tanı alırken mesane kanseri tanısı ortalama yaşı 73'tür (Siegel vd., 2019; Saginala vd., 2020).

Kronik Mesane Tahrişi ve Enfeksiyonları

Mesane kanseri riski ile ilişkili olası enfeksiyonlar (parazit, bakteriyel, viral), tekrarlayan idrar yolları enfeksiyonları, immünolojik bozukluklar, kronik ve mekanik tahrişler vb. birçok faktör literatürde yer almaktadır. Bu faktörler aracılığı ile kronik inflamasyon tetiklenebilir ve inflamasyon başladığında çeşitli moleküler yollarla kanser hücresi büyümesini ve metastazını uyararak mesane kanseri patogeneze aracılık edebilir

(Nesi vd., 2015; Sui vd., 2017). Yapılan bir çalışma, bazı ülkelerde endemik olarak görülen ve bir paraziter hastalık olan Şistozomal (*Schistosoma haematobium*) enfeksiyonların mesanenin skuamöz hücreli karsinomalarının %60-90'ını, adenokarsinomların %5-15'ini oluşturduğunu bildirmiştir (Abol-Enein, 2008). Bakteriyel kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının mesane kanseri oluşturma riski ile ilgili literatürde tutarsızlık olmasına rağmen, çalışmaların çoğu idrar yolu enfeksiyonları ile mesane kanserinin ilişkili olduğunu göstermektedir (Abol-Enein, 2008; Anderson-Otunu ve Akhtar, 2016).

Genetik ve Aile Öyküsü

Normal mesane hücrelerinde bazı değişiklikler, bunların anormal şekilde büyümesine ve kanser oluşturmaya neden olabilir. Bu duruma onkogenlerin aktif veya tümör baskılayıcı genlerin inaktif formda bulunması neden olabilir. Amerikan Kanser Topluluğu'na göre, TP53 veya RB1 tümör baskılayıcı genler ve FGFR veya RAS onkogenleri gibi belirli genlerde meydana gelen değişiklikler, mesane kanserlerinin gelişiminde rol oynamaktadır. Bazı çalışmalar mesane kanserini genetik yatkınlık ile ilişkilendirmiş ve N-asetil-transferaz ve GSTM1 gibi (kanserojenlerin metabolizmasında rol oynayan) genlerin artan risk ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (An vd., 2015). Bugüne kadar birkaç çalışmanın sonucu, mesane kanserli birinci derece akrabası olan bireylerin, ailesinde mesane kanseri öyküsü olmayanlara göre 2 kat fazla mesane kanseri riski taşıdığını göstermiştir (Aben vd., 2002; Turati vd., 2017; Koutros vd., 2021).

2.1.3. Histoloji

Mesane duvarının histolojik yapısı mikroskopik olarak incelendiğinde içten dışa doğru epitelyum (astar epitelyum), lamina propria, muskularis propria ve serosa/adventisya tabakalarından oluşmaktadır (Bolla vd., 2021) (Şekil 3).

2.1.3.1. Epitelyum

Mesanenin iç yüzeyi ürotelyum adı verilen (daha önceleri transizyonel epitel olarak bilinen) epitel hücrelerden meydana gelir. Normal durumda ürotelyum 5-7 kat kalınlıkta iken, mesanenin idrarla dolmasıyla birlikte mesane duvarı genişleyerek ürotelyum 2-3 kat şekilde yeniden düzenlenir. Ürotelyum, en içte apikal tabaka (şemsiye şekilli hücre katmanı), 2-3 poligonal hücre katmanından meydana gelen bir ara tabaka ve bazal tabakadan oluşur (Fry vd., 2011).

2.1.3.2. Lamina Propria

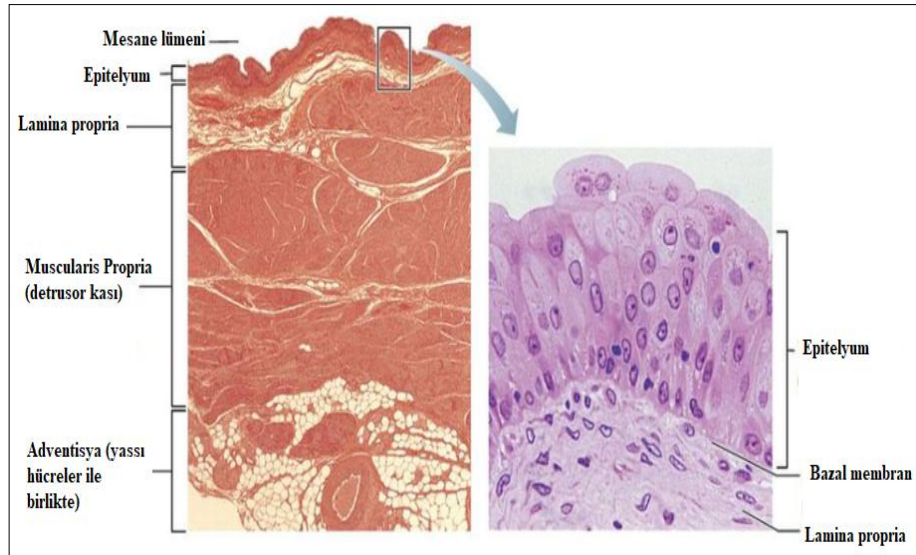
Lamina propria, ürotelyumun hemen altında bulunan ve mesane kasları ile çevrelenmiş submukozal bir tabakadır. Elastik lifler, kılcıl damarlar, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, adipositler, duyuşal sinir uçları dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini içeren hücre dışı matristen oluşmaktadır (Bolla vd., 2021).

2.1.3.3. Muskularis Propria

Muskularis propria mesanenin kalın, dış kas tabakasıdır. İdrarın atılımı veya tutulumu için mesanenin kasılma ve gevşeme hareketlerini sağlayan farklı yöne yönlendirilmiş detrusor kası olarak da bilinen düz kas liflerinden oluşur. İç katman uzunlamasına başlayıp orta katmanda dairesel şekilde ve dış katmanda tekrar uzunlamasına olmak üzere 3 düz kas tabakasından meydana gelir (Sam vd., 2020; Bolla vd., 2021) (Şekil 3).

2.1.3.4. Serosa/Adventisya

Serosa, mesanenin üst kısmını örten ince bir zar yapısıdır. Çeşitli boyutlarda kan damarları içerir. Adventisya, mesanenin serosa yapısının bulunmadığı alanlarını kaplayan gevşek bağ doku tabakası ile mesanenin dış tabakası görevini görür (Bolla vd., 2021).



Şekil 3. Mesanenin histolojisi

2.1.4. Histopatolojik İnceleme

Farklı histopatolojik özellikte çok sayıda alt grupların varlığı mesane kanserini heterojen bir tümör grubu haline getirmektedir. Mesane tümörleri genel olarak ürotelyal karsinoma olarak adlandırılan epitel tabakasından (ürotelyum) gelişebilirler. Ürotelyal karsinoma, mesane kanseri vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturan, çeşitli alt gruplara ayrılabilen histolojik alt tiptir (Kaufman vd., 2009; Humphrey vd., 2016; Bray vd., 2018). Mesane kanserlerinin geriye kalan yaklaşık %10'luk kısmı skuamöz hücreli karsinom (yassı epitel hücreli karsinom), glandüler (adenokarsinom), küçük hücreli/nöroendokrin, mikropapiller ve sarkomatid karsinom gibi çeşitli histopatolojik varyantlar içerir (Kaufman vd., 2009; McConkey ve Choi, 2018; Black ve Black, 2020). WHO, mesanenin ürotelyal karsinomunu histopatolojiye dayalı olarak düşük dereceli ve yüksek dereceli tümör olarak sınıflandırır.

2.1.5. Mesane Kanseri Evreleme ve Derecelendirme

Evreleme, kanser teşhisi konulduktan sonra kanserin nerede yerleştiğinin, nerelere yayılıp yayılmayacağının veya diğer organların etkilenip etkilenmediğinin belirlendiği süreç olarak tanımlanabilir. Mesane kanseri için patolojik evreleme, tedavi stratejilerini ve prognozu etkileyen en önemli prognostik faktörlerden biridir (Brierley vd., 2017). Kanserlerin evrelemesinde, AJCC [American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Ortak Komitesi)] ve UICC [The Union for International Cancer Control (Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği)] tarafından önerilen TNM (Tümör-Nod-Metastaz) evreleme sistemi kullanılmaktadır. TNM evreleme sistemi ile tümörün derinliği, lenf nodlarına yayılımı ve metastaz durumu değerlendirilir (Magers vd., 2019). WHO ürotelyal tümörleri, Ta, T1 ve Tis/Cis evrelerinde yer aldığı KİOMK, T2-T4 evrelerinde ise KİMK olarak iki başlık altında sınıflandırmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Mesane kanserinin TNM sınıflandırması (Magers vd., 2019)

T: Birincil Tümör		
Kas-İnvaziv Olmayan Hastalık	Tx	Primer tümör değerlendirilememektedir
	T0	Tümör kanıtı yok
	Ta	Non-invaziv papiller karsinom
	Tis/Cis	Karsinoma in-situ “flat tümör”
	T1	Subepitelyal bağ dokusu istilas
Kas-İnvaziv Hastalık	T2	Tümörün muskularis propria kası istilas
	T2a	Tümörün yüzeysel muskularis propria kasını istilas (iç yarı)
	T2b	Tümörün derin kas dokusunu istilas (dış yarı)
	T3	Tümörün perivezikal bölgeyi istilas
	T3a	Mikroskopik olarak istila
	T3b	Makroskopik olarak istila (ekstravezikal kitle)
	T4	Tümörün; prostat stroması, uterus, vajina, pelvik veya karın duvarı gibi yapıları istilas
	T4a	Tümörün; prostat stroması, seminal veziküller, uterus veya vajina istilas
	T4b	Tümörün; pelvik duvar ve karın duvarını istilas
N: Lenf Nodu		
	Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir
	N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
	N1	Tek bir bölgesel lenf nodu tutulumu (hipogastrik, obturator, dış iliak veya presakral lenf nodu)
	N2	Multipl bölgesel lenf nodu tutulumu (hipogastrik, obturator, dış iliak veya presakral lenf nodu)
	N3	Ortak iliak lenf nodunda tutulum
M: Uzak Metastaz		
	M0	Uzak metastaz yok
	M1	Uzak metastaz var
	M1a	Bölgesel olmayan lenf düğümlerine metastaz var
	M1b	Diğer uzak metastazlar

Derecelendirme, tümör hücrelerinin sağlıklı hücrelere kıyasla ne kadar anormal olduğunu tanımlamaktadır. Mesane tümörünün patolojik derecesinin doğru belirlenmesi, mesane kanseri tanısı alan hastaların tedavi yönetimi için tümörleri farklı gruplara ayırmayı amaçlamaktadır. WHO tarafından 1973 yılında kabul edilen mesane kanserlerinin derecelendirme sistemi, 1998’de WHO ve ISUP [International Society of Urologic Pathology (Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği)] tarafından önerilen bilgiler doğrultusunda güncellenmiştir. Düşük malign potansiyeli bulunan papiller ürotelyal neoplazm [papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)] kavramı ilk kez bu sınıflandırmada tanıtılmıştır. 2004 yılında yayınlanan sınıflandırmaya göre ürotelyal tümörler düşük dereceli ve yüksek dereceli tümörler olarak bölünmüş olup; birkaç değişiklikle beraber bu sınıflandırma 2016 yılı derecelendirme sisteminde de yer almıştır (Babjuk vd., 2017; Compérat vd., 2019). 1973’teki derecelendirmede ürotelyal karsinomalar derece 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) şeklinde iken; günümüzde ürotelyal papilloma (tamamen iyi huylu lezyon), PUNLMP, düşük derece ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinoma olarak güncellenmiştir. Benimsenen önceki sınıflandırmada G2 veya G3 ürotelyal karsinomalar günümüzde yüksek dereceli ürotelyal karsinoma olarak kabul edilmektedir. Ancak klinik uygulamada Avrupa Üroloji Derneği, önerilen tüm sınıflandırmalarının birlikte kullanılmasını önermektedir (Compérat vd., 2019).

Güncel sınıflandırma ile doku istilası için daha fazla eğilim gösteren tümörler daha iyi bir şekilde kategorize edilmiştir. 2016 sisteminde, patolojik olarak Ta ve T1 evresinde bulunan tümörler Düşük veya Yüksek Dereceli olarak derecelendirilmekte ve tüm Muscularis Propria’ya invaziv ürotelyal karsinomalar yüksek dereceli tümörler olarak kabul edilmektedir. T1 tümörleri genellikle yüksek dereceli olarak tanımlanmaktadır ancak doğru prognostik bilginin elde edilmesi için, T1 tümörlerinin alt evrelendirilmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir (Babjuk vd., 2017; Soukup vd., 2017; Compérat vd., 2019). Patolojik evrelendirilmesi T2-4 olan ürotelyal karsinomalar, WHO 2004/2016 derecelendirme sistemine göre yüksek dereceli tümörler olarak sınıflandırılır. Ayrıca bazı Ta evre tümörleri de yüksek dereceli olabilmektedir. Yüksek dereceli olarak nitelendirilen tümörler genellikle daha agresif lezyonlardır. Mesane kanserinin derecelendirme sistemleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1973 ve 2004/2016 WHO derecelendirme sistemleri (Babjuk vd., 2017)

1973 WHO Derecelendirme Sistemi
Ürotelyal Papilloma
Derece 1: İyi derece farklılaşmış (differansiye)
Derece 2: Orta derecede farklılaşmış
Derece 3: Kötü derecede farklılaşmış, çoğunlukla kötü huylu
2004/2016 WHO Derecelendirme Sistemi (papiller lezyonlar)
Ürotelyal Papilloma (tamamen iyi huylu)
PUNLMP (düşük malign potansiyeli bulunan papiller ürotelyal neoplazm)
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinoma
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinoma
Flat (Düz/Yassı) Lezyonlar (2004 WHO Derecelendirme Sistemi)
Belirsiz malign potansiyelin ürotelyal proliferasyonu (arcinia hiperplazisi)
Reaktif atipi (atipili düz lezyon)
Önemi bilinmeyen atipi
Ürotelyal displazi
Ürotelyal CIS (her zaman yüksek dereceli)

2.1.6. Moleküler Patoloji

Moleküler ve klinikopatolojik özellikleri açısından değerlendirildiğinde mesane kanserinin, heterojen bir hastalık grubunu temsil ettiği görülmektedir. Mesane kanserinin potansiyel patogeneze yollarının, farklı histopatolojik ve moleküler gözlemlere dayalı olarak iki ana yoldan geliştiği bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalardan elde edilen patolojik ve klinik bilgiler, mesane kanserinde farklı moleküler yollar üzerinden gelişen KİOMK ve KİMK olarak gruplandırılan iki ana tümör grubunun varlığını öne sürmektedir. İlk tanıda hastaların yaklaşık %20'si daha agresif ve önemli mortalite ile ilişkili KİMK ve yaklaşık %80'i sıklıkla nüks eğilimi gösteren KİOMK teşhisi almaktadır (Tran vd., 2020). Son yıllarda mesane kanserinin çok sayıda moleküler alt tipinin tanımlanması ile hem KİOMK hem de KİMK için birden fazla aşağı yönde yolların varlığı gösterilmiştir. Mesane kanserlerinde, FGFR3/RAF/RAS, TP53/RB1 ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları en sık değişiklik meydana gelen yollarlardır. Bu yollar immün yanıt kontrol noktası

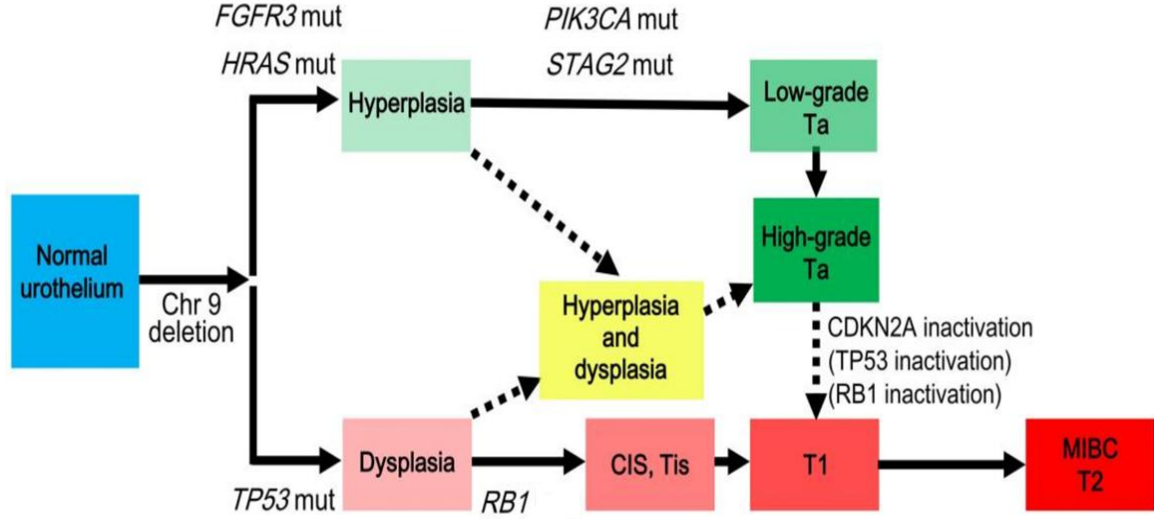
modulatorlerini, kromatin düzenleyicilerini ve yeniden modelleme genlerini içermektedir (Inamura, 2018). Mesane kanserinin gelişiminde meydana gelen en önemli kromozomal değişiklik 9. kromozomdaki değişikliklerdir. Hem KİMK hem de KİOMK’de görülen 9. kromozomdaki değişiklikler tümörün erken evresinde meydana gelmektedir ve bu değişikliklerin genetik kararsızlığa (genetik instabilite) neden olduğu düşünülmektedir (Netto, 2011).

Genellikle düşük dereceli papiller tümörler benign ürotelyumdan gelişen ürotelyal hiperplazi ve düz displaziden gelişir. KİOMK’de moleküler düzeyde meydana gelen değişiklikler arasında; kromozom 9 heterozigotluk kaybı (LOH) ve Telomeraz ters transkriptazı (*TERT*) mutasyonları, *HRas*, *FGFR3*, *PIK3CA* ve *STAG2*’de meydana gelen mutasyonlar gibi çok sayıda mutasyon yer almaktadır (Knowles ve Hurst, 2015). Özellikle KİOMK ve düşük dereceli karsinomaların yaklaşık %80’inde *FGFR3* geninin sıklıkla mutasyona uğradığı gösterilmiştir (Gönül vd., 2007; Humphrey vd., 2016). *TERT*’i kodlayan genin promotöründe meydana gelen mutasyonlar, mesane neoplazmalarında %70-80’lik bir sıklıkta mevcut olmasına rağmen klinik sonuçlarla tam olarak ilişkili değildir, ancak mesane kanseri hastalarında tespit edilmesinin tanıya katkısı olabileceği düşünülmektedir (Humphrey vd., 2016; Kurtis vd., 2016).

KİMK’lerde de çok sayıda kopya sayısı anormallikleri, heterozigotluk kaybı, artan genomik kararsızlık, epigenetik değişiklikler ve onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyelerinde farklılıklar bildirilmiştir. KİMK’leri, 9. kromozomda delesyon ve *TP53*’te mutasyon gösteren flat ‘yassı’ displazi, CIS (karsinoma in situ) veya düşük dereceli ürotelyal tümörlerin yüksek dereceli tümörlere dönüşümü ile *CDKN2A* (Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A) geninde meydana gelen bir delesyon sonucunda kas invazyonuna doğru ilerlemesiyle gelişebilir. Şekil 4’te gösterildiği gibi, yassı displazinin yüksek dereceli invaziv olmayan papiller tümörler, hiperplazi ve displaziye gelişiminin (kesikli ok ile gösterilen kısım) altında yatan moleküler değişimler kesin olarak bilinmemektedir (Knowles ve Hurst, 2015).

Mesane kanseri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda, kromozom ve gen düzeyinde meydana gelen değişikliklerin yanı sıra epigenetik değişikliklerin de karsinogenezde etkili olduğuna dair sonuçlar bildirilmiştir. KİMK ve KİOMK tümör grupları farklı epigenetik değişiklikler içermektedir. Sıklıkla KİMK’lerde promotör

hipermetilasyonları, KİOMK'lerde ise hipometilasyonlar görülmektedir (Sanli vd., 2017; Tran vd., 2021).



Şekil 4. Mesane kanseri patogenezinin potansiyel yolları (Inamura, 2018)

2.1.7. Hücre Orijini ve Klonalite

Mesane kanseri, papiller/luminal ve papiller olmayan/bazal yollar boyunca mikroçevreden etkilenen farklı ürotelyal progenitör (üroprogenitör) hücrelerden veya ürotelyal kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Czerniak vd., 2016). Mesanenin iç yüzeyini kaplayan ürotelyumun yapı ve işlevi göz önüne alındığında, karsinogenez ile ilgili bilgiler sunabileceği görülmektedir. Ayrıca ürotelyumun kanserojenlere kronik olarak maruz kalması, cerrahi işlem ile intraepitelyal genişleme veya tek bir tümör klonundan yayılma sırasında serbest kalan hücrelerin çoğalması ile lezyonlar ortaya çıkabilir. Mesane karsinogenezinde forerunner/öncü (FR) genleri olarak adlandırılan yeni bir gen sınıfının potansiyel başlatıcı olabileceği bildirilmiştir. Başlatıcı luminal ve bazal alan etkileri (initiating luminal and basal field effects), farklı üroprogenitör hücrelerden kaynaklanır ve farklı öncü genler tarafından hücre yayılması tetiklenir. Alan etkilerini başlatan moleküler mekanizmalarda rol alan bu öncü genler, RB1 gibi tümör baskılayıcıların etrafında yerleşik durumdadır. Ürotelyum içerisinde öncül neoplastik hücrelerin klonal genişlemesini sağlayan öncü genler, genellikle hipermetilasyon ve bazen de mutasyonlar aracılığıyla susturulurlar (Majewski vd., 2008).

Tüm-mesane haritalama (whole-bladder mapping) çalışmaları ile, normal veya displastik morfolojiye sahip KİMK'de 3q22, 5q22-23, 9q21, 10p26, 13q14 ve 17q13'te heterozigotluk kaybı bulunan, farklılaşmış hücrelerin klonal alanlarını temsil eden altı bölge tanımlanmıştır. 13. kromozomun q kolunun 1. bölgesinin 4. bandında (13q14) yer alan RB1 geni ile ilgili yapılan bir çalışmada, morfolojik değişikliğin minimum seviyede olduğu veya hiç olmadığı ürotelyal alanlarda öncü neoplastik ürotelyal klonun ilk klonal genişlemesinde rol alan bir bölge tanımlanmıştır. Burada, RB1'in hem klonal genişleme ile ilgili bir mutasyona uğramaması hem de hipermetile olmamasına rağmen böyle bir bölgenin varlığı, FR genlerin klonal genişlemenin itici güçleri olduğu, karsinoma in situ gelişimi ve tümörün ilerlemesi sırasında RB1'de meydana gelen fonksiyon kaybının ikincil bir olay olduğu ileri sürülmüştür. RB1 çevresinde mesane kanserinin gelişiminde potansiyel başlatıcı aday FR genler arasında ITM2B, LPAR6, MLNR, CAB39L ve ARL11 yer almaktadır (Majewski vd., 2008).

Farelerde gerçekleştirilen soy-izleme çalışmalarında, mesanenin bazal olmayan katmanlarındaki hücrelerin, KİOMK'nin tümör başlatıcı hücreleri olduğu ve sonic hedgehog (Shh) eksprese eden kök hücrelerin, hasar sonrası normal ürotelyumu yeniden doldurabilen ve kanserojen ile indüklenme sonucunda KİMK'ye neden olan bazal progenitor hücreler olduğu bildirilmiştir (Shin vd., 2014; Van vd., 2014).

2.1.8. Tanı

Mesane kanseri hastalarında diğer nedenler ile açıklanamayan hematüri (makroskobik veya mikroskobik) varlığı en yaygın görülen belirtilerdendir. Bununla birlikte idrara çıkmadaki sıklık, dizüri (ağrılı idrar yapma) artışı, obstrüktif semptomlar, ilerlemiş tümörlerde pelvik ağrı gibi belirtiler görüldüğünde mesane kanserinden şüphe edilebilir.

Mesane kanseri şüphesi taşıyan hastalarda radyolojik görüntüleme (BT, MRI, PET/PET-CT, IVU, USG), sistoskopi, idrar sitolojisi ve idrar belirteçleri, transüretral rezeksiyon (TUR)/biyopsi gibi çeşitli tanısal değerlendirme araçları kullanılmaktadır (Yazbek-Hanna vd., 2016; Babjuk vd., 2017). Mesane kanserlerinde tanı için çeşitli yöntemler mevcut olsa da en sık kullanılan yöntem sistoskopidir. Tanıda altın standart yöntem olarak kabul edilen sistoskopi, rezeksiyon ve histopatolojik değerlendirmeye olanak sağlayan endoskopik bir prosedürdür. Gelişen teknoloji sayesinde kullanılan görüntüleme yöntemleri de sistoskopi ve rezeksiyon ile değerlendirilemeyen mesane

kanseri hastalarında tanı ve evrelemede önemli yer tutmaktadır. Mesane kanserinde TUR, tanı ve evrelemede önemli olduğu kadar invaziv olmayan mesane kanserlerinde tedavi için de önemli bir araçtır. BT (bilgisayarlı tomografi), mesane kanserlerinde tanı ve evrelemede, lenf düğümü ve uzak metastazların değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan görüntüleme yöntemidir (Galgano vd., 2020).

2.1.9. Mesane Kanseri Tedavi/Yönetimi

Mesane kanserinin tedavi ve yönetimi için Avrupa Üroloji Derneği, Amerikan Üroloji Derneği, Ürolojik Onkoloji Derneği gibi çeşitli dernekler tarafından klavuzlar yayınlanmaktadır (Chang vd., 2016; Alfred Witjes vd., 2017; Babjuk vd., 2017). Mesane kanserinde uygulanacak olan tedavinin seçimi, kas invazyonunun varlığına veya yokluğuna göre yapılmaktadır. Tedavinin planlanmasında EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer) ve EUA (European Association of Urology) gibi risk sınıflandırma yöntemleri kullanılır. Mesane kanseri tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapötik, radyolojik ve immünoterapötik yöntemleri içermektedir.

KİOMK'lerin tedavisinde genellikle TURBT ve intravezikal uygulamalar (intravezikal kemoterapi, intravezikal BCG) kullanılmaktadır. İlk TURBT'in ardından tümörün büyüklüğüne, evresine, derecesine, CIS varlığına/yokluğuna vb. risk faktörlerine göre hastalar düşük, orta veya yüksek riskli olarak sınıflandırılır. TURBT ile birlikte intravezikal kemoterapi (Mitomisin C, Gemsitabin, Epirubisin ve Doksorubisin gibi) uygulamasının hastalığın nüks sıklığını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (Messing vd., 2018; Babjuk vd., 2019). Yapılan analizler sonucunda BCG intravezikal tedavisinin kemoterapiye kıyasla orta ve yüksek riskli KİOMK'li hasta grubunda, hastalığın nüksünü, ilerlemesini azalttığı ve sağkalım oranlarında artış sağladığı gösterilmiştir (Sylvester vd., 2002; Peyton vd., 2019).

Genel olarak KİMK'lerde altın standart tedavi yöntemi radikal sistektomidir ve hastaların evre ve metastaz durumuna göre neoadjuvan/adjuvan tedavileri dahil edilebilmektedir. Radikal sistektomi ile bazı komşu organlar ve bölgesel lenf nodları çıkarılarak hastalığın tedavisi amaçlanmaktadır. KİMK'li hastanın cerrahi tedaviye uygunluğu ve hastanın bu tedavi sonucunda ortaya çıkabilecek zorlukları kabul edip etmeyeceği, hastalığın yönetiminin temelini oluşturmaktadır. Genellikle patolojik evre II-III olan hastalarda, kombine sisplatin/radikal sistektomi veya kombine modalite adı verilen TURBT ve kemo-radyasyon tedavilerinin birlikte uygulanması şeklinde hastalık süreci

yönetilir (Chang vd., 2017). Ayrıca radikal sistektominin, KİOMK’de intravezikal tedavinin başarısız olduğu durumlarda (BCG’ye dirençli, BCG nüksü ve BCG’ye yanıt vermeyen hastalarda) ve bazı yüksek dereceli T1 evre (lamina propria istilası) hastalarında da kullanılması önerilmektedir (Fritsche vd., 2010; Alfred Witjes vd., 2017; Witjes vd., 2021).

Metastatik mesane kanseri tedavisinde sisplatin bazlı kemoterapi kombinasyonları standart birinci basamak tedavi olarak uygulanmaktadır. Birinci basamak tedavide MVAC (Metotreksat, Vinblastin, Adriamisin/Doksorubisin ve Sisplatin) ve GC (Gemsitabin ve Sisplatin) en çok kullanılan sisplatin bazlı kemoterapi kombinasyonlarıdır (Kaseb ve Aeddula, 2019; Witjes vd., 2021). Mesane kanseri hastalarının %50’den fazlası sisplatin bazlı kemoterapiye uygun değildir, bu durumda da Gemsitabin-Karboplatin kombinasyonu kullanılmaktadır. Metastatik hastalığın birinci basamak tedaviden sonra ilerlemesi sonucunda ikinci basamak tedavide kemoterapi ilacı Vinflunin kullanılması önerilmektedir (Alfred Witjes vd., 2017).

Platin bazlı kemoterapi rejimlerine uygun olmayan mesane kanseri hastalarında birinci ve ikinci basamak tedavi için diğer bir seçenek de immünoterapilerdir. İmmün kontrol noktası inhibitörleri adı verilen PD-L1 (Programlanmış hücre ölüm ligand 1) veya PD-1 (Programlanmış hücre ölümü 1) proteinini hedefleyen ilaçlar, platin bazlı kemoterapi rejimlerine dirençli hasta grupları için tercih edilmektedir. FDA ve Avrupa İlaç Ajansı, sisplatin tedavilerine uygun olmayan hastalar için Pembrolizumab ve Atezolizumab immünoterapilerini birinci basamak tedavi olarak onaylamış durumdadır.

Son yıllarda platin bazlı kemoterapi sırasında veya sonrasında ileri ve metastatik mesane kanseri hastaları için onaylanmış olan Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab, Avelumab ve Durvalumab gibi PD-1/PD-L1 kontrol noktası inhibitörleri tedavi protokolleri içerisinde yer almakta ve standart tedavideki yeri araştırılmaya devam etmektedir (Witjes vd., 2021). İlerlemiş mesane kanserinin tedavi ve yönetimi aşağıda Şekil 5’te özetlenmiştir.

Birinci Basamak Tedavi		
Sisplatin tedavisi için uygun mu?		
Evet	Hayır	Hayır
Performans durumu: 0-1 ve Glomerüler filtrasyon hızı: ≥ 60 mL/dk	Performans durumu: 2 ve Glomerüler filtrasyon hızı: < 60 mL/dk	Performans durumu: ≥ 2 ve Glomerüler filtrasyon hızı: < 60 mL/dk
GC MVAC Yüksek doz MVAC PCG	1. CG 2. Pembrolizumab (PD-L1 pozitif ise) 3. Atezolizumab (PD-L1 pozitif ise) 4. Alternatif rejimler 5. Klinik denemeler veya en iyi destekleyici bakım	1. Pembrolizumab (PD-L1 pozitif ise) 2. Atezolizumab (PD-L1 pozitif ise) veya En iyi destekleyici bakım
İkinci Basamak Tedavi		
Performans durumu: 0-1		Performans durumu: ≥ 2
1. Pembrolizumab 2. Atezolizumab 3. Nivolumab veya - Klinik denemeler - Kombinasyon kemoterapi - Monoterapiler		1. İmmünoterapi düşünülmeli 2. Klinik denemeler 3. En iyi destekleyici bakım
Sonraki tedaviler		
1. Kemoterapi 2. İmmünoterapi (ikinci basamak tedavi olarak verilmemişse) 3. Klinik denemeler 4. En iyi destekleyici bakım		

Şekil 5. İlerlemiş mesane kanserinin tedavi ve yönetimi (GC; Gemsitabin+Sisplatin, MVAC; Metotreksat+Vinblastin+Adriamisin+Sisplatin, PCG; Paklitaksel+Sisplatin+Gemsitabin) (Witjes vd., 2021).

Son yıllarda, mesane kanserinin genomik karakterizasyonu, onkogenezi ve ilerlemesinde rol alan moleküler araçların potansiyel olarak hedeflenebilir olabileceğine dair ümit verici başka immünoterapötik yaklaşımlar da ortaya çıkmıştır. FGFR inhibitörü olarak Erdafitinib ile yürütülen klinik çalışmalar sonucunda, FGFR değişiklikleri olan mesane kanseri hastalarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. VEGFR, EGFR, HER2 ve PDGFR inhibitörlerinin de ilerlemiş mesane kanseri tedavisi için tek ajan veya kemoterapi ile kombinasyon halinde klinik çalışmaları devam etmektedir. Metastatik

mesane kanseri tedavisi için bir diğer strateji de Antikor-İlaç Konjugatlarıdır. Mesane kanserlerinde yüksek oranda Nektin-4'ü hedefleyen Antikor-İlaç Konjugatı Enfortumab Vedotin, yürütülen bazı klinik çalışmalar sonucunda FDA onayı almıştır. Bunlara ek olarak; yakın zamanda ortaya çıkan immünoterapötik hedefler IDO-1 ve OX40, PD-L1 ve CD137'yi hedefleyen yeni nesil bispesifik antikorlar (INBRX-105), tümör aşısı ve PARP inhibitörlerinin mesane kanseri hastalarının tedavisinde kullanımı için klinik çalışmaları devam etmektedir (Mollica vd., 2020).

2.2. Kanserde İmmünoterapiler

Geleneksel kanser tedavilerinin (kemoterapi ve radyoterapi gibi) aksine immünoterapi, immün sistemi yeniden düzenleyerek savunma mekanizmasını güçlendiren ve kanserle savaşmak üzere immün sistem hücrelerini tetikleyen yenilikçi bir tedavidir. 1890'larda Dr. William Coley tarafından kanser hastalarına canlı bakteri enjekte ederek bakteri toksinleri ile (Coley toksini) immün yanıt oluşumunun tetiklenmesi, tarihte ilk immünoterapi uygulaması olarak kaydedilmiştir. Sonrasında toleransı çok zor olan IL-2 ve interferon gibi immünoterapötik ajanlar klinik deneylerde araştırılmaya başlanmıştır. Kanser ve immün sistem arasındaki etkileşim ve bu etkileşimde yer alan moleküller hakkında daha fazla veri elde edildikçe daha spesifik hedefleme ajanları çalışılmaya başlanmıştır (Jagodinsky vd., 2020). 1950'lerden sonra BCG adı verilen bakteri bazlı bir tüberküloz aşısı ile birçok kanserin tedavisi için denemeler yapılmış, ancak sadece mesane kanseri hastalarında kullanımının etkili olduğu görülmüştür. 1990'lara gelindiğinde KİOMK'lerinde intravezikal BCG aşısının kullanımı FDA tarafından onaylanan ilk modern kanser immünoterapisi olarak kayıtlara geçmiştir ve günümüzde KİOMK'nin tedavisi için altın standart olmaya devam etmektedir (Miyazaki vd., 2018; Okafor vd., 2021).

2.3. Kanser ve İmmün Sistem

İmmünojenik kanserler arasında yer alan mesane kanseri, yüksek oranda mutasyon yüküne sahip olduğundan tümör antijenleri immün tepki oluşumunu daha etkin bir şekilde tetikleyebilir. Tümör hücrelerine karşı verilecek immün tepkinin gelişimi, antijen sunan hücreler tarafından tümör antijeninin tanınması sonrası efektör T hücrelerinin hazırlanması ve aktive edilmesi ile birlikte, düzenleyici T hücreleri, tümörle ilişkili makrofajlar gibi tümör mikroçevresindeki çok sayıda immün hücrelerin de dâhil olduğu karmaşık ve dinamik etkileşimlere dayanmaktadır. Kanserlerin önemli özelliklerinden olan

inflamasyon, immün sistemin herhangi bir zararlı uyarana karşı yanıt olarak oluşturduğu konak savunma mekanizmasıdır. Karsinogenez süreci ile ilişkili olan bu kronik inflamatuvar mikroçevre, hem tümör alanlarını hem de stromada proinflamatuvar hücrelerini (immün hücreler, fibroblastlar vb.), aynı zamanda sekresyon ürünlerini (sitokinler, büyüme faktörleri vb.) ve ekstrasellüler matriksi içeren oldukça kompleks bir ortam ile karakterizedir. Kanser hücreleri ile mikroçevre arasındaki etkileşimler, kanserin başlangıcı, ilerlemesi, tedaviye cevap oluşturması ve metastaz sürecinde önemli rollere sahip olduğundan bu etkileşimde yer alan faktörlerin anlaşılmasının, mesane kanseri ve diğer birçok kanserin tedavisinde yeni terapötik stratejiler geliştirilmesine fayda sağlayacağı düşünülmektedir (Kang vd., 2017; Sui vd., 2017).

Kanser hücreleri ve mikroçevre arasında karşılıklı iki yönlü bir etkileşim bulunmaktadır. Başarılı bir immün savunma için hızlı/etkili immün tepki ve aşırı/uzun süreli immün tepki arasındaki hassas dengenin korunması gereklidir. Bu denge, uyarıcı ve inhibitör reseptörler aracılığıyla içsel immün düzenleyici mekanizmalarla ya da hücre-hücre etkileşimi sonucunda ve/veya inhibitör faktörlerin salgılanması ile diğer immün hücre gruplarının etkili olduğu dışsal yollar ile düzenlenmektedir. Normal şartlarda uyarıcı ve inhibe edici faktörler arasında dengede tutulan immün savunma, immün kontrol noktaları olarak tanımlanan mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bu süreçte PD-1 ve PD-L1 gibi immün kontrol noktaları, düzenleyici T hücreleri, myeloid türevli baskılayıcı hücreler, tümör ilişkili makrofajlar, dentritik hücreler ve lenfositler de dâhil olmak üzere birçok hücre görev almaktadır (Bilgin vd., 2019; Schneider vd., 2019).

İnsan immün sistemi, MHC-I (Majör Histokompatibilite Kompleksi-I)'in hücre yüzeyinde bulunan reseptörler aracılığıyla antijenleri T lenfositlere sunar ve kendine ait olan veya olmayan antijenleri birbirinden ayırır. Yabancı hücelere (enfekte, hasarlı, kanserli vb.) karşı immün yanıt, antitümör bağışıklık tepkisinin yayılmasında rol alan yardımcı T hücreleri ve doğrudan tümör hücrelerini öldürme kapasitesine sahip sitotoksik T lenfositler (CTL'ler) ile gerçekleştirilir. T hücreleri kanser antijenlerini doğrudan tanıyamaz, bu yüzden öncelikle antijen sunan hücreler (ASH, dendritik hücreler gibi) tarafından kanser antijenleri işlenir. Burada antijen parçalar eğer yabancı olarak kabul edilirse antijen sunan hücreler üzerindeki bu antijenler MHC-II molekülü aracılığıyla T hücrelerine sunulur ve T hücrelerinin aktivasyon süreci başlatılır. Bu aşamada aktifleşen T hücreleri aynı antijeni taşıyan hücreleri bulup sitotoksik görevlerine başlarlar. T

hücrelerinin antijeni tanınması ve aktive olması süreci, T hücresi reseptörlerinin (TCR) ve ASH/MHC komplekslerinin etkileşimleri sonucunda gerçekleşir. Bu süreçte aşırı aktifleşmeyi engelleyerek belli bir dengede tutmak için frenleme mekanizmaları bulunmaktadır. İmmün sistem, kanserlerle mücadelede frenleme mekanizması olarak immün kontrol noktalarını kullanır ve immün kontrol noktası moleküllerinin uyarıcı veya inhibe edici sinyalleri aracılığıyla bu süreci sıkı bir şekilde düzenler (Zou ve Chen, 2008; La - Beck vd., 2015).

2.3.1. İmmün Kontrol Noktaları

İmmün kontrol noktaları, immün yanıtı düzenleyerek homeostazın devam ettirilmesinde görevli hücre yüzey proteinleridir. İmmün sistemin işleyişini engelleyerek immün sistemi kontrol altında tuttuklarından kontrol noktası proteinleri olarak adlandırılırlar. Bu proteinlerin bir kısmı bağışıklık tepkisini artırırken, bir kısmı da tam tersi şekilde bağışıklık tepkisini inhibe eder. Günümüzde immün kontrol noktası proteini olarak görev yapan CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, OX40 gibi birçok inhibitör immünoresptör bulunur (Aksu ve Şengül, 2019). Bu tez çalışmasının da konusu olan PD-1 ve ligandı PD-L1 ile ilgili bilgiler ilerleyen kısımlarda detaylandırılmaktadır.

İmmün kontrol noktaları normalde kendi antijenlerine karşı bağışıklık tepkilerini baskı altında tutarlar ve böylelikle istenmeyen otoimmüniteyi önlerler. Ancak birçok kanserde bu immün kontrol noktalarını içeren yollar upregüle edilir ve kanserle ilişkili immün baskılama ve kaçış mekanizmalarında kritik roller üstlenmiş durumdadır. İmmün sistem normalde yabancı hücreleri bulup yok etme yeteneğine sahip olmasına rağmen kanser hücreleri, immün savunma mekanizmasından kaçmak için immün kontrol noktalarını kullanılırlar. Kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan antijenlerle immün kontrol noktası moleküllerinin etkileşimi (PD-1:PD-L1 ve CTLA-4:B27 gibi) sonucunda sitotoksik T hücrelerinin etkinliği bozulmaktadır ve tümör hücreleri bu etkileşim sayesinde immün sistemin savunma mekanizmasından kaçabilmektedir.

2.3.1.1. PD-1/PD-L1 Yolu

Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1/PDCD1/CD279 gibi isimlerle de anılır), immün sistem hücrelerinin özellikle de aktive edilmiş T hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen immün inhibitör reseptörüdür. T hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve CD4⁺ T hücrelerinin düzenleyici T hücrelerine farklılaşmasında görev

yapan immün kontrol noktası molekülleridir (Wołacewicz vd., 2020). Bilinen iki ligandı mevcuttur: PD-L1 ve daha az karakterize edilmiş olan PD-L2. PD-L1 (Programlanmış hücre ölümü ligand-1, CD274, B7-H1), çeşitli tümör hücrelerinde, hematopoietik (T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler de dahil) ve hematopoietik olmayan (vasküler endotelial hücreler, keratinositler, astrositler ve endotel hücreleri gibi) sağlıklı doku hücreleri tarafından eksprese edilen immün kontrol noktası PD-1 reseptörünün ligandı tip I transmembran proteinidir (Sun vd., 2018; Wołacewicz vd., 2020). Kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan PD-L1'in immün hücrelerin yüzeyindeki reseptörü PD-1 ile bağlanması sonucunda, apoptoz ve aktif T hücrelerinin anejisi indüklenir, sitokin üretimi downregüle edilerek immün sistemin tümöre karşı tepkisi baskılanır (La-Beck vd., 2015).

İmmün kontrol noktaları, inhibe edici uyarıları iletmek için sıklıkla reseptör-ligand etkileşimi ile sinyal mekanizmalarını kullanır. Bu inhibe edici uyarıcı sinyalleri iletmek için PD-1'in sitoplazmik kuyruğunda immünoresseptör tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM) ve immünoresseptör tirozin bazlı anahtar motif (ITSM) adlı iki parçası mevcuttur. PD-1'in PD-L1 ile bağlanması sonucu, intrasellüler domainindeki ITIM ve ITSM'nin fosforilasyonu gerçekleşir ve ITIM fosfataz SHP-2'yi ITSM de fosfataz SHP-1'i PD-1'in intrasellüler domainine bağlar. Ardından TCR'nin ve CD28'in tirozin bazlı grupları defosforile edilir. Bunun sonucunda PD-1/PD-L1 bağlanmasıyla downstream sinyal yolağındaki, mesane kanseri de dahil birçok kanserde kritik rollere sahip PI3K-Akt-mTOR yolağı ve Ras-MEK-ERK yolağı inhibe edilir (Riley, 2009; Boussiotis, 2016; He ve Xu, 2020).

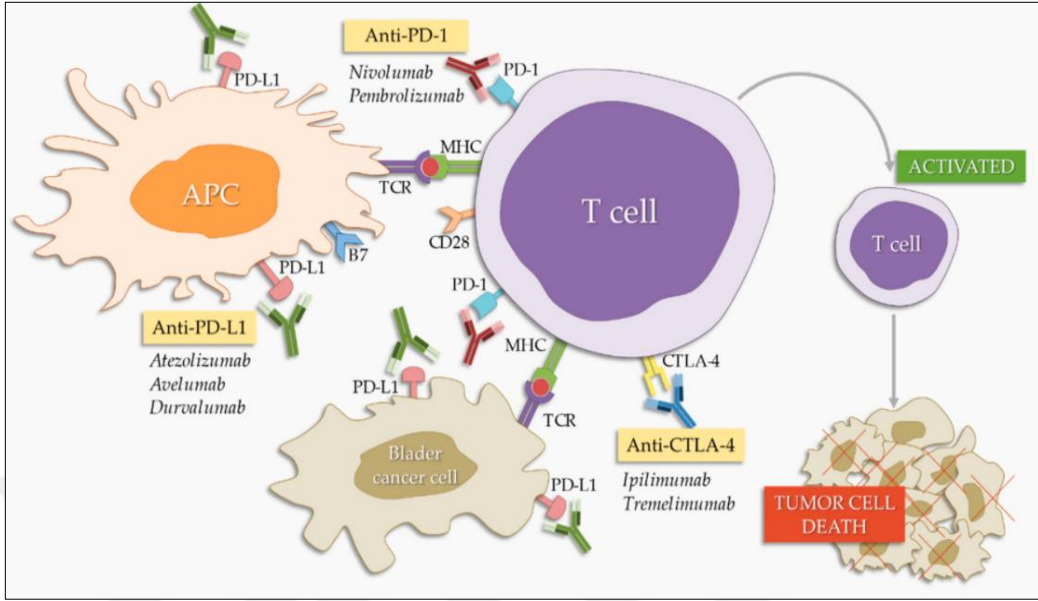
Son yıllarda kanser ve immün sistem arasındaki etkileşim hakkında verilerin artmasıyla birçok kanser için immün kontrol noktaları potansiyel terapötik hedefler olarak tanımlanmakta ve immün kontrol noktası inhibitörleri adı verilen ilaçlarla yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir.

2.3.1.2. İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri

Kanserlerin tedavisinde kullanılan birçok immünoterapi çeşidi mevcut olsa da günümüzde kanser immünoterapisi denilince akla ilk olarak “immün kontrol noktası inhibitörü” (İKNİ) olarak adlandırılan ilaçlar gelmektedir. İmmün kontrol noktası inhibitörleri olarak adlandırılan bu ilaçlar, etkili bir immün savunmanın devam edebilmesi amacıyla immün kontrol noktası inhibitör reseptörlerin ve bunların liganları arasındaki

etkileşimi bloke eden rekombinant antikorlardır. İmmün kontrol noktası inhibitör reseptörü PD-1 ve ligandı PD-L1 arasındaki bağlantıyı bloke etmeyi hedefleyen İKNİ'ler, tümör mikroçevresinde tümöre karşı oluşturulan immün tepkinin baskılanmasına sebep olan PD-1/PD-L1 bağlantısını bloke ederler. Bu sayede T hücrelerinin üzerindeki baskı ortadan kaldırılarak yeniden tümöre karşı T hücre aracılı immün savunma mekanizması harekete geçirilir (Alsaab vd., 2017).

İKNİ tedavileri son on yıldır kanser tedavisi için en ümit verici gelişmeler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalar ile, yüksek mutasyon yükünün ve neo-antijenlerdeki artışın İKNİ tedavilerinde daha yüksek yanıt oranları ile ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Bu yüzden de yüksek mutasyon yüküne sahip ileri evre mesane, deri, akciğer vb. kanserlerde İKNİ tedavilerinin klinik denemeleri devam etmektedir (Bilgin vd., 2019). İKNİ'lerin mesane kanserindeki aktivitesi ilk olarak metastatik ve lokal ileri evre mesane kanserlerinde rapor edilmiştir. Yapılan klinik araştırmalar sonucunda ileri ve metastatik mesane kanseri hastalarında PD-L1 pozitif ve platin bazlı kemoterapi için uygun olmayan hastalarda birinci basamak tedavi ve platin bazlı kemoterapi başarısızlığı sonrasında ikinci basamak tedavi olarak veya herhangi bir platin bazlı kemoterapi için uygun olmayan mesane kanseri hastalarında birinci basamak tedavi olarak kullanımı kabul edilmektedir. Şimdiye kadar toplamda 5 adet immün kontrol noktası inhibitörü, mesane kanseri tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. Bunlar PD-L1'i hedef alan Atezolizumab, Durvalumab ve Avelumab ve hedefi PD-1 olan Pembrolizumab ve Nivolumab adı verilen monoklonal antikorlardır (Boegemann vd., 2017; Hanna, 2017; Kim vd., 2020).



Şekil 6. Mesane kanseri tedavisinde kontrol noktası inhibitörlerinin etki mekanizması. PD-1/PD-L1 ve CTLA-4 blokerleri, bağışıklık sisteminin engelleyici kontrol noktası moleküllerine müdahale ederek T hücresi aktivasyonuna ve tümör hücresi ölümüne yol açar (Wołacewicz vd., 2020).

Atezolizumab

Atezolizumab, PD-L1'e bağlanıp PD-1 reseptörü ile etkileşimini bloke ederek immün sistem hücrelerinin yeniden aktive edilmesini sağlayan anti-PD-L1 monoklonal antikordur. FDA tarafından mesane kanseri hastaları için onaylanan ilk PD-1/PD-L1 kontrol noktası inhibitörüdür. Ayrıca küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve üçlü negatif meme kanserinde kullanımı onaylanmış olup, diğer birçok kanser için klinik araştırmalar devam etmektedir (FDA, 2016; Rosenberg vd., 2016).

Durvalumab

Durvalumab, mesane kanseri için PD-L1'in PD-1'e bağlanmasını bloke eden FDA tarafından onaylı diğer bir immünoterapi seçeneğidir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, Durvalumab'ın aktivitesinin PD-L1'in hem pozitif hem de negatif olduğu hasta gruplarında yüksek olduğu, bununla birlikte yüksek oranda PD-L1 ekspresyonuna sahip hasta gruplarında daha yüksek yanıt oranlarının ortaya çıktığını göstermiştir (FDA, 2017; Bilgin vd., 2019; Zajac vd., 2019).

Avelumab

Mesane kanserinde FDA onaylı diğer bir PD-L1 inhibitörü Avelumab'dir. Metastatik mesane kanseri hastalarında kalıcı yanıt ve uzun süreli sağkalım ile ilişkilendirilen Avelumab, Merkel hücreli karsinom tedavisinde de ilk FDA onaylı ilaçtır (Apolo vd., 2017; FDA, 2017; Patel VD., 2018).

Pembrolizumab

Pembrolizumab, mesane kanseri hastalarında PD-1'e bağlanarak hem PD-L1 hem de PD-L2 ile etkileşimini engelleyen oldukça seçici monoklonal antikordur. Kemoterapi ile karşılaştırıldığında genel sağkalım oranının daha iyi seviyede olduğu gösterilen ilk immün kontrol noktası inhibitörüdür. Ayrıca diğer ilaçlara göre daha iyi bir güvenlik profiline sahip olduğu bildirilmiştir. Lokal olarak ilerlemiş veya metastatik ürotelyal karsinom ve erken evre yüksek riskli mesane kanserinin yanı sıra baş ve boyun kanseri, hodgkin lenfoma, böbrek kanseri gibi birçok kanserde FDA tarafından onaylanmış anti-PD-1 immünoterapisidir (Bellmunt vd., 2017; Farina vd., 2017; FDA, 2017).

Nivolumab

Mesane kanseri hastalarında FDA onaylı PD-1'i hedefleyen diğer bir immün kontrol noktası inhibitördür. Yapılan klinik çalışmalardan birinde, PD-L1'i yüksek seviyede eksprese eden grupla düşük ekspresyona sahip grup arasında anlamlı bir fark bulunamamış, ancak önemli ve kalıcı bir tümör yanıtı, ümit verici sağkalım ve kabul edilebilir güvenlik profili ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında bazı hastalarda ciddi yan etkilerin varlığı da rapor edilmiştir (Sharma vd., 2016; FDA, 2017; Sharma vd., 2017; Babjuk vd., 2019).

Özellikle metastatik ve ileri evre hastalar için İKNİ immünoterapilerinin etkinliğinin kemoterapiden daha yüksek olduğu birçok çalışmada gösterilmektedir (Rittmeyer vd., 2017; Khan vd., 2018; Ciccarese vd., 2019; Dafni vd., 2019; Mok vd., 2019; Reck vd., 2019; Rizzo vd., 2021). İKNİ'ler kemoterapilere kıyasla daha hafif yan etki, olumlu cevap oranı ve daha yüksek sağkalım oranı ile üstün görünmektedir. Ancak İKNİ'ler ile ilgili klinik çalışmaların daha yeni olmasından dolayı uzun vadede getireceği olumsuzluklar tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca İKNİ'lerin immün sistemi uyarması nedeniyle otoimmün hastalıkları tetikleyebilme potansiyeli ve toksisite kontrolü ile ilgili bazı çekinceler mevcuttur. Keşfedilen yeni moleküller ve elde edilen klinik çalışma

sonuçları, mesane kanseri tedavisi için yeni stratejiler ortaya çıkarmaktadır. Günümüzde İKNI'lerin hem monoterapi olarak hem de kombinasyon terapiler şeklinde etkinliğini araştıran birçok klinik çalışma devam etmektedir. İleri ve metastatik mesane kanseri hastaları için FDA onaylı İKNI'ler Tablo 3'te gösterilmiştir (Kim vd., 2020).

Tablo 3. İleri veya metastatik mesane kanseri hastalar için mevcut FDA onaylı İKNI'ler

Ajan adı	FDA onay tarihi	Türü	Klinik deneme	Açıklama
Atezolizumab	Mayıs 2016	Anti-PD-L1	IMvigor-210	Birinci basamak: PD-L1 pozitif (PD-L1 ekspresyonu $\geq 5\%$) sisplatin için uygun olmayan veya platin için uygun olmayan, ilerlemiş veya metastatik hastalar İkinci basamak: platin içeren kemoterapi başarısızlığını takiben ileri veya metastatik
Avelumab	Mayıs 2017	Anti-PD-L1	JAVELIN	İkinci basamak: platin bazlı kemoterapinin başarısızlığını takiben ileri veya metastatik hastalar
Durvalumab	Mayıs 2017	Anti-PD-L1	Çalışma-1108	İkinci basamak: platin bazlı kemoterapinin başarısızlığını takiben ileri veya metastatik hastalar
Nivolumab	Şubat 2017	Anti-PD-1	CheckMate-275	İkinci basamak: platin bazlı kemoterapinin başarısızlığını takiben ileri veya metastatik hastalar
Pembrolizumab	Mayıs 2017	Anti-PD-1	KEYNOTE-045	Birinci basamak: PD-L1 pozitif (CPS ≥ 10) sisplatin için uygun olmayan ileri evre veya metastatik hastalar veya herhangi bir platin bazlı kemoterapi için uygun olmayan hastalar İkinci basamak: platin içeren kemoterapi başarısızlığını takiben ileri veya metastatik hastalar

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasına, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde mesane kanseri tanısı konmuş 62 hastanın mesane kanseri tümör dokusu ve pozitif kontrol grubu olarak 5 farklı tonsil dokusuna ait Formalin ile Fikse Edilmiş Parafine Gömülü [Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE)] doku bloklarından 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve hasta biyopsi numaraları ile etiketlenmiş 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 2 kesit konulmuş halde temin edildi. Seçilen parafin blokların yaşı maksimum 4 yıl (2017-2020) olarak kaydedildi.

Parafine gömülü tümör ve kontrol doku örnekleri ile, iki farklı RNA izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilen RNA'lar kaliteleri açısından karşılaştırıldı. İlk olarak RNA izolasyonu, ticari kit (NucleoSpin® RNA, MACHEREY-NAGEL) ile FFPE örnekleri için üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesi ve konsantrasyonu, Agaroze jel elektroforezi ve spektrofotometre cihazı ile test edildi. Elde edilen RNA'ların kalitesinin ileri aşamalar için yetersiz olduğu gözlemlendi. Diğer bir izolasyon yöntemi olarak da literatürde sıkça önerilen Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yöntemi ile RNA izolasyonu denemesi yapıldı. Monofazik Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yöntemi ile, ticari kit uygulamasına göre parafine gömülü dokulardan daha kaliteli RNA'lar elde edildi ve deneylere bu yöntemde yer alan lizis aşamasında optimizasyonlar yapılarak devam edilmesine karar verildi. Parafine gömülü dokulardan Monofazik Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yöntemi ile RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra total RNA'dan cDNA dönüşümü ticari kit ile gerçekleştirildi. Sonrasında qRT-PCR yöntemiyle PD-L1 ve PD-1 genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilerek ekspresyon kat farkları belirlendi. Parafin dokuların immünohistokimyasal olarak incelenmesi için çeşitli optimizasyon denemeleri yapıldı. FFPE tümör doku bloklarından 5 µm kalınlığında kesitler poli-lizin kaplı lam üzerine alınarak immünohistokimyasal olarak anti-PD-L1 ve anti-PD-1 antikorları uygulandı.

3.1. Materyal

3.1.1. Alet ve Cihazlar

- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye/İstanbul)
- Çalkalamalı Isı Bloğu (Ditabis HLC MHR 13, Almanya/Pforzheim)

- Yatay Jel Elektrophorez Sistemi (Thermo Scientific Owl™ EasyCast™ B1 Mini Gel Electrophoresis Systems)
- Elektrophorez Güç Kaynağı (Consort EV233, ABD/Cohasset)
- Jel Dökümantasyon Sistemi (DNR MiniLumi, İsrail/Neve Yamin)
- Jel Görüntüleme ve İşleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems/MiniLumi)
- Hassas Terazi (OHAUS Pioneer® Analytical, Filipinler/Batangas)
- Ligh Cyler 480 II Roche (LightCycler® 480 Instrument II, İsviçre/Basel)
- 96'lık plate (Light Cyler 480 Multiwell Plate 96, İsviçre/Basel)
- Manyetik Karıştırıcı (Velp® Scientifica are Heating Magnetic Stirrer, İtalya/Usmate)
- Mikrodalga Fırın (VESTEL MD-23)
- Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya/Hamburg)
- 1,5 ml'lik Mikrosantrifüj Tüpü (DNaz/RNaz Free) (Isolab)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge® 16, ABD/ Kaliforniya)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, ABD/Massachusetts)
- Otoklav (Nüve OT 40L, Türkiye/Ankara)
- Mikrodalga (Vestel)
- Saf Su Cihazı (GFL Saf Su Cihazı 2104, Almanya/Burgwedel)
- Thermal Cyler (Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cyler, ABD/Kaliforniya)
- Vorteks (ZX3 VELP® SCIENTIFICA, İtalya/Usmate)
- Pipet uçları (ISOLAB)
- Tüp Standı (ISOLAB)
- Soğutmalı Santrifüj (SIGMA 1-14K)
- Çeker Ocak (BİLSER)
- Soğutmalı-Isıtmalı Su Banyosu (JSR JSRC-13C)
- Su Banyosu (UNITERM)
- pH Metre (Hanna Instruments pH 211)
- Isı Bloğu (Wealtec Corp./HB-1, Amerika Birleşik Devletleri/ Sparks)
- Mikrotom Cihazı (SHANDON AS325 RETRACTION)
- İnkübatör/Etöv (WiseCube)

- Floresan Mikroskop (BAB Görüntü İşleme ve Analizi Sistemi, Türkiye/Ankara)
- Işık Mikroskobu (Olympus/ CX21, Japonya/Tokyo)
- Poli-Lizin Kaplı Lam (SUPERIOR QUALITY)
- Cam şaleler (ISOLAB)

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

- cDNA Sentez Kiti (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™)
- qRT-PCR Mastermix (Light Cycler® 480 Probes Master, Roche)
- Etilen diamintetraasetikasit (EDTA) (Bio Basic Inc., Kanada, 6381-92-6)
- Etil alkol ($\geq$ %99.5 J.T Baker)
- Etidyum Bromür (EtBr) (SIGMA®, ABD/ Missouri, 1239-45-8)
- Tris Baz (Fisher Bioreagents®, ABD, BP152-500)
- Borik Asit (Merck EMSURE®, Almanya/Darmstadt)
- SDS (BIO BASIC)
- Ksilen (MEDİKO KİMYA)
- Kalsiyum Klorür (SIGMA-ALDRICH)
- Potasyum Fosfat Manobasic (HIMEDIA)
- Potasyum Klorür (BIO BASİC)
- Di-Sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (MERCK)
- Trizol (BIO BASIC, BS410A)
- Kloroform (TEKKİM)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Agaroza (Bio Basic Inc., Kanada)
- Hidrojen Peroksit (MERCK)
- Hematoksilen (MERCK)
- Tween 20 (MERCK)
- Trisodyum sitrat dihidrat (MERCK)
- Entellan® (Merck, Almanya, 1079610100)
- Hidroklorik Asit (HCl) (Merck, Almanya, 100317)
- Goat serum (steril-filtre edilmiş, Diagnosticon)

3.1.3. Çözeltiler

%5'lik SDS Solüsyonu

5 g SDS, 80 ml ddH₂O'da 60°C'ye kadar ısıtılarak çözdüldükten sonra ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

Tris-HCl Stok Solüsyonu (pH 9.0, 100 mM)

1.21 g Tris 80 ml ddH₂O'da çözülüp, HCl ile pH 9.0'a ayarlandı. ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

EDTA (pH 8.0, 50 mM)

1.86 g EDTA 80 ml'de çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. pH 8.0'e ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

1M NaCl

5.84 g NaCl, ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

100 mM CaCl₂

1.109 g CaCl₂, ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

Proteinase K Digestion Buffer 1

- 0.01 M Tris (pH 8.0)
- 5 mM EDTA
- %0.5 SDS
- 50 µg/ml Proteinaz K

Proteinase K Digestion Buffer 2

- 250 µl TE-9 Tamponu (500 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA)
- 80 µl %10 SDS
- 20 µl Proteinaz K

Lizis Solüsyonu 1

- 40 µl Tris (20 mM)
- 2 µl CaCl₂ (1 mM)

- 10 µl %10 SDS
- 10 µl Proteinaz K

Lizis Solüsyonu 2

- 70 µl Tris-HCl (30 mM)
- 40 µl EDTA (10 mM)
- 40 µl %1 SDS
- 10 µl Proteinaz K

Lizis Solüsyonu 3

- 10 µl Tris-HCl (10 mM)
- 160 µl EDTA (40 mM)
- 50 µl %5 SDS
- 10 µl Proteinaz K

10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu

- 108 g Tris Baz
- 55.65 g Borik Asit
- 40 ml 0.5 M EDTA (ph 8.0) ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi.

0.5X Elektroforez Yürütme Tamponu

Hazırlanan 10X TBE'den 50 ml alınıp, ddH₂O ile 1000ml'ye tamamlandı.

Jel Boyama Solüsyonu (0.5 µg/ml)

1X TBE içerisinde 0.5 µg/ml olacak şekilde stok (5 mg/ml) Etidyum Bromür çözeltisinden alınarak hazırlandı.

%1.2'lik Agaroz Jel (50 ml)

0.6 g Agaroz, 0.5X TBE'den 50 ml alındı ve agaroz çözülene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Soğuması için (60°C'ye kadar) bir süre bekletildikten sonra 5 µl Etidyum Bromür eklendi.

6X Yükleme Tamponu

- %0.25 Bromofenol mavisi
- %0.25 Ksilen Siyanol
- %30 Gliserol, olacak şekilde hazırlanıp +4 °C’de saklandı.

Isı ile İndüklenen Antijen Geri Kazanımı için Tampon Solüsyon (Tris-EDTA tamponu 10 mM Tris baz, 1 mM EDTA solüsyonu, %0.05 Tween 20, pH 9.0)

- 1.21 g Tris
- 0.37 g EDTA
- 900 ml dH₂O ile çözülüp, pH 9.0 olarak ayarlandıktan sonra 1000 ml’ye tamamlandı.
- 0.5 ml Tween 20 eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

Isı ile İndüklenen Antijen Geri Kazanımı için Tampon Solüsyon (Sodyum Sitrat buffer 10 mM Sodyum Sitrat, %0.05 Tween 20, pH 6.0)

2.94 g Trisodyum sitrat dihidrat 1L dH₂O ile çözülüp, pH 6.0 olarak ayarlandıktan sonra 0.5 ml Tween 20 eklendi.

10X Tris Tamponlu Salin (TBS) Stok Solüsyonu

- 24,2 g Tris
- 80 g Sodyum Klorür
- 1000 ml dH₂O ile çözündürülüp, pH 7.6’ya ayarlandı.

1X TBST (Tris Buffered Saline-Tween 20) Tampon Solüsyon

- 100 ml 10X TBS
- 900 ml dH₂O ile çözülüp, üzerine 1 ml Tween 20 eklendi.

10X PBS (Phosphate-buffered saline) Stok Solüsyonu

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 18.1 g Na₂HPO₄.2H₂O
- 2.4 g KH₂PO₄, 800 ml ddH₂O ile çözülüp, HCl ile pH 7.4’e ayarlandıktan sonra 1 L’ye ayarlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Macherey-Nagel Nucleospin® RNA İzolasyon Kiti FFPE Dokudan RNA İzolasyon Protokolü

Macherey-Nagel Nucleospin RNA İzolasyon Kiti ile RNA izolasyonu, üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir:

Tüp içerisindeki doku kesitlerinin üzerine 300 µL Ksilen eklendi ve oda sıcaklığında çalkalamalı ısı bloğunda 5 dk inkübe edildi. Sonrasında maksimum hızda (13 000 rpm) 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pelletin üstünde kalan ksilen uzaklaştırıldı. Ksilen adımı iki kez daha tekrarlandı. Ardından tüplere 300 µL %96'lık Etanol eklendi ve oda sıcaklığında çalkalamalı ısı bloğunda 5 dk inkübe edildi. Maksimum hızda (13 000 rpm) 3 dakika santrifüj işleminden sonra etanol uzaklaştırıldı. Etanol adımları 2 kez daha tekrar edildi. Hücrelerin lizis aşaması için kit içeriğinde yer alan Solüsyon RA1'den 350 µL ve 3.5 µL β-merkaptoetanol doku pelleti üzerine eklenerek kuvvetlice vortekslendi. Daha sonra lizatın temizlenmesi ve viskozitenin azaltılması için NucleoSpin Filtresi 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve karışım filtre edildikten sonra 11 000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. NucleoSpin Filtresi atıldı ve homojenize lizata 350 µL %70'lik etanol eklendikten sonra beş kez pipetaj yapıldı. Yeni bir toplama tüpüne RNA'nın bağlanacağı NucleoSpin RNA kolunu yerleştirildi. Lizat pipet yardımıyla 2-3 kez karıştırıldıktan sonra hazırlanan yeni toplama tüpüne aktarıldı. 11 000 xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra mavi renkli kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 350 µL Membrane Desalting Buffer eklendi ve 11 000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. Daha sonra rDNaz ve Reaksiyon Solüsyonu karıştırılarak steril DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışımdan 95 µL alınarak kolonun silika membranının tam ortasına bırakıldı ve 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından yıkama aşamalarına geçildi. İlk yıkamada NucleoSpin RNA kolunu üzerine 200 µL rDNA'yı inaktive edecek olan Solüsyon RAW 2 eklendi ve 11 000 xg'de 30 sn santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. İkinci yıkama aşaması için NucleoSpin RNA kolunu üzerine 600 µL Solüsyon RAW 3 eklendi ve 11 000 xg'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltılıp filtre tekrar bu tüpe yerleştirildi. Son yıkama aşaması için NucleoSpin RNA kolunu üzerine 250 µL Solüsyon RA 3 eklendi ve 11 000 xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kolon 1.5 mL'lik nuclease-free toplama tüpüne yerleştirildi. Son olarak 60 µL RNase-free H₂O içinde RNA elüe edilip 11 000 xg'de 1 dk santrifüj edildi.

3.2.2. FFPE Dokudan RNA İzolasyonu İçin Optimizasyon Çalışmaları

FFPE dokudan RNA izolasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmek için hazırlanan protokolde çeşitli optimizasyonlar denendi. İlk yapılan denemeler sonucunda Lizis aşamasının yeterli olmadığı görüldü ve Lizis solüsyonu içeriğinde yer alan Tris, EDTA, SDS ve Proteinaz K'nın konsantrasyonları değiştirilerek, RNA izolasyonu için 3 farklı Lizis solüsyonu ile işlem basamakları gerçekleştirildi. Hazırlanan Lizis solüsyon içerikleri Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. RNA izolasyon protokolünün optimizasyonunda kullanılan lizis solüsyonları

Lizis Solüsyonu 1	Lizis Solüsyonu 2	Lizis Solüsyonu 3
20 mM Tris 1 mM CaCl %0.5 SDS 5 µl PK	30 mM Tris 10 mM EDTA %1 SDS 10 µl PK	10 mM Tris 40 mM EDTA %5 SDS 10 µl PK

Örneklerin ne kadar süre Lizis Solüsyonu ile inkübasyona bırakılacağı yapılan denemeler sonucunda kararlaştırıldı. Lizis Solüsyonu 1, 2, ve 3 uygulamaları çeşitli inkübasyon süreleri ve farklı sıcaklık değerleri kullanılarak denendi. Hazırlanan üç Lizis solüsyonu ve Trizol ile yapılan RNA izolasyonu işlemi sonunda elde edilen örnekler Agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edildi. Sadece Lizis Solüsyonu 1 ile RNA izolasyonu gerçekleştirilen tümör ve kontrol doku örneklerinde jelde bant görüntüsü elde edildi. Bunun sonucunda FFPE dokudan RNA izolasyonu işleminde Lizis Solüsyonu 1, 55 °C'de 3 saat inkübasyon şeklinde uygulandı.

3.2.3. Optimize Edilmiş RNA İzolasyon Protokolü

Parafine gömülü tümör doku örneklerinden, Monofazik Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yöntemi kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyon protokolü aşağıdaki basamakları kapsamaktadır:

Tüplerin içerisinde bulunan parafin doku kesitleri 10 µm kalınlığında kesitler halinde tüplere yerleştirildi. Parafini uzaklaştırmak için tüplere 1 mL ksilen (%100)

eklendi, 10 sn vortekslenildi ve 50 °C'de 3 dk ısı bloğunda inkübe edildi. Örnekler ısı bloğundan alınarak maksimum hızda (14 000 x g) 2 dk santrifüj edildi ve ksilen uzaklaştırıldı. Ksilen adımları 2 kez tekrar edildi. Örneklerle 1 mL etanol (%100) eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında maksimum hızda 2 dk santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldı ve etanol ekleme adımı tekrarlandı. Pellet 10-15 dk oda sıcaklığında etanolün uzaklaşması için bırakıldı. Örneklerin üzerine belirtilen miktarlarda lizis solüsyonu 1 eklendi [20 mM Tris, 1 mM,% CaCl₂, %10 SDS, 10 µl Proteinaz K (20 mg/mL)] ve vorteks ile karıştırıldı. Örnekler çalkalamalı ısı bloğunda 55 °C'de 3 saat inkübe edildi. Sonrasında 1 mL trizol eklendi, ters çevirerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Örneklerle trizol reaktifi mL başına 200 µl kloroform eklendi, tüpler 15 sn kuvvetli bir şekilde vortekslenildi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra 12 000 x g'de 15 dk soğutmalı santrifüj cihazında +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından tüpün üstünde kalan berrak sulu faz (RNA'nın olduğu katman), içerisine 0.5 mL izopropanol konulan tüplere aktarıldı. Nazikçe ters çevirerek karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Örnekler 12 000 x g'de 10 dk boyunca +4 °C'de santrifüj edildi. Tüpteki süpernatant RNA, ara faz DNA, pellet ise protein içerir. Tüpteki RNA içeren süpernatant, DNA ve Protein içeren kısımdan ayırmak için başka bir tüpe alındı, üzerine 1 mL Etanol (%75) eklendi ve ters çevirerek karıştırıldı. Örnekler 7500 x g'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk ters çevirerek pelletin büyüklüğüne göre 20-30 µl RNaz içermeyen su eklenerek pellet çözüldü ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler çalışmanın sonraki adımlarında kullanılmak üzere etiketlenerek -80 °C dondurucuda saklandı.

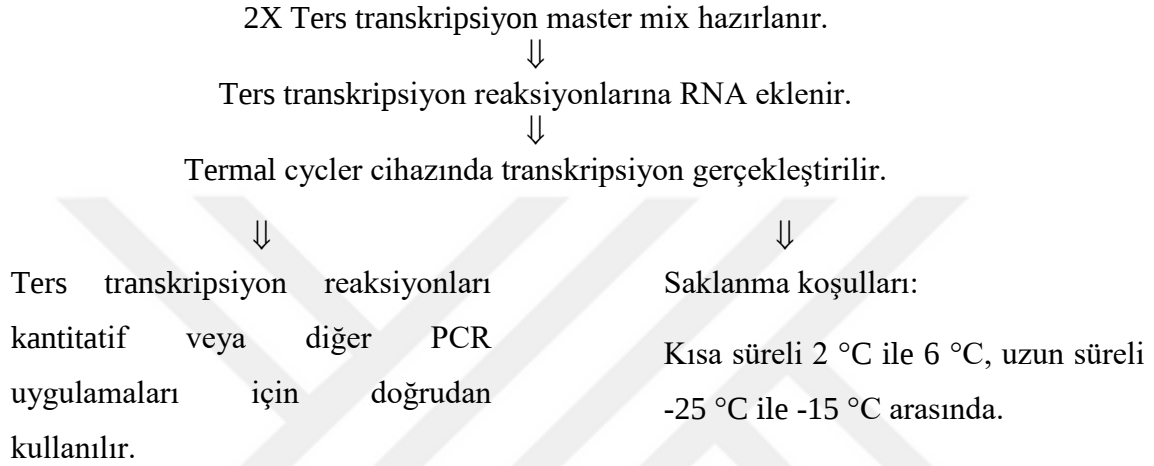
3.2.4. Agaroz Jel Elektrofrez ile RNA Kalitesinin Kontrolü

İzole edilen RNA'lar, Agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek kontrol ve tümör doku örneklerinin kalite kontrolü yapıldı. Yukarıda çözeltiler bölümünde tarif edildiği gibi %1.2'lik Agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan karışım jel tablasına döküldü ve katılaşması için 30 dk bekletildi. Jel katılaştıktan sonra tablanın içerisinde bulunan tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak, 0.5 X TBE elektrofrez tamponu içerisine yerleştirildi. Örnekler 6X yükleme tamponu ile 5:1 (2 µl RNA örneği + 3 µl dH₂O : 1 µl yükleme tamponu) oranında karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 0.5 X TBE tamponu içerisinde 70 V'da 45 dk yürütüldü. Örneklerin jelde yürütülmesi işlemi tamamlandıktan sonra, UV altında jel dökümantasyon sisteminde görüntüledi.

3.2.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan kitle, cDNA sentezi için Random primerler kullanır ve bu primerler, mevcut tüm RNA'lara rastgele bağlanarak verimli bir şekilde cDNA sentezini gerçekleştirir.

cDNA Sentezi Genel İş Akışı



cDNA sentezi için üretici firmanın önerdiği protokol basamakları uygulandı: Öncelikle 2X ters transkripsiyon master mix hazırlanması için kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldü. Reaksiyonu hazırlamak için gerekli bileşenlerin hacmi hesaplandı (gerekli bileşenler ve hacimleri Tablo 5'da belirtilmiştir). 2X ters transkripsiyon master mix buz üzerine koyularak yavaşça karıştırıldı.

Tablo 5. Reaksiyon bileşen ve hacimleri

BİLEŞEN	HACİM
10X RT Buffer	2 µl
10X RT Random Primers	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
Nuclease-free water	4.2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1 µl

Daha sonra ters transkripsiyon reaksiyonları hazırlandı. 0.2 mL’lik her bir tüpün içerisine 10 µl 2X RT master mix eklendi. Tüplere 10 µl RNA örneği eklendi ve pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Tüplerin kapakları kapatıldı ve thermal cycler cihazı hazır olana kadar tüpler buz üzerinde bekletildi. Thermal Cycler cihazı ile ters transkripsiyon işlemi aşağıdaki Tablo 6’da verilen koşullar kullanılarak thermal cycler programlandı.

Tablo 6. Thermal cycler koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞
Total reaksiyon hacmi: 20 µl				

3.2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR)

cDNA dönüşümü sonrasında mesane tümör ve kontrol dokularındaki PD-L1 ve PD-1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, Light Cycler 480 II (Roche) cihazında Light Cycler® 480 Probes Master ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Light Cycler® 480 Probes Master ticari kiti hidroliz probu/taqman probu algılama formatı için özel olarak geliştirilmiş, hot start PCR için FastStart Taq DNA Polimeraz içeren, kullanıma hazır bir reaksiyon karışımıdır. 2X konsantre ana karışım, neredeyse tüm primer

kombinasyonlarıyla çalışan sabit bir $MgCl_2$ konsantrasyonu için optimize edilmiş formdadır. Sadece kalıp DNA, PCR primerleri ve hidroliz problemleri eklenerek çalışma gerçekleştirilir.

Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kullanılacak bileşenler $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki blok üzerinde çözünmeleri için bir süre bekletildi. Çalışmada, PD-L1 (Hs01125301_m1) ve PD-1 (Hs01550088) problemleri kullanıldı. İlgilenilen genlerin mRNA ekspresyonunu normalize etmek için GAPDH geninin ekspresyon seviyeleri dahili bir referans olarak kullanıldı. GAPDH referans genine ait Forward Primer: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', Reverse Primer: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' ve GAPDH YAK: YAK-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCCT-BBQ dizi bilgileri üretici firmanın veri tabanından elde edildi (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). Sonuçlar LightCycler 480 II SW 1.5.1 programında yer alan "Basic Relative Quantification for All Samples" analiz metodu ile değerlendirildi ve total RNA miktarı GAPDH referans geni ile normalize edilip $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü uygulanarak ekspresyon hesaplaması yapıldı.

qRT-PCR için Örneklerin Cihaza Yükleme ve Reaksiyonun Başlatılması

Örneklerdeki PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyonlarının kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile tespiti için Tablo 7'de belirtilen reaksiyon bileşenleri ticari kit (Light Cycler® 480 Probes Master) kullanılarak hazırlandı. Örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı ve cDNA'lar, 96 Multiwell plate üzerinde yer alan her bir kuyucuğa eşit hacimde ($8\text{ }\mu\text{l}$ reaksiyon karışımı + $2\text{ }\mu\text{l}$ cDNA) ve her örnek 3 tekrarlı olacak şekilde pipetleme yapılarak kuyucuklara dağıtıldı. Kuyucukların üzeri Light Cycler® 480 Sealing Foil ile kapatılarak cihaza yüklendi.

Tablo 7. qRT-PCR Reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µl)
GAPDH Forward Primer (5.0 nmol)	0.25
GAPDH Reverse Primer (5.0 nmol)	0.25
GAPDH YAK (Dye-Probe, 5.1 nmol)	0.25
Light Cyclers 480 Probes Master Mix (2X)	5
TagMan Target Primer-Probe (20X)	0.5
RNase-free H ₂ O	1.75
cDNA (ng/µl)	2
Toplam Hacim	10 µl

Örneklerin cihaza yüklenmesinin ardından LightCycler 480 SW 1.5.1 programında aşağıda Tablo 8’de verilen koşullar programa girildi.

Tablo 8. qRT-PCR için Çalışma protokolü

PROGRAMLAR				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Metodu		
Pre-inkübasyon	1	Yok		
Amplifikasyon	45	Nicel		
Soğutma	1	Yok		
PROGRAM SICAKLIK HEDEFLERİ				
Hedeflenen Sıcaklık (°C)	Edinme Modu	Bekletme Süresi (sa:dk:sn)	Pik Değeri (°C/s)	
Pre-inkübasyon				
95 °C	Yok	00:10:00	4.4	
Amplifikasyon				
95 °C	Yok	00:00:10	4.4	
60 °C	Yok	00:00:30	2.2	
72 °C	Tek	00:00:01	4.4.	
Soğutma				
40 °C	Yok	00:00:30	2.2.	

Çalışma tamamlandığında verilerin analizi, programda yer alan analiz metodlarından “Basic Relative Quantification for All Samples” seçilerek gerçekleştirildi.

3.2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal (İHK) inceleme için öncelikle tonsil FFPE doku bloklarından mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alınıp 40 °C’deki su banyosunun içine bırakıldı. Su banyosu içerisinde yüzen kesitler, etiketlenmiş olan polilizin kaplı lam üzerine alındı. Kesitlerin lam üzerine iyice yapışması için hangi sıcaklığın ve sürenin daha iyi sonuç vereceği araştırıldı. Yapılan denemeler şu değerleri içermektedir: 55 °C’de 20 dk, 55 °C’de 1 sa ve 37 °C’de gece boyunca etüvde bekletme. 37 °C’de gece boyunca etüvde bekletme işlemi en iyi sonucu verdiği için, bundan sonraki denemelere bu değerler ile devam edildi.

Boyama işleminden önce dokulardan parafinin uzaklaştırılması (deparafinizasyon) ve Antigen Retrieval (AR, antijenik bölgelerin açığa çıkarılması) işlem basamakları gerçekleştirildi. Uygulanan optimizasyon denemeleri aşağıda belirtilmektedir. Tüm işlemler çeker ocak içerisinde yapıldı ve tüm İHK işlemleri boyunca lam üzerindeki dokunun kurummasına izin verilmeden nemli bir ortamda (humidity chamber içerisinde) gerçekleştirildi. İHK için yapılan denemeler kısaca; uygulanan işlemlerin süreleri, solüsyonların konsantrasyonları, AR işlemi için kullanılan aletleri, yıkama ve antikor seyreltme için kullanılan solüsyonları içermektedir. Bu denemelerin yapıldığı kesitlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Deparafinizasyon basamağı için yapılan denemeler:

Öncelikle lam sepetinin içerisinde yerleştirilen lamlar 10 dk ksilenle bekletildi. Ardından lamlar 10 dk taze ksilen içerisinde bekletildi ancak bu aşama daha sonra 15 dk ya çıkarıldı. Lamlar sırasıyla %100’lük etil alkol, %100’lük taze etil alkol, %95’lik, %80’lik etil alkol solüsyonlarının her birinde 5 dk boyunca bekletildi. Sonraki denemelerde alkol serilerine %60’lık etil alkol solüsyonu da eklenerek devam edildi. Daha sonrasında lamlar 5 dk dH₂O içerisinde bekletildi. Bu aşama aynı şekilde 5 dk musluk suyu ile de denendi.

AR basamağı için yapılan denemeler:

AR işlemi için literatürde sıklıkla kullanılan Tris-EDTA (TE) pH:9 ve Sodyum Sitrat pH:6 solüsyonları ile denemeler yapıldı. Isı aracılı AR işlemi için su banyosu, mikrodalga fırın ve otoklav; enzimatik yolla AR için de PK sıklıkla kullanılan

yöntemlerdir. PK, TE ve Sodyum Sitrat solüsyonları kullanılarak 60 °C su banyosunda gece boyu inkübasyon (cihazın bozulma riskine karşılık daha yüksek derecelere çıkılamadı), mikrodalga fırında 200W-700W güç aralığında, minimum 2 dk maksimum 20 dk'lık ikişer, üçer, dörder kerelik ısıtma ve ardından 20-30 dk soğutma işlemi ve otoklav uygulamasında 105 °C, 120 °C, 125 °C sıcaklıkta 2 dk, 5dk, 10 dk, 15 dk ve 20 dk'lık inkübasyon ardından 20-30 dk soğutma denemeleri yapıldı. Yıkama basamağı için 1X TBST, PBS, 1X PBST, dH₂O ve musluk suyu kullanılarak 2x5 dk'lık farklı yıkama işlemleri denendi. Ardından lam üzerinde yer alan dokunun çevresi hidrofobik kalem ile çizildi.

Boyama basamağı için yapılan denemeler:

Spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak/bloke etmek için 1X TBS ve 1X PBS içerisinde %10'luk ve %5'lik Goat serum (keçi serumu) ile 2 sa, 1 sa ve 30 dk'lık inkübasyonlar gerçekleştirildi. Bu çalışmada birincil antikor olarak anti-PD-L1 antikorunu SP142 klonu (ab228462) ve anti-PD-1 [EPR4877(2), ab137132] kullanılmıştır. Birincil antikorlar 1X TBS ve 1X PBS içerisinde %1 goat serumda 1/100, 1/150, 1/200, 1/400 oranlarında seyreltildi ve nemli bir ortamda 4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. 1X TBST ve 1X PBST içerisinde 2x5 dk yıkamalar yapıldı. Sekonder antikor olarak Goat anti-rabbit IgG H8L (HRP) (ab205718) kullanıldı. %1 Goat serum içeren TBS ve PBS içinde 1/200, 1/1000, 1/10000, 1/20000 oranlarında seyreltildi ve oda sıcaklığında 1 sa inkübasyona bırakıldı. 1X TBST ve 1X PBST içerisinde 2x5 dk yıkamalar yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi, non-spesifik boyanmanın azaltılması amacıyla kesitler TBS ve PBS içerisinde %3'lük ve %0.3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ile 15-20 dk oda sıcaklığı ve 37 °C sıcaklıkta bekletildi. Hidrojen Peroksit işlemi deneylerin bir kısmında birincil antikordan sonra diğer kısmında ise sekonder antikor uygulamasından sonra denemeleri yapıldı. 1X TBST ve 1X PBST içinde 2x5 dk oda sıcaklığında yıkamalar yapıldı. Antikor boyanmasını görselleştirmek için kromojen olarak DAB Substrate kiti (Thermo Scientific katalog no: 34002) üretici firmanın talimatlarına göre kullanıldı. Renk gelişimi 2-20 dk arasında değişebilmektedir. Bu çalışmada 2 dk, 5 dk, 8 dk, 10 dk, 15 dk ve 20 dk'lık süreler denendi. Renk gelişiminden hemen sonra kesitler 2x3 dk 1X TBST, PBST, dH₂O ve musluk suyu ile yıkamalar yapıldı. Kesitler hematoksilin ile 2 dk karşı boyama yapıldı. Daha sonrasında kesitler musluk suyunda 1 dk boyunca yıkandı.

Dehidrasyon basamağı:

Kesitler sırasıyla %60'lık, %80'lik ve %95'lik etanolde 3 dk, %100'lük ve taze %100'lük etanol 5 dk boyunca bekletildi. Daha sonrasında ksilen 5 dk ve taze ksilende 5 dk bekletildi. Kesitler Entellan ile kapatıldı.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Ekspresyon çalışmasında, tekrarlı şekilde çalışılan PD-L1 ve PD-1 genleri için, tümör ve kontrol doku örneklerine ait Cp verileri GAPDH geni için elde edilen veriler referans kullanılarak normalize edildi. Analiz için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü uygulanarak, veriler istatistiksel analiz için uygun hale getirildi.

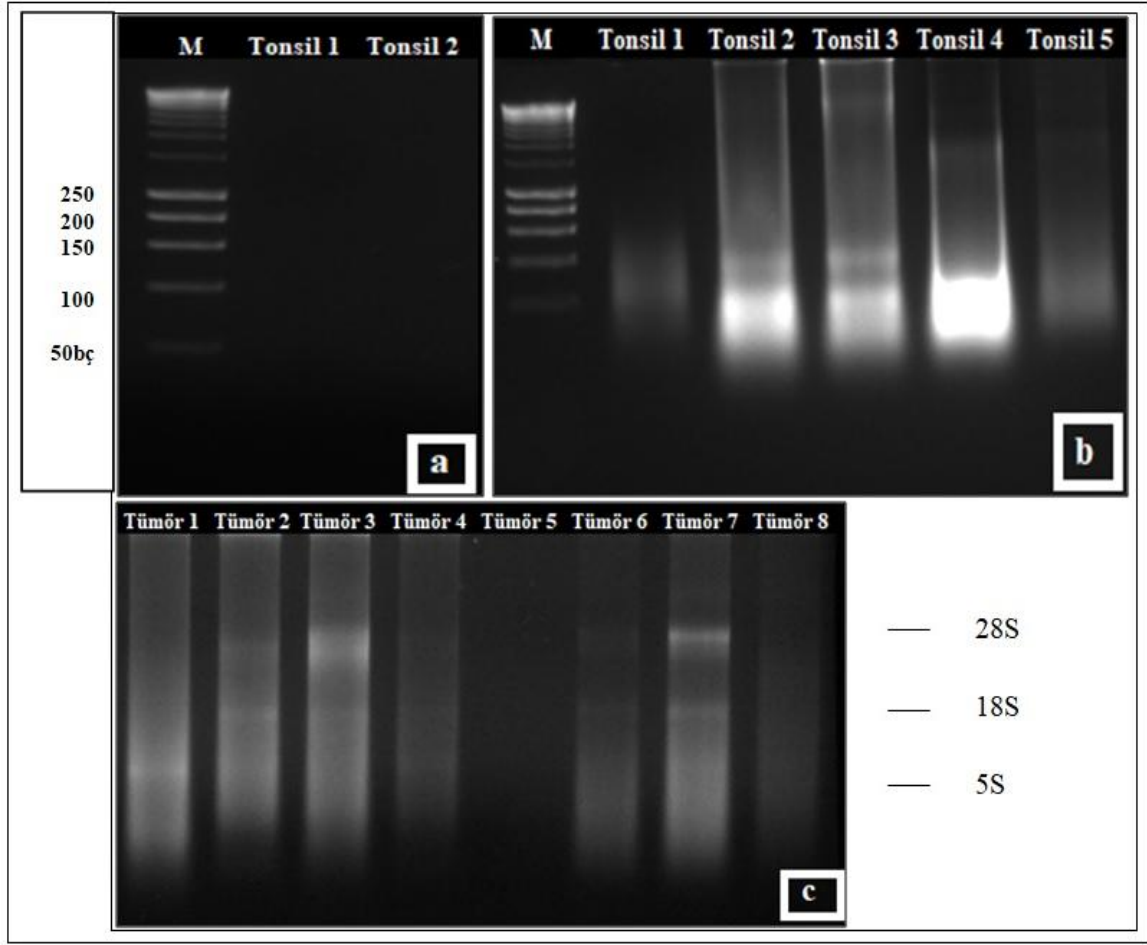
Çalışma verilerinin istatistiksel analizi, IBM SPSS Statistics Versiyon 25 programı kullanılarak yapıldı. Tümör doku örnekleri düşük dereceli ve yüksek dereceli tümör olarak iki gruba ayrıldı ve her iki hedef gen için ayrı ayrı (PD-L1/PD-1) ekspresyon seviyesi bakımından, iki grup arasındaki farklılıkların karşılaştırılması için Independent students t-testi gerçekleştirildi. Ardından tümör doku örneklerinde PD-L1/PD-1 genlerinin ekspresyon seviyeleri tümör evreleri (pTa, pT1, pT2) açısından incelenmesi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında sıkça kullanılan One-way ANOVA testi ile yapıldı ve gruplar arası birebir farkları görmek için post-hoc testler gerçekleştirildi. PD-L1 ekspresyonu, tümör derece ve kanser evresinin genel sağkalım ile ilişkisi Kaplan-Meier analizi ile hesaplandı. Yapılan değerlendirmeler sonucunda $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında mesane kanseri tanısı almış 48 hastanın FFPE dokularında PD-L1 ve PD-1 ekspresyonları moleküler inceleme yöntemlerinden qRT-PCR ile incelendi ve bu genlerin ekspresyonlarının tümör derecesi, kanser evresi ve hasta sağkalım süreleri ile ilişkisinin incelenmesi sonucunda prognozisteki etkisi araştırıldı. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular aşağıda belirtilmektedir.

4.1. FFPE Dokudan RNA İzolasyon Çalışmaları

FFPE tümör ve kontrol doku (tonsil) örneklerinden iki farklı RNA izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilen RNA'lar kaliteleri açısından karşılaştırıldı. Öncelikle FFPE dokudan RNA izolasyonu için uygun olan MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® RNA ticari kiti ile FFPE dokudan RNA izolasyonu protokolü uygulandı. Agaroz jel elektroforezi ile dokulardan elde edilen RNA'lar test edildiğinde herhangi bir bant görüntüsü elde edilemedi (Şekil 7a). Sonrasında manuel olarak RNA izolasyonu için Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yönteminde kullanılan Lizis solüsyonları ile ilgili optimizasyon çalışmaları yapıldı. İzole edilen RNA'ların bant varlığını gözlemlemek için %1.2'lik Agaroz jelde 70 V'da yürütüldü ve sonucunda, sadece Lizis solüsyon 1 protokolünün uygulandığı örneklerde bant görüntüsü elde edildi (Şekil 7b). Bunun sonucunda FFPE dokudan RNA izolasyonu için Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yönteminin Lizis solüsyon 1 protokolü kullanılarak uygulanmasına karar verildi. Ancak elde edilen RNA'ların bir kısmında degradasyon mevcuttu, ayrıca bazı doku örneklerinden RNA elde edilemedi (Şekil 7c, tümör 5). Yapılan RNA izolasyonu sonucunda FFPE doku bloklarından elde edilen RNA'lara ait agaroz jel görüntüleri Şekil 7 gösterilmiştir.



Şekil 7. FFPE doku bloklarından elde edilen RNA'lara ait agaroz jel görüntüleri. **(a)** Macherey-Nagel Nucleospin RNA İzolasyon Kiti ile tonsil dokusundan RNA izolasyonu. **(b)** Lizis solüsyon 1 ile tonsil dokusundan RNA izolasyonu. **(c)** Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yöntemi ile tümör dokusundan RNA izolasyonu (M: 50bç DNA ladder, Tümör 5: RNA elde edilemeyen doku örneği, Tümör 8: degrade RNA örneği).

4.2. Klinikopatolojik Özellikler

PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyon seviyelerini incelemek için mesane kanseri tanısı almış 62 hastanın FFPE dokuları ile tez çalışmasına başlandı. 14 tümör doku örneği çalışma grubuna kabul edilme kriterlerini sağlamadığından, çalışmaya 48 hasta örneği ile devam edildi. Çalışma grubuna kabul kriterleri: hasta datasının olması, İHK çalışmasında kesit alabilmek için parafin bloklarda dokunun yeterli miktarda görünür olması (en az 5 mm x 5 mm), RNA izolasyonu sonrasında kalite kontrolü için yapılan agaroz jel elektroforezinde bant görüntülenmesi, PD-L1 ekspresyon Cp değerinin 35'in üzerinde

olmamasıdır. Mesane kanseri hastalarında PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyonlarının incelendiği 48 hastaya ait klinikopatolojik özellikler Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Hastalara ait klinikopatolojik özellikler

Özellikler	Hasta sayısı n=48
Yaş	
Ortalama (en alt ve üst yaş sınırları)	65 (29-85)
Cinsiyet	
Kadın	2
Erkek	46
Tümör Derecesi	
Düşük dereceli	20
Yüksek dereceli	28
Patolojik Evre	
pTa	32
pT1	5
pT2	11

4.3. PD-L1 ve PD-1 Genlerinin qRT-PCR Kullanılarak Gerçekleştirilen Gen Ekspresyon Analizi

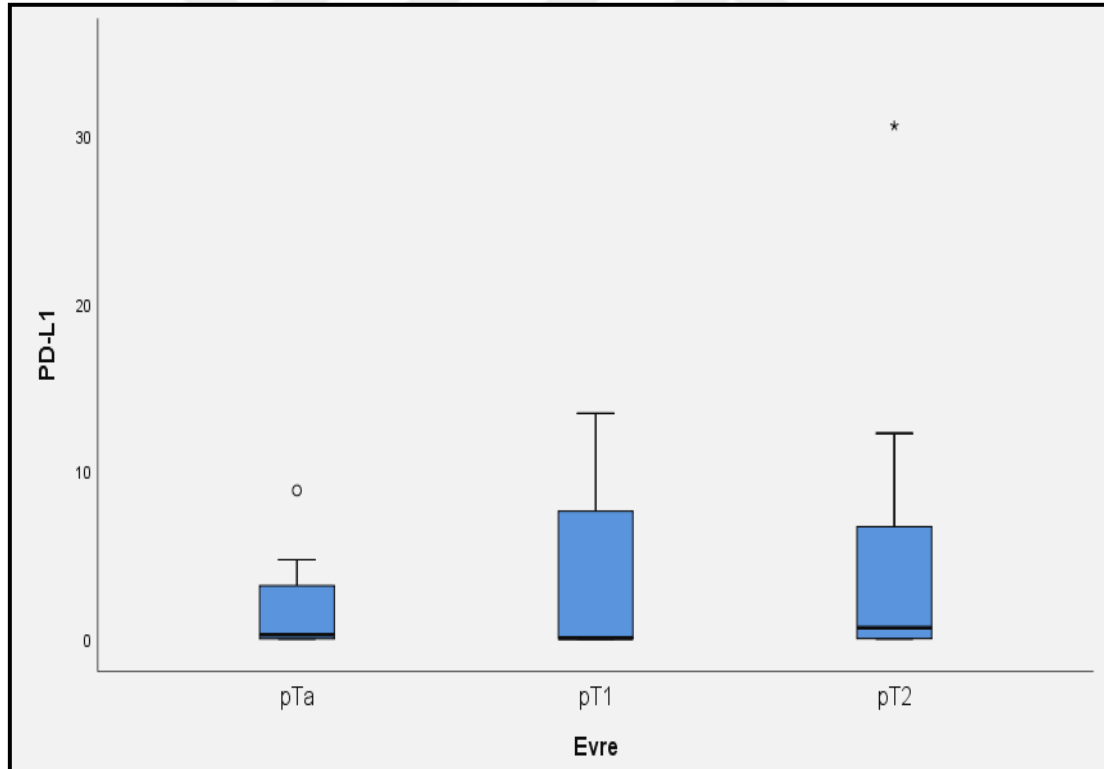
Bu tez çalışması kapsamında, mesane kanserli hastaların FFPE dokularından izole edilen RNA’ların cDNA dönüşümü sonrasında PD-L1 ve PD-1’in gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak TaqMan prob tekniği ile Light Cycler 480 II (Roche) cihazında analiz edildi. Her örneğin PD-L1 ve PD-1 genlerine ait veriler GAPDH referans geni ile normalize edilip $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü uygulanarak ekspresyon kat farkları istatistiksel olarak değerlendirildi. Mesane kanseri hastalarındaki PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyon seviyelerinin tümör derecesi, kanser evresi, genel sağkalım ile prognozisteki etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan istatistiksel değerlendirmeler aşağıda belirtilmiştir.

PD-1 ekspresyonu için 48 örnekten 10 örneğin Cp değerleri 35-40 arasında bulunmuştur. Cp değeri 35’in altında belirlenen iki örnek dışındaki diğer örneklerde PD-1 ekspresyonu tespit edilememiştir. 35’in üzerinde Cp değerleri analize dahil edilmediğinden

sadece düşük dereceli mesane kanserine sahip iki örneğin Cp değerleri değerlendirilmiştir. Bu iki örneğe ait PD-1 ekspresyonu için 8-14 Cp'ler arasında değerler tespit edilirken GAPDH geninin Cp değerleri 20-21 aralığında bulunmuştur. Fakat bu bulgular, analiz ve gruplar arası değerlendirme yapmak için yeterli değildir.

4.3.1. PD-L1 Ekspresyonunun Kanser Evresi ve Tümör Derecesi ile İlişkisi

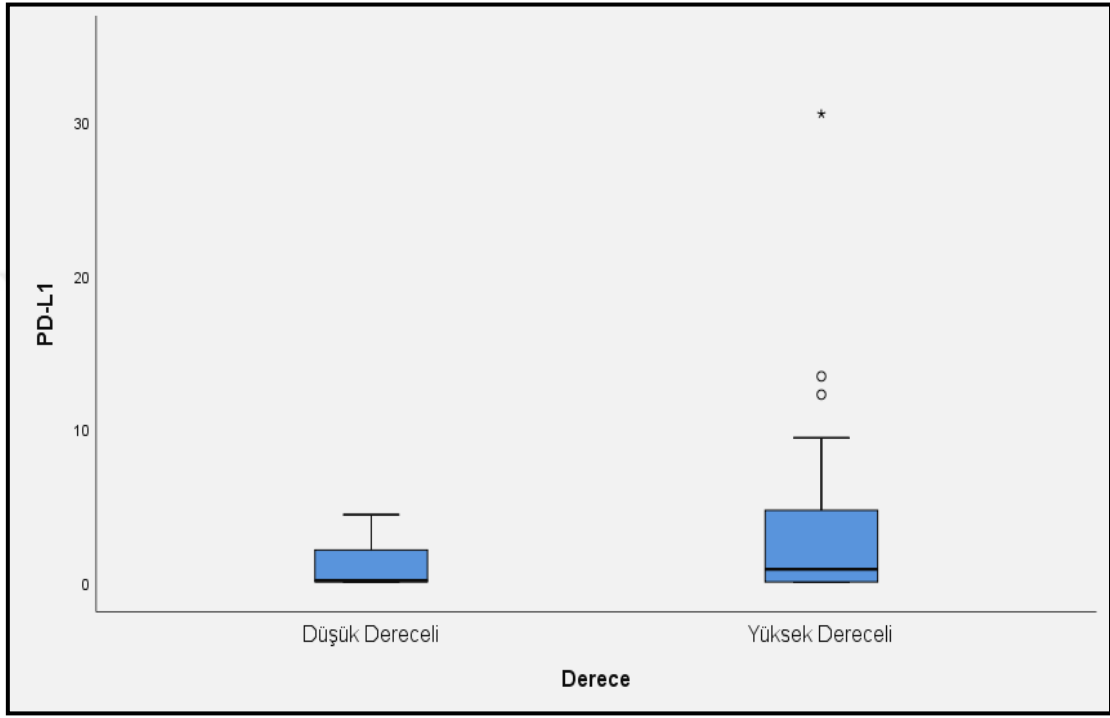
Çalışmamıza dâhil edilen 48 hastanın 32'si pTa, 5'i pT1 ve 11'i pT2 kanser evresine sahiptir. Kanseri evreleri ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında sıkça kullanılan One-way ANOVA testi ile incelendiğinde, PD-L1 ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.089$). Ayrıca gruplar kendi içerisinde birbirleriyle kıyaslandığında da (Post Hoc Test) anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Kanseri evresine göre PD-L1 ekspresyonunun kat değişimini gösteren kutu grafiği Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Kanseri evresine göre PD-L1 ekspresyonu kat-değişimi

Çalışma grubumuzda 20 düşük dereceli, 28 yüksek dereceli mesane kanseri dokusu mevcuttu. Yüksek dereceli mesane tümör grubu ($n=28$) ile düşük dereceli mesane tümör grubunda ($n=20$) PD-L1 ekspresyonları arasında fark olup olmadığı incelendiğinde ve

Independent students t-testi ile karşılaştırıldığında; yüksek dereceli tümör grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmış PD-L1 ekspresyonu görülmüştür ($p=0.036$). Tümör derecesine göre PD-L1 ekspresyonunun kat değişimini gösteren kutu grafiği şekil 9’da gösterilmiştir.

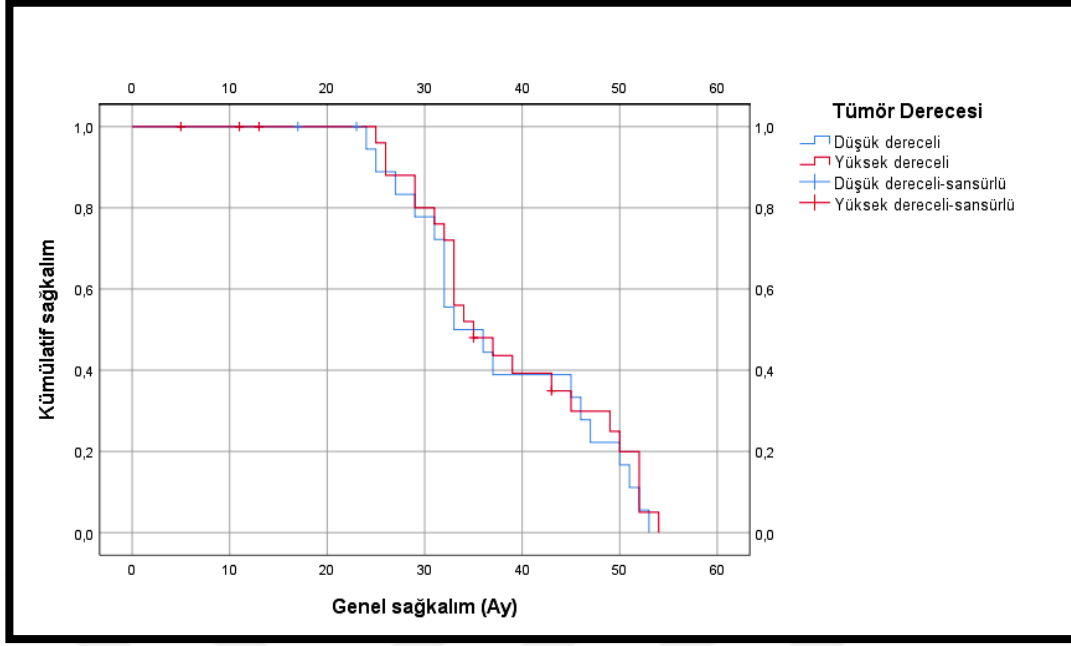


Şekil 9. Tümör derecesine göre PD-L1 ekspresyonu kat-değişimi

4.4. PD-L1 Ekspresyonu, Kanser Evresi, Tümör Derecesi ile Genel Sağkalım İlişkisi

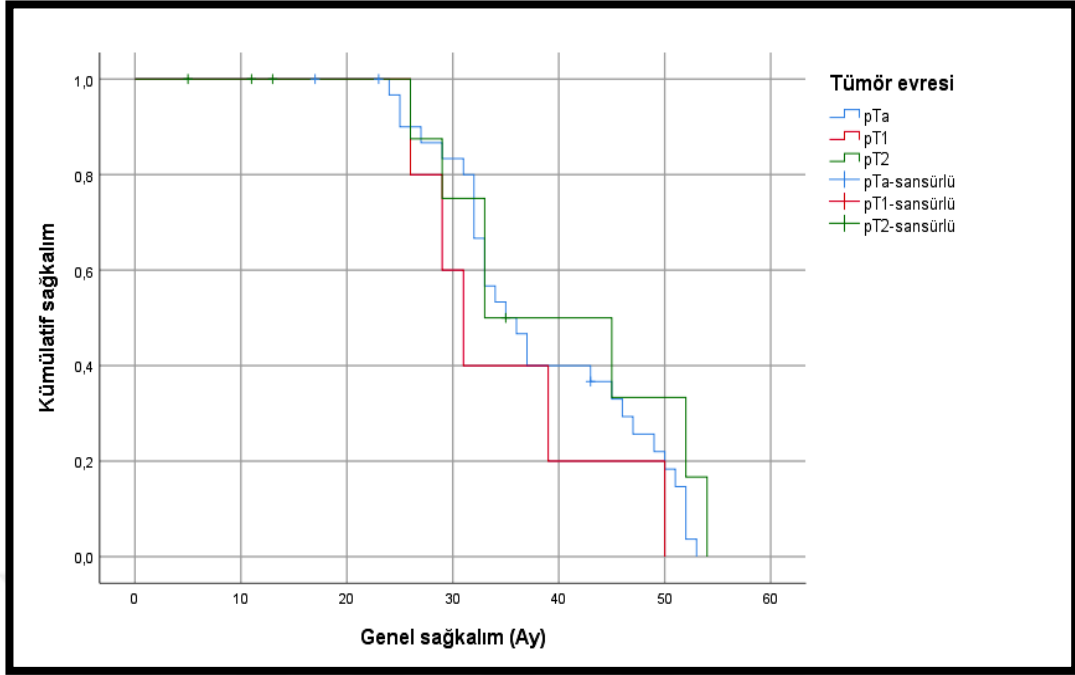
Mesane kanseri hastalarında PD-L1 ekspresyonu, tümör derece ve kanser evresinin genel sağkalım ile ilişkisi Kaplan-Meier analizi ile hesaplanarak sağkalım eğrilerinin karşılaştırılması Log Rank (Mantel-Cox) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubundaki hastalardan 41 tanesi hayatta iken, 7 tanesinin ölmüş olduğu belirlenmiştir. Hastaların genel sağkalım süreleri en az 5 ay en fazla 56 ay olup, ölmüş hastalardan 2’si düşük dereceli 5’i de yüksek dereceli mesane kanseridir. Ayrıca ölmüş 7 hastanın 3’ü Ta ve 4’ü de T2 patolojik tümör evresine sahiptir.

Tümör derecesinin sağkalım ile ilişkisi incelendiğinde: düşük dereceli hastalarda 33 ay yüksek dereceli hastalarda 35 aylık bir sağkalım süresi tespit edilmiş olsa da bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.573$) (Şekil 10).



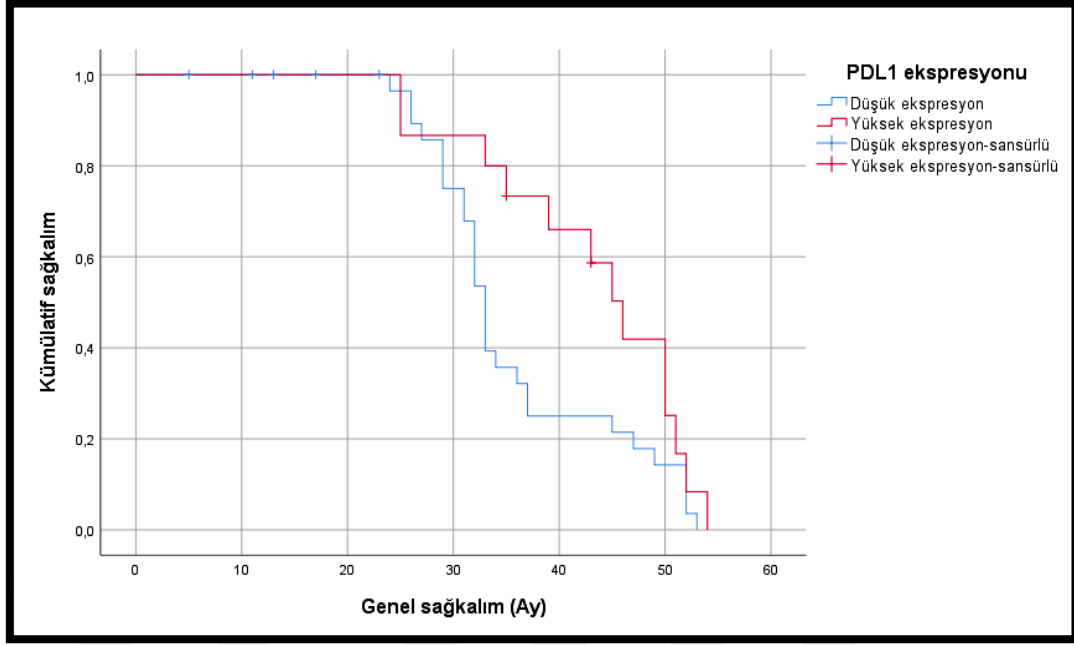
Şekil 10. Tümör derecesi ile genel sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan-Meier eğrisi

Kanser evrelerine göre genel sağkalım oranları incelendiğinde: Ta evresindeki hastaların 38.5 ay, T1 evresindekilerin 35 ay ve T2 evresindeki hastaların 40 aylık bir sağkalım sürelerinin olduğu görünse de, yapılan istatistiksel değerlendirmede genel sağkalım sürelerinin kanser evresi grupları arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p=0.334$) (Şekil 11).



Şekil 11. Tümör evresi ile genel sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan-Meier eğrisi

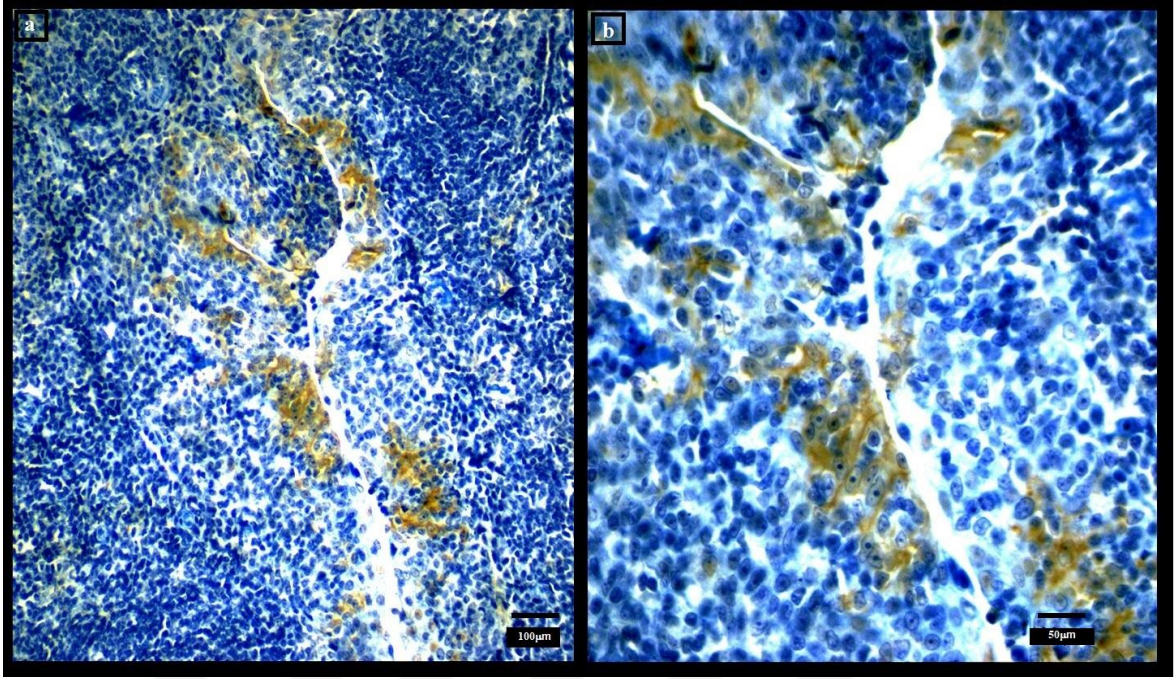
Çalışma grubunda PD-L1'i yüksek eksprese eden 15 hasta ve düşük ekspresyona sahip 33 hasta olduğu tespit edildi. PD-L1'i yüksek eksprese eden hastaların genel sağkalım süreleri 43 ay, PD-L1 düşük ekspresyonlu hastaların ise 35 aylık genel sağkalıma sahip olduğu bulundu ancak sağkalım verileri düşük ve yüksek PD-L1 ekspresyonu gruplarında incelendiğinde fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=0.064$) (Şekil 12).



Şekil 12. PD-L1 ekspresyonu ile genel sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren Kaplan-meier eğrisi

4.5. İmmünohistokimyasal Boyama için Denemeler

Mesane kanseri hastalarının doku kesitleri ile PD-L1 ve PD-1 ekspresyonlarının belirlenmesinde İHK yönteminin kullanılabilmesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Literatürde yer alan İHK protokolleri incelenerek, çok sayıda farklı kombinasyonlar içeren deney protokolleri oluşturuldu. Uygulanan anti-PD-L1 (ab228462) ve anti-PD-1 (ab137132) antikorların hücre membranındaki boyanma şiddeti dikkate alınarak PD-L1 ve PD-1 genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmeye çalışıldı. Kontrol doku kesitlerinde PD-L1 ve PD-1'in ekspresyonunun belirlenmesi için yapılan İHK denemeleri non-spesifik boyamalar ile sonuçlandı. Yapılan İHK denemeleri sonucunda tonsil doku örneklerine ait görüntüler Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13. Tonsil doku örneğinde İHK denemeleri sonucunda non-spesifik PD-L1 boyaması. **(a)** x20 büyütme, **(b)** x40 büyütme

5. TARTIŞMA

IARC'ın son yayımlanan verilerine göre immünojenik kanserlerden biri olan mesane kanseri dünya genelinde en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Mesane kanseri erkeklerde, dünyada 6. ülkemizde ise 4. en yaygın görülen kanser türüdür. Dünya genelinde erkeklerde yaklaşık 4 kat daha fazla görülmektedir ve ülkemizde bu oran 6 kata kadar çıkmaktadır. Nüks oranı yüksek ve tedavi süreci en maliyetli kanserlerden biri olan mesane kanserinde tedavi yönlendirici ve prognostik biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (Yeung vd., 2014).

Günümüzde morfolojik ve genomik olarak heterojen yapıda olan mesane kanserinin immünojenik özellikleri araştırılarak, prognostik ve terapötik öneme sahip moleküller giderek daha fazla araştırılmaya başlanmıştır (Li vd., 2020). Son yıllarda immün kontrol noktasında görevli özellikle PD-L1 ve daha az sıklıkla PD-1 moleküllerinin mesane kanseri de dâhil bazı kanser türlerinde potansiyel terapötik hedefler olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, mesane kanseri tanısı almış hastalara ait FFPE tümör dokularından elde edilen RNA örneklerinde PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyon seviyeleri incelenerek bu genlerin mevcut hasta kohortunda mesane kanserinde tümör derecesi, kanser evresi ile ilişkisi ve prognostik rolü araştırıldı.

Bu çalışma kapsamında, 2-4 yıllık saklanma süresine sahip 62 FFPE dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirmek için öncelikle ticari bir kitin FFPE dokudan RNA izolasyon protokolü kullanıldı fakat RNA elde edilemedi. Çalışmada kullanılan RNA'lar Monofazik Fenol ve Guanidin İzotiyosiyanat yöntemi kullanılarak hazırlandı. Dışlama kriterleri kullanılarak daha önce belirtildiği gibi 14 örnek çalışmadan çıkarıldı. Bazı örneklerde RNA'ların yetersiz ve degrade şekilde olduğu görüldü. Dünya genelinde hastalığın moleküler temellerinin incelenmesinde, taze veya donmuş doku örneklerinden ve normal/ tümöral dokuların FFPE şeklinde saklanan arşiv materyallerinden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, bütün dokuların dondurularak saklanması her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle FFPE yöntemi en yaygın kullanılan doku depolama şeklidir. Ancak uzun yıllar saklanan FFPE doku örneklerinden taze ve donmuş dokulara kıyasla daha düşük oranda nükleik asit elde edildiği bilinmektedir. Uzun süreli formalin fiksasyonu ile kullanılan diğer fiziksel ve kimyasal ajanların fiksasyon sırasındaki etkileşimleri parafin dokulardan elde edilen nükleik asit kalitesinde değişikliklere neden olabilmektedir (Lehmann ve Kreipe, 2001; Farragher vd., 2008)..Cronin vd. (2004)

tarafından, yaklaşık 1 yıl, 6 yıl ve 17 yıl boyunca depolanan 62 adet FFPE meme kanseri dokusu ile gen ekspresyon çalışması yapılmış ve yaklaşık 1 yıllık parafin doku RNA'sının diğer parafin doku RNA'larından daha büyük moleküler ağırlığa sahip olduğu gösterilmiştir. Parafin dokudan elde edilen RNA'ların degrade olma derecesinin daha uzun depolama süresi ile artabileceği sonucuna varılmıştır (Cronin vd., 2004).

Bu tez çalışmasında, mesane kanseri örneklerinde belirlenecek yüksek PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunun hastaların kötü prognozu, yüksek tümör evre ve kanser derecesi ile ilişkilendirilebileceği hipotezi sınanmıştır. Bu çalışmada, tümör derecesi ve kanser evresine göre gruplanan mesane kanseri tanısı almış hastalarda literatürde prediktif ve prognostik biyobelirteçler olarak bilinen PD-1 ve PD-L1 ekspresyon seviyelerinin nasıl değiştiğini ve hasta prognozu açısından mevcut kohorttaki rolü incelendi. Mesane kanseri hastalarının parafin dokuları ile gerçekleştirilen mevcut çalışmada, 48 mesane kanserli hasta dokusunda PD-L1 ekspresyonu qRT-PCR yöntemi ile tespit edilebilirken, PD-1 ekspresyonu sadece 12 tümör örneğinde belirlenebildi. Çalışmamızda elde ettiğimiz tümör dokularında düşük PD-1 ekspresyonu sonucumuz ile uyumlu olarak Li vd. (2020), 260 mesane kanseri tümör örneğini doku mikroarrayi ile analiz ettiği çalışmada, PD-1 ekspresyonunun tümöre infiltrate immün hücrelerle ilişkili olması nedeniyle tümör dokusunda PD-1 ekspresyonu pozitifliğini düşük bulmuştur (Li vd., 2020). Bununla birlikte, Mo vd. (2016), endometrial kanserlerde PD-1, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak 35 normal endometrial doku örneğinde ve 75 endometrial kanser doku örneğinde incelemiştir. Endometrial kanserlerin yaklaşık %61'inde tümör infiltrate eden bağışıklık hücre yüzeyinde PD-1 boyaması pozitif olarak bulunmuş, fakat PD-1'in tümör hücrelerinde veya normal endometrial dokularda eksprese edilmediği bildirilmiştir (Mo vd., 2016).

Çalışmamızda yüksek dereceli mesane kanseri hasta grubunda anlamlı derecede artmış PD-L1 ekspresyonu bulundu. Kanser evresi grupları arasında PD-L1 ekspresyon seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. PD-L1 ekspresyon seviyesinin kanser evresi hasta grupları arasında gösterdiği farkın istatistiksel anlamlılık göstermeme nedeni gruplar arasındaki hasta dağılımının dengeli olmaması olarak düşünülebilir (32 pTa, 5 pT1 ve 11 pT2). Ayrıca, Kaplan Meier yöntemi ile genel sağkalım verileri analiz edildiğinde, tümör dokularında PD-L1 ekspresyonu, tümör derecesi ve kanser evresi grupları arasında sağkalım süresi açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Hasta

kohortunda takip süresinin en yüksek 56 ay ile sınırlı olması sağkalım verilerinde kısıtlılık oluşturmaktadır. Daha uzun takip süresi sağkalım analiz sonuçlarında değişiklik oluşturabilir. Davick vd. (2018), tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu ve mesane kanserlerinin immünolojik ortamını incelemek için 165 sistektomi örneği ile bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu örnekler tümör tipi, tümör derecesi, patolojik evresi ve genel sağkalım açısından araştırılmıştır. Sonuçlarımızla uyumlu olarak yüksek dereceli tümörlerin düşük dereceli tümörlerden daha çok PD-L1 pozitif olduğu fakat sağkalım oranlarına bakıldığında da PD-L1-pozitif ve PD-L1-negatif mesane kanserleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (Davick vd., 2018). Benzer şekilde, Kawahara vd. (2018), qRT-PCR ile normal ve mesane kanseri dokusunda PD-1/PD-L1 genlerinin ekspresyonlarını incelemişlerdir. Normal ve kanserli doku arasında PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarında anlamlı bir fark bulunamamış ancak, PD-1 ve PD-L1'in tüm mesane kanserli dokularda eksprese edildiği ve yüksek dereceli mesane kanserinde düşük dereceli mesane kanserinden daha fazla eksprese olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, PD-1 ve PD-L1'in mesane kanserinin patolojik derecesi ile ilişkili yeni bir biyobelirteç olabileceği ve mesane kanserinde evre ilerlemesinin aracısı olarak işlev görebileceği vurgulanmıştır (Kawahara vd., 2018). 2019 yılında mesane kanserli hastalarda PD-L1'in prognostik ve klinikopatolojik önemi ile ilgili 1.697 hastayı içeren toplam 11 çalışmanın dahil edildiği bir meta-analiz çalışmasında yüksek PD-L1 ekspresyonunun zayıf genel sağkalım oranı, ileri tümör evresi ve uzak metastaz ile ilişki olduğu gösterilmiştir (Zhu vd., 2019). Boorjian vd. (2008), mesane ürotelyal karsinomunda PD-L1, PD-1 ve B7-H3 T hücre düzenleyicilerinin ekspresyonunu radikal sistektomi uygulanan 318 hastanın parafin bloklarını immünohistokimya ile değerlendirmiş ve PD-L1 ve PD-1 ekspresyonları ilerlemiş hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Boorjian vd., 2008). Mesane kanserinde PD-L1 ekspresyonunun klinik sonuçlar ile ilişkisini araştıran başka bir çalışmada ise, 110 ürotelyal mesane kanseri hastasında PD-L1'in ekspresyonu immünohistokimya ve qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, PD-L1 ekspresyonunun kanserli dokularda normal dokulara kıyasla yüksek olduğu ve derece, evre, nüks, metastaz ve sağkalım ile pozitif yönde ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Li vd., 2018). Bu çalışmaların aksine, mesanenin ürotelyal karsinomunda PD-L1 ekspresyonunun klinikopatolojik ve prognostik değeri ile ilgili yapılan diğer bir meta-analiz, 4 032 hasta ile 27 çalışmayı içermektedir. Tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonu ile hem ileri evre kanser hem de daha yüksek tümör derecesi ile arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Fakat, tümör hücreleri

üzerindeki PD-L1 ekspresyonunun mesane kanseri hastalarında kas invazyonu ile ilişkili olduğu ve PD-L1-pozitif hastaların anti-PD-1/PD-L1 antikor tedavisine daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir (Ding vd., 2019). Mesane kanseri tedavisinde PD-L1'in prediktif ve prognostik rolü tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Mevcut literatür verileri göre, PD-L1-pozitif tümöre sahip hastalarda anti-PD-L1 tedavisi uygulaması sonrası objektif cevap oranının daha yüksek olduğu fakat genel sağkalım oranlarında hem PD-L1-pozitif hem de negatif grupların tedaviden fayda gördüğü sonucu rapor edilmektedir.

PD-L1'in prognostik rolü daha önce çeşitli kanserlerde araştırılmıştır ve mesane kanserindeki sonuçlara benzer şekilde PD-L1'in yüksek ekspresyonunun negatif bir prognostik parametre olabileceği sonucu desteklenmektedir. Zhao vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, toplam 2005 Hodgkin dışı lenfoma hastasında yüksek PD-L1 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2018). Li vd. (2018), 1.843 hepatoselüler karsinoma hastasında PD-L1'in genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım için prognostik rolünü araştırmış ve yüksek PD-L1 ekspresyonunun daha kısa sağkalım ve daha kötü hastalıksız sağkalım ile ilişkilendirmiştir (Li vd., 2018). 993 pankreas kanserli hastayı içeren başka bir çalışmada ise, yüksek PD-L1 ekspresyonunun kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğu, PD-L1'in pankreas kanseri için hem potansiyel bir prognostik biyobelirteç hem de pankreas kanseri hastalarında tedavide immünoterapiyi önerecek klinisyenlere yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Hu vd., 2019).

Bu tez çalışmasında tonsil kontrol ve mesane kanseri doku kesitlerinde PD-L1 ve PD-1 antikorları için immünohistokimyasal inceleme optimize edilmeye çalışıldı. Çalışmada literatürde daha önce çeşitli çalışmalarda rapor edilen primer antikor PD-L1 SP142 klonu kullanıldı (Halse vd., 2018; Kozuma vd., 2018; Chen vd., 2019; Zajac vd., 2019). Ancak, yapılan denemeler non-spesifik boyanmalar ile sonuçlandı ve immünohistokimyasal değerlendirme yapılamadı. Bu durumunun FFPE doku bloklarının kontrol tonsil dokusu da dahil olmak üzere 2-4 yıl süre ile depolanmış olmasından dolayı ya da kullanılan antikor kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği 100'den az tümör hücresi içeren veya 3 yıldan eski doku bloklarının PD-L1 testi için kullanılmamasını önermektedir. Bu önermeyi doğrulayan Gagné vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri 1249 hasta ait numune özelliklerinin PD-L1 üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada araştırılan numune özellikleri: Canlı tümör hücrelerinin sayısını (1-100 hücre veya >100

hücre), numune tipini (hücre bloğu, biyopsi veya cerrahi rezeksiyon) ve FFPE blok yaşını içermektedir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda 100'den az tümör hücresi içeren veya 3 yıldan eski parafin doku örneklerinin PD-L1 ekspresyon seviyesinin olduğundan az tahmin edilmesine yol açabileceği gösterilmiştir (Gagné vd., 2019). Akciğer kanserinde bir biyobelirteç olarak PD-L1'in tümör infiltrate edici lenfositlerde ve tümör hücrelerinde İHK değerlendirmesine ilişkin Giunchi vd. (2018) tarafından yapılan metodolojik çalışmada, İHK boyamasını tümör histolojisi, derecesi ve doku bloklarının yaşı ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada daha eski parafin bloklarında tümör hücrelerinde PD-L1 İHK ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, parafine gömülü akciğer kanseri dokularında PD-L1'in İHK değerlendirmesinin uygulanabilir olduğu ancak 1 yıldan daha uzun süreli doku bloklarının değerlendirilmesinde dikkatli olunması gerektiği sonucuna varılmıştır (Giunchi vd., 2018). Bunun yanında immünohistokimyasal PD-L1 uygulaması için antikor bağlanma bölgelerinin haritalanmasını analiz eden bir çalışmada, mevcut İHK çalışmamızda kullandığımız SP142 antikor klonu ile ticari olarak erişime açık alternatif klon SP263 antikorunu kıyaslanmış ve her ikisinin de PD-L1'in ekstrem C-terminusunda sitoplazmik domainde aynı epitopa bağlanmasına rağmen, farklı bağlanma profillerine sahip olduğu belirtilmiştir. SP142 klonunun immünohistokimyasal boyamada önemli derecede uyumsuz sonuçlar oluşturduğu fakat bunun yanında tümör heterojenitesi gibi faktörlerinde katkısının göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır (Lawson vd., 2020).

PD-L1/PD-1 immün kontrol noktalarının tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında önemli rol oynadığı, mesane kanseri de dahil çeşitli malignitelerde genellikle PD-L1'in yüksek seviyede eksprese edildiği ve yüksek PD-L1 ekspresyonuna sahip mesane kanseri hastalarının kötü prognoz gösterdiği literatürde çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Bununla birlikte PD-L1'in çeşitli kanser türlerindeki ekspresyonunun farklı olmasından dolayı her bir hastalık için ayrı değerlendirilmesi gerektiğinden ve az sayıdaki bazı çalışmalarda PD-L1 ve PD-1 ekspresyonu ile prognoz arasında net bir ilişki gösterilememiştir. Literatürde bu konu ile ilgili çelişkili sonuçların varlığı bu alanda daha fazla çalışma yapılması için önemli bir gerekçe sunmaktadır.

Sonuç olarak, tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında önemli rol oynayan PD-L1/PD-1'in birçok kanserde eksprese edildiği ve ekspresyon durumunun prognoz ile ilişkisi hakkında literatürde farklı sonuçların olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, PD-L1 ve PD-1 ekspresyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda: Örneklenen organ ve toplama

yöntemindeki (TUR-BT, sistektomi, nefroüretrektomi gibi) çeşitlilik, FFPE dokularının yaşı, materyale (formalin-fikse parafin bloğu ve donmuş doku) bağlı değişiklikler, farklı PD-1 ve PD-L1 antikorlarının kullanımı ve ekspresyon pozitifliği oranlarındaki farklılıklar vb. nedenler literatürdeki çalışmaları doğrudan karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Sonuç olarak, mevcut çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda mesane kanserinde qRT-PCR yöntemi ile belirlenen PD-L1 ekspresyonunun tek başına prognostik bir biyobelirteç olarak güçlü olmadığı fakat yüksek tümör derecesine sahip örneklerde tespit edilen artmış PD-L1 ekspresyonunun tedavi yönlendirici özellik taşıması nedeniyle etkili bir prediktif belirleyici olabileceği gösterildi.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Mesane kanseri hastalarına ait parafin doku blokları kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada, yüksek tümör derecesine sahip hasta grubunda anlamlı seviyede artmış PD-L1 ekspresyonu ($p<0.05$) gösterildi.
2. PD-L1 ekspresyonundaki değişim hastalar tümör evrelerine göre gruplandığında anlamlı bulunmadı, bunun temel nedeninin çalışma alt grubunda yer alan pT1 evresindeki hasta sayısının azlığı ($n=5$) olduğu düşünülmektedir.
3. Ayrıca PD-L1 ekspresyonu verilerinin genel sağkalım ile ilişkisi analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.
4. Sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak mesane kanserinde PD-L1 ekspresyonunun prognostik bir biyobelirteç olarak tek başına yeterli olmayabileceği ancak, diğer çalışmalarda da bildirildiği gibi PD-L1'in yüksek ekspresyonunun tümörün agresifliği ve tümör derecesi ile güçlü bir ilişkili gösterdiğini bulunmuştur.
5. Mesane kanserli hastalara ait tümör dokularının büyük çoğunluğunda tespit edilebilir seviyede PD-L1 ekspresyonunun varlığı, standart tedaviye cevap vermeyen hastalar için anti-PD-L1 immünoterapilerinin alternatif bir tedavi seçeneği olarak önerilmesi konusunda fikir sağlayabilir.
6. Onkoloji alanında kişiye özel hedef tedavi seçeneklerinin sunulabildiği günümüzde, sıralı tedavi stratejileri ve ilerlemiş veya metastatik mesane kanseri hastaları için doğru tedavinin seçilmesini kolaylaştırıcı ve yönlendirici prediktif biyobelirteçlerin çalışılması önem taşımaktadır.
7. Çalışmamızda örneklem sayımızın kısıtlı olması ve hasta takip süresinin daha uzun olması gerekliliği, PD-L1 ekspresyon farkının tümör evre grupları arasında anlamlı bulunmaması ve sağkalım sürelerinin PD-L1 gen ekspresyon verileri ile analizlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamasının nedeni olabilir.
8. Literatürde yer alan farklı sonuçlar, çok merkezli ve yüksek örneklem sayısı ile gerçekleştirilecek çalışmalara gereksinim olduğunu ortaya koymaktadır. Geniş kapsamlı çalışmaların PD-L1 ve PD-1'ihedefleyen antikör tedavisine uygun hasta grubunun tanımlanmasına yardımcı olarak aynı zamanda literatürü yönlendirici olması açısından önemli katkılar sunulabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

Aben, K. K., J. A. Witjes, M. P. Schoenberg, C. Hulsbergen-van de Kaa, A. L. Verbeek and L. A. Kiemeny (2002). "Familial aggregation of urothelial cell carcinoma." International journal of cancer **98**(2): 274-278.

Abol-Enein, H. (2008). "Infection: is it a cause of bladder cancer?" Scandinavian Journal of Urology and Nephrology **42**(sup218): 79-84.

Aksu, O. B. and S. Sengul (2019). "Immune Checkpoints and Inhibitors/Immun Denetim Noktaları ve Inhibitorleri." Journal of Ankara University Faculty of Medicine **72**(3): 262-268.

Alfred Witjes, J., T. Lebet, E. M. Compérat, N. C. Cowan, M. De Santis, H. M. Bruins, V. Hernández, E. L. Espinós, J. Dunn, M. Rouanne, Y. Neuzillet, E. Veskimäe, A. G. van der Heijden, G. Gakis and M. J. Ribal (2017). "Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer." Eur Urol **71**(3): 462-475.

Alsaab, H. O., S. Sau, R. Alzhrani, K. Tatiparti, K. Bhise, S. K. Kashaw and A. K. Iyer (2017). "PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome." Frontiers in pharmacology **8**: 561.

American Cancer Society. (2019). "Bladder Cancer Risk Factors [online]." Retrieved 10.08.2021, from https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html#written_by.

An, Y., H. Li, K. J. Wang, X. H. Liu, M. X. Qiu, Y. Liao, J. L. Huang and X. S. Wang (2015). "Meta-analysis of the relationship between slow acetylation of N-acetyl transferase 2 and the risk of bladder cancer." Genet Mol Res **14**(4): 16896-16904.

Anderson-Otunu, O. and S. Akhtar (2016). "Chronic Infections of the Urinary Tract and Bladder Cancer Risk a Systematic Review." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **17**(8): 3805-3807.

Apolo, A. B., J. R. Infante, A. Balmanoukian, M. R. Patel, D. Wang, K. Kelly, A. E. Mega, C. D. Britten, A. Ravaud and A. C. Mita (2017). "Avelumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in patients with refractory metastatic urothelial carcinoma: results from a multicenter, phase ib study." Journal of Clinical Oncology **35**(19): 2117.

Babjuk, M., A. Böhle, M. Burger, O. Capoun, D. Cohen, E. M. Comperat, V. Hernandez, E. Kaasinen, J. Palou, M. Roupret, B. W. van Rhijn, S. F. Shariat, V. Soukup, R. J. Sylvester and R. Zigeuner (2017). "EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016." Eur Urol **71**(3): 447-461.

Babjuk, M., A. Böhle, M. Burger, O. Capoun, D. Cohen, E. M. Compérat, V. Hernández, E. Kaasinen, J. Palou and M. Rouprêt (2017). "EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016." European urology **71**(3): 447-461.

Babjuk, M., M. Burger, E. M. Compérat, P. Gontero, A. H. Mostafid, J. Palou, B. W. van Rhijn, M. Rouprêt, S. F. Shariat and R. Sylvester (2019). "European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and carcinoma in situ)-2019 update." European urology **76**(5): 639-657.

Babjuk, M., M. Burger, E. M. Compérat, P. Gontero, A. H. Mostafid, J. Palou, B. W. G. van Rhijn, M. Rouprêt, S. F. Shariat, R. Sylvester, R. Zigeuner, O. Capoun, D. Cohen, J. L. D. Escrig, V. Hernández, B. Peyronnet, T. Seisen and V. Soukup (2019). "European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update." Eur Urol **76**(5): 639-657.

Bassett, J. C., J. L. Gore, A. C. Chi, L. Kwan, W. McCarthy, K. Chamie and C. S. Saigal (2012). "Impact of a bladder cancer diagnosis on smoking behavior." J Clin Oncol **30**(15): 1871-1878.

Bellmunt, J., R. De Wit, D. J. Vaughn, Y. Fradet, J.-L. Lee, L. Fong, N. J. Vogelzang, M. A. Climent, D. P. Petrylak and T. K. Choueiri (2017). "Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma." New England Journal of Medicine **376**(11): 1015-1026.

Bellmunt, J., R. de Wit, D. J. Vaughn, Y. Fradet, J. L. Lee, L. Fong, N. J. Vogelzang, M. A. Climent, D. P. Petrylak, T. K. Choueiri, A. Necchi, W. Gerritsen, H. Gurney, D. I. Quinn, S. Culine, C. N. Sternberg, Y. Mai, C. H. Poehlein, R. F. Perini and D. F. Bajorin (2017). "Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma." N Engl J Med **376**(11): 1015-1026.

Bilgin, B., M. A. Sendur, M. Hizal and B. Yalçın (2019). "An update on immunotherapy options for urothelial cancer." Expert opinion on biological therapy **19**(12): 1265-1274.

Bilgin, B., M. A. N. Sendur, M. Hizal and B. Yalcin (2019). "An update on immunotherapy options for urothelial cancer." Expert Opin Biol Ther **19**(12): 1265-1274.

Black, A. J. and P. C. Black (2020). "Variant histology in bladder cancer: diagnostic and clinical implications." TRANSLATIONAL CANCER RESEARCH **9**(10): 6565-6575.

Boegemann, M., A. M. Aydin, A. Bagrodia and L.-M. Krabbe (2017). "Prospects and progress of immunotherapy for bladder cancer." Expert opinion on biological therapy **17**(11): 1417-1431.

Bolla, S. R., N. Odeluga and R. Jeti (2021). Histology, Bladder. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

Boussiotis, V. A. (2016). "Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway." N Engl J Med **375**(18): 1767-1778.

Boorjian, S. A., Y. Sheinin, P. L. Crispen, S. A. Farmer, C. M. Lohse, S. M. Kuntz, B. C. Leibovich, E. D. Kwon and I. Frank (2008). "T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival." Clin Cancer Res **14**(15): 4800-4808.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin **68**(6): 394-424.

Brierley, J. D., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). TNM classification of malignant tumours, John Wiley & Sons.

Chang, S. S., B. H. Bochner, R. Chou, R. Dreicer, A. M. Kamat, S. P. Lerner, Y. Lotan, J. J. Meeks, J. M. Michalski, T. M. Morgan, D. Z. Quale, J. E. Rosenberg, A. L. Zietman and J. M. Holzbeierlein (2017). "Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline." J Urol **198**(3): 552-559.

Chang, S. S., S. A. Boorjian, R. Chou, P. E. Clark, S. Daneshmand, B. R. Konety, R. Pruthi, D. Z. Quale, C. R. Ritch, J. D. Seigne, E. C. Skinner, N. D. Smith and J. M. McKiernan (2016). "Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline." J Urol **196**(4): 1021-1029.

Chen, X.-J., Y.-Q. Tan, N. Zhang, M.-J. He and G. Zhou (2019). "Expression of programmed cell death-ligand 1 in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia is associated with disease progress and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes." Pathology-Research and Practice **215**(6): 152418.

Cronin, M., M. Pho, D. Dutta, J. C. Stephans, S. Shak, M. C. Kiefer, J. M. Esteban and J. B. Baker (2004). "Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay." The American journal of pathology **164**(1): 35-42.

Ciccarese, C., R. Iacovelli, E. Bria, C. Mosillo, D. Bimbatti, E. Fantinel, I. Bisogno, M. Brunelli and G. Tortora (2019). Second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma: Defining the best treatment option among immunotherapy, chemotherapy, and antiangiogenic targeted therapies. A systematic review and meta-analysis. Seminars in oncology, Elsevier.

Compérat, E. M., M. Burger, P. Gontero, A. H. Mostafid, J. Palou, M. Rouprêt, B. W. G. van Rhijn, S. F. Shariat, R. J. Sylvester, R. Zigeuner and M. Babjuk (2019). "Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016"." Eur Urol Focus **5**(3): 457-466.

Czerniak, B., C. Dinney and D. McConkey (2016). "Origins of Bladder Cancer." Annu Rev Pathol **11**: 149-174.

Dafni, U., Z. Tsourtli, K. Vervita and S. Peters (2019). "Immune checkpoint inhibitors, alone or in combination with chemotherapy, as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. A systematic review and network meta-analysis." Lung cancer **134**: 127-140.

Davick, J. J., H. F. Frierson, M. Smolkin and A. A. Gru (2018). "PD-L1 expression in tumor cells and the immunologic milieu of bladder carcinomas: a pathologic review of 165 cases." Hum Pathol **81**: 184-191.

Ding, X., Q. Chen, Z. Yang, J. Li, H. Zhan, N. Lu, M. Chen, Y. Yang, J. Wang and D. Yang (2019). "Clinicopathological and prognostic value of PD-L1 in urothelial carcinoma: a meta-analysis." Cancer Manag Res **11**: 4171-4184.

Fang, W., Z.-Y. Yang, T.-Y. Chen, X.-F. Shen and C. Zhang (2020). "Ethnicity and survival in bladder cancer: a population-based study based on the SEER database." Journal of translational medicine **18**: 1-11.

Farina, M. S., K. T. Lundgren and J. Bellmunt (2017). "Immunotherapy in urothelial cancer: recent results and future perspectives." Drugs **77**(10): 1077-1089.

Farragher, S. M., A. Tanney, R. D. Kennedy and D. Paul Harkin (2008). "RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues." Histochem Cell Biol **130**(3): 435-445.

FDA. (2016). "Atezolizumab (TECENTRIQ) [online]." Retrieved 10.08.2021, 2021, from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/atezolizumab-tecentriq>.

FDA. (2017). "Durvalumab (Imfinzi) [online]." Retrieved 10.08.2021, from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/durvalumab-imfinzi>.

FDA. (2017). "FDA grants accelerated approval to avelumab for urothelial carcinoma [online]." Retrieved 10.08.2021, from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-avelumab-urothelial-carcinoma>.

FDA. (2017). "Nivolumab for Treatment of Urothelial Carcinoma [online]." Retrieved 10.08.2021, from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/nivolumab-treatment-urothelial-carcinoma>.

FDA. (2017). "Pembrolizumab (Keytruda): Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma [online]." from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/pembrolizumab-keytruda-advanced-or-metastatic-urothelial-carcinoma>.

Freedman, N. D., D. T. Silverman, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin and C. C. Abnet (2011). "Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women." Jama **306**(7): 737-745.

Fritsche, H. M., M. Burger, R. S. Svatek, C. Jeldres, P. I. Karakiewicz, G. Novara, E. Skinner, S. Denzinger, Y. Fradet, H. Isbarn, P. J. Bastian, B. G. Volkmer, F. Montorsi, W. Kassouf, D. Tilki, W. Otto, U. Capitanio, J. I. Izawa, V. Ficarra, S. Lerner, A. I. Sagalowsky, M. Schoenberg, A. Kamat, C. P. Dinney, Y. Lotan and S. F. Shariat (2010). "Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort." Eur Urol **57**(2): 300-309.

Fry, C. H., M. Bayliss, J. S. Young and M. Hussain (2011). "Influence of age and bladder dysfunction on the contractile properties of isolated human detrusor smooth muscle." BJU Int **108**(2 Pt 2): E91-96.

Gagné, A., E. Wang, N. Bastien, M. Orain, P. Desmeules, S. Pagé, S. Trahan, C. Couture, D. Joubert and P. Joubert (2019). "Impact of Specimen Characteristics on PD-L1 Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: Validation of the IASLC PD-L1 Testing Recommendations." J Thorac Oncol **14**(12): 2062-2070.

Galgano, S. J., K. K. Porter, C. Burgan and S. Rais-Bahrami (2020). "The role of imaging in bladder cancer diagnosis and staging." Diagnostics **10**(9): 703.

Giunchi, F., A. Degiovanni, N. Daddi, R. Trisolini, A. Dell'Amore, C. Agostinelli, A. Ardizzoni and M. Fiorentino (2018). "Fading With Time of PD-L1 Immunoreactivity in Non-Small Cells Lung Cancer Tissues: A Methodological Study." Appl Immunohistochem Mol Morphol **26**(7): 489-494.

Gönül, İ. I., A. Poyraz, Ç. Ünsal, C. Acar and T. Alkibay (2007). "Comparison of 1998 WHO/ISUP and 1973 WHO classifications for interobserver variability in grading of papillary urothelial neoplasms of the bladder." Urologia internationalis **78**(4): 338-344.

Halse, H., A. Colebatch, P. Petrone, M. Henderson, J. Mills, H. Snow, J. Westwood, S. Sandhu, J. Raleigh and A. Behren (2018). "Multiplex immunohistochemistry accurately defines the immune context of metastatic melanoma." Scientific reports **8**(1): 1-14.

Hanna, K. S. (2017). "A Review of Immune Checkpoint Inhibitors for the Management of Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma." Pharmacotherapy **37**(11): 1391-1405.

He, X. and C. Xu (2020). "Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy." Cell research **30**(8): 660-669.

Humphrey, P. A., H. Moch, A. L. Cubilla, T. M. Ulbright and V. E. Reuter (2016). "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours." Eur Urol **70**(1): 106-119.

Hu, Y., W. Chen, Z. Yan, J. Ma, F. Zhu and J. Huo (2019). "Prognostic value of PD-L1 expression in patients with pancreatic cancer: a PRISMA-compliant meta-analysis." Medicine **98**(3).

Inamura, K. (2018). "Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology." Cancers (Basel) **10**(4).

Jagodinsky, J. C., P. M. Harari and Z. S. Morris (2020). "The promise of combining radiation therapy with immunotherapy." International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics **108**(1): 6-16.

Kang, H. W., W.-J. Kim and S. J. Yun (2017). "The role of the tumor microenvironment in bladder cancer development and progression." Translational Cancer Research: S744-S758.
Kaseb, H. and N. R. Aeddula (2019). "Bladder Cancer."

Kaufman, D. S., W. U. Shipley and A. S. Feldman (2009). "Bladder cancer." Lancet **374**(9685): 239-249.

Khan, M., J. Lin, G. Liao, Y. Tian, Y. Liang, R. Li, M. Liu and Y. Yuan (2018). "Comparative analysis of immune checkpoint inhibitors and chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials." Medicine **97**(33).

Kawahara, T., Y. Ishiguro, S. Ohtake, I. Kato, Y. Ito, H. Ito, K. Makiyama, K. Kondo, Y. Miyoshi, Y. Yumura, N. Hayashi, H. Hasumi, K. Osaka, K. Muraoka, K. Izumi, J. I. Teranishi, H. Uemura, M. Yao and N. Nakaigawa (2018). "PD-1 and PD-L1 are more highly expressed in high-grade bladder cancer than in low-grade cases: PD-L1 might function as a mediator of stage progression in bladder cancer." BMC Urol **18**(1): 97.

Kozuma, Y., K. Takada, G. Toyokawa, K. Kohashi, M. Shimokawa, F. Hirai, T. Tagawa, T. Okamoto, Y. Oda and Y. Maehara (2018). "Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 and programmed cell death-ligand 1 co-expression correlates with aggressive features in lung adenocarcinoma." European Journal of Cancer **101**: 20-29.

Kim, T. J., K. S. Cho and K. C. Koo (2020). "Current status and future perspectives of immunotherapy for locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: a comprehensive review." Cancers **12**(1): 192.

Kirkali, Z., T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng, L. Kiemeny, M. Kriegmair, R. Montironi, W. M. Murphy, I. A. Sesterhenn, M. Tachibana and J. Weider (2005). "Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis." Urology **66**(6 Suppl 1): 4-34.

Knowles, M. A. and C. D. Hurst (2015). "Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity." Nature reviews cancer **15**(1): 25-41.

Koutros, S., K. L. Decker, D. Baris, L. A. Pardo, A. Johnson, G. M. Hosain, N. Rothman, M. R. Karagas, M. R. Schwenn and D. T. Silverman (2021). "Bladder cancer risk associated with family history of cancer." International Journal of Cancer.

Kurtis, B., J. Zhuge, C. Ojaimi, F. Ye, D. Cai, D. Zhang, J. T. Fallon and M. Zhong (2016). "Recurrent TERT promoter mutations in urothelial carcinoma and potential clinical applications." Annals of diagnostic pathology **21**: 7-11.

La-Beck, N. M., G. W. Jean, C. Huynh, S. K. Alzghari and D. B. Lowe (2015). "Immune checkpoint inhibitors: new insights and current place in cancer therapy." Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy **35**(10): 963-976.

Lawson, N. L., C. I. Dix, P. W. Scorer, C. J. Stubbs, E. Wong, L. Hutchinson, E. J. McCall, M. Schimpl, E. DeVries, J. Walker, G. H. Williams, J. Hunt and C. Barker (2020). "Mapping the binding sites of antibodies utilized in programmed cell death ligand-1 predictive immunohistochemical assays for use with immuno-oncology therapies." Mod Pathol **33**(4): 518-530.

Lehmann, U. and H. Kreipe (2001). "Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies." Methods **25**(4): 409-418.

- Li, H., Q. Zhang, L. Shuman, M. Kaag, J. D. Raman, S. Merrill, D. J. DeGraff, J. I. Warrick and G. Chen (2020). "Evaluation of PD-L1 and other immune markers in bladder urothelial carcinoma stratified by histologic variants and molecular subtypes." Sci Rep **10**(1): 1439.
- Li, J. H., W. J. Ma, G. G. Wang, X. Jiang, X. Chen, L. Wu, Z. S. Liu, X. T. Zeng, F. L. Zhou and Y. F. Yuan (2018). "Clinicopathologic Significance and Prognostic Value of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) in Patients With Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis." Front Immunol **9**: 2077.
- Li, Q., F. Li, J. Che, Y. Zhao and C. Qiao (2018). "Expression of B7 Homolog 1 (B7H1) Is Associated with Clinicopathologic Features in Urothelial Bladder Cancer." Med Sci Monit **24**: 7303-7308.
- Magers, M. J., A. Lopez-Beltran, R. Montironi, S. R. Williamson, H. Z. Kaimakliotis and L. Cheng (2019). "Staging of bladder cancer." Histopathology **74**(1): 112-134.
- Majewski, T., S. Lee, J. Jeong, D. S. Yoon, A. Kram, M. S. Kim, T. Tuziak, J. Bondaruk, S. Lee, W. S. Park, K. S. Tang, W. Chung, L. Shen, S. S. Ahmed, D. A. Johnston, H. B. Grossman, C. P. Dinney, J. H. Zhou, R. A. Harris, C. Snyder, S. Filipek, S. A. Narod, P. Watson, H. T. Lynch, A. Gazdar, M. Bar-Eli, X. F. Wu, D. J. McConkey, K. Baggerly, J. P. Issa, W. F. Benedict, S. E. Scherer and B. Czerniak (2008). "Understanding the development of human bladder cancer by using a whole-organ genomic mapping strategy." Lab Invest **88**(7): 694-721.
- McConkey, D. J. and W. Choi (2018). "Molecular subtypes of bladder cancer." Current oncology reports **20**(10): 1-7.
- Messing, E. M., C. M. Tangen, S. P. Lerner, D. M. Sahasrabudhe, T. M. Koppie, D. P. Wood, Jr., P. C. Mack, R. S. Svatek, C. P. Evans, K. S. Hafez, D. J. Culkin, T. C. Brand, L. I. Karsh, J. M. Holzbeierlein, S. S. Wilson, G. Wu, M. Plets, N. J. Vogelzang and I. M. Thompson, Jr. (2018). "Effect of Intravesical Instillation of Gemcitabine vs Saline Immediately Following Resection of Suspected Low-Grade Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer on Tumor Recurrence: SWOG S0337 Randomized Clinical Trial." Jama **319**(18): 1880-1888.
- Miyazaki, J., M. Onozawa, E. Takaoka and I. Yano (2018). "Bacillus Calmette-Guérin strain differences as the basis for immunotherapies against bladder cancer." Int J Urol **25**(5): 405-413.
- Mo, Z., J. Liu, Q. Zhang, Z. Chen, J. Mei, L. Liu, S. Yang, H. Li, L. Zhou and Z. You (2016). "Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 is associated with differentiation status and histological type of endometrial cancer." Oncology letters **12**(2): 944-950.
- Mok, T. S. K., Y. L. Wu, I. Kudaba, D. M. Kowalski, B. C. Cho, H. Z. Turna, G. Castro, Jr., V. Srimuninnimit, K. K. Laktionov, I. Bondarenko, K. Kubota, G. M. Lubiniecki, J. Zhang, D. Kush and G. Lopes (2019). "Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell

lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial." Lancet **393**(10183): 1819-1830.

Mollica, V., A. Rizzo, R. Montironi, L. Cheng, F. Giunchi, R. Schiavina, M. Santoni, M. Fiorentino, A. Lopez-Beltran, E. Brunocilla, G. Brandi and F. Massari (2020). "Current Strategies and Novel Therapeutic Approaches for Metastatic Urothelial Carcinoma." Cancers (Basel) **12**(6).

Nakano, M., T. Shinagawa, Y. Eitaki, K. Omae, A. Takeuchi, S. Iwasawa, K. Fukai, N. Yoshioka, S. Tanaka and S. Koda (2021). "Risk of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine and other aromatic amines." International Archives of Occupational and Environmental Health: 1-13.

Nesi, G., S. Nobili, T. Cai, S. Caini and R. Santi (2015). "Chronic inflammation in urothelial bladder cancer." Virchows Archiv **467**(6): 623-633.

Netto, G. J. (2011). "Molecular diagnostics in urologic malignancies: a work in progress." Arch Pathol Lab Med **135**(5): 610-621.

Okafor, C. N., A. Rewane and Momodu, II (2021). *Bacillus Calmette Guerin*. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

Olfert, S. M., S. A. Felknor and G. L. Delclos (2006). "An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures." South Med J **99**(11): 1256-1263.

Pal, D. K., A. Agrawal, S. Ghosh and A. Ghosh (2020). "Association of arsenic with recurrence of urinary bladder cancer." Trop Doct **50**(4): 325-330.

Patel, M. R., J. Ellerton, J. R. Infante, M. Agrawal, M. Gordon, R. Aljumaily, C. D. Britten, L. Dirix, K.-W. Lee and M. Taylor (2018). "Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial." The Lancet Oncology **19**(1): 51-64.

Peyton, C. C., J. Chipollini, M. Azizi, A. M. Kamat, S. M. Gilbert and P. E. Spiess (2019). "Updates on the use of intravesical therapies for non-muscle invasive bladder cancer: how, when and what." World J Urol **37**(10): 2017-2029.

Reck, M., D. Rodriguez-Abreu, A. Robinson, R. Hui, T. Csoszi, A. Fulop, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi and S. Cuffe (2019). "Updated analysis of KEYNOTE-024: pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater."

Redondo-Gonzalez, E., L. De Castro, J. Moreno-Sierra, M. Maestro De Las Casas, V. Vera-Gonzalez, D. Ferrari and J. Corchado (2015). "A cluster analysis." BioMed Res. Int.

Riley, J. L. (2009). "PD-1 signaling in primary T cells." Immunol Rev **229**(1): 114-125.

Rittmeyer, A., F. Barlesi, D. Waterkamp, K. Park, F. Ciardiello, J. von Pawel, S. M. Gadgeel, T. Hida, D. M. Kowalski, M. C. Dols, D. L. Cortinovis, J. Leach, J. Polikoff, C. Barrios, F. Kabbinavar, O. A. Frontera, F. De Marinis, H. Turna, J. S. Lee, M. Ballinger, M. Kowanetz, P. He, D. S. Chen, A. Sandler and D. R. Gandara (2017). "Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial." Lancet **389**(10066): 255-265.

Rizzo, A., V. Mollica and F. Massari (2021). "Expression of programmed cell death ligand 1 as a predictive biomarker in metastatic urothelial carcinoma patients treated with first-line immune checkpoint inhibitors versus chemotherapy: a systematic review and meta-analysis." European Urology Focus.

Rosenberg, J. E., J. Hoffman-Censits, T. Powles, M. S. van der Heijden, A. V. Balar, A. Necchi, N. Dawson, P. H. O'Donnell, A. Balmanoukian, Y. Loriot, S. Srinivas, M. M. Retz, P. Grivas, R. W. Joseph, M. D. Galsky, M. T. Fleming, D. P. Petrylak, J. L. Perez-Gracia, H. A. Burris, D. Castellano, C. Canil, J. Bellmunt, D. Bajorin, D. Nickles, R. Bourgon, G. M. Frampton, N. Cui, S. Mariathasan, O. Abidoye, G. D. Fine and R. Dreicer (2016). "Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial." Lancet **387**(10031): 1909-1920.

Saginala, K., A. Barsouk, J. S. Aluru, P. Rawla, S. A. Padala and A. Barsouk (2020). "Epidemiology of Bladder Cancer." Medical Sciences **8**(1): 15.

Saint-Jacques, N., L. Parker, P. Brown and T. J. Dummer (2014). "Arsenic in drinking water and urinary tract cancers: a systematic review of 30 years of epidemiological evidence." Environ Health **13**: 44.

Sam, P., A. Nassereddin and C. A. LaGrange (2020). "Anatomy, abdomen and pelvis, bladder detrusor muscle." StatPearls [Internet].

Sanli, O., J. Dobruch, M. A. Knowles, M. Burger, M. Alemozaffar, M. E. Nielsen and Y. Lotan (2017). "Bladder cancer." Nat Rev Dis Primers **3**: 17022.

Scélo, G. and P. Brennan (2007). "The epidemiology of bladder and kidney cancer." Nature clinical practice urology **4**(4): 205-217.

Schneider, A. K., M. F. Chevalier and L. Derré (2019). "The multifaceted immune regulation of bladder cancer." Nature Reviews Urology **16**(10): 613-630.

Sharma, P., M. K. Callahan, P. Bono, J. Kim, P. Spiliopoulou, E. Calvo, R. N. Pillai, P. A. Ott, F. de Braud and M. Morse (2016). "Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial." The Lancet Oncology **17**(11): 1590-1598.

Sharma, P., M. Retz, A. Siefker-Radtke, A. Baron, A. Necchi, J. Bedke, E. R. Plimack, D. Vaena, M.-O. Grimm and S. Bracarda (2017). "Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial." The lancet oncology **18**(3): 312-322.

Shin, K., A. Lim, J. I. Odegaard, J. D. Honeycutt, S. Kawano, M. H. Hsieh and P. A. Beachy (2014). "Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma." Nat Cell Biol **16**(5): 469-478.

Shin, K., A. Lim, C. Zhao, D. Sahoo, Y. Pan, E. Spiekerkoetter, J. C. Liao and P. A. Beachy (2014). "Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors." Cancer Cell **26**(4): 521-533.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2019). "Cancer statistics, 2019." CA Cancer J Clin **69**(1): 7-34.

Siemiatycki, J., L. Richardson, K. Straif, B. Latreille, R. Lakhani, S. Campbell, M.-C. Rousseau and P. Boffetta (2004). "Listing occupational carcinogens." Environmental health perspectives **112**(15): 1447-1459.

Soukup, V., O. Čapoun, D. Cohen, V. Hernandez, M. Babjuk, M. Burger, E. Compérat, P. Gontero, T. Lam and S. MacLennan (2017). "Prognostic performance and reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading classification systems in non-muscle-invasive bladder cancer: a European Association of Urology non-muscle invasive bladder cancer guidelines panel systematic review." European urology **72**(5): 801-813.

Sui, X., L. Lei, L. Chen, T. Xie and X. Li (2017). "Inflammatory microenvironment in the initiation and progression of bladder cancer." Oncotarget **8**(54): 93279.

Sun, C., R. Mezzadra and T. N. Schumacher (2018). "Regulation and function of the PD-L1 checkpoint." Immunity **48**(3): 434-452.

Sun, X., K. A. Hoadley, W. Y. Kim, H. Furberg, A. F. Olshan and M. A. Troester (2017). "Age at diagnosis, obesity, smoking, and molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer." Cancer Causes Control **28**(6): 539-544.

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin.

Sylvester, R. J., M. A. van der and D. L. Lamm (2002). "Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials." J Urol **168**(5): 1964-1970.

Tran, L., J.-F. Xiao, N. Agarwal, J. E. Duex and D. Theodorescu (2020). "Advances in bladder cancer biology and therapy." Nature Reviews Cancer: 1-18.

Tran, L., J. F. Xiao, N. Agarwal, J. E. Duex and D. Theodorescu (2021). "Advances in bladder cancer biology and therapy." Nat Rev Cancer **21**(2): 104-121.

- Turati, F., C. Bosetti, J. Polesel, D. Serraino, M. Montella, M. Libra, G. Facchini, M. Ferraroni, A. Tavani, C. La Vecchia and E. Negri (2017). "Family history of cancer and the risk of bladder cancer: A case-control study from Italy." Cancer Epidemiol **48**: 29-35.
- Van Batavia, J., T. Yamany, A. Molotkov, H. Dan, M. Mansukhani, E. Batourina, K. Schneider, D. Oyon, M. Dunlop, X. R. Wu, C. Cordon-Cardo and C. Mendelsohn (2014). "Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations." Nat Cell Biol **16**(10): 982-991, 981-985.
- Witjes, J. A., H. M. Bruins, R. Cathomas, E. M. Compérat, N. C. Cowan, G. Gakis, V. Hernández, E. L. Espin  s, A. Lorch and Y. Neuzillet (2021). "European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines." European urology **79**(1): 82-104.
- Wo  ciewicz, M., R. Hryniewicz, E. Grywalska, T. Suchojad, T. Leksowski, J. Roli  ski and P. Nied  zwiedzka-Rystwej (2020). "Immunotherapy in Bladder Cancer: Current Methods and Future Perspectives." Cancers **12**(5): 1181.
- Yazbek-Hanna, M., P. Whelan and S. Jain (2016). "Bladder cancer." Medicine **44**(1): 52-55.
- Yee, D. S., N. M. Ishill, W. T. Lowrance, H. W. Herr and E. B. Elkin (2011). "Ethnic differences in bladder cancer survival." Urology **78**(3): 544-549.
- Yeung, C., T. Dinh and J. Lee (2014). "The health economics of bladder cancer: an updated review of the published literature." Pharmacoeconomics **32**(11): 1093-1104.
- Zajac, M., A. M. Boothman, Y. Ben, A. Gupta, X. Jin, A. Mistry, C. Sabalos, A. Nielsen, G. Manriquez, C. Barker, J. Antal, P. Wang, P. Patil, N. Schechter, M. C. Rebelatto and J. Walker (2019). "Analytical Validation and Clinical Utility of an Immunohistochemical Programmed Death Ligand-1 Diagnostic Assay and Combined Tumor and Immune Cell Scoring Algorithm for Durvalumab in Urothelial Carcinoma." Arch Pathol Lab Med **143**(6): 722-731.
- Zhao, S., M. Zhang, Y. Zhang, H. Meng, Y. Wang, Y. Liu, J. Jing, L. Huang, M. Sun, Y. Zhang and Q. Zhang (2018). "The prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis." Cancer Biol Med **15**(3): 290-298.
- Zhu, L., J. Sun, L. Wang, Z. Li, L. Wang and Z. Li (2019). "Prognostic and Clinicopathological Significance of PD-L1 in Patients With Bladder Cancer: A Meta-Analysis." Front Pharmacol **10**: 962.
- Zeegers, M. P., F. E. Tan, E. Dorant and P. A. van Den Brandt (2000). "The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies." Cancer **89**(3): 630-639.
- Zou, W. and L. Chen (2008). "Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment." Nature Reviews Immunology **8**(6): 467-477.



EKLER

EK 1. Bilimsel Araştırma İzni



T.C.
RİZE VALİLİĞİ
İl Sağlık Müdürlüğü

RİZE İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ - RİZE İL EĞİTİM BİRLİĞİ
20/09/2019 10:03 - 64247179 - 799 - E.365



Sayı : 64247179-799
Konu : Bilimsel Araştırma İzni/
Dr.Öğr.Üys.Hatice SEVİM
NALKIRAN

MÜDÜRLÜK MAKAMINA

Dr.Öğr.Üys.Hatice SEVİM NALKIRAN, kurumumuza bağlı R.T.E.Ü. Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde "Mesane Kanseri Hastalarında PD-1 ve PD-L1 Ekspresyonlarının Prognostik Öneminin İncelenmesi" konulu çalışmasını yapmak üzere tarafına izin verilmesini talep etmektedir.

Çalışma planı incelenmiş olup, çalışma süresince değişikliğe gidilmeden; sunulan hizmeti aksatmayacak şekilde, hasta mahremiyeti ve bilgi güvenliği hususlarında güvenlik tedbirleri alınarak çalışmanın yürütülmesi, yapılacak çalışma sonucunun Bakanlığımız bilgisi dışında ilan edilmemesi ve çalışma sonucu ile ilgili tarafımıza bilgi verilmesi kaydıyla söz konusu çalışmanın kurumumuza bağlı ilgili sağlık tesisinde 30/09/2019-30/09/2020 tarihleri arasında yapılması uygun görülmüştür.

Olurlarınıza arz ederim.

e-imzalıdır.

Ahmet İNCE

Pers. ve Dest.Hiz.Bşk.Yrd.

Uygun görüşle arz ederim.

.../.../2019

e-imzalıdır.

Dr.Hakan GÖRGÜLÜ

Pers. ve Dest. Hizm. Başkanı

OLUR

.../.../2019

e-imzalıdır.

Dr.Mustafa TEPE

İl Sağlık Müdürü

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ BAŞTABIPLIĞINA

Bilgilerinizi ve yazımız ile ekte gönderilen protokol metninin ilgili kişiye tebliği hususunda gereğini rica ederim.

EKLER:

Protokol (2 Sayfa)

e-imzalıdır.

Dr.Mustafa TEPE

İl Sağlık Müdürü

Paşakuyu Mahallesi Zübeyde Hanım Cad. Sağlık Kompleksi Kat:4 Rize/Merkez

Telefon: Faks No: 04642130364

e-Posta: esranur.senturk@saglik.gov.tr İnternet Adresi:

http://www.rize.epiim@saglik.gov.tr

Evrakin elektronik imzalı suretine http://e-belge.saglik.gov.tr adresinden db16133d-2105-434e-ac64-b3cd8b5c68d7 kodu ile erişebilirsiniz.

Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Bilgi için: Esra Nur ŞENTÜRK

EBE

Telefon No: (0 464) 213 03 57



Canlı imza

EK 2. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı



T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : 40465587-050.01.04-256
Konu : Etik Kurul

05.11.2019

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “**Mesane Kanseri Hastalarında PD-1 Ve PD-L1 Ekspresyonlarının Prognostik Öneminin İncelenmesi**” isimli başvurunuz etik kurulumuz yönergesine göre **31.10.2019** tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş olup, **2019/167** karar numarası ile bilimsel ve etik yönden **uygun** bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

 **e-imzalıdır**
Dr. Öğr. Üyesi Atilla TOPÇU
Başkan

Tel : Fax :

Bilgi : BURAK HANKAYA

Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanununa göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Kodu : 5330A476-407A-4EEE-B126-BE164EE014AB - <http://ebys.erdogan.edu.tr/EBYS/eimzadogrulam>

