

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KAS İNVAZİV OLMAYAN BCG REFRAKTER MESANE
KARSİNOMLARINDA MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ VE
PD-L1 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Fadime Gül SALMAN

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Duygu KANKAYA**

Bu tez TÜBİTAK tarafından 119S342 proje numarası ve Ankara Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından
19H0230001 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
2020**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr.Fadime Gül SALMAN	Sınav tarihi: 24 / 01/ 2020
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Doç.Dr.Duygu KANKAYA	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Kas İnvaziv Olmayan, BCG Tedavisine Refrakter Mesane Kansерlerinde Mikrosatellit İnstabilitesi Ve PD-L1 Ekspresyonunun Araştırılması	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu	ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR	


Prof.Dr.Aylin OKÇU HEPER
Başkan
 Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr.Serpil DİZBAY SAK
Yedek Jüri Üyesi
 Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı



Doç.Dr.Duygu KANKAYA
Tez Danışmanı
 Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı



ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Duygu KANKAYA'ya, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde katkısı olan, beni patoloji ailesine kabul eden ve her zaman destek veren A.Ü.T.F Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında görevli tüm değerli hocalarıma ve uzmanlarıma teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca çalıştığım ve asistanlığım boyunca hep yanımda olan uzman ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Beni hiç yalnız bırakmayan, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Seher Yüksel, Hilal Özakıncı, Hale Kıvrak, Fatma Altuntaş Güzel, Sonay Kuş Öztürk, Seda Aktürk, A. Faruk Arman, Aslıhan Yavaş, Elif Öcal, Dilek Koyuncu Yamak, Dilara Akbulut, Merve Tural, Elif Özgür, Selim Sevim, Zarifakhanım Gahramanlı, Eda Nur Kozan, Ezgi Dicle Kuz ve İnga Adanır'a teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin hazırlanması boyunca bana yardımcı olan A.Ü.T.F Patoloji ve İmmünopatoloji laboratuvarı çalışanlarına; moleküler patoloji laboratuvarından Dr. Yasemin Şahin'e, arşiv materyallerinin elime ulaşmasında ve çalışma ortamımın sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Yusuf Aslan ve Alahattin Alptekin'e, kesitleri tarayarak dijital ortama aktarılmasını sağlayan Gökhan Özdoğan ve Sarp Yılmaz'a teşekkür ederim.

Tüm asistanlığım boyunca hep yanımda olan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı sekreteri Özlem Soyalp ve Sorumlu hemşiremiz Tevhide Çoban'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında, asistanlığım ve tez hazırlama dönemimde hep yanımda olan, sonsuz sabır ve ilgi gösteren, beni bugünlere getiren aileme teşekkür ederim.

Fadime Gül Salman

2020

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Genel Bilgiler	4
2.1.1. Anatomi	4
2.1.2. Mesanenin Damarları ve Sinirleri.....	6
2.1.3. Embriyoloji	7
2.1.4. Fizyoloji.....	7
2.1.5. Histoloji	7
2.2. Ürotelyal Mesane Karsinomu.....	9
2.2.1. Epidemiyoloji.....	9
2.2.2. Etyopatogenez.....	11
2.2.3. Lokalizasyon.....	13
2.2.4. Makroskopik Görünüm.....	14
2.2.5. Histopatoloji.....	14
2.2.6. İmmünohistokimyasal Özellikler.....	24
2.2.7. Moleküler Özellikler	24
2.2.8. Histolojik Derecelendirme	26
2.2.9. Evreleme	27
2.2.10. Prognoz ile İlişkili Morfolojik Faktörler	31
2.3. İntravezikal Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tedavisi	32
2.3.1. İntravezikal Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tedavisi ve BCG Tedavisine Yanıtsızlık	32
2.3.2. İntravezikal BCG Tedavisinin Etki Mekanizması	33
2.4. Mesanede İnflamatuvar Mikroçevre.....	34

2.5. İmmün Kontrol Noktaları	37
2.6. Mikrosatellit İnstabilitesi	42
2.6.1. “Mismatch” Tamir sistemi	42
2.6.2. Mikrosatellit bölgeleri ve İnstabilitesi	44
3. MATERYAL VE METOD	48
3.1. Olgu Seçimi	48
3.2. İmmünohistokimyasal Boyama	48
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	49
3.3.1. PD-L1:	49
3.3.2. DNA MMR gen ekspresyonu:	52
3.4. Mikrosatellit Analizi (MSA)	53
3.5. Mikrosatellit analizi değerlendirme	56
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	57
4. BULGULAR	58
4.1. Olgulara Ait Genel Bulgular	58
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	61
4.2.1. PD-L1	61
4.2.2. DNA MMR gen ekspresyonu:	64
4.3. Mikrosatellit Analiz Bulguları	66
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇLAR	78
ÖZET	83
SUMMARY	85
KAYNAKLAR	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin-difosfat
ATP	: Adenozin-trifosfat
BCG	: Bacillus Calmette-Guérin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FDA	: Food and Drug Administration
GSTM1	: Glutatyon S-transferaz mu1
IFNγ	: İnterferon γ
KİS	: Karsinoma İn Situ
LAG3	: Lenfosit aktive edici 3
LOH	: Loss of heterozygosity
LPS	: Lipopolisakkarit
MDSC	: “Myeloid-derived suppressor cells”
MLH1	: MutL homolog 1
MMR	: “Mismatch” onarım genleri
MSH2	: MutS homolog 2
MSH6	: MutS homolog 6
MSA	: Mikrosatellit Analizi
MSI	: Mikrosatellit İnstabilitesi
MSI-H	: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi
MSI-L	: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi
MSS	: Mikrosatellit Stabil
NAT2	: N-asetiltransferaz 2
NCI	: American “National Cancer Institute”
NK	: “Natural killer”

PCNA	: “Proliferating cell nuclear antigen”
PCR	: “Polymerase Chain Reaction”
PD-1	: “Programmed death - 1”
PD-L1	: “Programmed death ligand - 1”
PMS2	: “Postmeiotic segregation 2”
TAM	: “Tumor associated macrophage”
TH	: Tümör hücresi
TİİH	: Tümör ilişkili inflamatuvar hücre
TİL	: Tümör infiltre eden lenfosit
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü- α
TÖ	: Tedavi Öncesi
TS	: Tedavi Sonrası
TUR	: Transüretral rezeksiyon

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Erkeklerde mesaneye ait frontal kesit.	4
Resim 2: Erkek ve kadındaki mesane arka duvar ilişkileri	6
Resim 3: Tam kat mesane duvarı	9
Resim 4: Normal ürotelyum.....	9
Resim 5: Mesane Tümörü Makroskopisi	14
Resim 6: Ürotelyal Karsinoma İn Situ	15
Resim 7: İnfiltratif Ürotelyal Karsinom.....	16
Resim 8: A-Düşük Dereceli Ürotelyal Karsinom, B-Yüksek Dereceli Ürotelyal Karsinom.....	27
Resim 9: Mesane kanseri T evrelemesi.....	28
Resim 10: TİİH Oranının Belirlenmesi.....	50
Resim 11: TİİH’de Yüksek PD-L1 ifadesi ($\geq\%25$)	51
Resim 12: TİİH’de Düşük PD-L1 İfadesi ($<\%25$).....	51
Resim 13:Tümör hücrelerinde PD-L1 ile membranöz boyanma ve düşük PD-L1 ifadesi ($<\%25$)	51
Resim 14: DNA MMR Proteinlerinin (MSH2, MLH1, MSH6 ve PMS2) Ekspresyonun Değerlendirilmesi.....	52
Resim 15: MSA ile 5 poli-A mononükleotid mikrosatellit bölgesinin değerlendirilmesi.....	56

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: AJCC-8'e göre Mesane Karsinomu İçin Primer Tümör Sınıflaması (T)	29
Tablo 2: AJCC-8'e göre Mesane Karsinomu İçin Bölgesel Lenf Nodülü Sınıflaması (N).....	30
Tablo 3: AJCC-8'e göre Mesane Karsinomu İçin Uzak Metastaz Sınıflaması (M)	30
Tablo 4: AJCC-8 Prognostik Evre Grupları.....	31
Tablo 5: Çalışmamızda kullanılan immünohistokimyasal antikorlar	49
Tablo 6: PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları	55
Tablo 7: Olguların Klinikopatolojik Özellikleri	58
Tablo 8: Gruplara göre TİİH'de PD-L1 boyanma yüzdeleri ve TİİH oranından bağımsız değerlendirmede PD-L1 boyanma yüzdelerinin en düşük, median ve en yüksek değerleri.....	61
Tablo 9: TİİH Gruplarının ve TİİH PD-L1 Boyanma Oranlarına Göre Dağılımlar	62
Tablo 10: BCG Refrakter Grupta BCG Tedavisi Öncesi ve Sonrası Biyopsilerde TİİH'de Yüksek/Düşük PD-L1 İfadesi Dağılımı.....	63
Tablo 11: Gruplara göre en düşük, median ve en yüksek PMS2, MLH1, MSH2, MSH6 boyanma oranları.....	64
Tablo 12: Ürotelyal Karsinomada PD-L1 İfadesini Araştıran Önceki Çalışmaların Özeti.....	71
Tablo 13: Mesane Ürotelyal Karsinomu ve Mikrosatellit Analizi (MSA) Çalışmalarının Özeti	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Türkiye’de En Sık Görülen İlk 10 Kanser Türünün Cinsiyete Göre İnsidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu), 2018.....	10
Şekil 2: Türkiye’de En Sık Görülen İlk 10 Kanser Türü İnsidansının Uluslararası Karşılaştırması (100.000 Dünya Standart Nüfusu) 2018.....	10
Şekil 3: PD-L1 ve Hücre İçi Sinyal Yolakları	40
Şekil 4: E. Coli’deki DNA MMR sistem	43
Şekil 5: BCG Refrakter Grup TÖ (Tedavi Öncesi), TS (Tedavi Sonrası) Biyopsilerinde ve BCG Tedavisine Yanıt Veren Grupta T Evre Dağılımı	60
Şekil 6: Tedavi öncesi biyopsilerde yüzeysel ve derin l. propria invazyonu gösteren vakalarda BCG tedavi yanıtının karşılaştırılması	60
Şekil 7: Tümöre eşlik eden karsinoma in situ (KİS) durumu ile TİİH oranı arasındaki ilişki	61
Şekil 8: Noninvaziv (Ta) ve invaziv (T1) grupta TİİH’de PD-L1 ifadesi ilişkisi.....	63
Şekil 9:DNA MMR Protein Ekspresyonunda Parsiyel Kayıp Bulunduran Olguların (n:24) Dağılımı	64
Şekil 10: DNA MMR proteinlerinde parsiyel kayıp bulunan ve bulunmayan gruplarda BCG tedavi yanıtının dağılımı.....	65
Şekil 11: BCG Refrakter Grup ve BCG İyi Yanıt Veren Grup Arasında PMS2 (%) ve skor dağılımı	66

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanserleri dünya genelinde kanser sıralamasında 7. sırada gelmektedir (1). Büyük kısmını (%70-80) kas invaziv olmayan (Evre Ta, Tis, T1) yüzeysel ürotelyal karsinomalar oluşturur ve tedavilerinde tümör rekürrensi veya daha ileri evre tümöre progresyonu engelleyecek konservatif yaklaşımlar uygulanır (2, 3).

Yüksek dereceli kas invaziv olmayan tümörlerde transüretral rezeksiyon (TUR) sonrası intravezikal Bacillus Calmette-Guérin (BCG) uygulaması altın standart tedavi yaklaşımıdır. Ancak hastaların %30-45'inde BCG tedavisi başarısız olmakta, rekürrens veya progresyon gelişmektedir. BCG tedavisinin başarısız olduğu bu hastaların tedavisi önemli bir problem olarak ortaya çıkmakta, konservatif yeni tedavi arayışlarına ihtiyaç duyulmaktadır (2). Yeni kanser immünoterapisi, kimerik antijen reseptörü T hücresi, bispesifik antikorlar ve immün kontrol noktası inhibitörleri dahil olmak üzere, en umut verici kanser tedavi stratejisi olarak gündemde yer almaktadır.

PD-1 (Programmed death), aktif T hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen bir transmembran proteinidir. PD1'in PD-L1 (B7-H1 veya CD274) ve PD-L2 olmak üzere iki temel ligandı mevcuttur. Antijen sunan hücreler ve tümör hücrelerinde ifade edilen PD-L1'in PD-1'e bağlanması sonucunda, T hücre reseptör aracılıklı immün sistem ve CD8 pozitif T lenfositlerin proliferasyonu baskılanır. Bu mekanizma fizyolojik şartlar altında doku hasarına yol açacak aşırı immün reaksiyondan ve otoimmüniteden korunmayı sağlamaktadır. Malignite durumunda ise tümör hücreleri immün sistemden kaçabilmek için PD-L1 ifade ederler (4). Bu bilgiden yola çıkılarak geliştirilen immün kontrol noktası inhibitörleri, PD-1 ve PD-L1 etkileşimini inhibe ederek tümöre karşı gelişen T hücre yanıtının yeniden aktifleşmesini sağlar (5).

Mesane kanserlerinde standart olarak BCG tedavisinin kullanılması, bu kanser tipinde immünoterapinin önemini altını çizmektedir. İntravezikal BCG uygulanması sonucunda, çeşitli sitokinlerin salınması sonucunda inflamasyon meydana gelir. Bu nonspesifik inflamasyona ek olarak spesifik immün cevap da antitümör etkisinde rol oynar ve BCG tedavisinin antitümör etkisi, CD4 ve CD8

pozitif T hücre aktivasyonuna bağlıdır. Bu nedenle immün kontrol noktası regülasyonuna bağlı olarak gerçekleşen T hücre baskılanmasının, BCG tedavisinin etkisini azaltan faktörlerden biri olabileceği hipotezi akla gelmektedir (6, 7).

Mikrosatellitler, insan genomu boyunca kodlanan ve kodlanmayan gen bölgeleri arasında serpiştirilmiş şekilde dağılım gösteren, 1-6 baz arasında, 60-100 kez tekrar eden, çift olarak aynı uzunlukta olan DNA dizileridir. DNA replikasyonu sırasında mikrosatellit allellerinin insersiyon veya delesyon ile uzunluğu değişebilmekte, ortaya çıkan hatalar normal koşullarda DNA “mismatch” onarım genleri (MMR) tarafından düzeltilmektedir. DNA “mismatch” onarım sisteminde defekt olması sonucunda kodlanan genin ekzonunda oluşan tekrarlayan nükleotid dizileri tamir edilememekte ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) gelişmektedir. DNA “mismatch” onarım sisteminin MSH2/MSH6 ve PMS2/MLH1 olmak üzere 2 temel heterodimeri bulunmaktadır. Lynch sendromlu hastalarda MMR genlerinden birinde germline mutasyonu bulunmaktadır. Sporadik olan olgularda ise en sık olarak MLH1 promoter bölgesinde biallelik metilasyon; her iki allelin susturulmasına ve MSI gelişimine neden olur. MSI kanserler mikrosatellit stabil kanserlere göre 100-1000 kat daha fazla artmış “missense” mutasyonlar ile ilişkilidir (8).

Birçok kanser tipinde, DNA mismatch onarım sistemindeki defekt sonucuna ortaya çıkan mikrosatellit instabilitesi durumunda immün kontrol noktasını hedef alan tedavinin daha etkili olduğu anlaşılmıştır ve bu ilişki mikrosatellit instabilitesinin tümörü infiltre eden lenfositlerde artışa yol açmasıyla açıklanmaktadır (8). Mikrosatellit instabilitesi saptanan tümörlerde immün kontrol nokta inhibitör tedavisi uygulanması “*Food and Drug Administration (FDA)*” tarafından da onaylanmış bir tedavi yaklaşımıdır (9). Bu tedavi yöntemi ilerlemiş ürotelyal karsinoma için yakın dönemde tedavi seçeneği haline gelmiştir. Ancak kas invaziv olmayan mesane kanserlerinde, özellikle de BCG refrakter olgular özelinde, immün kontrol nokta inhibitör tedavisi ve mikrosatellit instabilite durumunu araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. İntravezikal BCG tedavisinin yüzeysel mesane kanserlerindeki başarısı ve mesane kanserlerinde immüdisfonksiyon tanımlanmış olması, diğer immunoterapi yaklaşımlarının da tedavide başarı sağlama olasılığını akla getirmektedir (10).

Çalışmamız, kas invaziv olmayan mesane kanserlerinin BCG tedavisine yanıtınlığında, MSI/MMR defekti ve PD-L1 aracılı immün kaçış mekanizmalarının rolünü birlikte araştıran, bunların birbiri ile ilişkisini inceleyen ilk çalışma özelliğindedir. “MSI / DNA MMR defekti”ni araştırırken, literatürde önerildiğı şekilde immünohistokimya ve mikrosatellit analiz yöntemlerinin birlikte kullanılmış olması, mesane kanserleri üzerinde yapılmış diğerk çalışmalardan farklı olarak MLH-1, MSH-2, PMS2 ve MSH6 proteinlerinin hepsini içeren bir panel ile immünohistokimyanın planlanması çalışmamızı öne çıkartan özelliklerdir.

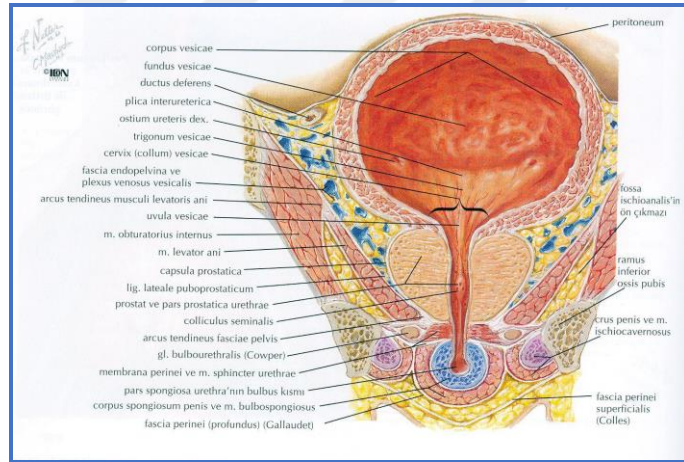
BCG tedavisi yanıtınlığında PD-1/PD-L1 aracılı immün sistemden kaçış mekanizması rolünün araştırılması ve MSI durumu ile BCG yanıtı ilişkisi incelenerek, immün kontrol nokta inhibitörlerinin BCG dirençli olgularda tedavi seçeneğı olarak gündeme gelme olasılığının değerkendirilmesi ile MSI araştırılmasında immünohistokimya ve mikrosatellit analiz yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması ve daha kolay ve ucuz bir yöntem olan immünohistokimyanın MSI-H vakaların saptanmasında belirleyiciliğinin değerkendirilmesi çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. Anatomi

Mesane (vesicae urinaria), alt üriner sistemde yer alan, başlıca görevi idrarı biriktirmek ve boşaltmak olan, içi boşluklu muskuler bir organdır. Mesanenin şekli ve pozisyonu içindeki idrar miktarına göre değişiklik gösterir. Boşken, symphysis pubis'in arkasında, pelvis boşluğunun tabanında, retroperitoneal konumda yer alırken; dolu olduğunda üst bölümü karın boşluğuna girer ve palpe edilebilir konuma gelir. Erkeklerde rektumun önünde, prostatın üzerinde, kadınlarda ise uterus ve vaginanın önünde yerleşimlidir (resim 1) (11).



Resim 1: Erkeklerde mesaneye ait frontal kesit. Netter İnsan Anatomi Atlası 5.

Baskı

Boş olan mesane tesbit edilerek incelendiğinde, tepesi önde ve biraz yukarıda, tabanı arkada ve aşağıda olan bir piramit şeklinde olduğu görülür. Bu durumdaki mesanenin tepesi (apex vesicae), taban (fundus vesicae), üst ve yan-alt yüzleri bulunur (11).

Apex vesicae, symphysis pubicanın hemen yukarısında karın ön duvarına doğru uzanır. Apex'ten umbilikusa kadar uzanan bağa lig.umbilicale medianum denir (12).

Fundus vesicae, piramide benzetilen mesanenin taban kısmı olup, arka ve aşağıya doğru bakar. Erkeklerde rektum ile komşudur ve aralarında fascia rectovesicalis, vesicula seminalis ve duktus deferensin son bölümü olan ampulla duktus deferentis bulunur. Kadınlarda ise vaginanın üst, uterusun da alt bölümleriyle komşudur (resim 2). Erkeklerde, fundus vesicae ile rektum arasında excavatio rectovesicalis denilen, kadınlarda ise fundus vesicae ile vagina arasında excavatio vesicouterina denilen periton çıkmazı vardır. Mesane kanserlerinin büyük kısmı posterior duvardan geliştiği ve komşu organlara invaze olabildiği için bu posterior anatomik ilişki klinik açıdan oldukça önemlidir (12).

Apex ve fundus arasında kalan, mesanenin en büyük bölümüne corpus vesicae olarak isimlendirilir (11).

Yan kenarlar arkada üreterlerden başlar ve önde mesanenin tepesine kadar uzanır. Üst yüzü örten periton bu kenardan pelvisin yan duvarına geçer. Böylece mesanenin yan kenarı ile pelvis yan duvarı arasında fossa paravesicalis denilen çukurluk oluşur. (11).

Erkeklerde mesanenin üst yüzü tamamiyle peritonla kaplıyken, kadınlarda arka tarafta kalan küçük bir bölüm peritonsuzdur. Peritonla kaplı olan kısmın büyük bölümü uterus, ön tarafta kalan küçük bölümü ise ince barsaklarla komşudur (11).

Yan-alt yüz, peritonla kaplı değildir, ön ve arka olmak üzere iki bölüme ayrılır. Ön kısım, symphysis pubica ile komşudur. Symphysis pubica ve mesane arasında gevşek yağ-bağ dokusu ve venöz pleksus bulunduran spatium prevesicale (Retzius aralığı) denilen bir aralık vardır. Arka bölüm prostatın taban kısmı üzerine oturur (11).

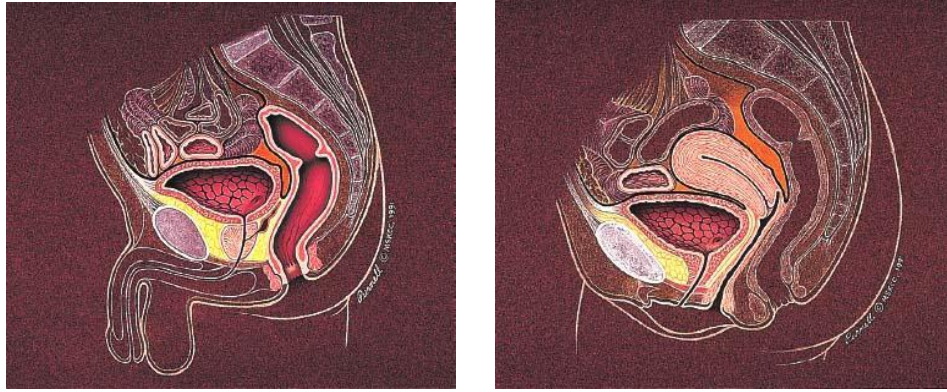
Mesane, yaklaşık 350-500 cm³ sıvı ile normal doluluk durumuna gelerek oval bir şekil alır. Dolu mesanede, arka-üst, ön-alt, yan yüzler, taban ve tepe kısımları görülür. Arka-üst yüzü peritonla örtülüdür. Ön-alt yüzü peritonsuzdur ve pubisin arka yüzü ile komşudur. Pubisin yukarısında kalan kısmı da doğrudan karın ön duvarının arka yüzü ile komşuluk yapar (11).

Trigonum vesicae (Lieutaud üçgeni), mesanenin tabanında yer alan ve arka mesane boynuna uzanan kompleks bir anatomik yapıdır. Üreterler, mesanenin içine

trigonun proksimal ve lateral yüzünden oblik şekilde girerler. Bu bölgedeki mukozanın altında yatan kas, intramural üreter ve detrusor kasının longitudinal tabakasının düz kasının bir kombinasyonundan oluşur. İntramural üreter, fibromüsküler bir kılıfla (Waldeyer'in kılıfı) çevrilidir (13). Trigonumda submukoza yoktur, bu nedenle mukozada plika bulunmaz ve her zaman düz olarak görülür (11).

Mesane boynu, posterior ve infero-lateral duvarların birleşerek üretraya açıldığı mesanenin en distal kısmıdır. Mesane boynu, trigonal kas sistemi, detrusor kas sistemi ve üretral kas sisteminin birleşiminden meydana gelir. İnternal sfinkter, büyük oranda detrusor kasın orta sirküler katmanından oluşur ve genellikle mesane boynunda yerleşir (13).

M. detrusor vesicae; mesanenin yapısındaki düz kasın adıdır. Kasın bazı lifleri, erkeklerde prostatın kapsülüne, kadınlarda ise vaginanın ön duvarına tutunur. Diğer lifleri de rektum ön duvarına yapışır.



Resim 2: Erkek ve kadındaki mesane arka duvar ilişkileri (12).

2.1.2. Mesanenin Damarları ve Sinirleri

Mesane, a. iliaca internadan gelen vezikal arterler tarafından beslenir. Mesane venlerinin oluşturduğu plexus venosus vesicalis, v. iliaca internaya açılır. Mesanenin lenf damarları, nodi iliaci externi ve interniye gider (14).

Plexus hypogastricus inferiordan gelen dallar, plexus vesicalis denilen bir sinir pleksusu oluşturur. Pleksusa, parasempatikler S2-4'ten, sempatikler ise T11-L2 segmentlerinden gelir (15).

2.1.3. Embriyoloji

Mesane, 4-7. gestasyonel haftalar arasında, allantoisin devamlılığındaki ürogenital sinüsün üst bölümünden gelişir. Ancak mesane iç yüzünde görülen trigonum vesicae, mezonefrik kanalların kaudal uçlarından oluşur. Mesane epiteli, ürogenital sinüsün endoderminden, kas ve bağ dokusu ise mezoderminden gelişir (12).

Embriyolojik gelişim sırasında, allantois, göbek ucundan mesanenin apeksine (kubbe) uzanan urakus şeklinde, kalın, epitelle kaplı bir tüp oluşturarak geriler. Doğumdan kısa bir süre önce ya da sonrasında urakus, basit fibröz kord halini alır ve bu fibröz kord median umbilikal ligaman olarak isimlendirilir (12).

2.1.4. Fizyoloji

Mesanenin temel görevi idrarın biriktirilmesi ve boşaltılmasıdır. Bu süreç otonom sinir sistemin innervasyonu ile düzenlenir. Parasempatikler, detrusor kasa kontraksiyon yaptırır, internal sfinkteri inhibe eder, böylece miksiyon gerçekleşir. Sempatik uyarı, detrusor kası inhibe edip, internal sfinkteri uyarak idrarın üretraya geçmesini önler (16).

Trigonum vesicae'nin olduğu, mesane tabanı bölümündeki kas tabakasının innervasyonu da sempatiktir ve bu tabakanın kontraksiyonu üreter orifislerini kapatarak kontinensi sağlar (12).

Mesanenin yetişkinlerdeki kapasitesi 500-600 ml'ye ulaşabilmektedir. Genellikle idrar birikimi 150 ml olduğunda miksiyon hissi başlar ve mesane duvarındaki gerilme ağrıya neden olur (17). Miksiyonun medulla spinalis merkezi S2-4'tür. Miksiyon, ponsun üst bölümünde yer alan ve Barrington merkezi olarak da isimlendirilen otonom merkez tarafından düzenlenir. Bu bölgenin uyarılması sonucu mesane kontraksiyonu ve miksiyon gerçekleşir (14).

2.1.5. Histoloji

Kaliksler, renal pelvis, üreter ve mesanenin histolojik yapısı aynıdır. Üreterlerin duvarı mesaneye doğru yaklaştıkça kalınlaşır. Mesane duvarının en iç tabakasını “ürotelyum” olarak isimlendirilen epitelyal yüzey oluşturur.

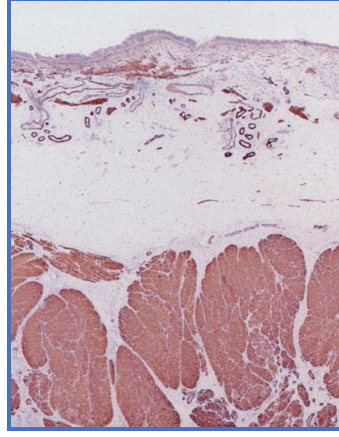
Ürotelyumdan sonra içten dışa doğru lamina propria, muskularis propria ve adventisya (seroza) tabakaları yer alır (resim 3) (13).

Ürotelyum, mesanenin distansiyon derecesine göre kalınlığı 3-7 hücre sırası arasında değişen çok katlı bir epitel tipidir. Ürotelyumun en yüzeysel kısmında, tek sıra şeklinde, büyük ve eliptik şekilli, geniş eozinofilik sitoplazmalı, sıklıkla binükleasyon gösterebilen veya belirgin nükleole sahip “şemsiye” hücreleri bulunur. Şemsiye hücreleri immünohistokimyasal olarak CK20 ve üroplakin ifade ederler (resim 4). İntermediate ürotelyal hücreler, glikojenden zengin amfofilik sitoplazmalı, ince granüler kromatine sahip oval nükleuslu, alçak kolumnar-kübik hücre özelliğindedir. Bazal ürotelyal hücreler ise daha silindirik görünüme sahip, mesane gerildikçe düzleşebilen, bir kısmı nükleer çentik içeren hücreler özelliğindedir ve bazal lamina üzerinde yerleşim gösterirler (13, 16).

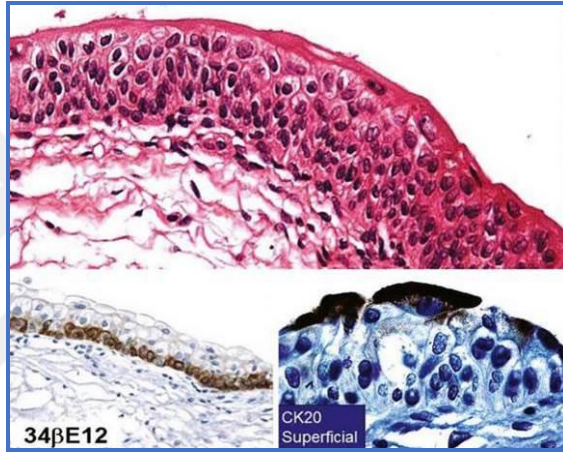
Lamina propria, bazal membran ve muskularis propria arasında bulunan, fibrovasküler bağ dokudan oluşan kompakt bir tabakadır ve ince, inkomplet düz kas fibrillerinden oluşan muskularis mukozayı da içerir. Orta-büyük boyutlu, kalın duvarlı damar yapıları da lamina propriaya ait özelliklerdendir ve bu damarlar genellikle muskularis mukozaya ait kas fibrillerine yakın yerleşimlidir (13, 16).

Muskularis propria, iç ve dış longitudinal tabaka ile orta sirküler tabaka olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Kas lifleri horizontal ve vertikal yerleşimli, kompakt ve devamlılık gösteren lifler şeklindedir. Bu kas tabakaları arasında matür yağ doku görülebilir. Adventisya, mesaneyi en dıştan kaplayan bağ doku tabakasıdır. Sadece kubbe ve ön duvarda mesane periton ile devamlılık gösterir ve bu kısımlarda serozaya sahiptir (12, 16).

Histolojik tabakalar ürotelyal karsinomlara sahip hastaların evrelemesi, tedavi seçimi ve sağkalım süresinin tahmini için hem patolojik hem de klinik olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle mikroskopik olarak doğru ayırt edilmesi önemlidir (13).



Resim 3: Tam kat mesane duvarı (13)



Resim 4: Normal ürotelyum (16)

2.2. Ürotelyal Mesane Karsinomu

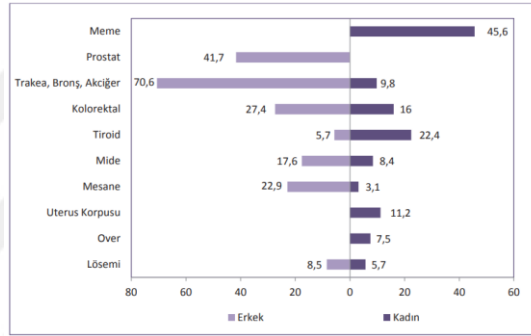
2.2.1. Epidemiyoloji

Türkiye’de 2017 yılı verilerine göre neoplaziler, ölüm nedenlerinin en sık ikinci nedeni olup tüm ölümlerin %19,5’ini (erkeklerde %23,2; kadınlarda %15,1) oluşturmaktadır. Mesane kanserleri dünya genelinde kanser sıralamasında 7. sırada gelmektedir, erkeklerde en sık görülen 4. kanser türüdür ve tüm kanserlerin %8,1’ini oluşturmaktadır (1, 18). Mesane kanseri insidansı coğrafi bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Standart-yaş-insidansı karşılaştırıldığında, gelişmiş ülkelerde, az gelişmiş ülkelere göre 3 kat daha sık görülmektedir (19).

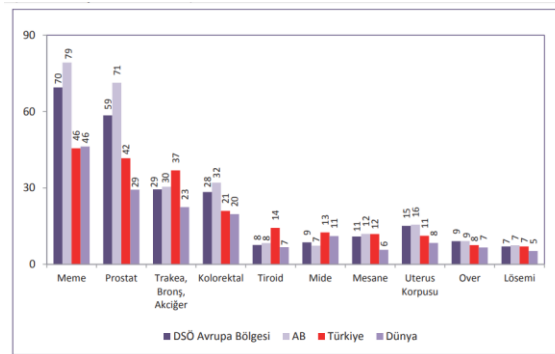
2015 yılı verilerine göre ülkemizde mesane kanseri görülme insidansı erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 100.000 de 20,2 ve 3,1 olarak saptanmıştır (18). Tüm dünyada mesane kanseri insidansı ve mortalitesi erkeklerde kadınlara oranla 3-4 kat daha sık olup, bu oran ülkemizde 8 kata kadar çıkmaktadır (2, 18).

Mesane karsinomu tanısı alan hastaların median yaşı 65-70 yaştır (20). Beklenen yaşam süresinin artmasıyla da mesane kanserlerinin görülme sıklığının yakın gelecekte 2 katına çıkacağı düşünülmektedir (19).

En sık görülen mesane kanseri, mesane kanserlerinin %80-90'ını oluşturan ürotelyal karsinomlardır. Skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom daha az sıklıkta görülür (15).



Şekil 1: Türkiye’de En Sık Görülen İlk 10 Kanser Türünün Cinsiyete Göre İnsidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu), 2018 (18)



Şekil 2: Türkiye’de En Sık Görülen İlk 10 Kanser Türü İnsidansının Uluslararası Karşılaştırması (100.000 Dünya Standart Nüfusu) 2018 (18)

2.2.2. Etyopatogenez

2.2.2.1. Kalıtsal kanser sendromları ve genetik yatkınlıklar

Lynch sendromu, otozomal dominant kalıtılan, DNA mismatch tamir genlerindeki hasar nedeniyle ortaya çıkan bir sendromdur. Endometrial, ince barsak, mide, over, hepatobilier, beyin, deri ve üriner sistem tümörleri gibi kolon dışı tümörler de sıklıkla görülür. Lynch sendromlu hastalarda üst üriner sistem neoplazi görülme sıklığı yüksek oranlarda bildirilirken, mesane karsinomlarında artmış risk olduğunu destekleyen yeni veriler de gündeme gelmektedir (20).

Fletcher ve ark. yaptıkları bir çalışmada, kemoterapi ya da yüksek doz radyoterapi almamış, 144 adet Herediter retinoblastom hastasının 5'inde mesane karsinomu geliştiği saptanmış, bu durum germline Rb mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur (21). Bazı kaynaklarda bu grup hastalarda mesane karsinomu görülme insidansının fazla olması, radyoterapi ve/veya siklofosfamid tedavisine bağlanmaktadır (20).

Mesane kanseri Costello sendromunun bir komponenti olarak da bulunabilir. Bu hastalarda, çocukluk çağında papiller ürotelyal karsinom görülebilir (22).

Birinci derece akrabasında mesane kanseri olan kişilerde, mesane kanseri gelişme riski 2 kat fazladır (23).

Yavaş asetilatör N-asetiltransferaz 2 (NAT2) varyantları ve Glutatyon S-transferaz mu1 (GSTM1)-null genotipi gibi detoksifikasyonda rol alan enzimlerle ilgili genetik faktörlerin ürotelyal mesane kanseri için risk faktörü olduğu keşfedilmiştir. Bu enzimlerdeki farklılık direkt olarak ürotelyal karsinom gelişimine neden olmamaktadır. Ancak, karsinojen maddelere maruziyet açısından ek bir risk oluşturarak ürotelyal karsinom gelişimine katkı sağlamaktadır (23).

2.2.2.2. Çevresel faktörler ve mesleki maruziyet

Üst ve alt üriner sistem karsinogenezisinde çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. Hava yolu ya da sindirim sistemi aracılığıyla vücuda giren geniş bir kimyasal ajan çeşitliliği mevcuttur.

Sigara kullanımı en iyi bilinen risk faktörlerinden birisidir. Sigara kullanan kişilerde, kullanmayanlara göre 3 kat daha sık mesane kanseri görülmektedir (24). Kanser gelişme riski sigara kullanımının miktarı ve süresi ile korelasyon gösterirken, bırakılması halinde de risk azalmaktadır. Hollanda’da yapılan prospektif bir çalışmada mesane kanseri vakalarının kadınlarda %23’ü, erkeklerde ise %50’si sigara ile ilişkili bulunmuştur (25). Sigara kullanımının etkileri vücutta metabolize edilen aromatik aminlerin (2-naftilamin ve 4-aminobifenil) ve polisiklik aromatik hidrokarbonların da dahil olduğu birçok kimyasal maddenin DNA üzerindeki etkileri ile ilişkilidir (26).

Çocukluk ve erişkinlik döneminde sigara dumanına maruz kalan kadınlarda ürotelyal mesane kanser insidansını araştıran bir çalışmada, bu kişilerde mesane karsinomu gelişimi ile sigara dumanına maruziyet arasında anlamlı olarak ilişki olduğu gösterilmiştir. Sigara dumanına çevresel maruziyetin etkisi kadınlarda erkeklere göre daha güçlü, hiç sigara içmemiş kadınlarda ise en güçlü oranda bulunmuştur (27).

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, bazı meslek gruplarında çeşitli aromatik aminlere maruziyet (şoförlerde egzoz dumanı ve boyacılarda boya maddeleri gibi) sonucu mesane kanseri gelişme riskinde artış bildirilmiştir. Sigara kullanımının bu kimyasal maddelerin karsinogenezis etkisini daha da arttırdığı gösterilmiştir (28).

İçme sularında ve toprakta arsenik bulunması mesane karsinomu açısından risk faktörleri arasında yer almaktadır. 300µg/L’nin üzerindeki arsenik miktarının mesane kanser gelişimi ile güçlü bir ilişkisi bulunduğu gösterilmiştir (29). Sigara kullanan kişiler arasında ise sinerjistik etkinin göstergesi olarak düşük konsantrasyonlardaki arsenik miktarı bile mesane kanseri gelişim riski ile ilişkili bulunmuştur (30). İçme suyunun klorlanması ve trihalometan seviyesi de ilgili kanserojenlerin bir kaynağı olarak görülmektedir (23).

2.2.2.3. Enfeksiyonlar

Her ne kadar mekanizması tam olarak bilinmese de kronik idrar yolları enfeksiyonu, uzun süreli üriner katater kullanımı ve mesanede taş öyküsü, mesane kanserinde artmış risk ile ilişkilidir. Afrika ve Orta doğu ülkelerinde sık görülen bir

parazit olan *Schistosoma haematobium* ile enfekte olan hastalarda skuamöz hücreli karsinom gelişme riski artmaktadır (31).

2.2.2.4. İlaçlar

Kanser veya otoimmün hastalık nedeniyle siklofosfomid kullanan kişilerde mesane kanseri gelişme riski 4-9 kat artmaktadır. Kanser gelişme riski kullanılan doz ve süre ile korelasyon göstermektedir (32).

Fenasetin içeren analjeziklerin uzun süreli kullanımının üst üriner sistem ürotelyal karsinom gelişimi ile güçlü bir ilişkisi bulunmaktadır. Fakat fenasetinin yerini başka analjeziklerin alması sonucunda bu ilaç ile ilişkili mesane karsinomlarının oranında azalma mevcuttur (33).

2.2.2.5. Radyasyon

Prostat veya uterin serviks karsinomun tedavisi için radyoterapi gören hastalarda pelvik radyasyonun mutajenik etkisi nedeniyle hem ürotelyal karsinom hem de skuamöz hücreli karsinom gelişme riskinde artış saptanmıştır (34).

2.2.2.6. Gelişimsel anomaliler

Konjenital ekstrofi vezika hastaları, erken rekonstrüktif cerrahi uygulansa dahi adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve ürotelyal karsinom gelişme riskine sahiptir (35).

2.2.3. Lokalizasyon

Ürotelyal karsinomların %90'dan fazlası mesaneden gelişir. Senkron ya da metakron multifokalite ürotelyal karsinomada oldukça sıktır. Multifokal tümörler benzer histolojide olabileceği gibi farklı görünüme de sahip olabilirler (16). Mesane tümörleri mesanenin herhangi bir yerinde yerleşim gösterebilir. Stephenson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, mesane ürotelyal karsinomlarının %37.1'inin yan duvar, %17.9'unun arka duvar, %12.6'sının trigon, %11.1'inin boyun kısmı, %9.8'inin üreter orifisi, %7.7'inin kubbe ve %3.8'inin ön duvar yerleşimli olduğu saptanmıştır (36). Papiller ürotelyal karsinom en sık mesanenin arka ve yan

duvarlarında yerleşim göstermekle birlikte ürotelyal mukozanın bulunduğu tüm yüzeylerde görülebilir (20).

2.2.4. Makroskopik Görünüm

İnfiltratif ürotelyal karsinomların büyük kısmı polipoid, sesil ya da ülseroinfiltratif özelliktedir. Papiller arkitektür bazen görülebilir. Eşlik eden karsinoma in situ ise, eritematöz alanların varlığı ile tanınabilir. Papiller ürotelyal karsinomlarda lezyonlar ekzofitik özelliktedir (resim 5). Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlar daha hiperemik olma eğilimindedir (20).



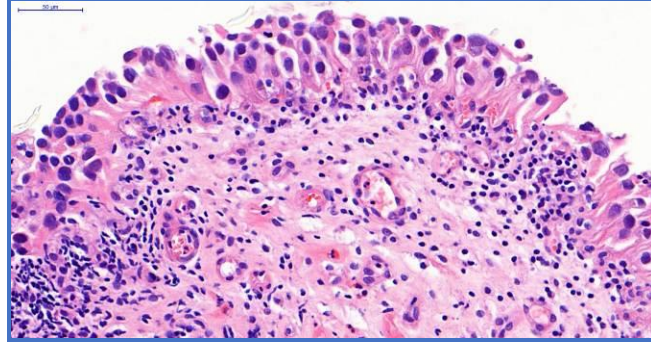
Resim 5: Mesane Tümörü Makroskopisi

2.2.5. Histopatoloji

2.2.5.1. Karsinoma İn Situ

Ürotelyal karsinoma in situ, büyük, pleomorfik, hiperkromatik nükleuslu, bir veya birden çok nükleol içeren, orta-geniş sitoplazmalı, belirgin atipik görünümde hücrelerden oluşan flat bir lezyondur (resim 6). Karsinoma in situ hücreleri bazen nükleositoplazmik oranı artmış, küçük hücreler özelliğinde olabilir. Hücre polaritesinde kayıp ve hücresel kalabalıklaşma bulunur. Mitoz genellikle çoktur, sıklıkla atipik formdadır ve epitelin üst yarısında izlenir, ancak bulunması şart değildir. Lamina propria genellikle ödemli, inflame ve konjesyone görünümündedir. Neoplastik hücrelerin tam kat epiteli işgal etmesi tanı için şart değildir. İzole malign hücrelerin pagetoid yayılımı karsinoma in situ tanısı için yeterlidir (16, 20).

Karsinoma in situya eşlik eden mikroinvazyon nadir olmayan bir bulgudur. Karsinoma in situnun düşük dereceli displaziden ayrımında morfolojik bulgular dikkate alınmalıdır (20).



Resim 6: Ürotelyal Karsinoma İn Situ

2.2.5.2. İnfiltratif Ürotelyal Karsinom

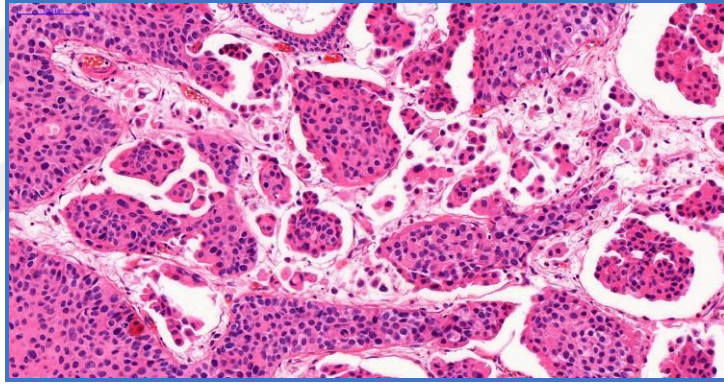
İnfiltratif ürotelyal karsinom, çok geniş bir yapısal paterne sahiptir. Tümör, yuvalanmalar, trabeküller, kordonlar meydana getirebilir ya da tek hücre şeklinde infiltrasyon oluşturabilir. Sıklıkla birbiri ile iç içe geçmiş paternler görülür. İnfiltratif kordonlar ya da tek hücre şeklinde infiltrasyon alanlarını daha çok bulunduran tümörlerin kötü sonuçlara sahip olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (20).

Her ne kadar ürotelyal karsinomların büyük kısmı yüksek dereceli tümörler olsa da, düşük-yüksek dereceli ürotelyal karsinomlar arasında anlamlı sonuç farklılıkları olduğu için raporlama sırasında tümörün derecesinin belirtilmesi önerilmektedir (20).

Karakteristik olarak belirgin pleomorfizm gösteren, düzensiz kontürlü, hiperkromatik nükelusa sahip tümör hücrelerinden oluşur (resim 7). Mitoz artmıştır ve atipik mitoz da izlenir. Sitoplazma genellikle orta-geniş özelliktedir ve bazen bu skuamoid görünüm gerçek bir skuamöz diferansiyasyon ile karışabilir. H-E boyalı kesitlerde sitoplazmik müsin seçilemez, ancak yüksek dereceli tümörlerin yaklaşık %60 kadarında histokimyasal müsin boyaları ile müsin varlığı gösterilebilir. Fakat bu müsin varlığının gösterilmesi tek başına glandüler diferansiyasyon demek için yeterli değildir. Ayrıca sitoplazmada glikojen birikimine bağlı olarak şeffaflaşma görülebilir (20).

İnfiltratif ürotelyal karsinomda hemen her zaman stromal bir reaksiyon görülür. Desmoplazi, diffüz infiltratif ürotelyal karsinom vakalarında görülebilse de ürotelyal karsinomda nadir bir bulgudur. Sellüler myofibroblastik proliferasyon sarkomatoid karsinomadan ayırt edilmelidir. Reaktif stromada, miksoid değişiklikler görülebilir ve miksoid değişiklikler baskın olduğunda miksoid sarkomatoid komponent ayırıcı tanısı gerekir. Retraksiyon artefaktı en sık lamina proprianın erken invazyonunda görülür. (20). Bazı invaziv karsinomlarda lenfoplazmatik inflamatuvar cevapta artış görülebilir. Bu konuda bilgiler sınırlı olsa da, artmış inflamatuvar cevaba sahip tümörlerin daha iyi prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (37).

İnfiltratif ürotelyal karsinomlarda skuamöz diferansiyasyon, glandüler diferansiyasyon, trofoblastik diferansiyasyon görülebilir (20).



Resim 7: İnfiltratif Ürotelyal Karsinom

1. Skuamöz Diferansiyasyon

Skuamöz diferansiyasyon, intersellüler köprüleşme ve/veya keratinizasyon varlığı ile karakterli, invaziv karsinomların %40 kadarında görülen en sık farklı diferansiyasyon tipidir. Görülme sıklığı derece ve evre arttıkça artar (16, 20). HPV enfeksiyonu ile ilişkisi gösterilmemiştir. Biyopsi ya da TUR materyalinde skuamöz diferansiyasyonun görülmesi, lokal ileri hastalık ile ilişkili bulunmuştur. Ancak, sistektomi materyalinde kanser spesifik kötü sağkalım ile ilişkili değildir (20). Birkaç

yayında skuamöz diferansiyasyonun radyoterapi ve kemoterapi etkisini azalttığı sonucuna varılmıştır (38-40).

Son zamanlardaki gen dizileme çalışmaları sonucunda bazal/skuamöz benzeri, luminal ve P53 benzeri karsinoma olmak üzere ürotelyal karsinomun 3 alt tipi tanımlanmıştır. Bazal subtip artmış kanser spesifik sağkalım ve kemoterapiye kötü yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Bazal subtip, skuamöz ya da skuamoid morfolojiye sahip, CK5/6 pozitif, ancak CK20 negatif olarak tanımlanmıştır (20).

2. Glandüler Diferansiyasyon

Glandüler diferansiyasyon tümörde gerçek gland yapısının bulunması olarak tanımlanmıştır. İnvaziv ürotelyal karsinomların %18 kadarında görülür. En sık enterik görünümde glandüler yapılar şeklinde görülür. Müsinöz adenokarsinoma, taşlı yüzük hücresi de görülebilir. Psödoglandüler boşluklardan ayırt edilmesi gerekir. İmmünohistokimyasal olarak enterik ifade paterni kazandıkları için CDX2 ve CK20 pozitifdir. Bazı vakalarda P63 ve GATA3 gibi ürotelyal belirteçlerde kayıp olabilir. Glandüler diferansiyasyonun prognostik önemi belirsizdir (20). Birkaç çalışmada glandüler diferansiyasyon gösteren tümörlerin daha ileri evrede tanı aldıkları, ancak aynı evredeki hastalarla karşılaştırıldığında kötü prognostik etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (41, 42).

3. Trofoblastik Diferansiyasyon

Trofoblastik diferansiyasyonun H-E boyalı kesitlerde tanınması oldukça nadirdir. Sinsityotrofoblastik dev hücrelere benzeyen tümör dev hücreleri sayesinde tanınabilir. Morfolojik olarak trofoblastik diferansiyasyon bulgusu göstermeyen vakaların %35'inde immünohistokimyasal olarak β HCG pozitifliği saptanır. β HCG pozitifliğinin yüksek derece ve ileri evre ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (20).

İNFİLTRATİF ÜROTELYAL KARSİNOM VARYANTLARI:

1. Nested Ürotelyal Karsinom

Nested ürotelyal karsinom, sitolojik olarak benign görünümüne sahip bir ürotelyal karsinom varyantıdır. Sistektomi materyallerinde ürotelyal karsinomların %0.8-

2.4'ünü oluşturur. En sık mesanede görülür. Nadir olarak renal pelvis ve üreterde de görülebilir. Tipik olarak, ürotelyumun altında, kalabalık, küçük yuvaların düzensiz bir şekilde çoğalması ile karakterizedir (13, 20). Varyasyonları, tübüller, mikrokistik alanlar ve geniş yuvalar bulundurulur. Lezyonun tabanında tümör-stroma arasında düzensiz bir sınırlanma bulunur. Nükleusta çok belirgin bir atipi görülmez. Bazen tümör tabanında sitolojik atipi görülebilir. Stroma tipik olarak miksoid özelliktedir. Klasik ürotelyal karsinoma eşlik edebilir. Ancak saf formu daha sık görülür. Nefrojenik adenoma ve von Brunn adacıkları en önemli ayırıcı tanılarındandır. Büyük nested karsinoma, inverted büyüme paterni gösteren non-invaziv ürotelyal karsinomadan ayırt edilmelidir (20). Klasik ürotelyal karsinomaya göre lokal ileri hastalık ve lenf nodu tutulum oranları daha yüksektir (13). Ancak aynı evreye sahip hastalarla karşılaştırıldıklarında prognoz açısından farklılık yoktur (20).

2. Mikrokistik Ürotelyal Karsinom

Mikrokistik ürotelyal karsinom kısmen benign görünen, ancak ileri evrelerde tanı alan bir ürotelyal karsinom tipidir. Bazı kaynaklarda mikrokistik ürotelyal karsinom tanısı verebilmek için bu komponentin en az %25 oranında bulunması gerektiği öne sürülmektedir (15). Sistitis sistitikaya oldukça benzer bir görünüme sahiptir. Benign veya ince, düzleşmiş görünüme sahip epitelle döşeli, yuvarlak-oval mikrokistlerle (1-2 mm boyutlu) karakterizedir. Mikrokistlerin lümeni genellikle eozinofilik sekret ya da nekrotik sellüler debri ile doludur. Stromal yanıt genellikle bulunmaz. Bu varyantta muskularis propria infiltrasyonu sıktır (20). Sistitis sistikadan, dağınık dağılım göstermesi, daha düzensiz adalardan oluşturması ve kas invazyonu ile ayırt edilebilir (13).

3. Mikropapiller Ürotelyal Karsinom

Mikropapiller ürotelyal karsinom, ürotelyal karsinomların %0.6-2.2 kadarını oluşturmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla 3 kat daha sıktır ve en sık 6. dekatta görülür. Mikropapiller karsinoma, etrafında boşluk bulunduran, vasküler kor içermeyen küçük hücre adaları şeklinde izlenir (20). Hücrelerin nükleusu periferde yerleşimlidir ve atipik görünüme sahiptirler. İmmünohistokimyasal olarak MUC1

boyası ile bu hücrelerin nükleus oryantasyonu gösterilebilir (16). Yüksek dereceli olarak kabul edilirler. Nükleusu iten ve halka görünümüne yol açan sitoplazmik vakuoller oldukça tipiktir. Lenfovasküler invazyon sıklıkla, karsinoma in situ vakaların %50'sinde görülür. Genellikle diğer ürotelyal karsinomlarla birlikte görülür ve mikropapiller karsinom demek için bir eşik değeri belirlenmemiştir. Ancak bulunduğu orandan bağımsız olarak mikropapiller komponentin varlığı bildirilmelidir (13, 20). Her2 amplifikasyonu ya da overekspresyonu diğer ürotelyal karsinomlara göre daha sıklıkla (16, 20). Bu varyant artmış mortalite riski ile ilişkilidir ve patolojik evre hastalık spesifik sağkalım için önemli bir belirteç (20).

4. Lenfoepitelyoma Benzeri Ürotelyal Karsinoma

Nazofarenksin lenfoepitelyoma benzeri karsinoması ile benzer morfolojiye sahiptir. Erkeklerde daha sıklıkla ve ortalama 69 yaş (44-90 yaş) civarında görülür. Lenfoepitelyoma benzeri ürotelyal karsinom, büyük pleomorfik nükleuslu, belirgin nükleollü, belirsiz sitoplazmik sınırlara sahip, sinsityal görünümde andiferansiye hücrelerin oluşturduğu, adalar, tabakalar ve kordonlardan meydana gelir. Zeminde T ve B lenfositler, plazma hücreleri, histiyositler, nötrofil ve eozinofil lökositlerle karışık belirgin lenfoid infiltrasyon bulunur. Tek başına ya da başka bir ürotelyal karsinom varyantı ile görülebilir. Baş boyun bölgesinde görülen eşleniğinin aksine mesanede EBV ilişkisi bildirilmemiştir (20). Saf formları kemoterapiye daha iyi yanıt verirler. Saf formlarında ya da baskın komponent olarak bulunduklarında kısmen daha iyi bir prognoza sahiptirler. Ancak diğer ürotelyal karsinomlarla birlikte fokal olarak bulunduklarında aynı evreye sahip hastalar arasında prognostik açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır (16).

5. Plazmasitoid Ürotelyal Karsinoma

Plazma hücreleri ve/veya monositlere benzeyen hücrelerden oluşan, oldukça nadir bir varyanttır. Epidemiyolojik özellikleri klasik ürotelyal karsinomaya benzerdir. Sistoskopide, mesane mukozası sıklıkla ödematöz görünümündedir ve yüzeyde bir lezyon genelde görülmez. Bu tümörler, miksoid veya gevşek bir stroma içerisinde, diskoheziv, şeffaf ya da eozinofilik sitoplazmalı, küçük nükleol bulunduran, santral ya da ekzantrik yerleşimli, hiperkromatik nükleusa sahip

hücrelerden meydana gelirler. Vakaların %50'sinde eşlik eden yüksek dereceli ürotelyal karsinoma komponenti bulunur (20).

Plazmasitoid morfolojiye ek olarak taşlı yüzük hücre görünümüne yol açan sitoplazmik vakuollü hücreler de görülebilir. Taşlı yüzük hücreli müsinöz adenokarsinomun aksine bu hücreler ekstrasellüler müsin ile ilişkisizdir. Diğer ürotelyal karsinomlardan farklı olarak bu tümörlerin büyük çoğunluğunda E-cadherinin membranöz ekspresyonunda kayıp görülür (16, 20).

Büyük kısmı ileri evrede tanı alır. Peritoneal yayılım ve sistektomi materyalinde pozitif cerrahi sınır açısından yüksek risk faktörüdür. Klasik ürotelyal karsinoma göre rekürrens ve ölüm oranları daha yüksektir (20).

6. Dev Hücreli Ürotelyal Karsinom

Genellikle klasik ürotelyal karsinoma eşlik eden, oldukça nadir ve agresif bir varyanttır. Pleomorfik dev hücreli karsinom komponenti, akciğerde görülen dev hücreli karsinoma benzer şekilde bizaar, pleomorfik tümör dev hücrelerinden oluşmaktadır. Tipik veya atipik mitoz, muskularis propria invazyonu, geniş nekroz oldukça sıktır. Trofoblastik diferansiyasyondan ya da osteoklast benzeri dev hücrelerden ayırmak gerekir. Prognoz genellikle kötüdür (16, 20).

7. Lipitten Zengin Ürotelyal Karsinom

Lipitten zengin ürotelyal karsinoma, bir veya birden fazla sitoplazmik vakuol içeren lipoblast benzeri büyük hücrelerle karakterizedir. Literatürde 37 vaka bildirilmiştir. Lipitten zengin morfoloji genelde tümörün %10-50 kadarını oluşturacak şekilde diğer ürotelyal karsinoma komponentleri ile görülür. Genellikle ileri evrede tanı alır (13, 20).

8. Şeffaf Hücreli (Glikojenden Zengin) Ürotelyal Karsinom

Şeffaf hücreli (glikojenden zengin) ürotelyal karsinoma, şeffaf görünüme sahip, glikojenden zengin sitoplazma bulunduran hücrelerden meydana gelir. Literatürde 25 kadar vaka bildirilmiştir. Sıklıkla karsinoma in situ veya papiller komponent veya infiltratif ürotelyal karsinom ile ilişkilidir. Sitoplazmik polisakkarid

komponent periodik asit- Schiff (PAS) boyası ile pozitif boyanırken diastaz ile kaybolur. Klasik ürotelyal karsinom belirteçlerini ifade ederler. Çok nadir görüldüğü için prognostik önemi net değildir (13, 20).

9. Sarkomatoid Ürotelyal Karsinom

Sarkomatoid karsinoma ürotelyal karsinomların %0,6 kadarını oluşturmaktadır. Radyasyon ve siklofosamid tedavisi tipik risk faktörleridir. Makroskopik olarak büyük polipoid ve infiltratif sınırlı, kavitasyon, nekroz ve hemoraji içeren kitle özelliğindedir.

Mikroskopik olarak, klasik ürotelyal karsinom, skuamöz, glandüler veya küçük hücre komponenti ile karışık olabilir. Sarkomatoid komponent, yüksek dereceli iğsi veya pleomorfik hücrelerden oluşur. Osteosarkom, kondrosarkom, rabdomyosarkom, leiomyosarkom, liposarkom ve anjiosarkom gibi heterolog komponentler eşlik edebilir. Heterolog eleman varlığı mutlaka raporda belirtilmelidir. Heterolog eleman varlığının daha kötü prognozla ilişkili olduğuna dair sınırlı bir bilgi vardır. Sarkomatoid komponent en azından fokal sitokeratin pozitifdir. P63 ve GATA3 ifade edebilirler. Ayırıcı tanıda, tedavi sonrası iğsi hücreli nodül, psödosarkomatöz stromaya sahip ürotelyal karsinoma, inflamatuvar myofibroblastik tümör ve primer sarkom yer alır. Sistektomiden sonra 5 yıllık sağkalım oranı %20'dir (13, 16, 20).

10. Az Diferansiye Tümörler

Az diferansiye tümörler, küçük hücreli andiferansiye karsinoma, sarkomatoid karsinoma, dev hücreli karsinoma ve andiferansiye karsinoma gibi tümörlerin karışık bir şekilde morfolojisine sahip tümör spektrumunu oluşturmaktadır. Osteoklast benzeri dev hücrelerden zengin alt tipinde, kemiğin dev hücreli tümörüne benzer şekilde belirgin osteoklastik reaksiyon bulunur. Epiteyal belirteçlerle pozitif boyanan mononükleer hücreler ve multinükleer osteoklastik dev hücrelerden meydana gelir. Bütün az diferansiye karsinomlar diğer ürotelyal karsinomlar ile ilişkili olarak görülebilir. Birkaç vaka bildirilmiş, bunlarda da sonuçlar kötü bulunmuştur (20).

2.2.5.2. Papiller Ürotelyal Neoplaziler

2.2.5.2.1. Papillom

Normal sitolojiye sahip, selüler sıralanması korunmuş, normal kalınlıktaki epitellerle döşeli basit papiller dallanma gösteren bir neoplazidir. Şemsiye hücre tabakası sıklıkla belirgindir, nükleer multilobülasyon, nükleomegali ve sitoplazmik vakuolizasyon gösterirler. İmmünohistokimya çalışılması tanı için gerekli değildir, ancak CK20 boyası ile şemsiye hücrelerinin pozitif, diğer hücrelerin negatif olduğu gösterilebilir (15, 20).

2.2.5.2.2. İnverted Ürotelyal Papillom

Anastomozlaşan kordonlar ve genellikle uniform kalınlıkta trabeküller meydana getiren, yüzeyden başlayarak lamina propriaya doğru invajinasyon gösteren bir tümördür. Tümörün üstündeki ürotelyum normal, atenüe ya da hiperplastik olabilir. Ekzofitik papiller organizasyon yoktur veya minimal olabilir. Lezyonun taban kısmında lezyon ile stroma arasında düzgün bir sınırlanma bulunur. Kordon ve trabeküllerin periferindeki hücreler daha koyu renklidir. Santralinde, kordonlara paralel akar görünümde, iğsi şekilli hücreler bulunur (15, 20).

Tümör epitel kalınlığı 5-10 hücre arasında değişir. Daha kalın epitel varlığı ya da sitolojik atipi bulundurmeyen hücrelerden oluşan nodüler ya da solid büyüme paterninin bulunması düşük malignite potansiyelli inverted papiller ürotelyal neoplaziyi veya inverted büyüme paterni gösteren ürotelyal karsinomayı düşündürmelidir. Nükleer atipi, irregüler nükleol varlığı, ekspansil büyüme paterni ve artmış mitoz inverted ürotelyal karsinom lehine bulgulardır (20).

2.2.5.2.3. Düşük Malignite Potansiyeline Sahip Papiller Ürotelyal Neoplazi

Küçük büyütmede, normal epitelden daha kalın ve/veya daha sellüler papiller yapılar görülür. Bu bulgu dışında başka yapısal anormallik yoktur, polarite kaybı izlenmez. Sitolojik olarak monoton bir görünüm hakimdir. Nükleus hafif büyümüş olabilir ve nükleer çentiklenme görülebilir. Nükleol yoktur veya çok belirsizdir. Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomada görülen dağılmış

hiperkromatik nükleus özellikleri izlenmez. Mitoz son derece nadirdir ve bazal tabakada sınırlıdır (13, 20).

2.2.5.2.4. Non-invaziv Papiller Ürotelyal Karsinom

Non-invaziv papiller ürotelyal karsinoma değişik kalınlıklarda neoplastik ürotelyum ile döşeli ince fibrovasküler kora sahip karsinomalar olarak tanımlanmaktadır. Nükleus şekil, boyut ve kromatin değişiklikleri sitolojik anormallikleri; hücrelerin birbirleri ve bazal membranla olan ilişkilerindeki bozulmalar da yapısal anormallikleri oluşturmaktadır (20).

2.2.5.2.4.1. Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom

Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomalar yaygın dallanmalar gösteren ince papiller yapılardan oluşur. Küçük büyütmelerde sıralanmada belirgin bir bozulma dikkati çekmezken, orta büyütmelerde polarite kaybı, hafif nükleer düzensizlik ve pleomorfizm izlenir. Mitoz görülebilir, ancak atipik mitoz beklenmez (13, 20).

2.2.5.2.4.2. Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom

Yüksek dereceli lezyonlarda papillalar birleşerek daha solid ekzofitik bir görünüme sahip olabilir. Nükleer boyut farklılıkları, irregüler ve pleomorfik nükleuslar küçük büyütmelerden dahi fark edilebilir. Belirgin nükleol ve artmış mitoz tipiktir. Ürotelyum kalınlığı değişkenlik gösterebilir, bazı vakalarda belirgin nükleer anaplazi bulunabilir (13, 20).

2.2.5.2.4.3. İverted Büyüme Paterni Gösteren Papiller Ürotelyal Karsinom

Bazı ürotelyal tümörlerde endofitik/inverted büyüme paterni baskındır. Bu tümörler dallanan, farklı genişliklerde, anastomozlaşan kordon yapıları ile karakterizedir. Stroma-epitel arası sınırlanma düzgündür. Sitolojik ve yapısal özellikler düşük ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlar ile benzerdir. Stromal invazyon ve muskularis propria invazyonu beklenmez (20).

2.2.6. İmmünohistokimyasal Özellikler

CD44, CK20 ve P53, flat ürotelyal lezyonlarda atipiyi değerlendirmek için günlük rutinde en sık kullanılan immünohistokimyasal belirteçlerdir. Normalde ürotelyumda CD44 ile tam kat, CK20 ile şemsiye hücrelerinde boyanma izlenir. P53 ile yaygın ve kuvvetli nükleer pozitiflik beklenmez. Reaktif atipi durumlarında normal ürotelyal epitele benzer immünohistokimyasal boyanma izlenir. Karsinoma in situ durumunda ise CD44, tamamen negatif olabilir ya da sadece bazal tabakada pozitif olabilir, CK20 ile neoplastik hücrelerde tam kat yaygın boyanma gözlenir ve P53 ifadesinde artış bulunur (13).

Üroplakin, ürotelyal diferansiyasyon için en spesifik immünohistokimyasal belirteç olarak düşünülmektedir, fakat sensitivitesi oldukça düşüktür. GATA3 sık kullanılan diğer bir belirteçtir ve ürotelyal karsinomların %67-90'ında pozitifdir. Ürotelyal karsinomların neredeyse %100'ü CK7, %67 kadarı CK20 ve yaklaşık %50-62 kadarı hem CK7 hem de CK20 ifade ederler (20). Papiller ürotelyal karsinomlar GATA3, CK20, p63, CK5/6 ve yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler ile pozitifdir, ancak derecelendirmede immünohistokimyanın rolü yoktur (20, 43).

Evreleme için önemli olan muskularis propria invazyonunu değerlendirmede zorlanılan durumlarda desmin ve geniş spektrumlu sitokeratin içeren bir panel kas invazyonunu aydınlatmak için kullanılabilir (43).

2.2.7. Moleküler Özellikler

Mesane karsinomu temel olarak FGFR3/RAS yolağı (kas invaziv olmayan papiller karsinom) ya da TP53/RB1 yolağı (kas invaziv non-papiller karsinom) üzerinden gelişir. Kromozom 9 delesyonu ürotelyal displazi ve hiperplazi gelişimine yol açar (19, 44).

Deney faresi modellerinde düşük seviyelerdeki Hras mutasyonu sonucunda flat ya da papiller ürotelyal hiperplastik lezyonlar geliştiği, yüksek seviyelerdeki Hras mutasyonunun kas invaziv olmayan ürotelyal karsinom gelişmesine yol açtığı saptanmıştır. Benzer şekilde insanlarda da kas invaziv olmayan ürotelyal karsinomların öncül lezyonları flat ya da papiller ürotelyal hiperplastik lezyonlardır (19).

FGFR3/RAS yolağı, ürotelyal hiperplaziden invaziv olmayan papiller tümörlere ilerleyişte rol alır. Düşük dereceli-Ta karsinomlarda sıklıkla PIK3CA/STAG2 mutasyonu bulunur (19, 44). Düşük dereceli-Ta karsinomlardan, yüksek dereceli-Ta tümörler gelişebilir ve CDKN2A inaktivasyonu sonucu T1 karsinomaya ilerleme gerçekleşir (44).

Deney fareleri üzerinde yapılan çalışmalarda, kas invaziv ürotelyal karsinomun gelişiminde P53, PTEN, Rb gibi tümör süpresör genlerden bir veya birden fazlasının inaktivasyonunun gerektiği gösterilmiştir. Deney faresi modellerinde izlenen tümörler flat ürotelyal displazi ve karsinoma in situ zemininde geliştiği saptanmıştır. Yine benzer şekilde insanlarda da ürotelyal displazi ve karsinoma in situ kas invaziv ürotelyal karsinoma gelişiminde yüksek risk faktörü olduğu gösterilmiştir (19).

TP53/RB1 yolağı, displazi ve karsinoma in situ aracılığı ile invaziv tümör gelişimine yol açmaktadır. P53 mutasyonu sıklıkla ürotelyal displazi gelişimi sırasında ortaya çıkarken, RB1 kaybı genellikle ürotelyal hiperplaziden karsinoma in situya geçişte görülür (44).

HER2 amplifikasyonu ve mutasyonu mikropapiller varyantta diğer ürotelyal karsinomlara göre daha sık görülür. FGFR3 mutasyonu kas invaziv olmayanlara göre daha az sıklıkta olmakla birlikte, %40'lara varan oranda kas invaziv karsinomlarda da bulunur (19).

Epigenetik değişiklikler açısından da kas invaziv grup ve kas invaziv olmayan grup arasında farklılıklar bulunmaktadır. Kas invaziv olmayan mesane karsinomlarında non-CPG adalarında hipometilasyon, kas invaziv mesane karsinomlarında promoter bölgelerinde hipermetilasyon görülür (19).

2017 yılında TCGA, mRNA dizileme analizine dayanan kas invaziv ürotelyal karsinomaların 3 ana alt tipini (Luminal (%60), Bazal-Skuamöz (%35), Nöronal (%5)) tanımlamıştır: Luminal alt tipin içinde, Luminal-papiller, Luminal-infiltrate, Luminal olmak üzere 3 alt grup yer alır. Bu alt tip luminal A meme kanserine benzer özelliklere sahiptir ve ürotelyal belirteçleri (GATA3, FOXA1) ifade eder. Luminal papiller alt grup, papiller morfolojiye sahiptir ve FGFR3 mutasyonu bulundurulur.

Bazal-skumöz alt tip, kök hücre belirteçleri ifade eder, bazal benzeri meme kanseri ve skumöz hücreli karsinomaya benzer. Luminal-infiltrate ve bazal/skumöz alt tiplerinin, PD-1 ve PD-L1 ifade ettikleri için immün kontrol noktası inhibitör tedavilerinden fayda görebileceği bildirilmiştir (44) .

2.2.8. Histolojik Derecelendirme

İnvaziv olmayan mesane kanserlerinde, özellikle de papiller neoplazilerde histolojik derecelendirme büyük önem taşımaktadır. İnfiltratif ürotelyal karsinomların %95 kadarı yüksek dereceli iken, sadece küçük bir kısmı düşük dereceli ve lamina propriada sınırlıdır (20). İnvaziv olmayan tümörler papiller ve flat olmak üzere 2 kategoride incelenir. Karsinoma in situ tanımsal olarak yüksek dereceli kabul edilir ve tanımı gereği papiller yapı içermemesi beklenir.

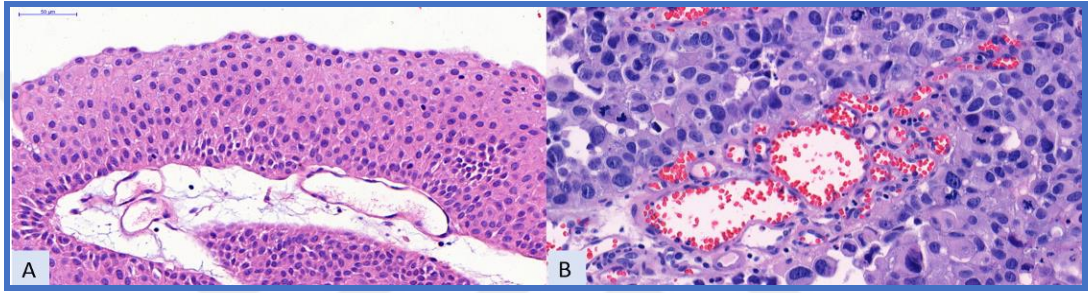
Flat lezyonlarda görülen atipi, reaktif atipiden, maligniteye bağlı atipiyeye kadar değişiklik gösterebilir. Benzer şekilde papiller lezyonlar da reaktif papiller proliferasyon, papillom, düşük malignite potansiyeline sahip papiller ürotelyal proliferasyon, düşük ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom gibi geniş bir tanı yelpazesine sahiptir. Geliştirilmeye çalışılan birçok derecelendirme sistemine rağmen histolojik derecelendirmede gözlemciler arası farklılık oldukça yüksektir (45).

Ürotelyal karsinomların histolojik derecelendirilmesinde günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 tarafından kullanılması önerilen sistem, düşük ve yüksek dereceli olmak üzere ikili derecelendirme sistemidir (20, 46).

Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlar nükleer pleomorfizm ya da nükleomegali göstermeyen, uniform hücrelerden oluşur. Epitelde polarite kaybı bulunur. Mitoz oldukça nadirdir, bulunduğu zaman genellikle epitelin alt 1/2'sinde sınırlı olarak görülür (resim 8A).

Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomda ise belirgin nükleomegali, nükleer pleomorfizm ve sıklıkla yüzeye ulaşan, artmış mitotik aktivite izlenir. Atipik mitoz görülebilir. Epitelde polarite kaybı bulunur ve neoplastik hücreler belirgin olarak artar (resim 8B) (20, 47).

Bazı kaynaklar tümörde %5'ten fazla yüksek dereceli komponent olması durumunda, tümörün yüksek dereceli olarak isimlendirilmesini önermektedir (15). Ancak bazı gözlemciler %10'dan az yüksek dereceli komponent bulunduran tümörlerin düşük dereceli hastalık klinik gidişatına sahip olduklarını saptamışlardır (48).



Resim 8: A-Düşük Dereceli Ürotelyal Karsinom, B-Yüksek Dereceli Ürotelyal Karsinom

2.2.9. Evreleme

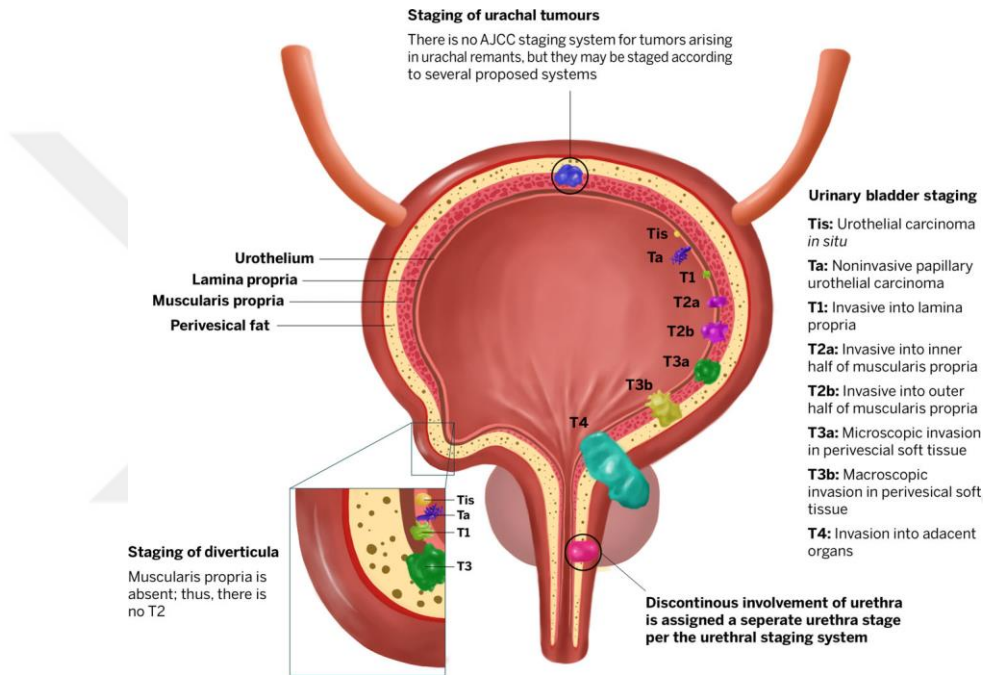
AJCC 8'e göre tanımlanan TNM sınıflaması Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'te; prognostik evre grupları Tablo 4'te gösterilmiştir.

2.2.9.1. T Komponenti

Mesane kanseri evrelemesinde ilk adım sistoskopi uygulanmasıdır. Tümör saptandığında, histolojik tanı ve hastalık yaygınlığını anlayabilmek için transüretral rezeksiyon (TUR) yapılır ya da biyopsi alınır. Nihai patolojik evreleme radikal ya da parsiyel sistektomi materyali üzerinden yapılabilir (resim 9). Ancak TUR materyali cerrahi operasyon öncesi hastalığın yaygınlığı hakkında fikir verir. TUR materyalinin yeterli olabilmesi için kas invazyonunu değerlendirmeye imkân verecek ölçüde kas dokusu da içermesi gerekir. TUR materyalinde T komponenti Ta, Tis, T1 ve T2 olmak üzere 4 kategoride değerlendirilir. Bu aşamada önemli olan T1 ve T2 ayrımının doğru bir şekilde yapılmasıdır (20).

Yüksek dereceli Ta ve tüm T1 tümörler için ilk TUR materyalinde muskularis propria yoksa 2-6 hafta sonra tekrar TUR yapılması önerilmektedir (20).

Sistektomi materyalinde, perivezikal yağ doku ve muskularis proprianın dış tabakası arasındaki sınır çok net olmadığı için, dış ½ muskularis propria invazyonu (pT2b) ve mikroskopik perivezikal yağ doku invazyonu (pT3a) ayrımı güç olabilir (20).



Resim 9: Mesane kanseri T evrelemesi (46)

2.2.9.2. N Komponenti

Radikal sistektomi sırasında pelvik lenf nodülü diseksiyonu uygulanır. Kommon iliak, paraaortik ve parakaval lenf nodlarının da diseksiyon daha düşük pelvik rekürrens ve artmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Pozitif lenf nodlarının sayısı ve lokalizasyonu evre ve prognoz açısından önemli olduğu için tüm lenf nodları mikroskopik olarak incelenmelidir (20).

2.2.9.3. M Komponenti

T1 ya da daha ileri evredeki hastalarda M evrelemesinin sistektomi yapılmadan önce uygulanması önerilmektedir (20).

Tablo 1: AJCC-8'e göre Mesane Karsinomu İçin Primer Tümör Sınıflaması (T)

T Kategorisi	Kriterleri
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör için delil yok
Ta	Non-invaziv papiller karsinoma
Tis	Karsinoma <i>in situ</i> : 'flat tümör'
T1	Lamina propriaya (Subepitelyal bağ doku) invaze
T2	Muskularis propriaya invaze
T2a	Kas tabakasının iç 1/2'sine invaze
T2b	Kas tabakasının dış 1/2'sine invaze
T3	Perivezikal yağ dokuya invaze
T3a	Mikroskopik invazyon
T3b	Makroskopik invazyon (ekstravezikal kitle)
T4	Ekstravezikal tümörün prostat stroması, veziküla seminalis, uterus, vajina, pelvik duvar ve abdominal duvardan herhangi birine direkt invazyonu
T4a	Prostat stroması, veziküla seminalis, uterus, vajinaya invaze
T4b	Pelvik duvara, abdominal duvara invaze

Tablo 2: AJCC-8'e göre Mesane Karsinomu İçin Bölgesel Lenf Nodülü Sınıflaması (N)

N Kategorisi	Kriterleri
NX	Bölgesel lenf nodülü değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodülü metastazı yok
N1	Pelvik lenf nodüllerinden (perivezikal,obturator, internal ve eksternal iliak ya da sakral) tek bir lenf nodülünde metastaz varlığı
N2	Pelvik lenf nodüllerinde (perivezikal,obturator, internal ve eksternal iliak ya da sakral) birden çok lenf nodülünde metastaz varlığı
N3	Kommon iliak lenf nodüllerinde metastaz varlığı

Tablo 3: AJCC-8'e göre Mesane Karsinomu İçin Uzak Metastaz Sınıflaması (M)

M Kategorisi	Kriterleri
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Bölgesel olmayan lenf nodüllerinde metastaz var
M1b	Diğer uzak metastazlar

Tablo 4: AJCC-8 Prognostik Evre Grupları

Prognostik Grup	T	N	M
0a	Ta	N0	M0
0is	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a	N0	M0
II	T2b	N0	M0
IIIA	T3a, T3b, T4a	N0	M0
IIIA	T1-T4a	N1	M0
IIIB	T4b	N0	M0
IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b

2.2.10. Prognoz ile İlişkili Morfolojik Faktörler

Histolojik derece, evre, lenfovasküler invazyon ve bazı varyantlar prognoz ile ilişkili bulunan morfolojik özelliklerdendir. Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom zemininde invaziv karsinom geliştiğinde %34 oranında, yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom zemininde invaziv karsinom geliştiğinde ise %70 oranında rekürrens görülmektedir. Karsinoma in situ vakalarını %50 kadarı kas invaziv hastalığa ilerlemektedir. Ek olarak karsinoma in situ multifokal hastalık ile ilişkili bulunmuştur.

İnvaziv karsinomlarda invazyon derinliği bir diğer önemli prognostik faktördür. T1 vakalarda, 1mm invazyon eşiği ve invazyon derinliğinin büyük çapının bir büyük büyütme alanından (1 BBA'dan) daha büyük ya da küçük olması prognoz

ile ilişkili bulunmuştur. T2 hastalıkları yüzeysel muskularis propria invazyonu (T2a) ve derin muskularis propria invazyonu (T2b) olarak alt evrelere ayırmak lenf nodu metastazı bulunmayan hastalarda rekürrens ve sağkalım açısından anlamlı farklılık göstermektedir.

Lenfovasküler invazyonun prevelansı evre ilerledikçe artmaktadır. Lenf nodu metastazı bulundurmeyen kas invaziv ürotelyal karsinomalarda lenfovasküler invazyon bağımsız kötü prognostik faktör olarak kabul edilse de, T1 vakalarda ve lenf nodu metastazı bulunan T2 vakalardaki prognostik önemi net değildir (49).

Mikropapiller ürotelyal karsinom, nested ürotelyal karsinoma, plazmasitoid ürotelyal karsinoma, sarkomatoid ürotelyal karsinoma ve küçük hücre diferansiyasyonu kötü prognoz ve tedaviye yanıtızsızlık ile ilişkili olduğu gösterilmiş ürotelyal karsinoma varyantlarıdır. Bu varyantları tanımak, diğer ürotelyal karsinom tipleri ile görüldüklerinde varlıklarını bildirmek bu anlamda önemlidir.

2.3. İntravezikal Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tedavisi

2.3.1. İntravezikal Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tedavisi ve BCG

Tedavisine Yanıtızsızlık

1974 yılında Zbar ve Rapp tarafından, bir hayvan modelinde Mycobacterium bovis'in zayıflatılmış bir suşu olan Bacillus Calmette-Guérin'nin (BCG) anti-tümör etkilerini gösterilmiş, aynı zamanda bu ilacın etkili olması için gerekenler tanımlanmıştır (10). 1976 yılında, Kanadalı onkolog Alvaro Morales, kas invaziv olmayan ürotelyal karsinoma için intravezikal BCG alan 10 hastanın 7'sinde tümör yanıtlarını tanımlamıştır. 1990 yılında da intravezikal BCG ilk kanser immünoterapisi olarak FDA tarafından onaylanmıştır (2). İntravezikal BCG tedavisi, intravezikal kemoterapik ajanlarla karşılaştırıldığında kas invaziv hastalığa ilerleyiş riski ile rekürrens olasılığını azalttığı kanıtlanan tek tedavi seçeneğidir. Yüksek riskli, kas invaziv olmayan tümörlerde (T1, yüksek dereceli papiller tümörler ve karsinoma in situ) transüretral rezeksiyon (TUR) sonrası intravezikal BCG uygulaması, ilk basamak olarak uygulanan ve altın standart tedavi yaklaşımıdır (2, 50, 51).

İndüksiyon tedavi siklusları haftalık olarak 6 kez intravezikal BCG uygulanmasını içermektedir. Bu tedavilerin belirgin toksisite olmadan kesilmesi, optimal bir immün yanıt elde edilmesini engelleyebilir. İdame tedavisi için toplam 10 doz intravezikal BCG'nin 18-27 hafta arasında değişen süreler içinde uygulandığı farklı protokoller mevcuttur (51, 52). Tedavi başarısı genel olarak %60-70'lere ulaşmaktadır. Ancak hastaların %30-45'inde BCG tedavisi başarısız olmakta, rekürrens veya progresyon gelişmektedir (2, 51). Bu hasta grubu için etkili bir konservatif ikinci basamak tedavi seçeneğinin bulunmaması sistektomiye gündeme getirmekte, ancak genellikle yaşlı ve komorbiditesi olan hastalar olmaları sistektomi gibi radikal yaklaşımlar için engel oluşturmaktadır (2).

Herhangi bir zamanda kas invaziv karsinoma ilerleme, 3. ay biyopsisinde kas invaziv olmayan yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom bulunması, hem 3. ay hem de 6. ayda karsinoma in situ (eşlik eden papiller tümör olmaksızın) görülmesi, BCG tedavisi sırasında yüksek dereceli tümörün ortaya çıkması, BCG tedavisi sonrasında ya da idame tedavisi tamamlandıktan sonra yüksek dereceli tümör rekürrensi olması BCG tedavisine yanıtızlık olarak kabul edilmektedir (52).

2.3.2. İntravezikal BCG Tedavisinin Etki Mekanizması

İntravezikal BCG uygulanması sonucunda, BCG fibronektin ve ekstrasellüler matriks proteini aracılığıyla ürotelyal epitel hücrelerine tutunur. BCG'nin hücre içine alımı PTEN delesyonu ve RAS onkogen aktive edici genetik değişiklikler bulunduran hücrelerde daha fazla olur. Ayrıca BCG'nin hücre içine alımına yanıt olarak, mesane kanseri hücreleri MHC sınıf II ve ICAM-1'in ekspresyonunu artırır. IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF- α ve INF- γ gibi sitokinler aracılığıyla ortama granülositlerin, makrofajların, NK (natural killer) hücrelerin, dendritik hücrelerin ve lenfositlerin gelmesini sağlar. Sitotoksik lenfositler, NK hücreleri, lökositler tarafından salgılanan TRAIL tümör hücrelerinin apoptozisini uyarır.

Nonspesifik inflamasyona ek olarak spesifik, hücresel immün cevap da BCG tedavisinin antitümör etkisinde rol oynar. BCG tedavisinin antitümör etkisi, CD4 ve CD8 pozitif T hücre aktivasyonuna bağlıdır (6, 7, 53, 54). Bu nedenle immün kontrol noktası regülasyonuna bağlı olarak gerçekleşen T hücre baskılanmasının, BCG

tedavisinin etkisini azaltan faktörlerden biri olabileceği hipotezi akla gelmektedir (6, 7).

2.4. Mesanede İnflamatuar Mikroçevre

Solid tümörlerde görülen kronik inflammatuar mikroçevre, hem tümör alanlarında hem de stromada proinflammatuar hücrelerin (makrofajlar, myeloid türevli baskılayıcı hücreler, Treg hücreler, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller ve lenfositler gibi) ve sitokinlerin (TNF-a gibi) varlığı ile karakterizedir (55).

İmmün yanıt, tümörlerin gelişiminde, malign hücreler ve mikroçevre arasında karmaşık ve dinamik etkileşimler meydana gelmesinde büyük rol oynar. Tümörü infiltre eden lökositlerin prognozu etkilediği, çeşitli neoplastik hastalıklarda tedaviye yanıt ve metastatik yayılım açısından olumlu prognostik etkisinin olduğu gösterilmiştir. İmmün ortamdaki elementlerin bazıları, anti-tümör aktivitesine yanıtı düzenleyen ve yönlendiren immünoterapi için hedef haline gelmektedir. Prostat, mesane ve böbrek tümörlerinde, konak immünolojik yanıt yeterliliği ile bazı klinik patolojik parametreler (histotip, evre ve prognoz) arasındaki ilişkiler ve bunların tedavi yanıtına etkileri 1978 yılından bu yana değerlendirilmektedir (56).

Tümör İnfilte Eden Lenfositler (TİL)

Tümör infiltre eden lenfositler (TİL), tümörün immün mikroçevresini etkileyen hayati bir bileşendir. Ayrıca, TİL yoğunluğunun, PD-L1'in ifadesinde artış ve klinik yararlar ilişkili olduğu doğrulanmıştır (4).

TİL'in mesane karsinomundaki klinik rolü, hastalığın çeşitli evrelerinde iyi veya kötü sonuçlarla ilişkilendirildiğinden tartışmalıdır. 1988'de yayınlanan bir çalışmada, TİL varlığı araştırılmış, akım sitometri analizinde, TİL'in çoğunlukla T lenfositler, ardından NK ve B hücrelerinden oluştuğu gösterilmiştir (56).

BCG tedavisi alan yüzeyel mesane karsinomu vakalarında TİL varlığı ve BCG tedavisine yanıt arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada TİL'lerin esas olarak T helper lenfositlerden (CD4 +) oluştuğu, CD4 / CD8 oranının 1'den büyük olduğun ve B hücrelerin daha az bulunduğu saptanmış, TİL ile BCG tedavisi yanıtı açısından bir ilişki bulunmadığı sonucuna varılmıştır (57).

Tümörler, TİL açısından 4 tipte sınıflandırılır. Tip I (PD-L1 + TIL +) tümörünün PD-1/PD-L1 blokaj tedavisine yanıt verme olasılığı yüksektir. Bununla birlikte, Tip III (PD-L1+ TIL-) tümörler, PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin monoterapisine karşı direnç gösterirken, PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin adjuvan tedavilerle kombinasyonu T hücresini tümör yatağına alarak, direnci tersine çevirmede yardımcı olabilir (4). TİL'ler üzerindeki PD-L1 ekspresyonunun, metastatik hastalık gelişen ve sisplatin bazlı kemoterapi alan ürotelyal karsinom hastalarında genel sağkalım ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (58).

Ürotelyal karsinomada prognostik bir belirteç olarak TİL'i araştıran çalışmalarda, tanımlamalarda ve kullanılan puanlama metodolojilerinde farklılıklar mevcuttur. Bu tutarsızlıklar çalışmalar arasında karşılaştırma yapılmasını ve bulguların klinik ortamlara yansıtılmasını engellemektedir. H&E'de değerlendirilen TİL'lerin potansiyel prognostik değerini araştıran büyük çalışmalara ihtiyaç vardır (58).

Düzenleyici T (Treg) Hücreler

Düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), CD4 pozitif T lenfosit ailesinden FOXP3 ifade eden hücre grubudur. İnflamasyonun patogeneğinde, kanser ve çeşitli otoimmün hastalıklarda, konakçı immün yanıtının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Halen, birçok çalışma Treg'lerin antitümör immün yanıtlarını baskılayarak veya inflamatuvar sitokinleri eksprese ederek kanser progresyonuna katkı sağlayabileceği fikrini desteklemektedir. Treg hücreler IL-10 ve TGF- β gibi immün sistemi baskılayıcı sitokinler salgılar.

Mesane kanserinde, T hücrelerinde S1PR1 sinyalleri, JAK / STAT3 aktivasyonu ile tümörlerde Treg birikimini hızlandırabilir ve bu da tümörün büyümesini teşvik eder (55). Bununla birlikte, bazı çalışmalar Treg'lerin mesane ürotelyal karsinomu dahil olmak üzere çeşitli tümör varlıkları üzerindeki paradoksal bir pozitif prognostik etkisi olduğunu göstermektedir.

Makrofajlar

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), M1 ve M2 olarak sınıflandırılan farklı polarizasyon durumlarına bağlı olarak mesane karsinomunda ikili rol oynarlar. M1

makrofajları tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interferon- γ (IF- γ), IL-1 β , IL-6, IL-23, lipopolisakarit (LPS) ile indüklenebilir ve mesane kanserinin başlatılması ve / veya ilerlemesinin inhibisyonundan sorumludur. M2 makrofajlar ise temel olarak IL-4, IL-10, IL-13 veya TGF- β tarafından aktive edilir ve kanser hücrelerinin proliferasyonunun, göçünün, invazyonunun, metastazın uyarılması ve anti-tümör immün yanıtın baskılanması ile ilişkilidir (55).

TAM'nin mesane karsinomu oluşumunda ve gelişimindeki rolüne ilişkin doğrudan kanıtlar yakın zamanda bildirilmiştir. Streptococcus türevli bir antikanser immünoterapötik ajan olan OK-432'nin, mesane kanserlerinde M1'i indükleyerek sitokinlerin salgılamasını sağlayıp, hücre proliferasyonunu ve metastaz gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (59). M2'lerin baskın olduğu stromaya sahip mesane karsinomalarında, BCG tedavisinde başarısızlık gelişmesinin sebebinin M2'nin immün baskılayıcı etkisi olduğu düşünülmektedir (55).

Myeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler

Myeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) kemik iliğinden veya periferik lenfoid organlardan kaynaklanır. MDSC'lerin varlığı birçok tümör tipinde hastalığın ilerlemesi ve azalmış sağkalım ile ilişkilidir.

Mesane karsinomları, yüksek oranda immünojenik bir malignitedir ve MDSC'lerin, mesane karsinom hücresi ile ilişkili immün baskılamının kritik mediatörleri olduğu gösterilmiştir. Mesane kanseri dokuları spontan olarak, kötü prognozu ile ilişkili olan MDSC'leri çeken CXCL8 (IL-8) ve CCL22'yi üretir. MDSC'ler, güçlü T hücre baskılayıcıdır ve mesane karsinomu hastalarında cinsiyet, tümör boyutu, tümör sayısı ve hastalık ilerlemesi ile ilişkilidir (55).

Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler, antijen sunan hücrelerdir. Bu nedenle hem antijene özgü bağışıklığın uyarılmasında hem de toleransın korunmasında önemli bir rol oynarlar. Myeloid dendritik hücrelerin sayısında azalma ve monosit kaynaklı dendritik hücrelerin fonksiyonunda bozulma, mesanenin yüzeyel ürotelyal karsinomunun çoğalması ile yakından ilişkilidir. Tümör infiltre eden dendritik hücreler, T hücrelerini uyarmak için anormal bir fenotip ve bozulmuş fonksiyon gösterirler. Çok

sayıda çalışma, tümör infiltre eden dendritik hücrelerin, antitümör immün yanıtlarını baskılayarak immün sistemden tümörün kaçmasına katkıda bulunduğunu, dolayısıyla tümör gelişimini desteklediğini göstermiştir (55).

Yüksek oranda CD83 (+) olgun tümör infiltre eden dendritik hücrelerin bulunması, kas-invaziv mesane karsinomu riski artışı ile ilişkili bulunmuştur (60). Buna karşılık, Xiang ve ark. tümör infiltre eden dendritik hücrelerin mesane ürotelyal karsinomunda malignite ve prognoz derecesi ile ters korelasyon gösterdiğini ve tümör infiltre eden dendritik hücreler sayısındaki azalmanın, tümör immün kaçışı ve immün toleransı ile önemli bir ilişkiye sahip olabileceğini bildirmiştir (61).

Mast Hücreleri

Mast hücreleri, kanser de dahil olmak üzere çeşitli inflamasyon ilişkili hastalıklarda önemli bir rol oynadığı bilinen güçlü proinflamatuvar hücreler arasındadır. Birkaç klinik çalışma, mast hücrelerinin, mesane kanserinin ilerlemesini etkileyebileceğini öne sürmektedir.

Tümör içindeki ve etrafındaki mast hücrelerinin sayısı mesane karsinomu olan hastalarda iyi bir prognostik gösterge olabilir. Mast hücrelerinin yoğunluğu, düşük dereceli ürotelyal karsinomalarda, yüksek dereceli ürotelyal karsinomalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Mesane karsinomunda c-kit pozitif mast hücreleri tümör anjiogenezi ve tümör invazyonunda önemli rol oynar (55).

2.5. İmmün Kontrol Noktaları

T hücrelerinin birincil rolü, T hücrelerinin yüzeyindeki çeşitli reseptörlerin aktivasyonu veya devre dışı bırakılması yoluyla, sağlıklı hücreleri patojenlerden veya malign hücrelerden ayırt etmektir (62). Bu işlem immün düzenleyici olarak adlandırılır ve kontrol noktası inhibisyonunun anlaşılması için kritik öneme sahiptir. İmmün düzenleme üç temel bileşen içerir: eliminasyon, denge ve kaçış. Genomik mutasyonların gerçekleşmesi sonucu malign transformasyona uğrayan hücreler, MHC-I yoluyla hücre yüzeylerinde tümörle ilişkili neoantijenleri sunar, böylece bağışıklık sisteminin klasik aktivasyonu gerçekleşir, "kendisine ait-olmayan" ve hedef olan hücreler tanınır (63).

T hücre aracılıklı bağışıklık sistemi antijen spesifik hücrelerin klonal seçilimi, aktivasyonu, proliferasyonu, fonksiyonel olma gibi birçok adım içerir. Her bir aşama, uyarıcı ve baskılayıcı sinyaller arasındaki denge ile düzenlenir. İmmün kontrol noktaları ise fizyolojik olarak inhibitör yolaklardandır. Diğer bir deyişle immün kontrol noktaları, immün yanıtı durdurabilen normal bağışıklık sinyalleridir (64).

İnaktif formdaki T hücrelerinin yüzeyinde immün kontrol noktası reseptörlerinin (ILT2 hariç) büyük kısmı yoktur. T hücre aktivasyonu, antijen sunan hücre/tümör hücresi üzerindeki MHC I/II ile T hücre reseptörünün ve B7 ile CD28'in bağlanması ile başlar. Bu bağlanma, proliferasyona, sitokinlerin salınımının uyarılmasına ve T hücrelerinin fonksiyon kazanmasına yol açar. Aktive olan T hücreleri immün kontrol noktası reseptörlerini ifade etmeye başlar (64).

Programlanmış hücre ölümü proteini 1 reseptörü (PD-1/CD279) reseptörü, ilk olarak 1999'da Dong ve ark. tarafından tanımlanmıştır (65, 66). PD-1, aktif T hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen, 2. kromozom üzerindeki PDCD1 geni tarafından kodlanan, 288 aminoasitlik tip I transmembran proteinidir. Fizyolojik şartlarda myeloid hücreler ve lenfositler tarafından ifade edilir. PD-1 ekstrasellüler IgV benzeri domain ve transmembran domaininden oluşur (66, 67). PD1'in PD-L1 (B7-H1 veya CD274) ve PD-L2 olmak üzere iki temel ligandı mevcuttur.

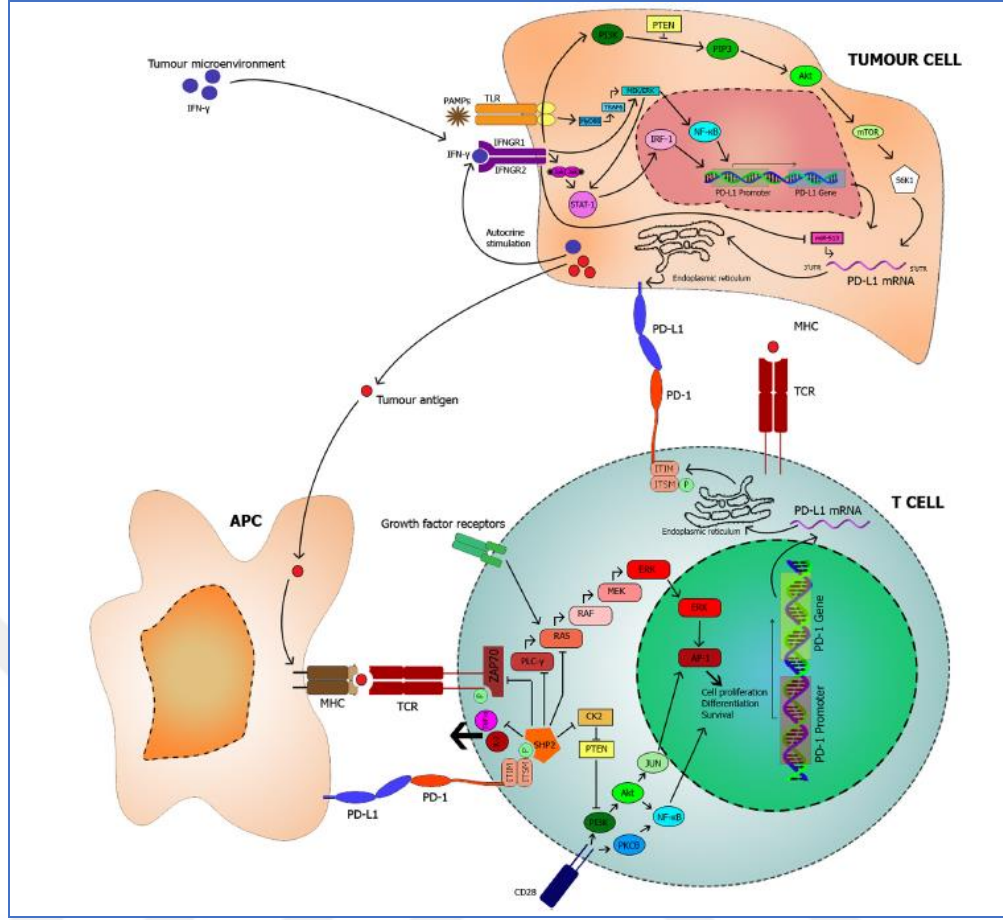
PD-1, dinlenme halindeki naif T hücrelerinin yanı sıra, gelişmekte olan timositlerin bazılarında bazal seviyelerde ifade edilir. Bu düşük seviye, bağışıklık toleransı ile ilişkilendirilmiştir. Bir immün uyarımının ardından, PD-1, CD4 ve CD8 (+) T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere birçok immün hücre tipinde geçici olarak eksprese edilir. PD-1, akut olarak antijene maruz kalma durumunda, antijen klirensi ile eşzamanlı olarak "down" regüle edilir. Kronik immün stimülasyon sırasında ise PD-1, yüksek düzeyde ekspresyonda kalır ve bu durum, fonksiyonel tükenmeye neden olabilir. Ek olarak, yüksek PD-1 ekspresyonu, düzenleyici T hücresi (Treg) gelişimi için gereklidir ve foliküler helper T hücreleri yüksek PD-1'i yapısal olarak ifade eder. (67).

PD-L1(B7-H1), kromozom 9 üzerinde bulunan PDCDL1 geni tarafından kodlanan 290 aminoasitlik tip I transmembran proteindir. IgV ve IgC benzeri

ekstrasellüler domain, hidrofobik transmembran domain ve 30 aminoasitlik kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşur.

PD-L1, T ve B hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar, mezenkimal kök hücreleri, langerhans hücreleri, mast hücrelerinde ifade edilir. İnflamasyona durumunda hematopoetik, endotelial ve epitelyal hücreleri baskılayıcı sinyal üretir. PD-L1, plasenta, testis ve gözün ön kamerası gibi bazı dokulara, ekzojen antijenlerin, inflamatuvar / immün yanıtın indüklenmesi olmadan tolere edildiği "immün ayrıcalıklı" statüsü verir.

PD-L1 ekspresyonu öncelikle, APC'lerde yüksek oranda eksprese edilen ve patojene bağlı moleküller tarafından aktive edilen "toll" benzeri reseptörlerden etkilenir. Toll benzeri reseptör aracılı PD-L1 düzenlemesi, nükleer faktör kappa B yoluyla PD-L1 mRNA transkripsiyonunu artıran MEK/ERK kinazlarının aktivasyonuna dayanır. PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesinde, Interferon- γ (IFN- γ) 1 ve 2 reseptörlerinin dahil olmasıyla, büyük ölçüde IRF-1'in Jak/STAT aracılı aktivasyonu rol alır. MEK / ERK ve fosfatidil-inositol 3 kinaz (PI3K)/AKT yolu ile Jak/STAT'ın interferon aracılı aktivasyonu tarafından PD-L1 ekspresyonu arttırılabilir. Antijen sunan hücreler ve tümör hücrelerinde ifade edilen PD-L1'in PD-1'e bağlanması sonucunda, T hücrelerinde Ras-Raf-MEK-ERK ve PI3K-AKT yolağı inhibe olur. Böylece T hücre reseptör aracılıklı immün sistem ve CD8 pozitif T lenfositlerin proliferasyonu baskılanır (şekil 3) (66). Bu mekanizma fizyolojik şartlar altında doku hasarına yol açacak aşırı immün reaksiyondan ve otoimmüniteden korunmayı sağlamaktadır.



Şekil 3: PD-L1 ve Hücre İçi Sinyal Yolakları (66)

Malignte durumunda tümör hücreleri immün sistemden kaçabilmek için PD-L1 ifade ederler ve karsinogeneziste, sürücü onkojenik mutasyonlar sonucu PD-L1 ifadesinde artış görülebilir. Akciğerde EGFR mutasyonu ile PD-L1 ifadesi arasında korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. PTEN-mutant tümörlerde, PD-L1 ifadesinde artış, PI3K / AKT yolağının aktivasyonu ile sağlanır (4, 66). PD-L1 ifadesi tümör mikroçevresinde salınan IFN- γ ve TNF- α tarafından da arttırılabilir. Tümör hücrelerinde veya TİL'de PD-L1 ifadesinde artış, T hücre yanıtının tükenmesine yol açar. Tümör spesifik immün yanıtın zayıflaması sonucunda tümör progresyonu gerçekleşir (4). Bu bilgiden yola çıkılarak geliştirilen immün kontrol noktası inhibitörleri, PD-1 ve PD-L1 etkileşimini inhibe ederek tümöre karşı gelişen T hücre yanıtının yeniden aktifleşmesini sağlar (5).

Mesane kanserlerindeki PD-L1 ifadesini araştıran çalışmalar mevcuttur. Nakanishi ve ark. PD-L1 ekspresyonu ile yüksek grade ve kötü sağ kalım arasında korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir (68). PD-L1'in mesane kanserlerinde ileri tümör evresi ile ilişkili olduğu ve organla sınırlı hastalarda mortalite için bağımsız prediktör faktör olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (69).

Inman ve arkadaşlarının çalıştığı seride, PD-L1 ifadesinin dereceden bağımsız olarak lokal tümör evre progresyonunun prediktif belirteci olduğu ve BCG tedavisine yanıt alınamayan vakalarda immün sistemden kaçışta PD-L1 ifadesinde artışın rol oynuyor olabileceği öne sürülmüştür (70). Son dönemde yapılan bir çalışmada BCG refrakter kas invaziv olmayan ürotelyal karsinoma hastalarda PD-L1 ekspresyonunun BCG tedavisi sonrası arttığı gösterilmiştir (71). Öte yandan, Hurwitz ve arkadaşları PD-L1 ifadesinin rekürrens ile artış gösterdiği, ancak BCG tedavisi ile ilişkisiz olduğu sonucuna varmışlardır (72). Ayrıca başka bir çalışmada artmış PD-L1 ifadesi bulunduran tümörlerde daha az rekürrens görüldüğü, ancak BCG tedavisi ile PD-L1 ifadesinin ilişkisiz olduğu bildirilmiştir. Ayrıca peritümöral lenfositlerde yüksek PD-L1 ifadesinin tümör evre progresyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (73).

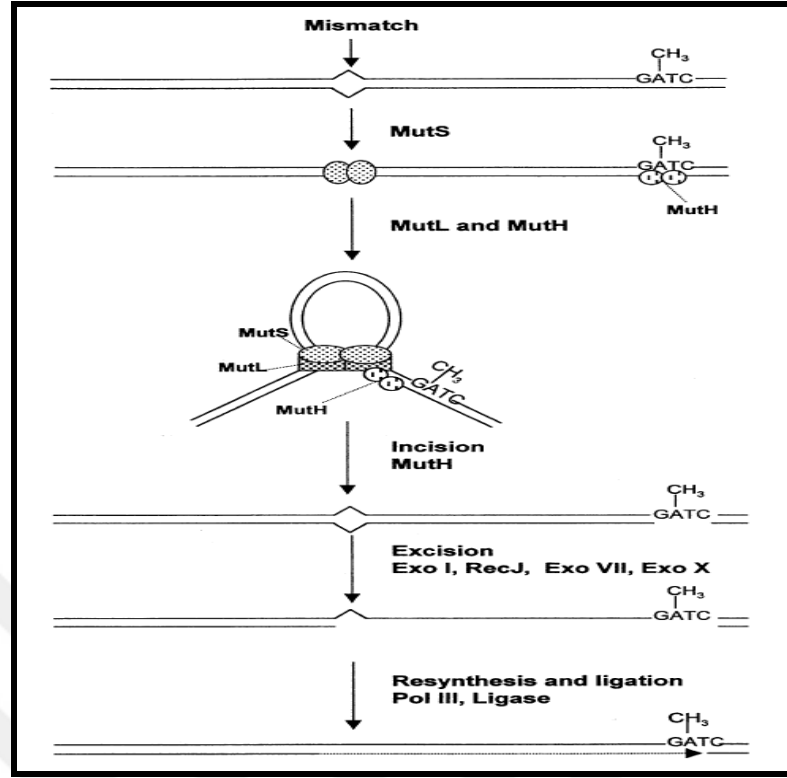
PD-L1 ifadesini immünohistokimyasal olarak değerlendirmede, kullanılan antikör klonuna göre değerlendirme yöntemi ve eşik değeri farklılık göstermektedir (74). Ürotelyal karsinomalarda PD-L1 ifadesini araştıran çalışmalarda kullanılan PD-L1 klonlarının ve değerlendirme yöntemlerinin farklılığı nedeniyle kabul edilen eşik değerlerde de çeşitlilik bulunmaktadır (50, 68, 71, 75). Mesane karsinomalarının tedavisinde kullanılan immün kontrol noktası inhibitörlerinden birisi olan Durvalumab'ın klinik olarak uygulanabilirliğinde değerlendirilen ve bizim de çalışmamızda immünohistokimya boyamalarında kullanacağımız PD-L1 klonu SP263'tür. PD-L1 (SP263) için "*Food and Drug Administration (FDA)*" tarafından belirlenen eşik değer, tümör hücrelerinin veya tümör infiltre eden mononükleer hücrelerin %25'inden fazlasında membranöz boyanmanın görülmesi şeklinde belirtilmiş, tümör infiltre eden mononükleer hücre oranının %1 olması durumunda ise immün hücrelerindeki pozitiflik eşiği %100 olarak belirlenmiştir (10, 76).

2.6. Mikrosatellit İnstabilitesi

2.6.1. “Mismatch” Tamir sistemi

DNA replikasyonu sırasında DNA polimerazın yeni sentezlenen zincire yaklaşık 10.000.000 bazda 1 yanlış nükleotid ekleme riski vardır. Bu çok düşük hata oranlarına rağmen, hücresel işlevi bozmak için yeterli hatalar birikebilir. Bu riske karşı prokaryot ve ökaryotlarda benzer sistem üzerinden işleyen “mismatch” tamir sistemi (MMR) bulunmaktadır. Bu sistemin proteinleri ilk defa prokaryotlarda tanımlanmış ve MutS, MutH, MutL olarak isimlendirilmiştir. Temel olarak yanlış eşleşmiş nükleotidin tanınması, hangi zincirin yeni zincir olduğunun anlaşılması ve hatalı bölgenin çıkarılarak yeniden sentezlenmesi MMR proteinlerinin görevleridir (77, 78).

E. Coli’de MutS proteini yanlış eşleşmiş nükleotidleri tanır ve onlara bağlanır. Bu bağlanma MutL proteini ile MutS arasındaki iletişimi sağlar. Kalıp DNA zinciri ile yeni sentezlenmiş DNA zinciri ayrımını GATC sekansında adenin metilasyonunun tanınması sağlar. Yeni sentezlenmiş zincir kesik kesik ve metillenmemiş iken, kalıp zincir metillenmiştir. MutH, yeni sentezlenmiş olan hemimetile GATC sekansını kesebilen bir endonükleazdır. MutL, “hemimetile” olan GATC sekansına bağlı MutH’nin bulunduğu alana ulaşır ve ATP-bağımlı translokasyonu uyarır. MutH metillenmemiş DNA’yı parçalar ve ekzonükleazların hatalı sekansı uzaklaştırmasını sağlar. Hatalı sekansın uzaklaştırılmasında MMR sisteminde en az 4 ekzonükleaz (recJ, ExoVII, ExoI, ExoX) katılmaktadır. Ayrılan hatalı bölümler daha sonra DNA polimeraz III ile tekrar sentez edilir (şekil 4) (77, 78).



Şekil 4: E. Coli'deki DNA MMR sistem (77)

İnsanlarda MMR proteinleri MutS homolog (MSH), MutL homolog (MLH) olarak sınıflandırılmaktadır: 5 adet MSH (hMSH2-hMSH6) ve 4 adet MLH (hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2). MMR proteinlerinin tamamı DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hataları düzeltme işlevi görmese de temel olarak hepsi DNA dizisinin kalitesinin korunmasıyla ilgilenmektedir. Bazıları, organeller ile ilgili DNA'nın genetik bütünlüğünü koruma işlevi görürken, bazıları mayoz sonrası rekombinasyon olaylarından kaynaklanan hataları düzeltmekle görevlidir (78).

İnsan DNA MMR sisteminin MSH2/MSH6 ve PMS2/MLH1 olmak üzere 2 temel heterodimeri bulunmaktadır. MSH2; kromozom 2p21-22'de yerleşimlidir, 15 ekzondan oluşur ve 934 aminoasid kodlar, MSH6 ise kromozom 2p16'da yerleşimli, 11 ekzondan oluşan, 1360 aminoasid kodlayan gendir. MSH2, MSH6'nın yokluğunda MSH3 ile eşleşmektedir. MLH1; kromozom 3p21.3'te yerleşimlidir, 19 ekzondan oluşur, 756 aminoasid kodlar, PMS2 ise kromozom 7p22'de yerleşimli, 14

ekzondan oluşan, 862 aminoasid kodlayan gendir. MLH1-PMS2 heterodimerinde MLH1 major, PMS2 minör komponenti oluşturmaktadır. MLH1, PMS2'nin yokluğunda PMS1 ile eşleşmektedir (77).

MSH (hMSH2-hMSH6) dimerlerinin tek baz çiftleşme hatalarına ve tek bazlık insersiyon/delesyon alanlarına yüksek afiniteleri bulunmaktadır. hMSH2 ve hMSH3 heterodimerleri hem tek bazlık insersiyon/delesyonları hem de daha büyük insersiyon/delesyonları tanıyabilir. MSH proteinleri ATP (adenozin-trifosfat) bağlayıcı alan ve intrinsek ATPaz aktivitesi bulundurmaktadır. İnaktif durumda MSH dimerleri ADP (adenozin-difosfat)'ye bağlı konumdadır ve DNA hatalarına karşı afiniteleri yüksektir. DNA replikasyonu sırasında hata oluştuğunda, MSH dimerleri hatalı DNA alanına bağlanır ve ADP'nin ATP'ye dönüşümünü sağlar. ADP/ATP dönüşümü, MSH dimerinin kayma kısıkaçı haline gelmesini ve hatalı alana yönelmesini sağlamaktadır. ATP hidrolizi ile MSH dimeri DNA'dan ayrılır ve yanlış eşleşme olduğunda saptamak için hazır olmak üzere inaktif formuna geri döner (78).

MLH heterodimerlerinin fonksiyonu, yanlış eşleşmeyi tanıyan MSH komplekslerinin yer aldığı DNA tamirinde diğer proteinlerin olaya katılmasını sağlamaktır. Bu proteinlerin yer aldıkları görevler hatalı zincirin tanınması, hatanın çıkarılması ve düzeltilmesidir. Endonükleaz aktivitesi bulunan MED1 ile kalıp zincirin belirlenmesinde görev alan PCNA ("proliferating cell nuclear antigen") bu proteinler arasında yer almaktadır (78).

2.6.2. Mikrosatellit bölgeleri ve İnstabilitesi

Mikrosatellit bölgeleri ilk olarak 1970'lerin başında prokaryotlarda tanımlanmıştır. Mikrosatellitler veya "short tandem repeat", insan genomu boyunca kodlanan ve kodlanmayan gen bölgeleri arasında serpiştirilmiş şekilde dağılım gösteren, 1-6 baz arasında, 60-100 kez tekrar eden, çift olarak aynı uzunlukta olan DNA dizileridir. Tekrarlar 10 bazdan uzun ise "minisatellit" olarak isimlendirilmektedir. DNA replikasyonu sırasında mikrosatellit allellerinin insersiyon veya delesyon ile uzunluğu değişebilmekte, ortaya çıkan hatalar normal koşullarda DNA "mismatch" onarım genleri (MMR) tarafından düzeltilmektedir. DNA "mismatch" onarım sisteminde defekt olduğunda ilk yanlış eşleşmeler

mikrosatellit adı verilen tekrar dizilerinde olur. Böylece kodlanan genin ekzonunda oluşan tekrarlayan nükleotid dizileri tamir edilemez, mutasyonlar meydana gelir ve bunun sonucunda mikrosatellit instabilitesi (MSI) gelişir. MMR defekti düşünülen hücrelerde ilk bakılması gereken bölgeler mikrosatellitlerdir. En sık etkilenen gen bölgeleri ise TGFBR2, ACVR2A, TCF4, IGF2R, BAX, MSH6 ve MSH3'tür.

Lynch sendromlu hastalarda MMR genlerinden birinde germline mutasyonu bulunmaktadır. Ancak hastalık oluşması için diğer allelin de mutasyona uğraması veya heterozigosite kaybının (LOH) gerçekleşmesi gerekir. Sporadik olan olgularda ise en sık olarak; MLH1 promotor bölgesinde biallelik metilasyon ve MSH2 genine komşu EPCAM geninde görülen delesyonların MSH2 transkripsiyonunu engellemesi gibi epigenetik mekanizmalar MSI gelişimine neden olur. MSI kanserler mikrosatellit stabil kanserlere göre 100-1000 kat daha fazla artmış "missense" mutasyonlar ile ilişkilidir (8, 78).

Literatüre bakıldığında MSI durumunu saptamada PCR bazlı fragman analizi yöntemi altın standart olarak kabul edilmekte, fragman analizi sonuçları ile uyumluluğu yüksek bulunan immünohistokimya yöntemi ise uygulama kolaylığı ve ulaşılabilirliği açısından birinci sırada önerilen, ancak belli durumlarda fragman analizi ile doğrulanması gereken bir yöntemdir (9, 79).

Kolorektal karsinomalarda MSI / DNA MMR defekti saptanmasında PCR tabanlı DNA fragman analizi ve immünohistokimya yöntemlerini karşılaştıran bir çalışmada, MSI-H saptanmasında immünohistokimyanın sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %81,08 ve %92,67 olarak belirtilmiştir. PCR metodu altın standart olarak kabul edildiğinde immünohistokimyanın pozitif prediktif değeri %43,48, negatif prediktif değeri ise %98,6 olarak belirtilmiştir. İki metodun birlikte kullanıldığı durumda uyumluluk %91,92 olarak saptanmıştır (kappa=0.526) (80).

DNA MMR defektinin immünohistokimya yöntemiyle değerlendirilmesine ilişkin bulguların büyük oranda kolorektal karsinomalarda yapılmış, özellikle de Lynch sendromlu vakaların tayinine yönelik araştırma sonuçlarını içerdiği görülmektedir. Bunlarda MLH-1, MSH-2, PMS2 ve MSH6 proteinlerinden herhangi biri ile total ekspresyon kaybının MMR defektif vakaları gösterdiği, bu proteinlerden biri ile fokal de olsa ikna edici bir nükleer pozitiflik olmasının ise DNA MMR intakt

vakaları belirlediği belirtilmektedir (81-83). Mesane ürotelyal karsinomlarında yapılmış birkaç çalışmada ise total ekspresyon kaybı veya belli bir eşik değerin altındaki (çalışmalar arasında %20 veya %30 olarak değişmektedir) boyanmalar “ekspresyon azalması” kabul edilerek aynı kategoride ele alınmış, bu eşik değerin üstünde boyanma gösteren vakalar ise “kayıp yok” kabul edilmiştir (84, 85).

Mikrosatellit analiz yöntemi, hedef mikrosatellit bölgelerinin PCR ile çoğaltılarak, elektroforez yöntemiyle uzunluk farklarının kıyaslanmasına dayanır ve bu karşılaştırma her hastanın kendi normal dokusu ve tümör dokusu arasında yapılır. “American National Cancer Institute (NCI)”, kolorektal kanserlerde MSI testi için BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 ve D17S2505 (Bethesda paneli) olmak üzere 5 mikrosatellit bölgesi tanımlamıştır. Son zamanlarda 5 poli-A mononükleotid (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27) tekrarlarından oluşan promega panelinin Bethesda panelinden daha spesifik ve sensitif olduğu bildirilmiştir (86, 87). Tümör DNA’sında bu 5 bölgeden 2 veya daha fazlasında instabilite saptanması durumu yüksek MSI (MSI-H), bir bölgede instabilite saptanması durumu ise düşük MSI (MSI-L) olarak tanımlanmıştır. Bu 5 bölgede instabilite saptanmadığında tümör mikrosatellit stabil (MSS) olarak kabul edilmektedir (9). Cortes-Ciriano ve arkadaşları, ürotelyal karsinoma vakalarında MSI sıklığını %0.8 oranında bildirmiştir (88).

Birçok kanser tipinde, DNA “mismatch” onarım sistemindeki defekt sonucunda ortaya çıkan mikrosatellit instabilitesi durumunda immün kontrol noktasını hedef alan tedavinin daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu ilişki mikrosatellit instabilitesinin tümörlerde artmış tümör mutasyon yükü sonucu ortaya çıkan neopeptitlere yanıt olarak artmış lenfositlerle açıklanmaktadır (8, 89). MSI-H kolorektal kanserler, MSS kolorektal kanserler ile karşılaştırıldığında, yüksek oranda CD8 + T hücresi infiltrasyonu bulundurulur. Bu aktif immün fenotipe sahip MSI-H kolon tümörleri ayrıca PD1, PD-L1, CTLA4, Lenfosit aktive edici 3 (LAG3) ve interferon- γ (IFN γ) dahil olmak üzere yüksek seviyelerde çoklu immün kontrol noktası moleküllerini ifade ederler. Bu bulgular, MSI-H tümörlerin hem genomik özelliklerinin hem de mikroçevrelerinin immünoterapiye yüksek cevap oranlarına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (89).

Mikrosatellit instabilitesi saptanan tümörlerde immün kontrol nokta inhibitör tedavisi uygulanması “*Food and Drug Administration (FDA)*” tarafından da onaylanmış bir tedavi yaklaşımıdır (9). Bu tedavi yöntemi ilerlemiş ürotelyal karsinoma için yakın dönemde tedavi seçeneği haline gelmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Olgu Seçimi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ve Tıbbi Patoloji AD'da, 2005-2018 yılları arasında, muskularis propria invazyonu göstermeyen (Ta, T1), yüksek dereceli ürotelyal karsinoma tanısı alıp, intravezikal BCG tedavisi uygulanmış hastalardan, Avrupa Üroloji Derneğinin 2018 tedavi rehberine göre (bakınız sayfa 33) BCG refrakter kabul edilmiş 29 hasta ve BCG tedavisine yanıt alınmış 30 hasta olmak üzere 59 hasta çalışma grubunu oluşturmaktadır (52).

BCG refrakter olan hasta grubunda BCG tedavisi öncesinde alınmış biyopsileri ile BCG tedavisine yanıtız kabul edildikleri nüks / progresyon biyopsileri; BCG'ye yanıt alınan hasta grubunda ise tanı biyopsileri değerlendirmeye alınmıştır. Ancak BCG refrakter kabul edilen 29 hastanın 2'sinde nüks/progresyon biyopsilerine ait parafin bloklara ulaşamadığı için sadece BCG tedavisi öncesi biyopsileri üzerinde değerlendirme yapılabilmekmiştir.

H-E boyalı kesitlerine patoloji arşivinden ulaşarak, tümör tipi, histolojik derece (düşük, yüksek), nükleer pleomorfizm derecesi (hafif, belirgin), invazyon yaygınlığı (1 odak: fokal, 1'den fazla odak: multifokal), en büyük invazyon odağı uzun çapı (<2mm, ≥2mm), lamina propria invazyon derinliği (yüzeyel l.propria, derin l. propria), eşlik eden varyant, skuamöz diferansiyasyon ve karsinoma in situ durumu ile tümör ilişkili inflamatuvar hücre (TİİH) oranı açısından yeniden değerlendirilmiştir. Tümör derecelendirmesi ve tiplendirmesine DSÖ 2016 sınıflamasına göre karar verilmiştir. H-E kesitlerde tümörü en iyi temsil eden parafin bloklar belirlenmiştir.

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Belirlenmiş olan parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitlerde MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 ve PD-L1 (SP263) antikorları kullanılarak boyamalar gerçekleştirilmiştir. Boyamalar Ventana otomatik boyama cihazında (Roche-Ventana), Ventana Optiview ve Ultraview DAB kitleri kullanılarak yapılmıştır. Pozitif dış kontrol olarak MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 için kolon ve PD-L1 (SP263) için plasenta dokuları kullanılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5: Çalışmamızda kullanılan immünohistokimyasal antikorlar

Antikor	Antijen açığa çıkarma yöntemi/süre	Kullanılan Kit	Antikor inkübasyon süresi	Klon	Dış Kontrol	Tedarikçi
PD-L1	EDTA/60'	Optiview DAB	120'	SP263	Plasenta	Ventana
MSH2	EDTA/60'	Ultraview DAB	40'	G219-1129	Kolon	Cell Marque
MSH6	EDTA/90'	Ultraview DAB	56'	44	Kolon	Ventana
PMS2	EDTA/60'	Optiview DAB	60'	EPR3947	Kolon	Cell Marque
MLH1	EDTA/60'	Ultraview DAB	48'	M1	Kolon	Ventana

3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimya boyalı preparatlar daha önce Tıbbi Patoloji AD'na BAP altyapı projesi (proje no:14A0230003) kapsamında alınmış olan “3DHistech Panoramic 250 Flash” dijital tarayıcıda taranmış ve immünohistokimyasal değerlendirme dijital görüntüler üzerinde yapılmıştır.

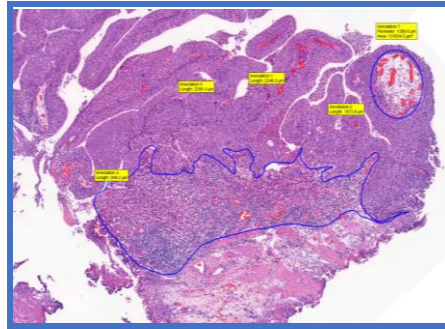
3.3.1. PD-L1 (SP263):

PD-L1(SP263) boyalı kesitler değerlendirilmeden önce H&E boyalı kesitler taranarak tümör alanları ve tümör ilişkili inflamatuvar hücre (TİİH) oranı (%0, %1, %5, %10, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70, %75, %80, %90, %100 şeklinde) belirlenmiştir. TİİH oranını belirlemek için infiltratif tümörlerde tümörü infiltre eden ve tümöre komşu dar stromadaki inflamatuvar hücreler; papiller ürotelyal karsinom olgularında ise fibrovasküler kor içindeki, tümör tabanına bitişik ve tümörü infiltre eden inflamatuvar hücreler değerlendirmeye alınmıştır (90) (resim 10). TİİH yüzdeleri belirlendikten sonra yüzdelerine göre (Grup 1: $\leq$ %5, Grup 2: %10, Grup 3: $\geq$ %20) gruplandırılmıştır.

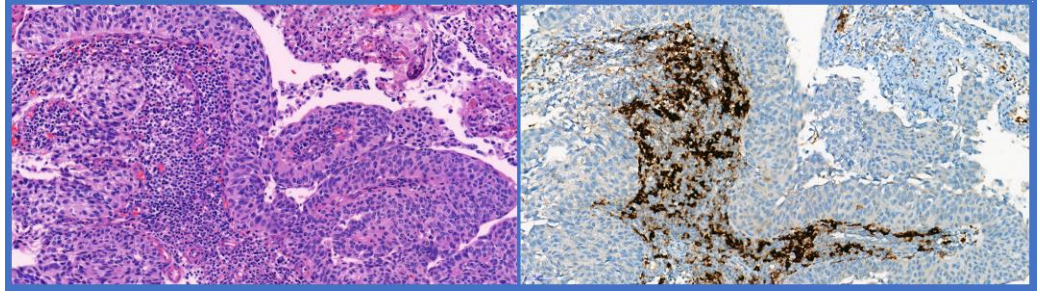
TİİH'lerdeki PD-L1 boyanma oranı (%0, %10, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70, %75, %80, %90, %100 şeklinde) belirlenmiştir. Literatürde belirtildiği gibi TİİH oranı %1'den fazla olduğunda boyanma şiddetinden bağımsız olarak, %25'in üzerinde tümör hücrelerinde membranöz veya TİİH'de membranöz/sitoplazmik/granüler boyanma; TİİH oranı $\leq$ %1 olduğunda ise TİİH'de %100 oranında membranöz/sitoplazmik/granüler boyanma veya tümör hücrelerinde %25'in üzerinde membranöz boyanma görülmesi halinde yüksek PD-L1 ifadesi (resim 11), bunun dışındaki durumlarda düşük PD-L1 ifadesi veya negatif olarak sınıflandırılmıştır (resim 12, 13) (90-93).

Ayrıca TİİH oranından bağımsız olarak yapılan değerlendirmede PD-L1 ile pozitif boyanma oranlarına göre TİİH ve tümör hücreleri (Grup 1: <%20, Grup 2: $\geq$ %20, <%50, Grup 3: $\geq$ %50) gruplandırılmıştır. Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma, intravasküler inflamatuvar hücrelerdeki ve normal lenfoid dokudaki PD-L1 boyanması ile nekroz alanları ve koter artefaktı bulunan alanlar değerlendirme dışında bırakılmıştır (10, 76, 90).

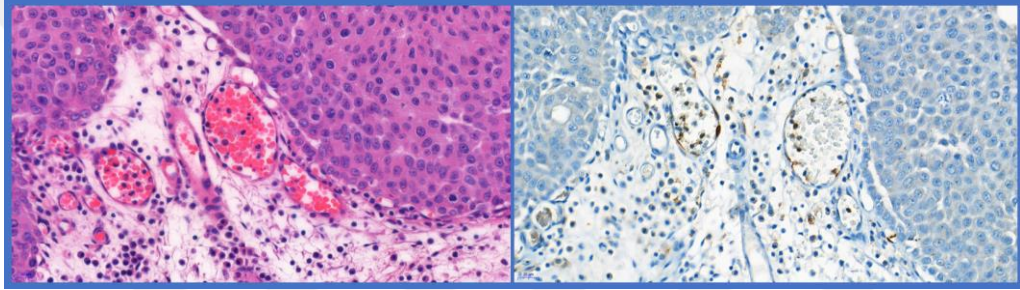
BCG refrakter kabul edilen gruptaki olgularda nüks/progresyon biyopsilerinde TİİH ve tümör hücrelerinde PD-L1 boyanma oranı değerlendirilmiş, tanı biyopsilerindeki PD-L1 boyanmaları ile karşılaştırılmıştır.



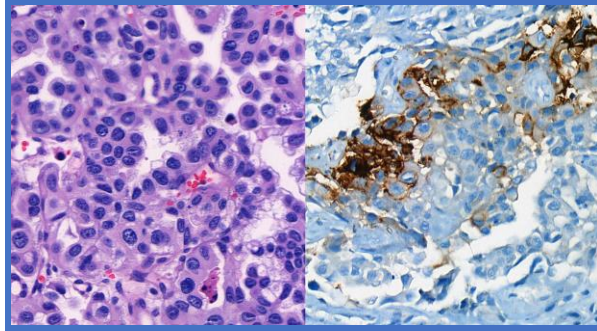
Resim 10: TİİH Oranının Belirlenmesi (Mavi çizgiler ile işaretli alanlar TİİH alanları)



Resim 11: TİİH'de Yüksek PD-L1 ifadesi ($\geq\%25$)



Resim 12: TİİH'de Düşük PD-L1 İfadesi ($<\%25$)



Resim 13: Tümör hücrelerinde PD-L1 ile membranöz boyanma ve düşük PD-L1 ifadesi ($<\%25$)

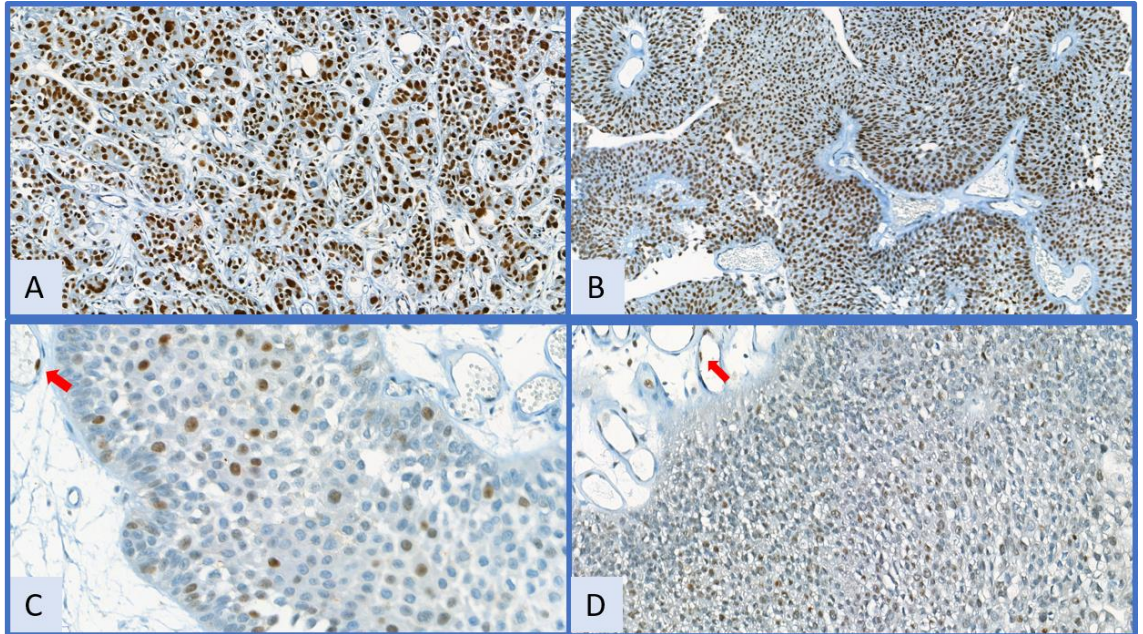
3.3.2. DNA MMR gen ekspresyonu:

Bütün olgularda MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 ekspresyonu değerlendirilirken çevredeki non-tümöral hücrelerde pozitif boyanma internal kontrol olarak kabul edilmiş, her bir antikörün nükleer boyanma yüzdesi hesaplanmıştır.

Nükleer boyanma yüzdesi değerlendirilirken tüm kesit alanı incelenmiş, nekroz ve koter artefaktı bulunan alanlar değerlendirme dışında bırakılmıştır. Değerlendirilen alanlarda internal kontrol olan non-tümöral hücrelerin boyanmış olmasına dikkat edilmiştir.

MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 proteinlerinden herhangi biri ile total ekspresyon kaybı durumu “total kayıp”, bu proteinlerden herhangi biri ile %30 ve altında ekspresyon görülmesi “parsiyel kayıp”, hepsiyle %30’un üzerinde ekspresyon görülme durumu ise “kayıp yok” şeklinde kategorize edilmiştir.

Ayrıca boyanma şiddeti zayıf:1, orta:2, kuvvetli:3 olacak şekilde değerlendirilmiş, boyanma yüzdesi (%0-100) ile boyanma şiddetinin değeri (1-3) çarpılarak her bir belirteç için boyanma skoru belirlenmiştir (resim 14).



Resim 14: DNA MMR Proteinlerinin (MSH2, MLH1, MSH6 ve PMS2) Ekspresyonunun Değerlendirilmesi: A-MSH2 ile tümör hücrelerinde %100 kuvvetli

nükleer boyanma, B-MLH1 ile tümör hücrelerinde %100 kuvvetli nükleer boyanma, C-MSH6 ile tümör hücrelerinde %20 oranında orta-kuvvetli nükleer boyanma (parsiyel kayıp), D- PMS2 ile tümör hücrelerinde %10 oranında zayıf nükleer boyanma (parsiyel kayıp) (kırmızı ok: endotel hücrelerindeki boyanma)

Bu çalışmada amaçlarımız arasında MSI-H vakaları saptamada immünohistokimya yönteminin belirleyiciliğinin değerlendirilmesi ve MSI-H vakaları gösterecek immünohistokimyasal bulguların oluşturulması yer aldığından, parsiyel kayıplar da ayrıca değerlendirmeye alınmıştır.

3.4. Mikrosatellit Analizi (MSA)

Hastalara ait tümörlü ve normal dokular seçilerek, parafin bloklarından 5 µm kalınlığında kesitler alınmış, her hastaya ait normal doku ve tümör dokusu için ayrı kodlar verilmiştir. Tümör miktarı %50'den az olan dokularda tümör alanı işaretlenmiş ve makrodiseksiyon uygulanmıştır. Olgulardan biri normal dokusunun olmaması, bir diğeri ise tümör oranının çok az olması nedeniyle DNA fragman analizine dahil edilmemiş, kalan 57 hastaya ait tümör örnekleri (55 tedavi öncesi, 2 tedavi sonrası nüks/progresyon biyopsisi) DNA fragman analizine dahil edilmiş, aşağıdaki protokol uygulanarak DNA fragman analizi gerçekleştirilmiştir.

Deparafinizasyon ve DNA izolasyonu:

1. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere alındı.
2. Her örneğin üzerine 1 ml ksilen eklendikten sonra 10 sn vortekslendi.
3. Tüm örnekler oda sıcaklığında (15-25°C) 2 dakika boyunca en yüksek hızda 2 dakika santrifüje edildi.
4. Yukarıda kalan sıvı pipetle tüpün dışına çıkarıldı.
5. Örneklerin üzerine 1 ml etanol (%96-%100) eklendi ve karıştırılarak tekrar vortekslendi.
6. Oda sıcaklığında (15-25°C) 2 dakika boyunca en yüksek hızda 2 dakika santrifüje edildi.

7. Yukarıda kalan sıvı pipetle tüpün dışına çıkarıldı.
8. Tüplerin kapakları açılıp, oda sıcaklığında rezidüel etanol kalmayana kadar inkübasyona bırakıldı.
9. 180 µl Buffer ATL ve 20 µl proteinaz K eklenerek tekrar süspansiyon hazırlandı ve vortekslenerek karıştırıldı.
10. 56°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
11. Ardından 90°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
12. 1.5 ml tüpte santrifüje edildi.
13. 200 µl Buffer AL eklendi ve vortekslendi. Sonra 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve tekrar vortekslenerek karışım hazırlandı.
14. Santrifüje edildi.
15. Örneklerin tamamı QIAamp MinElute kolonlara aktarıldı ve kapakları kapatılarak 1 dakika boyunca 6000 x g (8000 rpm) hızında santrifüje edildi. Kolonlar 2 ml'lik temiz tüplere yerleştirildi.
16. QIAamp MinElute kolonlar açıldı ve 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapakları kapatılarak 1 dakika boyunca 6000 x g (8000 rpm) hızında santrifüje edildi. Ardından kolonlar 2 ml'lik temiz tüplere yerleştirildi. Bu basamak 1 kere daha tekrar edildi.
17. 3 dakika boyunca en yüksek hızda, membran kuruyana kadar santrifüje edildi.
18. QIAamp MinElute kolonlar, temiz 1.5 ml'lik tüplere yerleştirildi ve sıvının kaldığı tüpler atıldı. QIAamp MinElute kolonların kapağı açıldı ve membranın ortasına 20-100 µl Buffer ATE eklendi.
19. Kapaklar kapatıldı ve odak sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra en yüksek hızda 1 dakika santrifüje edildi.
20. DNA miktarları ölçüldü (Qubit 3, İnvitrogen) ve DNA konsantrasyonları 2.5 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.

PCR aşaması; her örnek için aşağıdaki miktarlarda kimyasallarla karışım oluşturulmuştur.

Tablo 6: PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Ul
Su	3.425µl
Gold STHR 10X Buffer	0.5 µl
MSI 10X Primer Pair Mix	0.5 µl
GoTaq MDx Taq Polymerase (5u/µl)	0.075 µl
DNA (10ng/ul)*	0.5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	5.00 µl

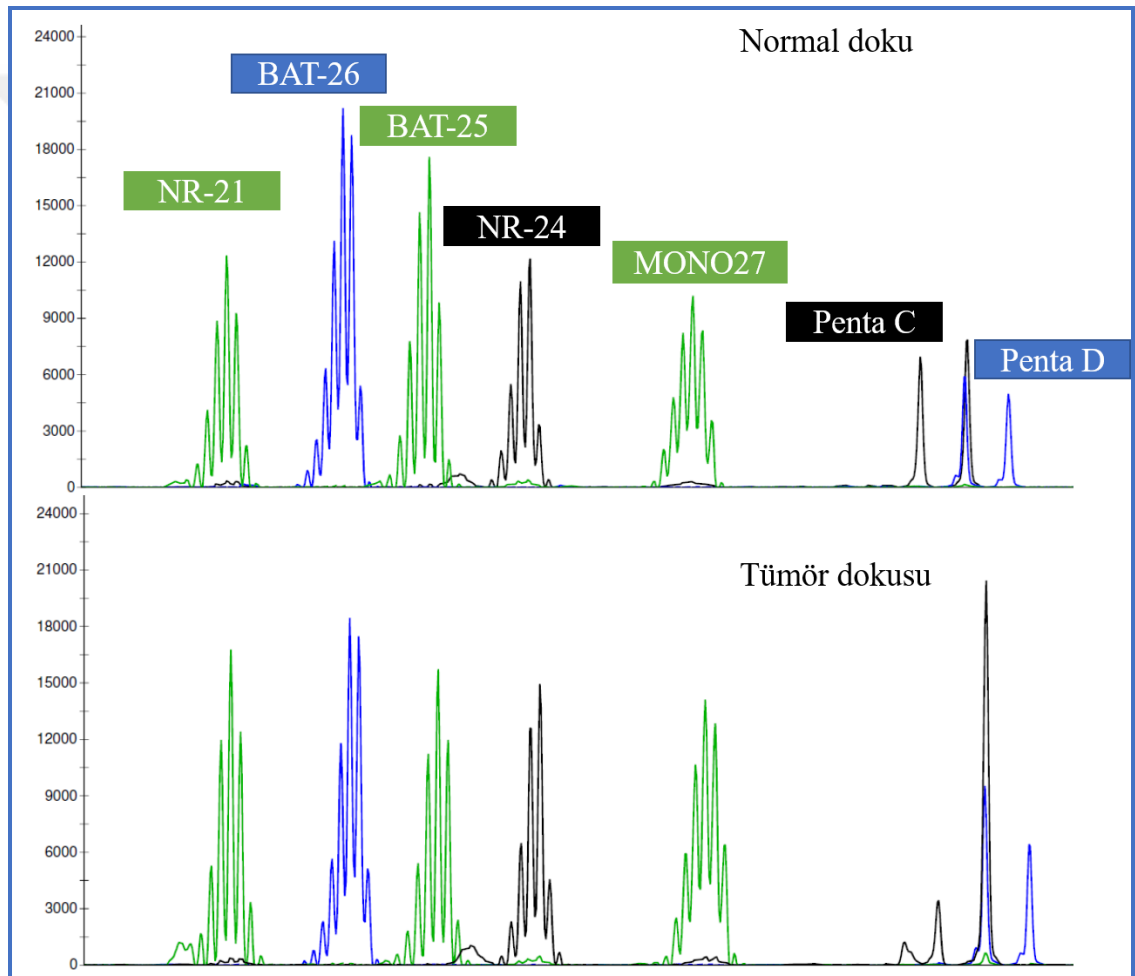
21. Kitten çıkan K562 High Molecular Weight DNA (10ng/µl) sulandırılarak kullanıldı. Ayrıca kontaminasyon kontrolü için her yürütmede 1 tane negatif kontrol (su) kullanıldı.
22. MSI için Thermal Cycler PCR Protokolü uygulandı. (10 siklus: 95°C 'de 2 dakika, 96°C'de 1 dakika, 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye, 70°C'de 1 dakika, ardından 20 siklus: 90°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye, 70°C'de 1 dakika, ardından 60°C'de 30 dakika ve 4°C'de bekleme)
23. PCR işlemi bittikten sonra PCR ürünlerini ABI 3500 cihazına yüklemek için örnek başına; 0.5µl ILS 600 ve 9.5µl Hi-Di™ formamide eklendi.
24. Karışım 10-15 saniye vorteksledikten sonra 96 well ABI platelerine 10ul koyuldu.
25. Ardından PCR ürünlerinden 0.5 ul eklendi ve üzeri septa ile kapatıldı.
26. ABI StepOne cihazında denatürasyon programında 5 dk ve 95C'de denatüre ettikten hemen sonra buza gömerek 5 dk bekletildi.
27. Plate bu işlemten sonra ABI 3500 cihazına yüklendi.

ABI 3500 cihazında kapiller elektroforezde DNA fragman analizi

Mikrosatellit instabilite durumunu saptamak için 5 poli-A mononükleotid marker (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27) ve doku kimliklendirmesi için 2 polimorfik pentanükleotid marker (Penta C ve Penta D) içeren Promega (MD1641 MSI Analysis System, Version 1.2) paneli kullanılarak her hastaya ait normal doku ve tümör dokusu arasında mikrosatellit bölge uzunlukları karşılaştırıldı.

3.5. Mikrosatellit analizi değerlendirme

Literatürde belirtilen şekilde normal doku ile tümörlü doku mikrosatellit bölge uzunlukları açısından yapılan karşılaştırmada 5 poli-A mononükleotid mikrosatellit bölgesinden (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO27) en az 2'sinde uzunluk farkı saptandığı durumda tümörler MSI-H, 1 bölgede uzunluk farkı olduğunda MSI-L, bölgeler arası uzunluk farkı olmadığında MSS olarak kabul edilmiştir (resim 15) (9, 79).



Resim 15: MSA ile 5 poli-A mononükleotid mikrosatellit bölgesinin değerlendirilmesi. Normal doku ve tümör dokusu arasında mikrosatellit bölgelerinde uzunluk farkı yok.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS istatistik paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı bulgular kısmında kategorik değişkenler sayı ve yüzde ile; sayısal değişkenler ise ortalama $\pm$ standart sapma, ortanca, en küçük ve en büyük şeklinde sunulmuştur. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-Kare ve Fisher Exact Testi, sayısal değişkenlerin karşılaştırılmasında ise normal dağılıma uygunluğuna göre parametrik (Student T Test vb.) veya nonparametrik (Mann Whitney U, Kruskal Wallis vb) testler kullanılmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel olarak saptanan 0,05'in altındaki p değerleri anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Olgulara Ait Genel Bulgular

Olguların %10,2'si (n:6) kadın, %89,8'i (n:53) erkektir. BCG refrakter hasta grubundaki 29 hastanın yaş ortalaması 66,34 (48-84), BCG tedavisine yanıt veren 30 hastanın yaş ortalaması 69,73 (52-85)'tür. Bu iki grupta yaş ve cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark izlenmemiştir (sırasıyla p=0,139; p=0,195). Klinikopatolojik özellikler Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: Olguların Klinikopatolojik Özellikleri

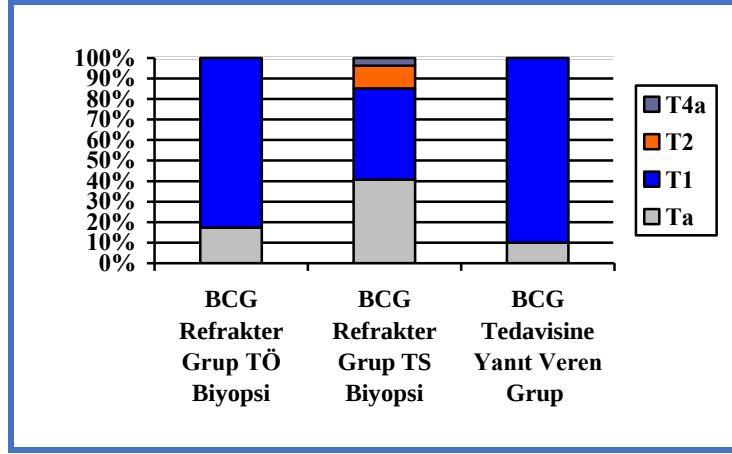
Klinikopatolojik Özellikler	Değerler (%)
Cinsiyet Kadın Erkek	6 (10.1) 53 (89.8)
Ortalama Yaş Yaş Aralığı	67.74 48-85
Evre Ta T1	8 (13.6) 51 (86.4)
Lamina Propria İnvazyon Derinliği Yüzeyel l. propria Derin l. propria	33 (64.7) 18 (35.3)
İnvazyon Yaygınlığı Fokal (1 odak) Multifokal (>1 odak)	28 (55) 23 (45)
En büyük invazyon odağı uzun çapı <2mm ≥2mm	32 (62.7) 19 (37.3)
Eşlik eden karsinoma in situ (KİS) Var Yok	10 (17) 49 (83)
Evre Progresyonu Var Yok	4 (14.8) 23 (85.2)

BCG refrakter 29 vakanın tedavi öncesi biyopsilerinin %17,2'si (n:5) Ta, %82,8'i (n:24) T1 evresinde; 29 hastanın 27'sinin tedavi sonrası alınan biyopsilerinde %40,8'i (n:11) Ta, %44,4'ü (n:12) T1, %11,1'i (n:3) T2 ve %3,7'si (n:1) T4a evresindedir. Tanı biyopsisi ile BCG tedavisi sonrası biyopsi tümör evresi açısından karşılaştırıldığında 27 hastanın %14,8'inde (n:4) evre progresyonu gözlenmiştir. BCG tedavisine yanıt alınan 30 hastanın tedavi öncesi biyopsilerinin %10'u (n:3) Ta, %90'ı (n:27) T1 evresindedir. Tedavi öncesi biyopsilerin evreleri karşılaştırıldığında BCG refrakter grup ile BCG tedavisine yanıt alınan grup arasında farklılık saptanmamıştır ($p=0,472$) (şekil 5). T evresi ile TİİH oranı arasında bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,773$).

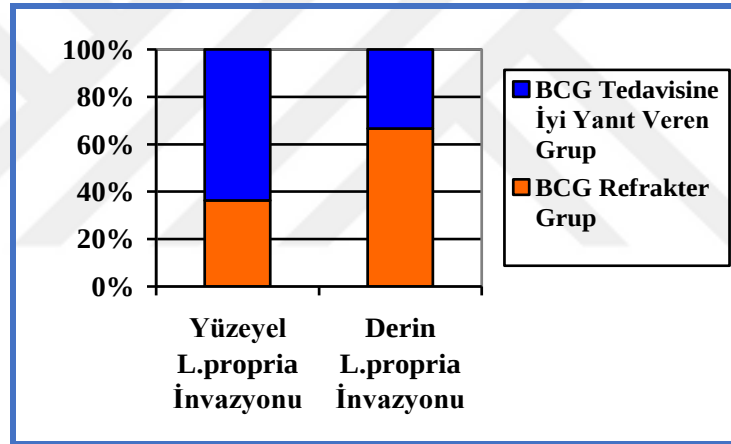
Olgular 1. propria invazyon derinliği ve BCG tedavi yanıtı açısından karşılaştırıldığında derin l.propria invazyonu gösteren olgularda BCG refrakterliğinin daha yüksek oranda olduğu görülmüştür ($p=0,038$) (şekil 6)

Tedavi öncesi biyopsiler değerlendirildiğinde 59 hastanın 10'unda (%17) tümöre eşlik eden karsinoma in situ saptanmış, bu bulgu BCG refrakter olma durumu ile ilişkisiz bulunmuştur ($p=1.000$). Ancak tümöre eşlik eden karsinoma in situ bulunan olgularda TİİH oranının daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0,018$) (şekil 7).

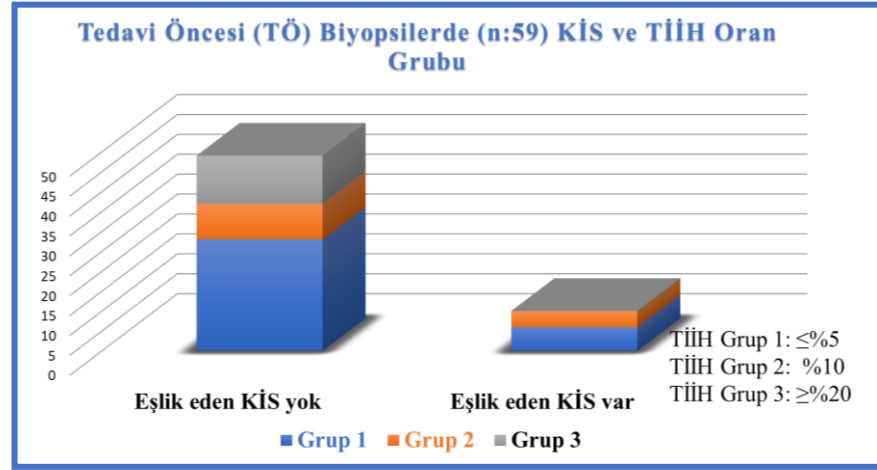
Hem tedavi öncesi biyopsilerde BCG refrakter grup ile BCG iyi yanıt veren grup arasında hem de BCG refrakter grupta tedavi öncesi ve sonrası biyopsiler arasında TİİH oranları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,922$ ve $p=0,352$).



Şekil 5: BCG Refrakter Grup TÖ (Tedavi Öncesi), TS (Tedavi Sonrası) Biyopsilerinde ve BCG Tedavisine Yanıt Veren Grupta T Evre Dağılımı



Şekil 6: Tedavi öncesi biyopsilerde yüzeyel ve derin l. propria invazyonu gösteren vakalarda BCG tedavi yanıtının karşılaştırılması. Derin l. propria invazyonu gösteren olgularda BCG refrakterliği daha fazladır ($p=0,038$).



Şekil 7: Tümöre eşlik eden karsinoma in situ (KİS) durumu ile TİİH oranı arasındaki ilişki. Tümöre eşlik eden KİS olan olgularda TİİH oranı daha düşüktür (p=0,018).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

TİİH PD-L1 boyanma yüzdesi ve TİİH oranından bağımsız değerlendirmede PD-L1 boyanma yüzdelерinin en düşük, median ve en yüksek değerleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8: Gruplara göre TİİH’de PD-L1 boyanma yüzdeleri ve TİİH oranından bağımsız değerlendirmede PD-L1 boyanma yüzdelерinin en düşük, median ve en yüksek değerleri

	BCG Refrakter Grup Tedavi Öncesi Biyopsi (n:29)			BCG Tedavisine Yanıt Veren Grup (n:30)			BCG Refrakter Grup Tedavi Sonrası Biyopsi (n:27)		
	Min.	Median	Maks.	Min.	Median	Maks.	Min.	Median	Maks.
TİİH PD-L1 (%)	0	25	80	0	30	80	0	20	80
TİİH oranından bağımsız TİİH PD- L1 (%)	0	30	80	0	35	80	0	20	80

4.2.1. PD-L1

BCG refrakter ve BCG iyi yanıt veren her iki grup bir arada değerlendirildiğinde; BCG tedavisi öncesine ait 59 biyopsinin 5’inde (%8) (1’i BCG

refrakter, 4'ü BCG iyi yanıt veren) tümör hücrelerinde %5 ve daha az oranda membranöz boyanma (düşük PD-L1) izlenmiştir. BCG refrakter hasta grubunda tedavi sonrası biyopsilerin sadece 1'inde (%3,7) tümör hücrelerinde %10 oranında membranöz boyanma (düşük PD-L1) gözlenmiştir. Böylece tüm biyopsiler tümör hücresi PD-L1 ifadesine göre düşük PD-L1 ifadesi göstermiştir.

Tedavi öncesi biyopsilerde, TİİH gruplarının, TİİH PD-L1 boyanma yüzdesine göre, düşük ve yüksek PD-L1 ifadesine göre dağılımı Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9: TİİH Gruplarına ve TİİH PD-L1 Boyanma Oranlarına Göre Tedavi Öncesine Ait Biyopsilerin Dağılımı

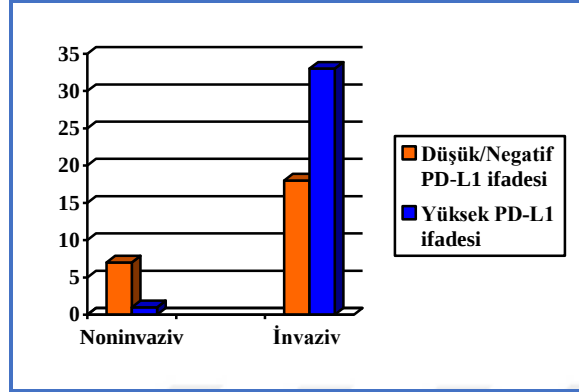
Değerlendirme	Sayı (%)
TİİH Grup	
Grup 1 ($\leq$ %5)	34 (57,6)
Grup 2 (%10)	13 (22)
Grup 3 ($\geq$ %20)	12 (20,4)
TİİH Oranından Bağımsız Yapılan Değerlendirmede TİİH PD-L1 Boyanmasına Göre	
Grup 1 ($<$ %20)	18 (30,5)
Grup 2 ($\geq$ %20, $<$ %50)	19 (32,2)
Grup 3 ($\geq$ %50)	22 (37,3)
TİİH'de Düşük PD-L1 *	25 (42,4)
TİİH'de Yüksek PD-L1 ($\geq$ %25)	34 (57,6)

* TİİH'de düşük PD-L1 ifadesi grubuna dahil edilen 25 biyopsinin 10'unda (%40) TİİH oranı $\leq$ %1 olarak saptanmış ve TİİH oranı $\leq$ %1 olan biyopsilerin hepsinde TİİH PD-L1 boyanması $<$ %100 olarak izlenmiştir. TİİH oranı %1'den fazla olan 15 olguda ise TİİH PD-L1 boyanma oranı %25'in altında olduğu için düşük PD-L1 grubuna alınmıştır.

TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi ($\geq$ %25) açısından noninvaziv (Ta) ve invaziv (T1) grup karşılaştırıldığında; T1 tümörlerde Ta tümörlere göre TİİH yüksek PD-L1 ifadesinin daha sık olduğu saptanmıştır (p=0.008) (şekil 8).

Tedavi öncesi biyopsilerde T1 olgular içinde, lamina propria invazyon derinliği, en büyük invazyon odağı uzun çapı ve invazyon yaygınlığı ile TİİH'deki

PD-L1 ifadesi arasında bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,313$; $p=0,859$; $p=0,603$). Ayrıca tümöre eşlik eden karsinoma in situ durumu da TİİH'deki PD-L1 ifadesi ile ilişkisiz bulunmuştur ($p=1,000$).



Şekil 8: Noninvaziv (Ta) ve invaziv (T1) grupta TİİH'de PD-L1 ifadesi ilişkisi: TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi invazyonla ilişkilidir ($p=0.008$).

TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi ile TİİH oranı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Pearson korelasyonu: 0,428).

Hem BCG refrakter grupta tedavi öncesi ve sonrası biyopsilerde, hem de BCG refrakter grup ile BCG tedavisine iyi yanıt veren grup arasında TİİH'de düşük/yüksek PD-L1 ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla $p= 0,508$; $p= 0,708$) (Tablo 10).

Tablo 10: BCG Refrakter Grupta BCG Tedavisi Öncesi ve Sonrası Biyopsilerde TİİH'de Yüksek/Düşük PD-L1 İfadesi Dağılımı

BCG Refrakter Grupta PD-L1 İfadesi	Sayı (%)
Tedavi Öncesi Biyopside Yüksek, Tedavi Sonrası Biyopside Düşük PD-L1 İfadesi	6 (22,2)
Tedavi Öncesi Biyopside Düşük, Tedavi Sonrası Biyopside Yüksek PD-L1 İfadesi	3 (11,1)
Her İki Biyopside Düşük PD-L1 İfadesi	8 (29,7)

Her İki Biyopside Yüksek PD-L1 İfadesi	10 (37)
--	---------

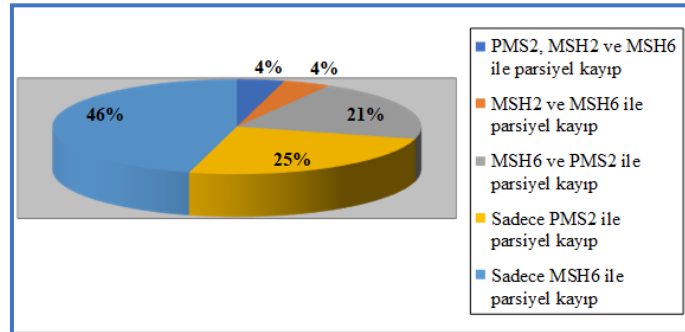
4.2.2. DNA MMR gen ekspresyonu:

Bir olguda MSH6 ile, 12 olguda ise PMS2 ile tümör hücrelerinde ve stromal hücrelerde nükleer boyanma olmaması nedeniyle immünohistokimyasal boyamalar tekrar edilmiş, tekrar sonrasında boyanma elde edilmiştir. Boyanma yüzdelerinin minimum, median ve maksimum değerleri Tablo 11’de özetlenmiştir.

Tablo 11: Gruplara göre en düşük, median ve en yüksek PMS2, MLH1, MSH2, MSH6 boyanma oranları

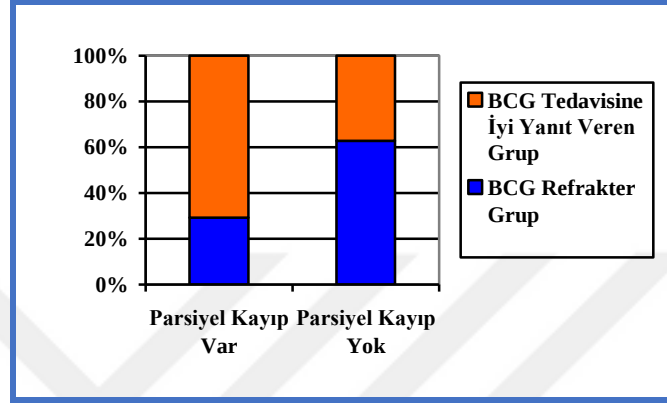
	BCG Refrakter Grup Tedavi Öncesi Biyopsi (n:29)			BCG Tedavisine Yanıt Veren Grup Tedavi Öncesi Biyopsi (n:30)		
	Min.	Median	Maks.	Min.	Median	Maks.
PMS2 (%)	10	80	100	10	55	100
MLH1 (%)	50	90	100	40	90	100
MSH2 (%)	30	100	100	10	95	100
MSH6 (%)	10	60	100	10	60	100

Olguların hiçbirinde DNA MMR proteinleri ile tümör hücrelerinde nükleer boyanmada total kayıp ve MLH1 ile parsiyel kayıp izlenmemiştir. Tedavi öncesine ait 59 biyopsinin 24’ünde DNA MMR proteinlerinde parsiyel kayıp ($\leq 30\%$) izlenmiş, bu olguların dağılımı şekil 9’da gösterilmiştir.



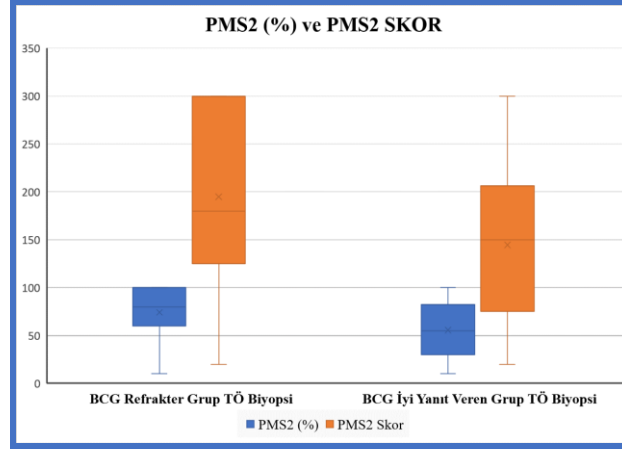
Şekil 9: DNA MMR Protein Ekspresyonunda Parsiyel Kayıp Bulunduran Olguların (n:24) Dağılımı

En az bir DNA MMR proteini ile parsiyel kayıp bulunduran grup ile bulundurmayan grup BCG tedavisine yanıt açısından karşılaştırıldığında, parsiyel kayıp bulunduran 24 olgunun büyük kısmının (%70,8 (n:17)) BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta olduğu saptanmıştır (p=0,022) (şekil 10).



Şekil 10: DNA MMR proteinlerinde parsiyel kayıp bulunan ve bulunmayan gruplarda BCG tedavi yanıtının dağılımı.

Tedavi öncesi biyopsilerde BCG refrakter grup ile BCG tedavisine yanıt veren grup arasında DNA MMR protein ifadeleri ayrı ayrı incelendiğinde hem PMS2 boyanma yüzdeleri hem de boyanma skorlarının BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta daha düşük olduğu görülmüştür (p=0,011 ve p=0,037) (şekil 11). Ancak PMS2 ile parsiyel kayıp ($\leq$ %30) durumuna göre yapılan yukarıdaki karşılaştırmada farkın istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmadığı izlenmiştir (p= 0,061). MSH2 ve MSH6 ile bir farklılık izlenmemiştir (p=0,521 ve p=0,113).



Şekil 11: BCG Refrakter Grup ve BCG İyi Yanıt Veren Grup Arasında PMS2 (%) ve skor dağılımı. Tedavi öncesi (TÖ) biyopsilerde BCG iyi yanıt veren grupta PMS2 boyanma yüzdeleri ve skoru BCG refrakter gruba göre daha düşüktür ($p=0,011$ ve $p=0,037$).

En az bir DNA MMR proteini ile parsiyel kayıp bulunduran grup ile hiçbirinde kayıp olmayan grup arasında yaş, evre, invazyon derinliği, eşlik eden karsinoma in situ varlığı açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla $p=0,965$, $p=1,000$, $p=0,972$ ve $p=0,490$).

Ayrıca en az bir DNA MMR proteininde parsiyel kayıp olması ile yüksek TİİH oranı veya TİİH’de yüksek PD-L1 ifadesi görülmesi arasında bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla $p= 0,778$; $p=0,891$).

4.3. Mikrosatellit Analiz Bulguları

Olgulardan biri normal dokusunun olmaması, bir diğeri ise tümör oranının çok az ($<20\%$) olması nedeniyle mikrosatellit analizine dahil edilmemiş, böylece toplam 57 hastada (55 tedavi öncesi biyopsi, 2 tedavi sonrası nüks/progresyon biyopsisi) DNA fragman analizi ile mikrosatellit instabilite durumu incelenmiştir.

DNA fragman analizi uygulanan 57 tümörün tamamı mikrosatellit stabil (MSS) saptanmıştır. DNA MMR proteinleri ile parsiyel kayıp görülmesinin, mikrosatellit instabilitesi göstergesi olmadığı sonucuna varılmıştır.

5. TARTIŞMA

Mesane kanserleri dünya genelinde kanser sıralamasında 7. sırada gelmektedir; erkeklerde en sık 4., kadınlarda ise en sık 17. kanserdir. Dünya genelinde mesane kanseri insidansı ve mortalitesi erkeklerde kadınlara göre 3-4 kat daha sık olup, ülkemizde bu oran 8 kata kadar çıkmaktadır. Ortalama tanı yaşı 73'tür (2, 18). Bizim çalışmamızda 59 hastanın %89,8'i erkek, %10,2'si kadındır; literatürle uyumlu olarak ortalama tanı yaşı 67,74 bulunmuştur.

Son zamanlarda, immün kontrol noktası moleküllerinin monoklonal antikorlarla bloke edilmesi, birçok malignitede olduğu gibi ileri evre ürotelyal kanser tedavisinde de umut verici bir yöntem olarak gündemdedir. PD-1 / PD-L1 sinyal yolunun, tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasında önemli bir rol oynadığı noktasından yola çıkılarak, bu yolaktaki proteinleri bloke eden antikorlarla tümöre karşı T hücre yanıtının yeniden aktive edilmesi amaçlanmaktadır (94).

Mesane kanserinde PD-L1 ifadesini araştıran çalışmalarda tüm kesit alanını inceleyen çalışmalar yanında doku mikroarray örneklerinden PD-L1 ifadesinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur (73, 94-97). Doku mikroarray örneklerinde PD-L1 ifadesinin incelenmesinde tümör heterojenitesi sonuçları etkileyen bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (95). Bizim çalışmamızda bu olumsuz faktörün önüne geçmek için tüm kesit alanı incelenmiş hem TİİH'de hem de tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi değerlendirilmiştir.

Mesane karsinomunda, tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliğinin görülme oranı yayınlanan çalışmalarda %4,3 ile %100 arasında değişmektedir (68-71, 95, 96). Bizim çalışmamızda diğer çalışmaların aksine, olguların hiçbirinde tümör hücrelerinin yüksek PD-L1 ifadesi ($\geq$ %25 membranöz boyanma) görülmemiştir.

Kas invaziv olmayan ürotelyal karsinom olgularında tümör infiltre eden mononükleer hücrelerde PD-L1 pozitifliği az sayıda çalışmada değerlendirilmiş ve %34,3-%50 oranında bildirilmiştir (71, 94, 96). Bizim çalışmamızda ise TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi %57,6 oranında izlenmiştir. Bu oran diğer çalışmalarda bulunan sonuçlardan görece yüksektir.

Huang ve ark. 103'ü kas invaziv olmayan 165 mesane kanserinde PD-L1 mRNA seviyelerini ölçtükleri çalışmalarında, artan T evresi ile PD-L1 ifadesinin pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (98). Nakanishi ve ark.nın 50'si mesaneye ait 65 ürotelyal karsinoma olgusunu inceledikleri çalışmalarında, T evresi arttıkça tümör hücrelerinde izlenen PD-L1 ifadesinde de artış saptanmıştır. T evresi ile TİİH oranının ters korelasyon gösterdiğini, ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı belirtilmiştir (68). Ayrıca yeni yayınlanan bir çalışmada, peritümöral lenfositlerdeki PD-L1 ifadesi invaziv tümörlerde ($\geq T1$) noninvaziv (Ta) tümörlere göre daha yüksek bulunmuştur (73).

Benzer şekilde Wankowicz ve ark. yüksek dereceli T1 tümörlerde tümör hücrelerinin PD-L1 pozitifliğinin T2 tümörlere oranla belirgin şekilde daha düşük olduğunu saptamışlardır (96). Ancak bu sonuçların aksine 23 $Ta/T1$, 133 T2 ürotelyal karsinom olgusunun incelendiği Bellmunt ve ark.nın çalışmasında tümör infiltre eden mononükleer hücrelerdeki veya tümör hücrelerindeki PD-L1 ifadesinin evre ile ilişkisiz olduğu bildirilmiştir (94). Bizim çalışmamızda ise T1 tümörlerde, Ta tümörlere göre TİİH yüksek PD-L1 ifadesi daha sık saptanmış ($p=0,008$), ancak T evresi ile TİİH oranı arasında bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,773$). Tümör evresi ile TİİH PD-L1 ekspresyonu arasındaki pozitif korelasyon, PD-1 / PD-L1 sinyal yolu aracılı konak immün yanıtından kaçış mekanizmasının mesane kanseri progresyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde tümör infiltre eden mononükleer hücre varlığının PD-L1 ifadesi ile korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (69, 94). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da artmış TİİH oranı ile TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi sıklığı arasında pozitif korelasyon izlenmiştir (Pearson korelasyonu: 0,428). Ancak literatürde bunu açıklayabilecek bir mekanizma bildirilmemiştir (69, 74).

Mesane kanserinde kullanılan ilk immünoterapi olması nedeniyle tarihsel öneme sahip intravezikal BCG tedavisi ile bir başka immünoterapi hedefi olan PD-L1 ifadesi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Inman ve arkadaşlarının çalıştıkları seride BCG tedavisi alan 44 hastada (16'sı BCG refrakter), BCG tedavisi sonunda "host" dokuda, özellikle BCG ilişkili granülomlarda ve karsinoma in situ alanlarında PD-L1 ifadesinde artış saptanmış ve artmış PD-L1

ifadesinin BCG tedavisinin etkinliğini azaltıcı bir faktör olabileceği öne sürülmüştür (70). Bizim çalışmamızda eşlik eden karsinoma in situ bulunan olgularda, bulunmayan olgulara göre PD-L1 ifadesinde bir farklılık görülmemiştir ($p=1.000$). Ayrıca yüksek PD-L1 ifadesi ile BCG refrakter olma durumu arasında bir ilişki de saptanmamıştır ($p=0,508$).

Bir çalışmada, 22 BCG refrakter hastada BCG tedavisi öncesi ve sonrasına ait biyopsilerdeki PD-L1 ifadeleri karşılaştırılmış; BCG tedavisi sonrasında 14 (%70) hastada tümör hücrelerinde, 13 (%59) hastada tümör infiltrate eden mononükleer hücrelerde PD-L1 ifadesinde artış saptanmıştır (71). Bunun aksine BCG tedavisi sonrasında tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesinin azaldığını (69) veya PD-L1 ifadesi ile BCG tedavisi arasında ilişki bulunmadığını bildiren çalışmalar da (73, 94, 95) mevcuttur. Bizim çalışmamızda BCG refrakter olguların büyük kısmında (%66,7) tedavi öncesi ve sonrası biyopsiler arasında yapılan karşılaştırmada TİİH'de veya tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi açısından değişiklik saptanmaması, BCG tedavisi direncinde PD-1/PD-L1 aracılı immün sistemden kaçış mekanizmasının rolünün olmadığını düşündürmektedir.

Wang ve ark., hem in vivo hem de in vitro deneylerle, BCG tedavisine yanıt olarak, akım sitometri yöntemiyle kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesinin arttığını göstermişlerdir. Ayrıca mesane kanseri bulunduran deney farelerindeki tümör yük miktarlarını karşılaştırmışlar; BCG ve anti-PD-L1 kombinasyon tedavisinin tümör infiltrate eden CD8 (+) T lenfositler ile myeloid kökenli süpresör hücrelerin sayısında ve aktivitesinde artış sağlayarak, anti-tümör immün cevabın artmasına yol açtığını ve kombinasyon tedavisinin, BCG ile tek ajan tedavisinden daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (75). Bir başka çalışmada da benzer şekilde BCG tedavisinin immün kontrol noktası inhibitörleri ile birlikte kullanılmasının BCG'nin etkinliğini arttırabileceğini bildirmişlerdir (99). Buna göre, BCG tedavisi direnci ile PD-1/PD-L1 aracılı immün sistemden kaçış mekanizması arasında ilişki bulunmasa da, tedavi öncesi biyopsilerde PD-L1 ifadesinin araştırılması ve uygun hastalarda BCG tedavisi ile immün kontrol noktası inhibitör tedavisinin kombine kullanımı tedavi etkinliğini arttırabilecek bir yaklaşım gibi görünmektedir.

İntravezikal BCG tedavisinin etki mekanizmasının temelinde inflamatuvar hücrelerde artış ve tümöre karşı inflamatuvar yanıtın oluşması yer almaktadır. Çalışmamızda BCG refrakter grupta tedavi sonrası biyopsilerde tedavi öncesi biyopsilere göre BCG tedavi etkisini gösterecek şekilde TİİH oranında bir artış saptanmaması, BCG tedavisi ile hedeflenen immün yanıtın bu hastalarda sağlanamadığını göstermekte ve BCG tedavisine yanıtızsız olma durumu ile örtüşmektedir.

BCG tedavisine yanıt alınamayan, kas invaziv olmayan mesane kanserlerinde PD-L1 ifadesini araştıran az sayıdaki çalışmanın sonuçlarındaki farklılıkların kullanılan PD-L1 klonlarının ve pozitif kabul edilme eşiklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir (tablo 12). Bu durum sonuçların yorumlanması ve karşılaştırılmasında güçlük yaratmaktadır.

Tablo 12: Ürotelyal Karsinomada PD-L1 İfadesini Araştıran Önceki Çalışmaların Özeti

Çalışma	Olgu Sayısı	PD-L1 klon	Eşik değeri (%)	Sonuç
Inman ve ark. (2007)	280 (44'ü BCG tedavisi almış, 16'sı refrakter)	5H1	>1	PD-L1, yüksek derece ve ileri evre ile ilişkilidir. BCG refrakter vakalarda immün sistemden kaçışta PD-L1 ifadesinin artışı rol oynuyor olabilir.
Nakanishi ve ark. (2007)	50	M1H1	>12	PD-L1 yüksek derece, daha kısa genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalımla ilişkilidir.
Boorjian ve ark. (2008)	318 (56'sı BCG tedavisi almış)	5H1	>5	BCG tedavisi sonrası tümör hücrelerinde (TH) PD-L1 ifadesinde azalma izlenmiştir. TH'de PD-L1 ifadesi ileri evre ile ilişkilidir.
Wang ve ark. (2009)	60	Pdcd-1L1 (H-130)	>10	PD-L1 ifadesi yüksek derece, kas invazyonu, rekürrens ve daha kısa genel sağ kalımla ilişkilidir.
Bellmunt ve ark. (2015)	160 (17'si BCG tedavisi almış)	405.9a11	>5	TH'de PD-L1 ifadesi BCG tedavisi öyküsü, evre, genel sağ kalımla ilişkisizdir.
Faraj ve ark. (2015)	56 (26'sı BCG tedavisi almış)	5H1	>5	PD-L1 ile korelasyon gösteren sonuç yok.
Wankowicz ve ark. (2017)	140	405.9a11	>5	T1 yüksek dereceli tümörlerde PD-L1 ifadesi tümör infiltre eden mononükleer hücrelerde yaygınken, TH'de kas invazivlere göre belirgin şekilde daha düşüktür; KİS ve prognoz ile ilişkisizdir.
Hashizume (2018)	30 (22'si refrakter)	E1L3N	>1, İS, PS	BCG tedavisi sonrası TH'de PD-L1 artar.
Eich ve ark. (2019)	61 (19 hasta BCG tedavisi almış ve 12 hastanın tedavi öncesi ve sonrası)	E1L3N	>1 ve 5	TH'de artmış PD-L1 ifadesi, daha az rekürrens ile ilişkili, ancak BCG tedavisi ile ilişkisizdir. Peritümöral lenfositlerde yüksek PD-L1 ifadesi tümör evre progresyonu ile ilişkilidir.
Çalışmamız	59 (29'u refrakter, 27'sinin tedavi öncesi ve sonrası)	SP263	≥25	TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi invazyon varlığı ile ilişkili, BCG refrakter olma durumu, KİS, l.p invazyon derinliği ve invazyon yaygınlığı ile ilişkisizdir. TİİH PD-L1 ifadesi BCG tedavisinden bağımsızdır.

Genetik instabilite karsinogenezisin erken aşamalarından biri olarak bilinmektedir. Kromozom anormallikleri ve nükleotid düzeyindeki mutasyonları olmak üzere iki genetik instabilite mekanizması tanımlanmıştır. Bunlardan ikincisi genellikle replikasyon sonrası DNA “mismatch” onarım (MMR) sistemindeki hatalardan kaynaklanır ve mikrosatellitler adı verilen basit tekrarlayan sekanslarda insersiyon/delesyon mutasyonlarının birikmesine yol açar (100).

Mikrosatellit instabilitesi (MSI) ilk olarak Lynch sendromu olgularında yapılan araştırmalarla gündeme gelmiştir. Lynch sendromu, başta kolorektal kanserler olmak üzere çeşitli kanserlere genetik yatkınlığın görüldüğü kalıtsal kanser sendromudur ve literatüre bakıldığında MSI ile ilişkili olarak özellikle kolorektal karsinomlarda yapılan çalışmaların öne çıktığı görülmektedir. DNA MMR defekti/MSI durumunun araştırılmasında ilk basamak olarak immünohistokimyanın kullanılması önerilmektedir (9, 101). Kolorektal karsinomlarda PMS2 ve MSH6’yı da içeren dördümlü immünohistokimya panelinin MSH2 ve MLH1’den oluşan ikili panele göre MSI saptamada daha sensitif olduğu gösterilmiştir (83, 101). Geçmişte ürotelyal karsinomada DNA MMR defekti / MSI durumunu immünohistokimyasal yöntemlerle araştıran çalışmalarda sadece MLH1 ifadesi ya da MSH2 ve MLH1 ifadesi birlikte incelenmiştir (84, 85, 102, 103). Sadece 1 çalışmada MSH2, MSH6 ve MLH1’den oluşan üçlü panel kullanılmıştır (1). Çalışmamız mesane ürotelyal karsinomlarında PMS2, MLH1, MSH2 ve MSH6 panelini birlikte kullanan ilk çalışma özelliğindedir.

Kolorektal karsinomlarda DNA MMR proteinleri ile fokal de olsa nükleer boyanmanın görülmesi DNA MMR proteinlerinin intakt olduğunun iyi bir kanıtı olarak kabul edilmektedir (83). Çalışmamızda DNA MMR proteinlerinin intakt olduğunu gösterir şekilde olguların hiçbirinde DNA MMR proteinleri ile total ekspresyon kaybı izlenmemiş; fragman analiz yöntemi ile olguların tamamının MSS olduğu görülerek DNA MMR defekti olmadığı doğrulanmıştır.

Joost ve ark. heterojen boyanmayı intraglandüler, klonal ve “compartmental” olmak üzere 3 tipte tanımlamışlardır (104). Mikrodiseksiyon ile boyanma olan ve boyanma olmayan tümör alanlarından ayrı ayrı DNA elde edilerek mikrosatellit analizi çalışılmış ve ekspresyon kaybı olan tümör alanlarının MSI-H

olduğu saptanmıştır (104, 105). Bu nedenle bu çalışmalarda DNA MMR proteinleri ile heterojen boyanma görülen tümörlerin MSS denmeden önce daha ileri analizlerle incelenmesi gerektiği önerilmektedir (104, 106). Ancak bizim çalışmamızda tümör hücrelerinde izlenen heterojen boyanma tipinin daha çok intraglandüler heterojeniteye benzer olması nedeniyle mikrodiseksiyon ile boyanma olan ve olmayan tümör hücre grubunu ayırmak ve ayrı ayrı mikrosatellit analizi yapmak mümkün olmamıştır. Tümörün genelinden mikrosatellit analizi yapılmış, olguların tamamı MSS olarak değerlendirilmiştir.

Mesane ürotelyal karsinomlarında MLH1 ve MSH2 ifadesinde azalmanın daha genç hastalarda ve invaziv tümörlerde daha sık olduğunu bildiren bir çalışmanın (85) aksine başka bir çalışmada MMR defekti ve MSI-H durumunun mesane kanserinde son derece nadir ve yaştan bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır (1). Çalışmamızda da DNA MMR proteinlerinden (PMS2, MLH1, MSH2, MSH6) en az biri ile parsiyel kayıp görülmesi durumu yaş ile ilişkisiz bulunmuştur ($p=0,965$).

Catto ve ark. farklı evre ve dereceye sahip 111 ürotelyal karsinom olgusunda azalmış MLH1 ve MSH2 ifadesinin ($<30\%$), kas invaziv tümörlerde yüzeyel ve düşük dereceli tümörlere göre daha sık olduğunu bildirmişlerdir (85). Bu durumun aksine Saetta ve arkadaşları ne azalmış MLH1 ifadesi ($<20\%$) ne de MSI durumu ile evre ya da derece arasında ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir (103). Bizim çalışmamızda DNA MMR proteinlerinden (PMS2, MLH1, MSH2, MSH6) en az biri ile parsiyel kayıp görülmesi durumu evre ve lamina propria invazyon derinliği ile ilişkisiz bulunmuştur ($p=1,000$ ve $p=0,972$).

Literatürde bir çalışmada yüzeyel mesane kanserlerinde DNA MMR proteinleri (MLH1, MSH2) ile ifade azalmasının ($<30\%$) daha az rekürrens ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (85). Başka bir çalışmada DNA MMR proteinleri (MLH1, MSH2) ile azalmış ifade ($<30\%$) gösteren 9 mesane ürotelyal karsinomunun hiçbirinde hastalık progresyonu saptanmadığı belirtilmiştir (107). Bunların aksine bir çalışmada ise azalmış DNA MMR ifadesinin (MLH1, $<20\%$) daha kısa hastaliksız sağkalım prediktörü olduğu bildirilmiştir (103).

Literatürde mesane kansinonlarında BCG tedavi yanıtı ile DNA MMR protein ifadesi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece bir çalışmada BCG tedavisi alan grup ile BCG tedavisi almayan grup karşılaştırılmış, MLH1 ifadesindeki azalmanın BCG tedavisi alan grupta progresyonsuz sağkalım için prediktif bir faktör olduğu sonucunu çıkarmışlardır (84). BCG tedavi yanıtı ile DNA MMR protein ifadesi arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışma olan çalışmamızda en az bir DNA MMR proteini ile parsiyel kayıp bulunduran olguların büyük kısmının (%70,8) BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta olduğu saptanmıştır ($p=0,022$). Ayrıca DNA MMR protein ifadeleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde PMS2 boyanma yüzde ve boyanma skorlarının BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta daha düşük olduğu izlenmiştir ($p=0,011$ ve $p=0,037$). Bu bulgular azalmış DNA MMR protein ifadesinin BCG tedavisine iyi yanıt ile ilişkili olduğunun göstergesi olabilir.

Lynch sendromlu kişilerde üst üriner kanalda ürotelyal kansinon görülme riski normal popülasyona göre 14 kat artmıştır, ancak mesane ürotelyal kansinonu için böyle bir ilişki bulunmamaktadır (108). Mesane ürotelyal kansinomunda MSI sıklığını araştıran çalışmalarda çeşitli mono-, di- tri- veya tetra-nükleotid panelleri kullanılmış, MSI sıklığı %0-100 arasında bildirilmiştir (1, 85, 88, 100, 103, 109-113). Sonuçlardaki çeşitlilik, analiz edilen mikrosatellit bölgeleri ve sayısının, kullanılan tekniklerin, kullanılan materyallerin, MSI sınıflandırma kriterlerinin ve hasta popülasyonunun farklılıklarından kaynaklanmaktadır (tablo 13) (113).

Kolorektal kansinomlarda mikrosatellit analizi için 5 poli-A mononükleotid tekrarını içeren panelin (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27) Bethesda panelinden (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) daha sensitif ve spesifik olduğu bildirilmiştir (86, 87, 101). Mesane kansinomlarında mikrosatellit analizi için önerilen standart bir panel bulunmamaktadır.

Mongiati-Artus ve ark. tanı yaşı 45'ten küçük 17 mesane kanserinde 5 poli-A mononükleotid panelini kullanarak mikrosatellit instabilitesi araştırmış, sadece 1'i MSI-H kabul edilmiş, sonuç olarak bu panelin mesane ürotelyal kansinomlarında MSI değerlendirmesi için yeterli olduğu ve erken yaşta mesane ürotelyal kansinonu görülmesi durumunun MSI ile ilişkisiz olduğunu bildirmişlerdir (113). Bizim

çalışmamızda da 5 poli-A paneli kullanılmış ve 57 olgunun tamamı MSS kabul edilmiştir.

Mesane ürotelyal karsinomlarında DNA MMR proteinlerinin ifadesinde azalma görülmesinin mikrosatellit instabilitesi ile korelasyon gösterdiğini bildiren bir çalışma (103) yanı sıra azalmış ifade veya ifade kaybı ile mikrosatellit instabilitesi arasında korelasyon olmadığını bildiren yayınlar (1, 85) da bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda fragman analizi uygulanan 57 olgunun tamamı MSS olarak değerlendirilmiş, parsiyel kayıp görülmesinin mikrosatellit instabilite göstergesi olmadığı sonucu çıkarılmıştır. Bu sonuç göz önüne alındığında, mesane karsinomlarında kolorektal karsinoma benzer şekilde fokal de olsa DNA MMR ifadesinin görülmesi, DNA MMR defekti olmadığı veya MSS olduğu yönünde değerlendirme için yeterli kabul edilebilir.

PD-1 / PD-L1 etkileşimini hedefleyen immün kontrol nokta inhibitörleri tedavisine yanıtı belirlemede mikrosatellit instabilite durumunun biyobelirteç olduğu bilinmektedir ve bu durum birçok farklı kanser tipinde DNA MMR defekti testi için klinik talep artışına neden olmuştur (8, 101). Gastrointestinal ve endometrial karsinomlar gibi mikrosatellit instabilitesinin sık olduğu tümörlerde DNA MMR defekti/MSI ile tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi arasında korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (114, 115). Ancak meme ve akciğer kanseri gibi mikrosatellit instabilitesinin daha nadir olduğu tümörlerde böyle bir korelasyonun bulunmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (116, 117). Bizim çalışmamızda diğer mesane karsinomu çalışmalarından farklı olarak DNA MMR protein ifadeleri ve mikrosatellit instabilite durumu ile PD-L1 ifadesinin ilişkisi araştırılmış; en az bir DNA MMR proteininde parsiyel kayıp olması ve mikrosatellit instabilite durumu ile TİİH oranı ve TİİH PD-L1 ifadesi arasında bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,778$ ve $p=0,891$). Bu durum parsiyel kayıp gösteren olguların tamamının MSS olması ve MSI-H olgularda görülen artmış neoantijen yapımına ve immün yanıtı yol açmaması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak; çalışmamız, kas invaziv olmayan mesane kanserlerinin BCG tedavisine yanıtızlığında, DNA MMR ifadesi, mikrosatellit instabilite durumu ve PD-L1 ifadesi rolünü birlikte araştıran ilk çalışma olma özelliğindedir. Çalışmamızın sonuçları BCG tedavisi direncinde PD-1/PD-L1 immün sistemden kaçış

mekanizmasının rolü olmadığını düşündürmektedir. Azalmış DNA MMR protein ifadesi BCG tedavisine yanıt verecek olguları belirlemede yol gösterici olabilir, ancak bu sonucun daha geniş vaka serileri ile desteklenmesi gerekmektedir. Mesane karsinomlarında immunohistokimyasal DNA MMR parsiyel ifade kaybı, MSI ile ilişkisizdir ve fokal de olsa DNA MMR ifadesinin görülmesi tümörün MSI olmadığını yüksek olasılıkla göstermektedir. Ancak olgu sayısının azlığı çalışmamızın sınırlı kaldığı bir yöndür ve sonuçlarımızın daha geniş serilerde yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



Tablo 13: Mesane Ürotelyal Karsinomu ve Mikrosatellit Analizi (MSA) Çalışmalarının Özeti

Çalışma	Olgu Sayısı	İHK-Eşik Değer	MSA Paneli	Sonuç
Bonnal ve ark. (2000)	33	-	3 Mononükleotid (BAX, TGFβRII, BAT-26) 21 hastada: 3 Dinükleotid (D2S123, D5S346, D17S250)	Mononükleotid tekrarlar ile hastaların hepsi MSS, dinükleotid tekrarlar ile 21 hastanın sadece 1 tanesinde MSI saptanmış. MSI mesane kanserinde çok nadirdir.
Kassem ve ark. (2001)	24	MLH1 ve MSH2- total kayıp	6 Dinükleotid (D2S123, D2S391, D2S119, D3S1612, D3S1561, D3S1611)	Örneklerin büyük kısmında intratümöral heterojenite görülmesi MMR defektinin tümör progresyonu sırasında geliştiğinin kanıtı olabilir.
Catto ve ark. (2003)	111 (84'üne MSA)	MLH1 ve MSH2- total kayıp ve <%30 azalmış ifade	14 bölge (BAT25, BAT26, MFD15, D2S123, D18S58, D10S197, APC, BAT40, MYC1L, D18S69, BAX, TGFβRII, hMSH3, hMSH6)	MLH1 ve MSH2 ile parsiyel kayıp derece, evre ve prognozla ilişkili, MSI ile ilişkisizdir. Heterojen MMR ifadesi karsinogeneze erken progenitör hücrelerin klonal çoğalmasının göstergesi olabilir.
Saetta ve ark. (2004)	72	MLH1 ve MSH2 <%20 azalmış ifade	Bethesda Paneli: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250	MLH1'in parsiyel kaybı MSI ile ilişkilidir ve daha kısa hastaliksız sağkalım için bir prediktördür. MSI derece, evre ve prognozla ilişkisizdir.
Vaish ve ark. (2005)	44		10 bölge (BAT26, D2S123, D18S58, D9S283, BAT40, D9S1851, BAX, TGFβRII, hMSH3, IGFIIR)	MSI yüzeyel tümörlerde rekürrens için bağımsız bir prognostik faktör olabilir.
Mongiati-Artus ve ark. (2005)	17 (<45 yaş)	-	Promega Paneli: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27, Penta C ve Penta D	Promega paneli, mesane ürotelyal karsinomlarında MSI saptamada yeterlidir. Genç hastalarda mesane kanseri MSI ile ilişkisizdir.
Yamamoto ve ark. (2006)	100	MLH1 ve MSH2 <%30 azalmış ifade	-	MMR proteini ile azalmış ifade daha iyi prognoz göstergesidir. Kromozomal instabil tümörler daha kötü prognozludur.
Giedl ve ark. (2014)	204 (109'u <45 yaş)	MLH1, MSH2, MSH6 <%5 ya da total kayıp	Bethesda Paneli: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250	MMR defekti ve MSI mesane kanserinde son derece nadir ve yaştan bağımsızdır. MSI ve MMR protein ekspresyonu arasında korelasyon yoktur.
Sanguedolce ve ark. (2018)	67	MLH1, MSH2 <%20 azalmış ifade	-	MLH1, BCG ile tedavi edilen hastalarda progresyonsuz sağkalım için bağımsız bir prediktördür.
Çalışmamız	59	MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 ≤%30 parsiyel kayıp >%30 kayıp yok	Promega Paneli: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27, Penta C ve Penta D	DNA MMR proteinlerinden en az birinde parsiyel kayıp görülmesi yaş, evre, l.propriya invazyon derinliği, TİİH oranı, TİİH'de PD-L1 ifadesi ve MSI ile ilişkisizdir. Ancak BCG tedavisine iyi yanıtın göstergesi olabilir.

6. SONUÇLAR

- Çalışmamızın başlıca amaçları, BCG tedavisi yanıtızlığında PD-L1 aracılı immün sistemden kaçış mekanizması rolünün araştırılması, MSI durumunun BCG yanıtı ile ilişkisini incelemek ve mesane ürotelyal karsinomlarında MSI araştırılmasında immünohistokimya ve DNA fragman analiz yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması ve immünohistokimya yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesidir.
- Yüksek dereceli, Ta veya T1 evresinde ürotelyal karsinom tanısı alıp, intravezikal BCG tedavisi uygulanmış hastalardan, Avrupa Üroloji Derneğinin 2018 tedavi rehberine göre BCG refrakter kabul edilmiş 29 hasta ve BCG tedavisine yanıt alınmış 30 hasta olmak üzere toplam 59 hasta çalışma grubumuzu oluşturmuştur. BCG'ye yanıt veren grupta sadece tedavi öncesine ait tümör örnekleri; BCG refrakter grupta ise tedavi öncesi biyopsiler ve tedavi sonrası nüks/progresyon biyopsileri değerlendirmeye alınmıştır. Ancak BCG refrakter grupta 2 hastanın tedavi sonrası nüks biyopsisine ait parafin bloğa ulaşılammıştır.
- PCR bazlı fragman analizi yöntemi ile mikrosatellit analizi 57 hastada yapılabilmıştır. Bunlardan 55'inde tedavi öncesi biyopside, 2 hastada ise tedavi sonrası nüks / progresyon biyopsisinde (tedavi öncesi biyopside tümör çok küçük olduğundan) bu değerlendirme yapılmıştır.
- Tüm olguların yaş, cinsiyet, BCG tedavisine yanıt durumu, T evresi, l. propria invazyon derinliği, en büyük invazyon odağı uzun çapı, l. propria invazyon yaygınlığı, eşlik eden karsinoma in situ varlığı ve TİİH oranı not edilmiştir.
- İmmünohistokimyasal olarak PD-L1(SP263), PMS2, MLH1, MSH2, MSH6 antikoları uygulanmıştır.
- PD-L1 ile tümör hücrelerinde membranöz ve TİİH'de sitoplazmik/membranöz boyanma yüzdeleri kaydedilmiş, ayrıca buna göre olgular yüksek PD-L1 (≥ 25) ve düşük PD-L1 (< 25) ifadesi olarak sınıflandırılmıştır. TİİH oranı ≤ 1 olan

olgularda TİİH PD-L1 ifadesi için yüksek PD-L1 (%100), düşük PD-L1 (<%100) şeklinde farklı bir eşik değeri kullanılmıştır. Bu değerlendirmeler üzerinden gruplar arası farklar araştırılmıştır.

- PMS2, MLH1, MSH2, MSH6 ile tümör hücrelerindeki nükleer boyanma yüzdeleri belirlenmiş; %30 ve altında boyanma gösteren olgular “parsiyel kayıp” grubuna, %30’dan fazla boyanma gösteren olgular “kayıp yok” grubuna dahil edilmiştir. Ayrıca boyanma şiddeti zayıf:1, orta:2, kuvvetli:3 olacak şekilde değerlendirilmiş, boyanma yüzdesi (%0-100) ile boyanma şiddetinin değeri (1-3) çarpılarak her bir belirteç için boyanma skoru elde edilmiştir. Bu değerler üzerinden gruplar arası farklar araştırılmıştır.
- PCR bazlı fragman analizi yöntemi ile mikrosatellit analizi için 5 poli-A mononükleotid marker (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27) ve doku kimliklendirmesi için 2 polimorfik pentanükleotid marker (Penta C ve Penta D) içeren Promega (MD1641 MSI Analysis System, Version 1.2) paneli kullanılmıştır.
- Normal doku ile tümör dokusu arasında mikrosatellit bölge uzunlukları karşılaştırılmış, 5 bölgeden en az 2’sinde uzunluk farkı saptandığı durumda tümörler MSI-H, 1 bölgede uzunluk farkı olduğunda MSI-L, bölgeler arası uzunluk farkı olmadığında MSS olarak kabul edilmiştir.
- Olguların %10,2’si (n:6) kadın, %89,8’i (n:53) erkektir, ortalama yaş 67,74 (48-85)’tür. BCG refrakter hasta grubundaki 29 hastanın yaş ortalaması 66,34 (48-84), BCG tedavisine yanıt veren 30 hastanın yaş ortalaması 69,73 (52-85)’tür. Bu iki grupta yaş ve cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark izlenmemiştir (sırasıyla p=0,139; p=0,195).
- 59 hastanın tedavi öncesi T evresi dağılımına bakıldığında; %13,6’sı (n:8) Ta, %86,4’ü (n:51) T1 evresindedir.
- BCG refrakter olgularda tedavi öncesi ve sonrası T evreleri karşılaştırılmıştır. 29 olgunun tedavi öncesi biyopsilerinin %17,2’si (n:5) Ta, %82,8’i (n:24) T1 evresinde; 27’sinin tedavi sonrası alınan biyopsilerinin %40,8’i (n:11) Ta,

%44,4'ü (n:12) T1, %11,1'i (n:3) T2 ve %3,7'si (n:1) T4a evresindedir. Buna göre %14,8'inde (n:4) evre progresyonu gözlenmiştir.

- BCG tedavisine yanıt alınan 30 hastanın tedavi öncesinde %10'u (n:3) Ta, %90'ı (n:27) T1 evresindedir.
- Tedavi öncesi tümör evreleri karşılaştırıldığında; BCG refrakter grup ile BCG tedavisine yanıt alınan grup arasında farklılık saptanmamıştır (p=0,472).
- **T1 olgular BCG tedavi yanıtı ve l. propria invazyon derinliği açısından kıyaslandığında derin l.propria invazyonu gösteren grupta BCG refrakterliğinin daha yüksek oranda olduğu tesbit edilmiştir (p=0,038).**
- Olguların %17'sinde (n: 10) tedavi öncesi biyopside tümöre eşlik eden karsinoma in situ (KİS) saptanmış, ancak bu bulgu BCG refrakterliği ile ilişkisiz bulunmuştur (p=1.000).
- **Tümöre eşlik eden karsinoma in situ bulunan olgularda TİİH oranı daha düşük bulunmuştur (p=0,018).**
- T evresi ile TİİH oranı arasında bir ilişki yoktur (p=0,773).
- Hem tedavi öncesi biyopsilerde BCG refrakter grup ile BCG iyi yanıt veren grup arasında hem de BCG refrakter grupta tedavi öncesi ve sonrası biyopsiler arasında TİİH oranları açısından anlamlı bir fark yoktur (p=0,922 ve p=0,352). BCG refrakter grupta tedavi sonrası biyopsilerde BCG tedavi etkisini gösterecek şekilde TİİH oranında bir artış saptanmaması, BCG tedavisi ile hedeflenen immün yanıtın bu hastalarda sağlanamadığını göstermekte ve BCG tedavisine yanıtsız olma durumu ile örtüşmektedir.
- Tedavi öncesi biyopsilerde olguların %57,6'sı (n:34) TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi, %42,4'ü (n:25) TİİH'de düşük PD-L1 ifadesine sahiptir. BCG refrakter grupta tedavi sonrasına ait biyopsilerin %48,1'i (n:13) yüksek PD-L1 ifadesi, %51,9'u (n:14) düşük PD-L1 ifadesi göstermektedir.

- BCG refrakter grup ve BCG tedavisine iyi yanıt veren grup arasında TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,708$)
- Tüm olgularda tümör hücrelerinde düşük PD-L1 ifadesi görülmüştür.
- BCG refrakter olguların büyük kısmında %66,7 (n:18)) tedavi öncesi ve sonrası biyopsiler arasında TİİH'de düşük veya yüksek PD-L1 ifadesi açısından değişiklik saptanmaması, PD-L1 ifadesinin BCG tedavisinden bağımsız olduğunu destekler niteliktedir.
- **T1 tümörlerde, Ta tümörlere göre TİİH yüksek PD-L1 ($\geq\%25$) ifadesi daha sıktır ($p=0.008$).**
- Tedavi öncesi biyopsilerde T1 olgular içinde, lamina propria invazyon derinliği, en büyük invazyon odağı uzun çapı ve invazyon yaygınlığı ile TİİH'de PD-L1 ifadesi arasında bir ilişki yoktur (sırasıyla $p=0,313$; $p=0,859$; $p=0,603$).
- Eşlik eden KİS durumu TİİH'de PD-L1 ifadesi ile ilişkisizdir ($p=1,000$).
- **TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi ($\geq\%25$) ile TİİH oranı arasında pozitif bir korelasyon vardır (Pearson korelasyonu: 0,428).**
- Olguların hiçbirinde DNA MMR proteinleri ile tümör hücrelerinde nükleer boyanmada total kayıp veya MLH1 ile parsiyel kayıp izlenmemiştir.
- Tedavi öncesine ait 59 biyopsinin 24'ünde (%40,7) DNA MMR proteinlerinde parsiyel kayıp ($\leq\%30$) izlenmiştir. Bu olguların 11'inde (%46) izole MSH6, 6'sında (%25) izole PMS, 5'inde (%21) PMS2 ve MSH6, 1'inde (%4) MSH2 ve MSH6, 1'inde (%4) PMS2, MSH2 ve MSH6 parsiyel kaybı gözlenmiştir.
- **En az bir DNA MMR proteini ile parsiyel kayıp bulunduran 24 olgunun büyük kısmının (%70,8 (n:17)) BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta olduğu saptanmıştır ($p=0,022$).**
- Tedavi öncesi biyopsilerde BCG refrakter grup ile BCG tedavisine yanıt veren grup arasında DNA MMR protein ifadeleri ayrı ayrı incelendiğinde; PMS2 boyanma yüzdeleri ve boyanma skorları BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta

daha düşüktür ($p=0,011$ ve $p=0,037$). Ancak PMS2 ile parsiyel kayıp ($\leq 30\%$) durumuna göre yapılan yukarıdaki karşılaştırmada farkın istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmadığı izlenmiştir ($p=0,061$). MSH2 ve MSH6 ile bir farklılık izlenmemiştir ($p=0,521$ ve $p=0,113$).

- DNA MMR proteinlerinden en az biri ile parsiyel kayıp görülmesi durumu yaş, evre, lamina propria invazyon derinliği, eşlik eden KİS varlığı ile ilişkisizdir (sırasıyla $p=0,965$, $p=1,000$, $p=0,972$ ve $p=0,490$).
- Ayrıca en az bir DNA MMR proteininde parsiyel kayıp olması ile yüksek TİİH oranı veya TİİH’de yüksek PD-L1 ifadesi görülmesi arasında bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,778$; $p=0,891$).
- **Mikrosatellit analizi uygulanan 57 tümörün tamamı mikrosatellit stabil (MSS) saptanmıştır. DNA MMR proteinleri ile parsiyel kayıp görülmesinin, mikrosatellit instabilitesi göstergesi olmadığı sonucuna varılmıştır.**
- **Kolorektal karsinoma benzer şekilde mesane karsinomlarında fokal de olsa DNA MMR ifadesinin görülmesi; DNA MMR defekti olmadığı veya MSS olduğu yönünde değerlendirme için yeterli kabul edilebilir.**
- Çalışmamız, kas invaziv olmayan mesane kanserlerinin BCG tedavisine yanıtızlığında, DNA MMR ifadesi, mikrosatellit instabilite durumu ve PD-L1 ifadesi rolünü birlikte araştıran, bunların birbiri ile ilişkisini inceleyen ilk çalışma olma özelliğindedir.
- Ayrıca diğer mesane karsinomalarında MMR defektini araştıran çalışmalardan farklı olarak, bilinen majör MMR proteinlerinin dördüne de birlikte (MLH-1, PMS2, MSH-2 ve MSH6) immünohistokimya panelinde yer veren ilk çalışma olarak önem kazanmaktadır.
- Ancak olgu sayısının azlığı çalışmamızın sınırlı kaldığı bir yöndür ve sonuçlarımızın daha geniş serilerde yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Kas İnvaziv Olmayan BCG Refrakter Mesane Karsinomlarında Mikrosatellit İnstabilitesi ve PD-L1 Ekspresyonunun Araştırılması

Amaç: Yüksek dereceli kas invaziv olmayan mesane karsinomalarında transüretal rezeksiyon sonrası intravezikal Bacillus Calmette-Guerin (BCG) uygulaması altın standart tedavi yaklaşımıdır. Ancak hastaların %30-45’inde BCG tedavisi başarısız olmakta ve radikal cerrahiye alternatif konservatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. PD-1/PD-L1 etkileşimini hedefleyen immün kontrol nokta inhibitörleri, antitümör konak immün yanıtının düzenlenmesinde etkili ve pek çok kanser tipinde gündemde olan umut verici bir tedavi yaklaşımıdır. DNA “mismatch” onarım (MMR) sisteminde defekt sonucunda mikrosatellit instabilitesi (MSI) gösteren tümörlerde immün kontrol noktasını hedef alan tedavilerin daha etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda BCG tedavi yanıtı ile PD-L1 ifadesinin rolü ve MSI durumunun ilişkisi incelenerek, immün kontrol nokta inhibitörlerinin BCG dirençli olgularda tedavi seçeneği olma olasılığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca mesane karsinomlarında MSI araştırılmasında immünohistokimya ile PCR yönteminin karşılaştırılması ve MSI-H vakaları gösterecek immünohistokimyasal bulguların belirlenebilmesi planlanmıştır.

Materyal ve Metod: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD’nda incelenmiş, yüksek dereceli, Ta/T1 evresinde ürotelyal karsinom tanısı alıp, intravezikal BCG tedavisi uygulanmış hastalardan tedavi yanıtı alınmış 30 hasta ve BCG refrakter kabul edilmiş 29 hasta olmak üzere toplam 59 hasta çalışma grubumuzu oluşturmuştur. İmmünohistokimyasal olarak PD-L1 (SP263), MSH2, MSH6, PMS2 ve MLH1 ekspresyonu araştırılmıştır. PD-L1 ekspresyonu, tümör hücrelerinde ve tümör ilişkili iltihap hücrelerinde (TİİH) değerlendirilmiştir. Tüm immünboyalı kesitler dijital ortamda değerlendirilerek boyanma yüzdeleri hesaplanmıştır. DNA MMR proteinlerinde ayrıca boyanma şiddeti de derecelendirilmiş ve boyanma yüzdesi (%0-100) ile şiddeti (1-3) çarpılarak boyanma skoru hesaplanmıştır. Mikrosatellit analizi için 5 poli-A mononükleotid marker (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 ve MONO-27) içeren Promega (MD1641 MSI Analysis System, Version 1.2) paneli kullanılmış, normal doku ile tümör dokusu

arasında mikrosatellit bölge uzunlukları karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak 0,05'in altındaki p değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar: BCG refrakter grup ve BCG tedavisine iyi yanıt veren grup arasında yaş, cinsiyet dağılımı ve tümör evresi açısından anlamlı fark izlenmemiştir; ancak l. propria invazyon derinliği açısından bakıldığında derin l. propria invazyonu gösteren olgularda BCG refrakterliğinin daha yüksek oranda olduğu izlenmiştir ($p=0,038$). T1 tümörlerde, Ta tümörlere göre TİİH yüksek PD-L1 ifadesi daha sıktır ($p=0,008$). TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi ile TİİH oranı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (Pearson korelasyonu: 0,428). BCG refrakter grupta tedavi öncesi ve sonrası biyopsiler arasında, BCG refrakter grup ile BCG tedavisine iyi yanıt veren grup arasında TİİH oranı, TİİH'de ve tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Olguların hiçbirinde DNA MMR proteinleri ile total kayıp izlenmemiş; %40,7'sinde en az bir DNA MMR proteininde parsiyel kayıp izlenmiş, bunların büyük kısmının (%70,8) BCG tedavisine iyi yanıt veren grupta olduğu saptanmıştır ($p=0,022$). En az bir DNA MMR proteininde parsiyel kayıp olması ile yüksek TİİH oranı veya TİİH'de yüksek PD-L1 ifadesi görülmesi arasında bir ilişki saptanmamıştır. 57 olguda DNA fragman analizi ile MSI değerlendirilmiş, tüm olgular mikrosatellit stabil bulunmuştur.

Tartışma: Çalışmamız, kas invaziv olmayan mesane kanserlerinin BCG tedavisine yanıtızlığında, DNA MMR ifadesi, mikrosatellit instabilite durumu ve PD-L1 ifadesi rolünü birlikte araştıran ilk çalışma olma özelliğindedir. Çalışmamızın sonuçları BCG tedavisi direncinde PD-1/ PD-L1 aracılı immün sistemden kaçış mekanizmasının rolü olmadığını düşündürmektedir. Azalmış DNA MMR protein ifadesi BCG tedavisine yanıt verecek olguları belirlemede yol gösterici olabilir, ancak bu sonucun daha geniş vaka serileri ile desteklenmesi gerekmektedir. Mesane karsinomlarında immünohistokimyasal DNA MMR parsiyel ifade kaybı, MSI ile ilişkisizdir ve fokal de olsa DNA MMR ifadesinin görülmesi tümörün MSI olmadığını yüksek olasılıkla göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mesane, BCG, PD-L1, DNA MMR, Mikrosatellit instabilitesi

SUMMARY

Investigation of Microsatellite Instability and PD-L1 Expression in Non-Muscle Invasive BCG Refractory Bladder Carcinomas

Aim: Instillation of intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) following transurethral resection is the gold standard treatment approach for high grade nonmuscle invasive urothelial carcinoma of the bladder (NMIBC). However, in 30-45% of patients, BCG treatment fails, and requirements of new conservative treatment occurs for these patients. Immune checkpoint inhibitor therapy (anti-PD1, anti-PD-L1) is a new therapy option that regulates the antitumoral immune response and has been found to be more effective in the microsatellite instable (MSI-H) / deficient mismatch repair (dMMR) cases. In our study, it was aimed to evaluate the role of PD-L1 expression and MSI status in BCG therapy response and the possibility of immune control point inhibitors as a treatment option in BCG refractory cases. In addition, it was planned to determine the immunohistochemical findings that will show MSI-H cases in NMIBC by comparing the PCR method and the immunohistochemistry method.

Material and Methods: This study consist of 59 patients (29 BCG refractory and 30 BCG responsive) who were examined in Ankara University School of Medicine, Department of Pathology and diagnosed as NMIBC with high grade and then intravesical BCG treatment was applied. Expression of PD-L1 (SP263), MSH2, MSH6, PMS2 and MLH1 were investigated by immunohistochemistry. PD-L1 expression was evaluated in tumor cells and tumor associated immune cells (IC). The percentage of staining was calculated on the digitally scanned slides. For DNA MMR proteins, the staining intensity was also graded, and the staining score was calculated by multiplying the percentage of staining (0-100%) and the intensity (1-3). For microsatellite analysis, 5 poly-A mononucleotide markers (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and MONO-27) were used and microsatellite region lengths were compared between normal tissue and tumor tissue. P values of <0.05 were considered statistically significant.

Results: No significant difference was observed between the BCG refractory group and BCG responsive group in terms of age, gender distribution and tumor stage.

BCG refractory cases were found to be more frequent in tumors with deep lamina propria invasion ($p = 0.038$). In T1 tumors, high PD-L1 expression in IC is more common than Ta tumors ($p = 0.008$). A positive correlation was found between IC percentage and high PD-L1 expression in IC (Pearson correlation: 0.428). There was no statistically significant difference in terms of IC percentage, PD-L1 expression in IC or tumor cells between neither the pre-and post-treatment biopsies in the BCG refractory group, nor the BCG refractory group and the BCG responsive group. None of the cases had total loss with DNA MMR proteins; reduced expression of DNA MMR protein was observed in 40.7% of total cases, and most of them (70.8%) were found to be in the BCG responsive group ($p = 0.022$). No relation was found between reduced expression of DNA MMR protein and high IC percentage or high PD-L1 expression in IC. MSI was evaluated by DNA fragment analysis in 57 cases, and all cases were microsatellite stable.

Conclusion: Our study is the first study to investigate the role of DNA MMR expression, microsatellite instability and PD-L1 expression in the BCG refractory NMIBC cases. The results of our study suggest that PD-1/PD-L1 mediated immune system escape mechanism has no role in BCG treatment resistance. Reduced expression of DNA MMR protein may be a sign to identify cases that will respond to BCG therapy, but this result should be supported by larger case series. Immunohistochemically reduced expression of DNA MMR expression is unrelated to MSI in bladder carcinomas and the presence of DNA MMR expression, even focal, most likely indicates that the tumor is not MSI.

Key Words: Bladder, BCG, PD-L1, DNA MMR, Microsatellite instability

KAYNAKLAR

1. Giedl J, Schneckenpointner R, Filbeck T, Ruemmele P, Hofstaedter F, Burger M, et al. Low frequency of HNPCC-associated microsatellite instability and aberrant MMR protein expression in early-onset bladder cancer. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(5):634-9.
2. Petrylak DP. Immunotherapy: The Wave of the Future in Bladder Cancer? *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(3S):S3-S17.
3. Smith SG, Zaharoff DA. Future directions in bladder cancer immunotherapy: towards adaptive immunity. *Immunotherapy*. 2016;8(3):351-65.
4. Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer*. 2018;17(1):129.
5. Davarpanah NN, Yuno A, Trepel JB, Apolo AB. Immunotherapy: a new treatment paradigm in bladder cancer. *Curr Opin Oncol*. 2017.
6. Singh P, Black P. Emerging role of checkpoint inhibition in localized bladder cancer. *Urol Oncol*. 2016;34(12):548-55.
7. Maruf M, Brancato SJ, Agarwal PK. Nonmuscle invasive bladder cancer: a primer on immunotherapy. *Cancer Biol Med*. 2016;13(2):194-205.
8. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2016;22(4):813-20.
9. Chang L, et al. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017;00:000–000. 2017.
10. Farina MS, Lundgren KT, Bellmunt J. Immunotherapy in Urothelial Cancer: Recent Results and Future Perspectives. *Drugs*. 2017;77(10):1077-89.
11. Arıncı K. *Anatomi 1. cilt: Kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar: Güneş kitapevi; 2006.*
12. Mills S. *Histology for pathologists: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.*
13. Cristina Magi-Galluzzi CGP. *Genitourinary Pathology* 2015.
14. Ozan H. *Anatomi: Klinisyen Tıp Kitabevleri; 2005.*
15. Ming Zhou GN, Jonathan Epstein. *Uropathology* 2012.
16. Antonio Lopez-Beltran CLM, Rodolfo Montironi, Liang Cheng. *Rare Tumors and Tumor-like Conditions in Urological Pathology* 2015.
17. Betts JG, DeSaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse DH, et al. *Anatomy and physiology*. 2014.
18. Birinci Ş. ÜM. *Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilgi Sistemleri Genel Müdürlüğü Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2017.*
19. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. 2017;3:17022.
20. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs 4ed. Bosman FT, S JE, R LS, Hiroko O, editors. Lyon International Agency for Research on Cancer 2016.
21. Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto JJotNCI. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. 2004;96(5):357-63.

22. Mueller CM, Caporaso N, Greene MH. Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol Oncol*. 2008;26(5):451-64.
23. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*. 2013;63(2):234-41.
24. Letasiova S, Medved'ova A, Sovcikova A, Dusinska M, Volkovova K, Mosoiu C, et al. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health-Glob*. 2012;11.
25. Zeegers MPA, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World Journal of Urology*. 2004;21(6):392-401.
26. Besaratinia A, Tommasi S. Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. *FASEB J*. 2013;27(6):2090-100.
27. Jiang X, Yuan J-M, Skipper PL, Tannenbaum SR, Mimi CYJCr. Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. 2007;67(15):7540-5.
28. Zeegers MP, Swaen GM, Kant I, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med*. 2001;58(9):590-6.
29. Navarro Silvera SA, Rohan TE. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control*. 2007;18(1):7-27.
30. Kurtio P, Pukkala E, Kahelin H, Auvinen A, Pekkanen J. Arsenic concentrations in well water and risk of bladder and kidney cancer in Finland. *Environ Health Persp*. 1999;107(9):705-10.
31. Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, Peters C. *Campbell-walsh urology*: Elsevier; 2016.
32. Griffiths TL, practice AoBCJIjoc. Current perspectives in bladder cancer management. 2013;67(5):435-48.
33. McCredie M, Stewart J, Day NJIjoc. Different roles for phenacetin and paracetamol in cancer of the kidney and renal pelvis. 1993;53(2):245-9.
34. Abern MR, Dude AM, Tsivian M, Coogan CL. The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer. *Urol Oncol-Semin Ori*. 2013;31(8):1628-34.
35. Rubenwolf PC, Eder F, Ebert A-K, Hofstaedter F, Woodhouse CR, Roesch WHJTJou. Persistent histological changes in the exstrophic bladder after primary closure—a cause for concern? 2013;189(2):671-7.
36. Stephenson WT, Holmes FF, Noble MJ, Gerald KB. Analysis of Bladder-Carcinoma by Subsite - Cystoscopic Location May Have Prognostic Value. *Cancer*. 1990;66(7):1630-5.
37. Cai T, Nesi G, Boddi V, Mazzoli S, Dal Canto M, Bartoletti R. Prognostic role of the tumor-associated tissue inflammatory reaction in transitional bladder cell carcinoma. *Oncology reports*. 2006;16(2):329-34.
38. Akdaş A, Türkeri L. The impact of squamous metaplasia in transitional cell carcinoma of the bladder. *International urology and nephrology*. 1991;23(4):333-6.
39. Logothetis CJ, Dexeus FH, Chong C, Sella A, Ayala AG, Ro JY, et al. Cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin chemotherapy for unresectable

- urothelial tumors: the MD Anderson experience. *The Journal of urology*. 1989;141(1):33-7.
40. Martin J, Jenkins B, Zuk R, Blandy J, Baithun S. Clinical importance of squamous metaplasia in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(3):250-3.
 41. Kim SP, Frank I, Cheville JC, Thompson RH, Weight CJ, Thapa P, et al. The impact of squamous and glandular differentiation on survival after radical cystectomy for urothelial carcinoma. *The Journal of urology*. 2012;188(2):405-9.
 42. Wasco MJ, Daignault S, Zhang Y, Kunju LP, Kinnaman M, Braun T, et al. Urothelial carcinoma with divergent histologic differentiation (mixed histologic features) predicts the presence of locally advanced bladder cancer when detected at transurethral resection. *Urology*. 2007;70(1):69-74.
 43. Epstein JI, Egevad L, Humphrey PA, Montironi R, pathology IliDUPGJTajos. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the prostate: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. 2014;38(8):e6-e19.
 44. Inamura KJC. Bladder cancer: new insights into its molecular pathology. 2018;10(4):100.
 45. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VEJEu. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part B: prostate and bladder tumours. 2016;70(1):106-19.
 46. Magers MJ, Lopez-Beltran A, Montironi R, Williamson SR, Kaimakliotis HZ, Cheng L. Staging of bladder cancer. *Histopathology*. 2019;74(1):112-34.
 47. Mahul B. Amin SKT. *Genitourinary Diagnostic Pathology*2016.
 48. Gofrit ON, Pizov G, Shapiro A, Duvdevani M, Yutkin V, Landau EH, et al. Mixed high and low grade bladder tumors—are they clinically high or low grade? *The Journal of urology*. 2014;191(6):1693-6.
 49. Lotan Y, Gupta A, Shariat SF, Palapattu GS, Vazina A, Karakiewicz PI, et al. Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(27):6533-9.
 50. Zhou TC, Sankin AI, Porcelli SA, Perlin DS, Schoenberg MP, Zang X. A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: From mediator of immune escape to target for treatment. *Urol Oncol*. 2017;35(1):14-20.
 51. Wood CTLaDP. *Bladder Cancer Diagnosis, Therapeutics and Management*2010.
 52. European Association of Urology Guidelines 2018. 2018.
 53. Morales A. BCG: A throwback from the stone age of vaccines opened the path for bladder cancer immunotherapy. *Can J Urol*. 2017;24(3):8788-93.
 54. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nature Reviews Urology*. 2014;11(3):153.
 55. Sui X, Lei L, Chen L, Xie T, Li X. Inflammatory microenvironment in the initiation and progression of bladder cancer. *Oncotarget*. 2017;8(54):93279.
 56. Solinas C, Chanzá NM, Awada A, Scartozzi M. The immune infiltrate in prostate, bladder and testicular tumors: an old friend for new challenges. *Cancer treatment reviews*. 2017;53:138-45.

57. Boccafoschi C, Montefiore M, Pastormerlo M, Annoscia S, Lozzi C, Betta P-G. Immunophenotypic characterization of the bladder mucosa infiltrating lymphocytes after intravesical BCG treatment for superficial bladder carcinoma. *European urology*. 1992;21:304-8.
58. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Advances in anatomic pathology*. 2017;24(5):235.
59. Tian Y-F, Tang K, Guan W, Yang T, Xu H, Zhuang Q-Y, et al. OK-432 Suppresses Proliferation and Metastasis by Tumor Associated Macrophages in Bladder Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2015;16(11):4537-42.
60. Ayari C, LaRue H, Hovington H, Caron A, Bergeron A, Têtu B, et al. High level of mature tumor-infiltrating dendritic cells predicts progression to muscle invasion in bladder cancer. *Human pathology*. 2013;44(8):1630-7.
61. Xiang S, Zhou S, Guan W, Liu J, Ye Z. Expression of MUC1 and distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human bladder transitional cell carcinoma. *Di 1 jun yi da xue xue bao= Academic journal of the first medical college of PLA*. 2005;25(9):1114-8.
62. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: the future is now. *Cancer treatment reviews*. 2017;54:58-67.
63. Bidnur S, Savdie R, Black PC. Inhibiting Immune Checkpoints for the Treatment of Bladder Cancer. *Bladder Cancer*. 2016;2(1):15-25.
64. Carosella ED, Ploussard G, LeMaout J, Desgrandchamps F. A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. *Eur Urol*. 2015;68(2):267-79.
65. Gong J, Chehrazhi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):8.
66. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. Pd-L1. *J Clin Pathol*. 2018;71(3):189-94.
67. Bally AP, Austin JW, Boss JM. Genetic and epigenetic regulation of PD-1 expression. *The Journal of Immunology*. 2016;196(6):2431-7.
68. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(8):1173-82.
69. Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM, et al. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res*. 2008;14(15):4800-8.
70. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstralh EJ, Frank I, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced

granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer*. 2007;109(8):1499-505.

71. Hashizume A, Umemoto S, Yokose T, Nakamura Y, Yoshihara M, Shoji K, et al. Enhanced expression of PD-L1 in non-muscle-invasive bladder cancer after treatment with Bacillus Calmette-Guerin. *Oncotarget*. 2018;9(75):34066-78.
72. Hurwitz ME, Adeniran A, Yao X, Hafez N, Schalper KA, Rimm DL, et al. The effect of BCG intravesical therapy and recurrence on PDL1 expression in non-invasive bladder cancers. *American Society of Clinical Oncology*; 2015.
73. Eich M-L, Chaux A, Guner G, Taheri D, Rodriguez MAM, Peña MDCR, et al. Tumor immune microenvironment in non-muscle invasive urothelial carcinoma of bladder. *Human pathology*. 2019.
74. Gevaert T, Montironi R, Lopez-Beltran A, Van Leenders G, Allory Y, De Ridder D, et al. Genito-urinary genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatment. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):216-27.
75. Wang Y, Liu J, Yang X, Liu Y, Liu Y, Li Y, et al. Bacillus Calmette-Guerin and anti-PD-L1 combination therapy boosts immune response against bladder cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:2891-9.
76. Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, Sabalos C, Schechter N, Li X, et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol*. 2016;11(1):95.
77. Sandrine Jacob FP. *Biochimie* 2002;84 27–47.
78. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/Oncology Clinics*. 2002;16(4):775-810.
79. Boland C. Richard SNT, Stanley R. Hamilton, David Sidransky, James R. Eshleman, Randall W. Burt, Stephen J. Meltzer, Miguel A. Rodriguez-Bigas, Riccardo Fodde, G. Nadia Ranzani, and Sudhir Srivastava. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *CANCER RESEARCH* 1998;58:5248-57.
80. Mei-Li Chen J-YC, Jing Hu, Qian Chen, Li-Xia Yu, Bao-Rui Liu, Xiao-Ping Qian, Mi Yang. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *nt J Clin Exp Pathol*. 2018;11(3):1431-8.
81. Asad Umar CRB, Jonathan P. Terdiman, Sapna Syngal, Albert de la Chapelle, Josef Rüschoff, Richard Fishel, Noralane M. Lindor, Lawrence J. Burgart, Richard Hamelin, Stanley R. Hamilton, Robert A. Hiatt, Jeremy Jass, Annika Lindblom, Henry T. Lynch, Päivi Peltomäki, Scott D. Ramsey, Miguel A. Rodriguez-Bigas, Hans F. A. Vasen, Ernest T. Hawk, J. Carl Barrett, Andrew N. Freedman, and Sudhir Srivastava. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst* 2004 96(4):261–8.
82. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*. 2015;47(4):1189-202.
83. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: part I. The utility of immunohistochemistry. *The Journal of molecular diagnostics*. 2008;10(4):293-300.

84. Sanguedolce F, Cormio A, Massenio P, Pedicillo MC, Cagiano S, Fortunato F, et al. Altered expression of HER-2 and the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 predicts the outcome of T1 high-grade bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(4):637-44.
85. Catto JW, Xinarianos G, Burton JL, Meuth M, Hamdy FC. Differential expression of hMLH1 and hMSH2 is related to bladder cancer grade, stage and prognosis but not microsatellite instability. *Int J Cancer*. 2003;105(4):484-90.
86. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2019.
87. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Disease markers*. 2004;20(4-5):251-7.
88. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, Kim TM, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*. 2017;8:15180.
89. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:133.
90. VENTANA PD-L1-SP263 (Package insert). Ventana Medical System, Inc, Tucson. 2017.
91. Reis H, Serrette R, Posada J, Lu V, Chen YB, Gopalan A, et al. PD-L1 Expression in Urothelial Carcinoma With Predominant or Pure Variant Histology: Concordance Among 3 Commonly Used and Commercially Available Antibodies. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(7):920-7.
92. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Johrens K, Kirchner T, Reu S, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2016;29(10):1165-72.
93. Zajac M, Boothman AM, Ben Y, Gupta A, Jin X, Mistry A, et al. 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*. 2019;143(6):722-31.
94. Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, Fay AP, Callea M, Leow JJ, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol*. 2015;26(4):812-7.
95. Faraj SF, Munari E, Guner G, Taube J, Anders R, Hicks J, et al. Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8⁺ T cells in urothelial carcinoma. *Urology*. 2015;85(3):703 e1-6.
96. Wankowicz SAM, Werner L, Orsola A, Novak J, Bowden M, Choueiri TK, et al. Differential Expression of PD-L1 in High Grade T1 vs Muscle Invasive Bladder Carcinoma and its Prognostic Implications. *J Urol*. 2017;198(4):817-23.
97. Wang Y, Zhuang Q, Zhou S, Hu Z, Lan R. Costimulatory molecule B7-H1 on the immune escape of bladder cancer and its clinical significance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009;29(1):77-9.
98. Huang Y, Zhang SD, McCrudden C, Chan KW, Lin Y, Kwok HF. The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer. *Oncol Rep*. 2015;33(6):3075-84.
99. Chevalier MF, Schneider AK, Cesson V, Dartiguenave F, Lucca I, Jichlinski P, et al. Conventional and PD-L1-expressing Regulatory T Cells are Enriched During BCG Therapy and may Limit its Efficacy. *Eur Urol*. 2018;74(5):540-4.

100. Bonnal C, Ravery V, Toubanc M, Bertrand G, Boccon-Gibod L, Henin D, et al. Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2000;55(2):287-91.
101. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg M, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals of Oncology*. 2019.
102. Kassem HS, Varley JM, Hamam SM, Margison GP. Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2001;84(3):321-8.
103. Saetta A, Goudopoulou A, Korkolopoulou P, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Michalopoulos N, et al. Mononucleotide markers of microsatellite instability in carcinomas of the urinary bladder. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2004;30(7):796-803.
104. Joost P, Veurink N, Holck S, Klarskov L, Bojesen A, Harbo M, et al. Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer. *Diagnostic pathology*. 2014;9(1):126.
105. McCarthy AJ, Capo-Chichi JM, Spence T, Grenier S, Stockley T, Kamel-Reid S, et al. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(2):115-29.
106. Tachon G, Frouin E, Karayan-Tapon L, Auriault ML, Godet J, Moulin V, et al. Heterogeneity of mismatch repair defect in colorectal cancer and its implications in clinical practice. *Eur J Cancer*. 2018;95:112-6.
107. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(6):899-921.
108. Hartmann A, Zanardo L, Bocker-Edmonston T, Blaszyk H, Dietmaier W, Stoehr R, et al. Frequent microsatellite instability in sporadic tumors of the upper urinary tract. *Cancer Res*. 2002;62(23):6796-802.
109. Gonzalez-Zulueta M, Ruppert JM, Tokino K, Tsai YC, Spruck CH, Miyao N, et al. Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer research*. 1993;53(23):5620-3.
110. Christensen M, Jensen MA, Wolf H, Ørntoft TF. Pronounced microsatellite instability in transitional cell carcinomas from young patients with bladder cancer. *International journal of cancer*. 1998;79(4):396-401.
111. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(21):9871-5.
112. Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. *BMC Urol*. 2005;5:2.
113. Mongiat-Artus P, Miquel C, van der Aa M, Buhard O, Hamelin R, Bangma C, et al. Infrequent microsatellite instability in urothelial cell carcinoma of the bladder in young patients. *Eur Urol*. 2006;49(4):685-90.
114. Sloan EA, Ring KL, Willis BC, Modesitt SC, Mills AM. PD-L1 expression in mismatch repair-deficient endometrial carcinomas, including lynch syndrome-associated and MLH1 promoter hypermethylated tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2017;41(3):326-33.

115. Salem ME, Puccini A, Grothey A, Raghavan D, Goldberg RM, Xiu J, et al. Landscape of tumor mutation load, mismatch repair deficiency, and PD-L1 expression in a large patient cohort of gastrointestinal cancers. *Molecular Cancer Research*. 2018;16(5):805-12.
116. Mills AM, Dill EA, Moskaluk CA, Dziegielewska J, Bullock TN, Dillon PM. The relationship between mismatch repair deficiency and PD-L1 expression in breast carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2018;42(2):183-91.
117. Takamochi K, Takahashi F, Suehara Y, Sato E, Kohsaka S, Hayashi T, et al. DNA mismatch repair deficiency in surgically resected lung adenocarcinoma: microsatellite instability analysis using the Promega panel. *Lung Cancer*. 2017;110:26-31.

