

T.C
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANENİN NONİNVAZİV VE İNVAZİV ÜROTELYAL
KARSİNOMLARINDA B7-H3, TİM-3, BTLA’NIN
İMMUNHİSTOKİMYASAL ANALİZİ, GRADE VE LENF NODU
TUTULUMU İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DR. NAZLI TÜRK

UZMANLIK TEZİ

KONYA -2019

T.C
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANENİN NONİNVAZİV VE İNVAZİV ÜROTELYAL
KARSİNOMLARINDA B7-H3, TİM-3, BTLA’NIN
İMMUNHISTOKİMYASAL ANALİZİ, GRADE VE LENF NODU
TUTULUMU İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DR. NAZLI TÜRK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

PROF.DR. LEMA TAVLI

KONYA-2019

NOT: Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü fonunca 191518004 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Patoloji uzmanlık eğitimimde engin bilgi ve tecrübelerini paylaşan, tez danışmanım, değerli hocam Prof.Dr. Lema Tavlı'ya,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösterip patolojiyi sevdiren, patolojinin inceliklerini aktaran, destek ve hoşgörüsünü esirgemeyen; değerli anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Salim Güngör'e ve değerli hocalarım Prof. Dr. M. Cihat Avunduk, Doç. Dr. Hasan Esen, Doç. Dr. Pembe Oltulu, Dr. Öğ. Üy. Sıddıka Fındık ve Dr. Öğ. Üy. Fahriye Kılıç'a,

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum, dostluklarıyla çalışma hayatımı kolaylaştıran sevgili asistan arkadaşlarıma,

Yardımlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen laboratuvar çalışanlarımıza, sekreterlerimize ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Sevgisi, anlayışı ve desteği ile daima yanımda olan sevgili eşim Hüseyin Buğra Türk'e, fedakarlıkların en büyüğünü gösteren canım oğlum Emin Mete Türk'e,

Hayatımın ve eğitimimin her anında yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük emek ve özveriyi gösteren canım annem Aysel Kılıç'a,

Fedakarlıkla her zaman yanımda olan biricik aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Mesanein Noninvaziv ve İnvaziv Ürotelyal Karsinomlarında B7-H3, TİM-3, BTLA'nın İmmunhistokimyasal Analizi, Grade ve Lenf Nodu Tutulumu ile İlişkinin Belirlenmesi

ÖZET

Mesane ürotelyal karsinomu en sık görülen 9. kanser tipidir. Yüzeysel mesane karsinomlarında 5 yıllık sağkalım %90'ın üzerindeyken kasa invaze mesane karsinomlarında bu oranın %45 ile %55 arasında bildirilmiştir. Bu durum immün kontrol noktalarını bloke eden antikorlar gibi yeni tedavi yöntemlerini araştırmaya yönlendirmiştir.

İmmün kontrol noktaları bağışıklık tepkisinin tipini, büyüklüğünü, süresini düzenlemekle görevli hem uyarıcı hem de inhibe edici yollardan oluşur. BTLA, TİM-3 ve B7-H3 immün kontrol noktalarından olup T hücre ilişkili inhibitör reseptörlerdir. Çalışmamızda mesane ürotelyal karsinomlarında tümör hücrelerinde B7-H3, TIM-3 ve BTLA reseptörlerinin ekspresyon durumları ile bunların prognostik faktörlerle ilişkisini irdelemeyi ve neticede gelecekte bu moleküller üzerinden etki edecek ilaçların mesanein ürotelyal karsinomlarında kullanımı ile ilgili ipucu elde edebilmeyi amaçladık.

Çalışmamıza Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 2013-2018 yıllarında noninvaziv veya invaziv ürotelyal karsinom tanılı 90 adet vaka dahil edildi. 13 adet normal görünümlü mesane dokusu kontrol grubu olarak belirlendi. Tüm olgulara immünohistokimyasal yöntem ile BTLA, TİM-3 ve B7-H3 çalışıldı. İmmunhistokimyasal çalışmanın sonuçları prognostik faktörlerden yaş, cinsiyet, histolojik derece, invazyon derinliği, lenf nodu metastazı varlığı ile ilişkileri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

90 adet ürotelyal karsinom olgusunun 60 tanesinde (%67,4) BTLA ekspresyonu tespit edilirken, 11 tanesinde (%12,2) yüksek ekspresyonu mevcuttu. BTLA ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. TİM-3 ekspresyonu ile ileri Tevre arasında anlamlı ilişki mevcutken ($p=0,001$) histolojik derece ve lenf nodu metastazı varlığı ile arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı. B7-H3 ekspresyonu ile histolojik grade ve ileri Tevre arasında anlamlı korelasyon saptanırken lenf nodu metastazı varlığı ile arasında anlamlı fark tespit edilmedi. 17 olguda primer tümör dokusunda ve metastatik lenf nodu dokusunda BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Çalışmamız literatürde mesanein ürotelyal karsinomlarında tümör hücrelerinde BTLA ekspresyonunu immünohistokimyasal yöntemle gösteren ve B7-H3 ekspresyonu ile yüksek histolojik derece ve ileri Tevre korelasyonunu gösteren ilk araştırmadır.

Determination of the Relationship of B7-H3, TIM-3, BTLA with Immunohistochemical Analysis, Grade and Lymph Node Involvement in Noninvasive and Invasive Urothelial Carcinomas of Bladder

SUMMARY

Urothelial carcinoma of the bladder is the 9th most prevalent type of cancer. Superficial bladder carcinomas are associated with a 90% five-year survival rate, however, this rate was reported to vary between 45% and 55% in cases of muscle invasive bladder carcinoma. This has promoted research on novel treatment methods such as antibodies that block the immune checkpoints.

Immune checkpoints consist of stimulatory and inhibitory pathways that are tasked with regulating the type, strength, and duration of the immune response. The immune checkpoints BTLA, TIM-3, and B7-H3 are T-cell co-inhibitory receptors. This study aims to investigate the expression levels of B7-H3, TIM-3, and BTLA receptors in tumor cells and their relationship with prognostic factors in urothelial carcinoma of the bladder, and consequently, obtain clues about the future use of medications that would take effect through these molecules in the treatment of urothelial carcinomas.

This study included 90 cases who were diagnosed with noninvasive or invasive urothelial carcinomas between 2013-2018 in the Pathology Department of Meram Faculty of Medicine. The control group was comprised of 13 bladder tissues with a normal appearance. All cases were tested for BTLA, TIM-3, B7-H3 using immunohistochemistry. The results of the immunohistochemical work-up was statistically compared to prognostic factors including age, sex, histological grade, depth of invasion, and the presence of lymph node metastasis.

BTLA expression was detected in 60 (67.4%) of the 90 urothelial carcinoma cases and 11 of these (12.2%) showed high expression. BTLA expression was not statistically correlated with age, sex, histological grade, the depth of invasion, and the presence of lymph node metastasis. TIM-3 expression was significantly correlated with an advanced T-stage ($p=0.001$), however, it did not have a statistically significant correlation with histological grade and the presence of lymph node metastasis. B7-H3 expression was significantly correlated with histological grade and an advanced T-stage ($p=0.001$), however, it did not have a statistically significant correlation with the presence of lymph node metastasis. In 17 cases, levels of BTLA, TIM-3, and B7-H3 expression were not significantly different between the primary tumor tissue and the metastatic lymph node tissue.

Our study is the first to demonstrate BTLA expression in tumor cells in urothelial carcinoma of the bladder using immunohistochemistry and show a correlation between B7-H3 expression and a high histological grade and T-stage.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Mesane	3
2.1.1 Mesanenin Anatomisi.....	3
2.1.2 Mesanenin Embriyolojisi.....	5
2.1.3 Mesanenin Histolojisi.....	7
2.2 Mesane Tümörleri.....	8
2.2.1 Epidemiyoloji ve İnsidans.....	8
2.2.2 Etiyoloji	8
2.2.3 Moleküler ve Genetik Özellikler	10
2.2.4 Mesane Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	11
2.2.5 Noninvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom.....	12
2.2.5.1 Makroskobik Özellikler	12
2.2.5.2 Mikroskobik Özellikler	12
2.2.6 İnvaziv Ürotelyal Karsinom	14
2.2.6.1 Makroskopik Özellikler	14
2.2.6.2 Mikroskopik Özellikler	15
2.2.6.3 Diferansiyasyonlar ve Histopatolojik Varyantlar	19
2.2.7 Klinik Bulgular ve Tanı	23
2.2.8 Tedavi	24
2.2.9 Evreleme.....	24
2.2.9 Ürotelyal Karsinomlarda Prognostik Faktörler.....	26
2.3 Tümör İmmünitesi.....	28
2.3.1 BTLA	31
2.3.2 TİM-3.....	34
2.3.3 B7-H3.....	37

3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Olgu Belirlenmesi ve Hazırlanması.....	41
3.2. Histopatolojik İnceleme.....	42
3.3. İmmunhistokimyasal İnceleme	42
3.4 İmmunreaktivitenin Değerlendirilmesi	43
3.5 İstatistiksel Analiz.....	46
3.6 Etik Kurul Onayı	46
4. BULGULAR	47
4.1. Genel Bulgular	47
4.1.1 Yaş	49
4.1.2 Cinsiyet.....	49
4.1.3 Histolojik Derece	50
4.1.4 İnvazyon Derinliği.....	52
4.1.5 Lenf Nodu Metastazı.....	55
4.2 İmmunhistokimyasal Bulgular	58
4.2.1 BTLA	58
4.2.2 TİM-3.....	62
4.2.3 B7-H3.....	66
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇLAR.....	81
7. KAYNAKÇA.....	83

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Üriner sistem tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması (2016)	11
Tablo 2.2: Mesane karsinomlarında TNM evreleme sistemi (AJCC 2017)	25
Tablo 2.3: Mesane karsinomlarında evre grupları.....	26
Tablo 3.1: Antikorların bazı özellikleri	43
Tablo 3.2: İmmunhistokimyasal BTLA, B7-H3 ve TİM-3 için boyanma yoğunluğunun değerlendirilmesi	44
Tablo 3.3: İmmunhistokimyasal BTLA için boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi.....	44
Tablo 3.4: İmmunhistokimyasal TİM-3 için boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi.....	45
Tablo 3.5: İmmunhistokimyasal TİM-3 için IRS puanlama sisteminin değerlendirilmesi	45
Tablo 4.1: Hastaların yaş, cinsiyet, histolojik grade, invazyon derinliği, lenf nodu tutulum durumu, B7-H3/BTLA/TİM-3 immunhistokimyasal boyanmalarının istatistiksel değerleri	47-48
Tablo 4.2: Yaş ve cinsiyet ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	49
Tablo 4.3: Yaş ve cinsiyet ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	50
Tablo 4.4: Yaş ve cinsiyet ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	50
Tablo 4.5: Histolojik grade ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	51
Tablo 4.6: Histolojik grade ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	51
Tablo 4.7: Histolojik grade ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	52
Tablo 4.8: İnvazyon derinliği ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	53
Tablo 4.9: İnvazyon derinliği ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	54

Tablo 4.10: İnvazyon derinliği ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	55
Tablo 4.11: Lenf nodu metastazı ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	56
Tablo 4.12: Lenf nodu metastazı ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	56
Tablo 4.13: Lenf nodu metastazı ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları	57
Tablo 4.14: Metastatik olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodu metastaz dokusunun immunhistokimyasal BTLA ekspresyonlarının istatistiksel analizi	57
Tablo 4.15: Metastatik olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodu metastaz dokusunun immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonlarının istatistiksel analizi	58
Tablo 4.16: Metastatik olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodu metastaz dokusunun immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonlarının istatistiksel analizi	58
Tablo 4.17: Histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazının TİM-3 IRS puanlamasına göre istatistiki analizi	66
Tablo 4.18: Ürotelyal karsinom tanılı tüm hastaların tümör dokuları ile normal ürotelyumun immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonlarının istatistiksel analizi	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Kadınlarda mesanenin anatomisi	4
Şekil 2.2: Erkeklerde mesanenin anatomisi	4
Şekil 2.3: Kloakanın ürogenital sinüs ve anal kanal olmak üzere ikiye ayrılması.....	6
Şekil 2.4: Normal ürotelyum	7
Şekil 2.5: Noninvaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	13
Şekil 2.6: Noninvaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	14
Şekil 2.7: Lamina propriaya invaze ürotelyal karsinom	17
Şekil 2.8: Muskularis propriaya invaze ürotelyal karsinom	18
Şekil 2.9: Skuamöz diferansiyasyon gösteren ürotelyal karsinom	20
Şekil 2.10: Nested varyant ürotelyal karsinom	21
Şekil 2.11: Tümör hücreleri veya antijen sunan hücreler ile T hücreli lenfositlerin immun etkileşimi, tümör mikroçevresi	31
Şekil 2.12: HVEM/BTLA/CD160 sinyal yolağı	33
Şekil 2.13: Hepatoselüler karsinom hücrelerinde TİM-3 regülasyonu ve fonksiyonları	37
Şekil 2.14: B7-H3'ün potansiyel rolleri	39
Şekil 4.1: Normal ürotelyumda immunhistokimyasal BTLA boyanması	59
Şekil 4.2: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile (-) boyanma	60
Şekil 4.3: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile 1(+) boyanma	61
Şekil 4.4: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile 2(+) boyanma	61
Şekil 4.5: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile 3(+) boyanma	62
Şekil 4.6: Normal ürotelyumda immunhistokimyasal TİM-3 ile boyanma	62
Şekil 4.7: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TİM-3 ile (-) boyanma.....	64
Şekil 4.8: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TİM-3 ile 1(+) boyanma	64
Şekil 4.9: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TİM-3 ile 2(+) boyanma	65
Şekil 4.10: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TİM-3 ile 3(+) boyanma	65
Şekil 4.11: Normal ürotelyumda immunhistokimyasal B7-H3 boyanması	67
Şekil 4.12: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile (-) boyanma	68

Şekil 4.13: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 1(+) boyanma	68
Şekil 4.14: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 2(+) boyanma	69
Şekil 4.15: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 3(+) boyanma	69
Şekil 4.16: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 1(+), 2(+) ve 3(+) boyanma	70



SİMGELER VE KISALTMALAR

- BCG: Bacillus Calmette-Guérin
- B-HCG: Beta Human Chorionic Gonadotropin
- BTLA: B ve T lenfosit zayıflatıcı
- CTLA-4: Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili molekül-4
- DC: Dendritik hücre
- Gal-9: Galektin-9
- GATA-3: GATA bağlayıcı protein 3
- H&E: Hematoksilen-eozin
- HAVCR2: Hepatit A virus selüler reseptör 2
- HMWCK: Yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin
- HNF: Hepatosit nükleer faktör
- HVEM: Herpes virus entry mediator
- IFN- γ : İnterferon- γ
- Ig: İmmunoglobulin
- IgV: İmmünglobülin variable domeini
- IKK: Nükleer Faktör-Kappa B İnhibitör Kinaz
- IL-10: İnterlökin-10
- IL-2: İnterlökin-2
- IL-6: İnterlökin-6
- ITIM: İmmüno-reseptör tirozin tabanlı inhibitör motif
- LTa: Lenfotoksin-a
- MHC: Majör doku uygunluk kompleksi
- NF- κ B: Nükleer Faktör-Kappa B
- NK hücreleri: Doğal öldürücü hücreler
- PD-1: Programlanmış hücre ölümü reseptörü-1
- PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligand-1

PTEN: Protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu

Rb: Retinoblastom

SHP: Src homoloji-2 içeren tirozin fosfataz

TAM: Tümör ilişkili makrofaj

TGF β : Dönüştürücü büyüme faktörü beta

Th1: Yardımcı T1 lenfositler

Th2: Yardımcı T2 lenfositler

THR: T hücre reseptörü

TİM-3: T hücresi immünoglobulin domain ve musin domain-3

TLT-2: TREM benzeri transkript 2 (“Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-like transcript 2”)

TNF: Tümör nekrozis faktörü

TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptörü

TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa

Treg: Düzenleyici T hücreleri

TREM: Myeloid hücrelerde ifade edilen tetikleyici reseptör (“Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells”)

TUR: Transüretal rezeksiyon

TUR-M: Transüretal rezeksiyon- Mesane

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane ürotelyal karsinomu üriner sistemin en sık görülen malignitesi olup, erkeklerde görülen kanserler arasında 7., kadınlarda ise 17. Sırada yer alır. (Burger ve ark 2013) En sık görülen 9. kanser tipi olarak bildirilen mesane kanserinin ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda insidansının dünya ortalamasının üstünde olduğu tespit edilmiştir. (Eser ve ark 2009, Aydın ve ark 2015, Ferlay ve ark 2015) Mesanenin idrar rezervuarı olması sebebiyle konsantre kimyasal maddelere maruz kaldığı ve buna bağlı olarak gelişen mesane tümörlerinin primer olarak çevresel faktörler nedeniyle oluştuğu yönünde görüşler vardır. Mesane kanseri insidansı ve mortalitesinde dünya genelinde coğrafi farklılıklar mevcut olup bu durum genetik ve çevresel faktörlere bağlanmıştır. (Siegel ve ark 2014) Mesane kanserleri erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülmekle birlikte kadınlarda daha kötü prognoza sahiptir. (Otto ve ark 2012)

Mesane tümörlerinin %90'ından fazlasını ürotelyal karsinom oluşturur. (Messing ve ark 2007) Ürotelyal kanserlerin yaklaşık %75'i tanı anında yüzeysel tümör şeklinde (Ta, Tis, T1) olup bu tümörlerin çoğunluğu rekürrens ile seyreder. (Smith ve ark 2014) Ürotelyal karsinomda en önemli prognostik faktör evredir. Yüzeysel mesane karsinomlarında 5 yıllık sağkalım %90'ın üzerindeyken kas dokusuna invaze mesane karsinomlarında bu oranın %45 ile %55 arasında olduğu bildirilmiştir. (Scinner ve ark 1980, Cheng ve ark 2000) Mesane kanseri şüphesi olan hastalarda tanı için sistoskopi yapılması ve tespit edilen lezyonların mesane kanserini taklit eden benign lezyonlardan ayırtılması için patolojik inceleme yapılması önerilir.

Genel olarak kılavuzlarda kas dokusuna invaze olmayan mesane kanseri olgularında transüretral rezeksiyon (TUR) ve risk gruplarına bağlı olarak intravezikal tedavi önerilirken, kasa invaze mesane kanseri olgularında kemoterapili veya kemoterapisiz sistektomi önerilmektedir. Ürotelyal karsinom diğer kanser türleri arasında tanıdan hastanın ölümüne kadar en yüksek tedavi maliyetine sahip olan kanser türü olarak bildirilmiştir. (Sievert ve ark 2009)

Kanser tedavisinde yeni araştırmalarla birlikte kemoterapi yanında artık immunoterapi ajanları da kullanılmaktadır. Kanser hücreleri bağışıklık sistemimiz tarafından "yabancı" olarak tanınır ve tümöre karşı immunité geliştirilir. Ancak, tümör hücreleri bazı manipülatif özellikler sergileyerek immünoşüpresif bir mikroçevre modülasyonu ile immün sistemden kaçış mekanizmalarına sahiptir. (Chen ve Mellman 2013) Tümörü infiltre eden immün hücrelerin, tümör büyümesini ve ilerlemesini kontrol

etmek için işlev görebileceği gibi aynı zamanda tümörün gelişebileceği bir immünoşüpresif ortamın yaratılmasına da yardımcı olabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. (Schreiber ve ark 2011) İmmun kontrol noktaları; otoimmün toleransı korumak ve bağışıklık tepkisinin tipini, büyüklüğünü ve süresini düzenlemekle görevli hem uyarıcı hem de inhibe edici yollardan oluşur. Kanserde immün kontrol noktası tedavisi, tümör hücrelerine karşı immün aktiviteyi arttırmak için, düzenleyici yolları hedef alan stratejileri içerir. (Sharma ve Allison 2015) Bağışıklık sisteminin antitümöral etkilerini güçlendirici, tümör indükleyici etkilerini baskılayıcı konularında çok sayıda çalışma yapılmakta olup yeni terapilerin geliştirilmesi ile gelecekte kanser tedavisinde başarının artması beklenmektedir.

B ve T lenfosit zayıflatıcı (BTLA), T hücresi immünoglobulin domain ve musin domain-3 (TIM-3) ve CD276 (B7-H3) immün kontrol noktalarından olup T hücre ilişkili inhibitör reseptörlerdir. T hücreleri, antijen sunan hücreler gibi immün hücrelerde bulunurlar. Mesane kanserlerinde ve diğer bazı kanserlerde tümör hücrelerinde de bu reseptörlerin ekspresyonunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ayrıca immün kontrol noktası tedavileri kapsamında B7-H3, TIM-3 ve BTLA ile ilgili ilaç geliştirme çalışmaları klinik fazI/fazII araştırmaları olarak devam etmektedir. (Marin-Acevedo ve ark 2018)

Biz bu çalışmamızda mesane ürotelyal karsinomlarında tümör hücrelerinde immün kontrol noktalarından olan B7-H3, TIM-3 ve BTLA reseptörlerinin ekspresyon durumları ile bunların prognostik faktörlerle ilişkisini irdelemek istedik. Elde edeceğimiz sonuçlar ile tümör immünitesini araştıran ve literatürde az sayıda bulunan çalışmalara katkı sağlamayı ve neticede gelecekte bu moleküller üzerinden etki edecek ilaçların mesanenin noninvaziv ve invaziv ürotelyal karsinomlarında kullanımı ile ilgili ipucu elde edebilmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

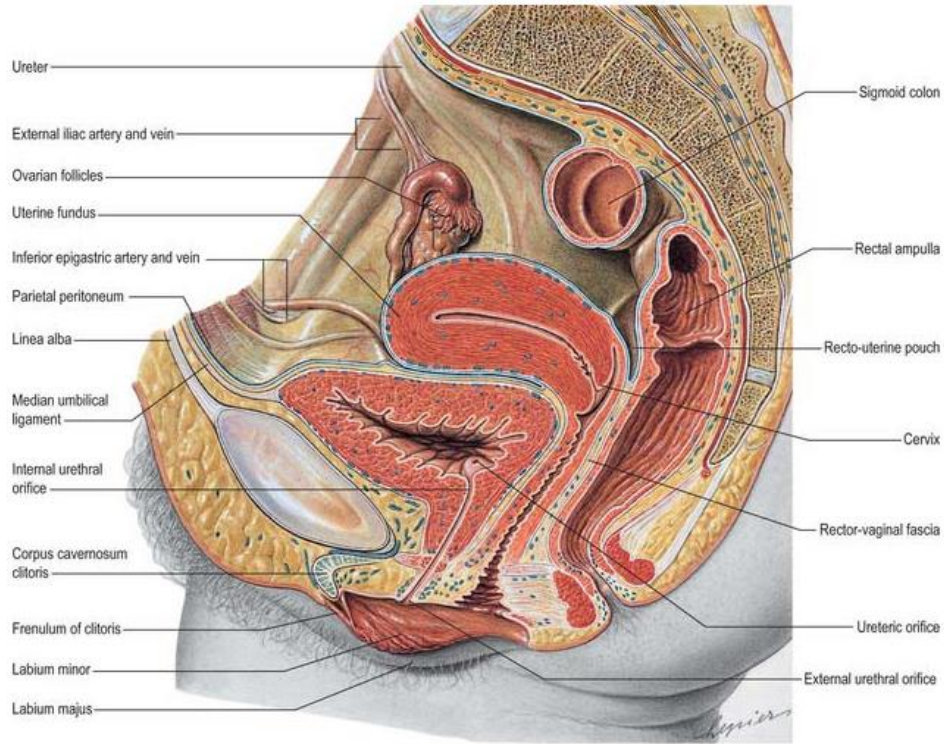
2.1 Mesane

2.1.1 Mesanenin Anatomisi

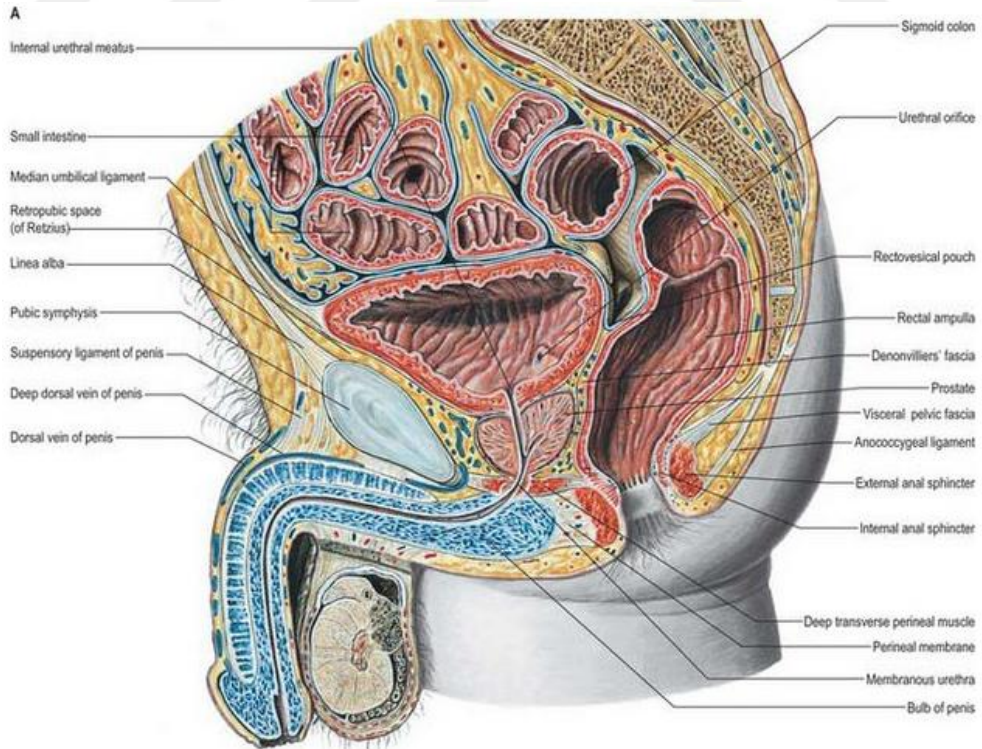
Mesane, pelviste pubis kemiklerin hemen arkasında yer alan kas yapısında duvarı olan içi boş bir organdır. (Brooks 2007) İdrar deposu olarak görev yapan ve genişleme yeteneğine sahip mesanenin kapasitesi yetişkinde 350-500 ml'dir. (Emil 2012)

Boş mesane ters çevrilmiş dört kenarlı piramit şeklindedir ve vezikal fasya ile kaplıdır. (Moore 1992) Mesane detrüör ve trigon olmak üzere iki farklı yapıdan oluşur. Detrüörün birbirlerini serbestçe çaprazlayan düz kas demetleri, mesane boynunda dairesel özellik olarak fonksiyonel bir sfinkter özelliği kazanır. Trigon, üreterlerin giriş deliklerinden mesane boynuna uzanır. Derin trigon detrüör düz kasının, yüzeysel trigon ise üreter kaslarının uzantısıdır. (Sivrioğlu 2005) Trigon mesanenin tabanında olup, mesane boynu ile devamlılık göstererek üretraya açılır. Mesanenin üretraya açıldığı yere ostium uretrae internum denir. Mesane boynunun oturduğu yapılar posteriorda erkekte rektum kadında vajen tarafından oluşturulur. (Şekil 2.1 ve 2.2) Anterior ve lateralleri pubik kemikler ile birlikte internal obturator ve levator ani kasları meydana getirir. Bu yapılar anterior, lateral veya mesane boynu bölgelerini işgal eden ileri evre tümörlerde tutulabilir ve hastayı ameliyat edilemez kılabilir. Mesanenin en ön-üst kesimi apeks veya kubbe olarak bilinir. Apeks median umbilikal ligamanın insersiyon noktasıdır ve dolayısıyla urakal karsinomların geliştiği bölgedir. (Epstein 2016)

Erkeklerde mesanenin üst yüzeyi tamamen peritonla kaplı olup, sigmoid kolon ve ince bağırsaklarla, kadınlarda ise uterus ve ince bağırsaklarla komşudur. (Tanagho 1992) Posterior yüzey mesanenin tabanı olarak bilinir, posteriora ve inferiora bakar. Rektumdan, kadında uterin serviks ve vajenin proksimal kesimi; erkekte seminal veziküller ve vaz deferenslerin ampullası ile ayrılır. Mesanenin posterior anatomik komşulukları klinik olarak çok önemlidir. Posterior duvardan kaynaklanan tümörler, invazyonla yumuşak dokuya ve komşu organlara yayılabilirler. (Epstein 2016) Mesanenin şekil, boyut, pozisyon ve komşulukları içerdiği idrar miktarı ve komşu olduğu organların durumuna göre değişebilmektedir. (Şahinoğlu 2007)



Şekil 2.1: Kadınlarda mesanenin anatomisi (Putz R, Pabst R. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Houten, the Netherlands: Bohn Stafleu van Loghum. 2006.)



Şekil 2.2: Erkeklerde mesanenin anatomisi (Putz R, Pabst R. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Houten, the Netherlands: Bohn Stafleu van Loghum. 2006.)

Mesanenin anterosüperior kısmı umbilikal arterin dalı olan süperior vezikal arterden, fundus kısmı da internal iliyak arterin dalı olan inferior vezikal arterden kanlanır. Kadınlarda uterin ve vajinal arterler de mesaneye dallar gönderir. Venöz drenajı ise vezikal venöz pleksustan gelen venlerin internal iliyak vene dökülmesiyle gerçekleşir. Mesanenin lenfatikleri vezikal, eksternal iliyak, internal iliyak (hipogastrik) ve ana iliak lenf nodüllerine boşalır. (Moore 1992)

Mesane sempatik ve parasempatik sinirlerden uyarı alır. Sempatik sinir lifleri torakal 11-12 ve lumbal 1-2 sinirlerinden kaynaklanırken, parasempatik sinirler sakral 2-4 segmentlerinden kaynaklanır. Mesanenin otonomik efferent innervasyonu sağlayan lifler pelvik pleksustan köken almakta ve mesaneye posterior ve lateral ligamanlar ile girmektedir. Detrusorun relaksasyonundan sempatik innervasyon sorumlu iken, detrusor aktivasyonundan parasempatik ve otonomik sinir sistemin komponenti olan nonadrenerjik nonkolinerjik sistem sorumludur. (Brooks 2007)

2.1.2 Mesanenin Embriyolojisi

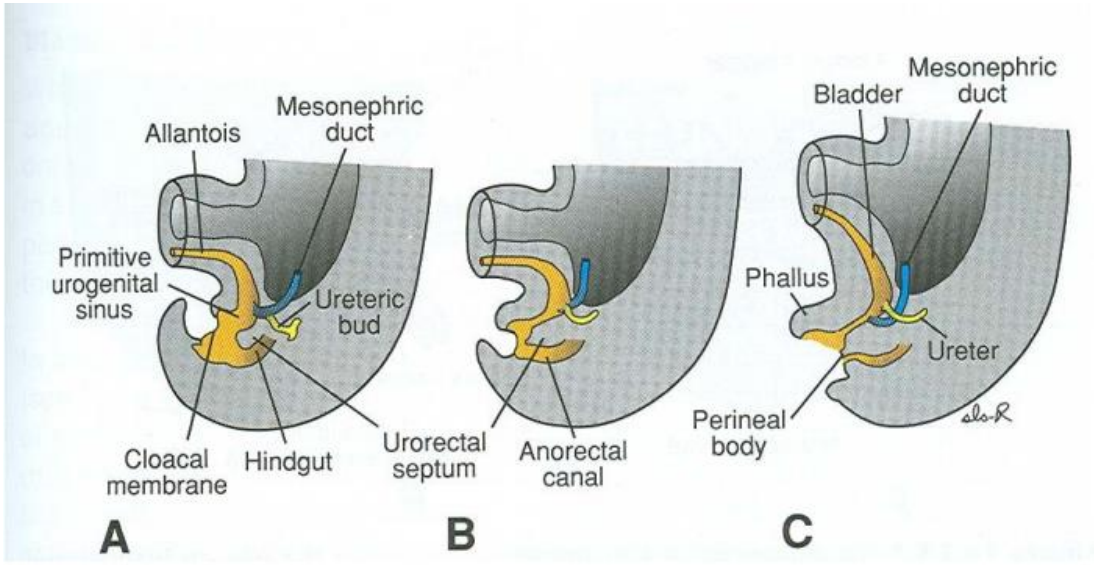
Mesane epiteli ürogenital sinüsün endoderminden köken alır. Lamina propria, muskularis propria ve adventisya splenik mezenkimden gelişir. Erken embriyolojik gelişme sırasında, mezonefrik kanalın kaudal kısmı trigon mukozasının şekillenmesine katkıda bulunur, fakat sonunda yerini endoderm alır. Renal pelvis ve üreterler mezodermden köken alırlar. (Sternberg 1997)

Ürogenital sistem, üriner sistem ve genital sistem olmak üzere embriyolojik gelişimleri iç içe olan ancak birbirinden tamamen farklı görevlere sahip iki kısımdan oluşur. Her iki sistem de karın boşluğunun arka duvarında yer alan intermediyer mezodermden gelişir. Her iki sistemin boşaltım kanalları da başlangıçta ortak bir boşluğa, kloakaya, açılır. (Sadler 1995)

Gelişimin 4. ve 7. haftaları arasında, ürorektal septum kloakayı anorektal kanal ve primitif ürogenital sinüse böler. (Şekil 2.3) Kloakal membranın kendisi de önde ürogenital membran, arkada anal membran kalacak şekilde ikiye bölünür. Primitif ürogenital sinüs üç kısımdan meydana gelir. Üst ve en büyük parça mesanedir. Başlangıçta mesane allantois ile ilişkidir. Mesane oluştuğunda allantois mesanenin apeksine bağlı olarak kalır. Zamanla allantois kord benzeri bir yapı halini alır ve bu yapı urakus adını alarak mesanenin apeksi ile umblikusu birbirine bağlar. (Sadler 1995)

Ürogenital sinüsün ikinci kısmı dar bir kanal olan pelvik kısım olup buradan erkeklerde üretranın prostatik ve membranöz kısımları oluşur. Ürogenital sinüsün son kısmı ise fallik kısımdır. Bu kısmın gelişimi cinsiyete göre farklılık göstermektedir. (Sadler 1995, Mills 2007)

Kloakanın değişimi sırasında mezonefrik duktusların kaudal kısımları mesane duvarı içine doğru emilir ve mezonefrik kanalların bir çıkıntısı olarak başlayan süreç sonucunda üreterler oluşur. Böbreklerin yukarı hareketi nedeniyle üreterlerin uçları yukarı doğru kayar. Mezonefrik kanalların uçları ise birbirine yaklaşarak prostatik üretraya açılır. (Sadler 1995)



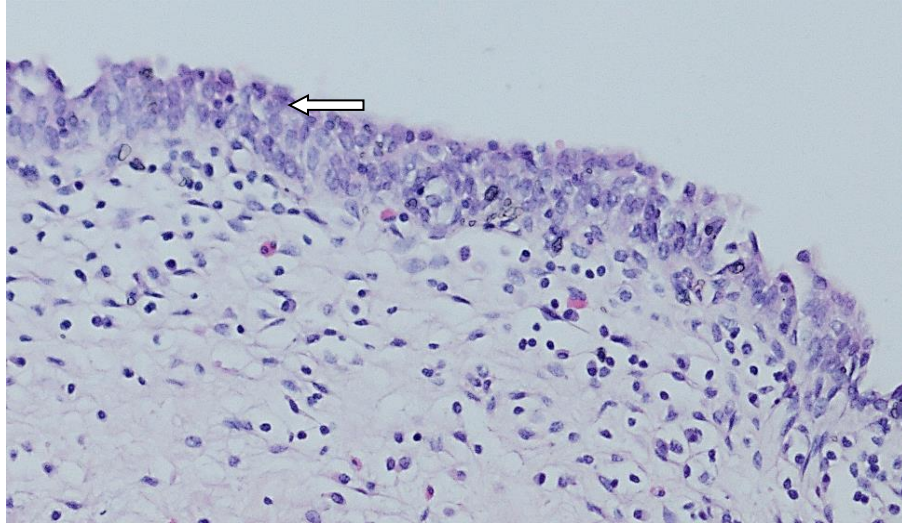
Şekil 2.3: Kloakanın ürogenital sinüs ve anal kanal olmak üzere ikiye ayrılması. A: Beşinci haftanın sonu B: Yedinci hafta C: Sekizinci hafta (Sadler T. Langman's Medical Embryology. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2011)

Mezonefrik kanallar ve üreterler mezoderm kaynaklı olduğundan, bu kanalların birleşmesi ile oluşan mesane mukozası da aslında mezodermden köken alır. Ancak zamanla trigondaki mezodermal epitel ürogenital sinüsün kaudal parçasından köken alan endodermal epitel ile yer değiştirir ve sonuçta tüm mesanenin içi endoderm kaynaklı epitel ile döşeli hale gelir. (Sadler 1995, Mills 2007) Lamina propria, muskularis propria ve adventisya ise splenik mezenkim kaynaklıdır. (Mills 2007)

2.1.3 Mesanenin Histolojisi

Histolojik olarak mesanenin tabakaları mukoza, muskularis propria ve adventisya (seroza) oluşturmaktadır. (Mills 2007)

Mukoza: Epitel, lamina propria ve bir muskularis mukozadan oluşur. Mesanenin iç yüzeyi ürotelyum (transizyonel epitel) ile döşelidir. Ürotelyum nonkeratinize skuamöz epitel ile psödostratifiye kolumnar epitel arasında histolojik görünümüne sahip olduğu için bu şekilde isimlendirilmiştir. Ürotelyumun kalınlığı anatomik lokalizasyonuna ve distansiyon derecesine göre değişir. Kontrakte mesanede ürotelyum 6-7 kat hücreden oluşurken dolu mesanede sadece 2-3 hücre kalınlığındadır. Ürotelyum yüzeyel, intermediyer ve bazal olmak üzere üç tabakadan oluşur. Yüzeyel tabaka bol eozinofilik sitoplazmaya sahip ve şemsiye hücreleri olarak anılan tek sıra iri elips şeklindeki hücrelerden oluşur. İntermediyer hücreler küboidal-alçak kolumnar şekilli, ince kromatin paternine sahip oval nükleusları olan sitoplazma sınırları belirgin hücrelerdir. Bazal tabaka ise bazal lamina üzerine oturan tek sıra küboidal hücrelerden meydana gelir. (Şekil 2.4) Lamina propria zengin bir vasküler ağ, lenf damarları ve birkaç elastik lif içeren gevşek bağ dokudan oluşur. Lamina propriada genellikle izole bantlar şeklinde, bazen kesintili (nadiren devamlılık gösteren) ince bir tabaka halinde düz kas hücreleri izlenebilir. Düz kas hücreleri bir tabaka halinde izlenirlerse muskularis mukoza olarak adlandırılırlar. (Mills 2007)



Şekil 2.4: Normal ürotelyum (ok: Şemsiye hücreleri)

Muskularis propria: Bu tabakayı detrüsor kası oluşturur. İç ve dış longitudinal tabakalar ve bunlar arasındaki santral sirküler kas tabakalarından oluşur. Matür yağ doku adaları mesane duvarında özellikle lamina proprianın derin kesimlerinde sık olarak

bulunur. Komşu bağ dokuda, genellikle nöral yapılarla bir arada küçük paraganglia izlenebilir. (Mills 2007) Paraganglia hücreleri adalar ve kordonlar yapmış, berrak ya da granüler sitoplazmalı, küçük veziküler nükleuslu hücrelerdir ve invaziv karsinom ile karıştırılmamalıdır (Sternberg 2004, Başaklar 2008)

Seroza: Mesaneyi kısmen kaplayan peritondur. Mesanenin peritonsuz kısımlarını da fibröz stroma örter. (Başaklar 2008) Fibroelastik bir tabaka olup damarlar ve sinirler bulunur. (Mills 2007)

2.2 Mesane Tümörleri

2.2.1 Epidemiyoloji ve İnsidans

Mesane kanseri dünyada en sık görülen 9. kanserdir. Kansere bağlı ölümlerin 13. en sık sebebi olan mesane kanseri erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 3,5 kat daha fazla görülmektedir. (Ferlay ve ark 2015) Amerika'da 2016 yılında 76,960 hasta yeni mesane kanseri tanısı alırken, 16,390 hastada mesane kanserine bağlı ölüm bildirilmiştir. (Siegel ve ark 2016) Mesane kanseri insidansı ve mortalitesinde dünya genelinde genetik ve çevresel faktörler sebebiyle coğrafi farklılıklar olduğu bilinmektedir. (Siegel ve ark 2014)

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar Türkiye'de mesane kanserlerinin dünya ortalamasının üstünde olduğunu düşündürmektedir. (Eser ve ark 2009) Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda prostat, akciğer ve kolon kanserleri ilk üç sırada yer alırken Türkiye'de Sağlık Bakanlığı verilerine göre sırasıyla akciğer, prostat ve 3. olarak da mesane kanseri en yüksek insidans oranlarına sahiptirler. Kadınlarda erkeklere oranla mesane kanseri insidansının daha düşük olduğu bildirilmiştir. (Aydin ve ark 2015)

Mesane tümörlerinin %90'undan fazlasını ürotelyal karsinom oluşturur. Yeni tanı alan mesane kanserli hastaların yaklaşık %75'i kasa invaziv olmayan mesane kanseri (Ta, Tis, T1) iken, %25'i kasa invaziv mesane kanseri veya metastatik hastalıktır. (Smith ve ark 2014) Kasa invaze veya metastatik olan mesane kanserli hastaların yaklaşık %60'ında ise 5 yıl içinde ölüm bildirilmiştir. (Messing ve ark 2007)

2.2.2 Etiyoloji

İdrar için rezervuar oluşturması nedeni ile mesane konsantre kimyasal maddelere maruz kalır. Bu nedenle çoğu araştırmacı mesane tümörlerinin primer olarak çevresel faktörler nedeniyle oluştuğunu düşünmektedir. Mesane tümörünün oluşma mekanizmasında çevresel faktörlere aşırı maruz kalmanın yanısıra bağışıklık sisteminde defektlerin bulunması da önemlidir. Şu ana kadarki veriler en azından bazı mesane

kanserlerinin karsinojenlere bağılı geliştiğini göstermektedir. (Walsh ve ark 2002) Mesane kanserinin etiolojisinde genetik yatkınlığın yanında pek çok çevresel potansiyel risk faktörü bilinmektedir. Karsinojen türü ne olursa olsun maruziyet süresinin uzunluğu da önemli bir rol oynar. Bu nedenle idrar stazı mesane tümörü gelişme insidansını arttırır. (Emil ve ark 2012)

Genetik yatkınlık: N-Asetiltransferaz 2 yavaş asetilasyonu ve GSTM1 genindeki defekt varlığının, artmış mesane kanseri riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır. (An ve ark 2015)

Sigara Kullanımı: Sigara, mesane kanserlerinin bilinen en önemli etiyojik faktördür. Mesane kanseri olgularının %40'ından sorumludur. Tütünde mesane kanserine neden olan karsinojenler, nitrozaminler ve 2-naftilamindir. Sigara kullanım süresi ve kullanım miktarı ile bu risk artmaktadır. (Bostwick ve ark 2008)

Mesleki Maruziyet: Boya, lastik, kağıt, deri sanayii, ilaç sanayii, tekstil endüstrisi, petrokimya tesislerinde çalışanlar mesane kanseri açısından risk altındadır (Rübben ve ark 2007) Çalışma ortamında karşılaşılan anilin boyaları, 2-naftilamin, 4-aminobifenil, benzin kimyasalları karsinojen olarak suçlanmıştır. (Rübben ve ark 2007, Anafarta ve ark 2010)

Fenasitin İçeren İlaçlar: Bir aromatik amin ürünü olup uzun süreli olarak bu maddeyi içeren ilaçların tüketimi renal pelvis, ureter ve mesane kanser gelişiminde risk faktörü olarak tanımlanmıştır. (Rübben ve ark 2007, Anafarta ve ark 2010) Ayrıca klornazepin, siklofosamid gibi ilaçların da mesane kanseri gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir. (Kırkcalı ve ark 2005)

Kronik inflamasyon: En önemli örneği schistosoma haematobium enfeksiyonudur. S. haematobium yumurtalarının mesanenin lamina propria ve muskularis propria tabakalarında bulunması kronik inflamasyon ve fibroze yol açar. Bu duruma yanıt olarak ürotelyal hiperplazi ve skuamöz metaplazi gelişir. Tüm bu değişiklikler ise mesanede kanser riskini artırmaktadır. (Smith ve ark 1986, Nesi ve ark 2015)

Kronik iritanlar: Uzun süren taş hastalığı, kateterizasyon ve bunlara bağılı tekrarlayan enfeksiyonlar mesanede mukozal hasara sebep olup mesane tümörüne zemin hazırlamaktadırlar. (Rübben ve ark 2007, Anafarta ve ark 2010)

Suni Tatlandırıcılar: Sakkarin ve Siklamid gibi suni tatlandırıcılar tümör oluşumunda katkısı olduğu düşünülmektedir. (Rübben ve ark 2007)

Kahve tüketimi: Mesane kanser riski ile ilişkileri sıklıkla çalışılmış olup aralarında zayıf pozitif bir ilişki bulunmuştur. (Montironi ve ark 2005)

Arsenik: İçme suyu ve toprakta bulunan arsenik mesane kanseri için risk faktörüdür. (Rübben ve ark 2007)

Radyoterapi: Pelvik radyasyona bağlı mutajenik etkiler hem ürotelyal karsinom hem de skuamöz hücreli karsinom riskinde artışa neden olmaktadır. (Abern ve ark 2013)

Doğumsal mesane ekstrofisi: Kronik inflamasyon, subepitelyal fibrozis, skuamöz metaplazi, sistitis sistika ve sistitis glandularis gibi mukozada çeşitli patolojik değişikliklere, bu yolla da mesane kanseri riskinde artışa neden olmaktadır. Bu hastalar erken dönemde ameliyatla tedavi edilseler bile mesane kalıntısında ürotelyal karsinom, adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom riski artmıştır. (Smeulders ve ark 2001, Rubenwolf ve ark 2013)

Kalıtımsal kanser sendromları: Özellikle Lynch sendromu, herediter retinoblastom ve Costello sendromunda mesane kanseri riski artmaktadır. (Mueller ve ark 2008)

2.2.3 Moleküler ve Genetik Özellikler

Mesane tümörlerinin %90'ından fazlasını ürotelyal karsinom oluşturur. Ürotelyal kanserlerin yaklaşık %75'i tanı anında yüzeysel tümör şeklinde (Ta, Tis, T1) olup muskularis propriaya invaziv değildir. (Smith ve ark 2014) Bunların büyük çoğunluğu rekürrens göstermekle birlikte yüzeysel kalır, ancak %20-30'u kasa invazyon yapar. Morfolojik olarak birbirinin aynısı olan iki tümörden birisinin yüzeysel kalırken diğerinin progresyon göstermesi kanserin moleküler davranış farkı ile açıklanmaktadır. Ürotelyal karsinom gelişimi için iki temel yolak vardır. (Castillo-Martin ve ark 2010, Pollard ve ark 2010)

Düşük dereceli papiller grubun (ürotelyal papillom, düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm ve düşük dereceli non-invaziv papiller ürotelyal karsinom) ürotelyal hiperplaziden köken aldıkları düşünülmektedir. Bu grup kasa invazyon yapmadan rekürrenslerle seyretme eğilimindedir. Kromozom 9 kaybı ve FGFR-3 (fibroblast büyüme faktör reseptörü-3) mutasyonları, bu tümörlerde izlenen en sık genetik değişikliklerdir. (Simon ve ark 2001)

Yüksek dereceli papiller grup ise genellikle denovo ya da ürotelyal karsinoma insitu zemininde gelişir. (Cordon-Cardo ve ark 1994, Liebert ve ark 1996) TP53 mutasyonu, Rb delesyonu ve PTEN ekspresyon kaybının kötü prognoz ve agresif seyir ile ilişkili olduğu saptanmıştır. (Cordon-Cardo ve ark 1992, Cordon-Cardo ve ark 1994, Platt ve ark 2009)

2.2.4 Mesane Tümörlerinin Sınıflandırılması

Günümüzde mesane tümörlerinin sınıflandırılmasında Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2016 yılında güncellediği sınıflandırma tercih edilmektedir. (Tablo 2.1)

Tablo 2.1: Üriner sistem tümörlerinin Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması (2016)

Ürotelyal Tümörler

İnvaziv Ürotelyal Karsinom

- Nested
- Mikrokistik
- Mikropapiller
- Lenfoepitelyoma benzeri
- Plazmasitoid/taşlı yüzük hücreli/diffüz
- Sarkomatoid
- Dev hücreli
- Az diferansiye
- Yağdan zengin
- Berrak hücreli

İnvaziv olmayan ürotelyal lezyonlar

- Ürotelyal karsinoma in situ
- İnvaziv olmayan papiller ürotelyal karsinom, düşük dereceli
- İnvaziv olmayan papiller ürotelyal karsinom, yüksek dereceli
- Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi
- Ürotelyal papillom
- İnverted ürotelyal papillom
- Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon
- Ürotelyal displazi

Skvamöz Hücreli Neoplaziler

- Saf Skvamöz Hücreli karsinom
- Verrüköz Karsinom
- Skvamöz Hücreli Papillom

Glandüler Neoplaziler

- Adenokarsinom
- Enterik
- Müsinöz
- Mikst
- Villöz Adenom

Urakal Karsinom

Mülleryen Kökenli Tümörler

- Berrak Hücreli Karsinom
- Endometrioid karsinom

Nöroendokrin Tümörler

- Küçük hücreli nöroendokrin karsinom
- Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
- İyi diferansiye nöroendokrin tümör
- Paraganglioma

Melanositik Tümörler

- Malign melanom
- Nevus
- Melanozis

Mezenkimal Tümörler

- Rabdomyosarkom
- Leiomyosarkom
- Anjiosarkom
- İnflamatuar myofibroblastik tümör
- Perivasküler epitelioid hücreli tümör
- Benign
- Malign
- Soliter fibröz tümör
- Leiomyoma
- Hemanjiom
- Granüler hücreli tümör
- Nörofibrom

Hematopoetik ve Lenfoid Tümörler

Diğer Tümörler

- Skene, Cowper ve Litre glandlarının tümörleri
- Metastatik ve diğer organlardan yayılım yoluyla gelen tümörler
- Üst üriner traktın epitelyal tümörleri
- Divertikül kaynaklı tümörler
- Üretranın ürotelyal tümörleri

2.2.5 Noninvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom

Papiller ürotelyal karsinom bazal membran altına invazyon göstermeyen, sitolojik ve yapısal olarak düzensiz büyüme gösteren ürotelyumun papiller neoplastik proliferasyonudur. Yeni tanı ürotelyal karsinomların %70-75'i noninvaziv ve papiller morfolojide olup bunların %50'den fazlası düşük derecelidir. (Kirkali ve ark 2005, Moch 2016)

2.2.5.1 Makroskobik Özellikler

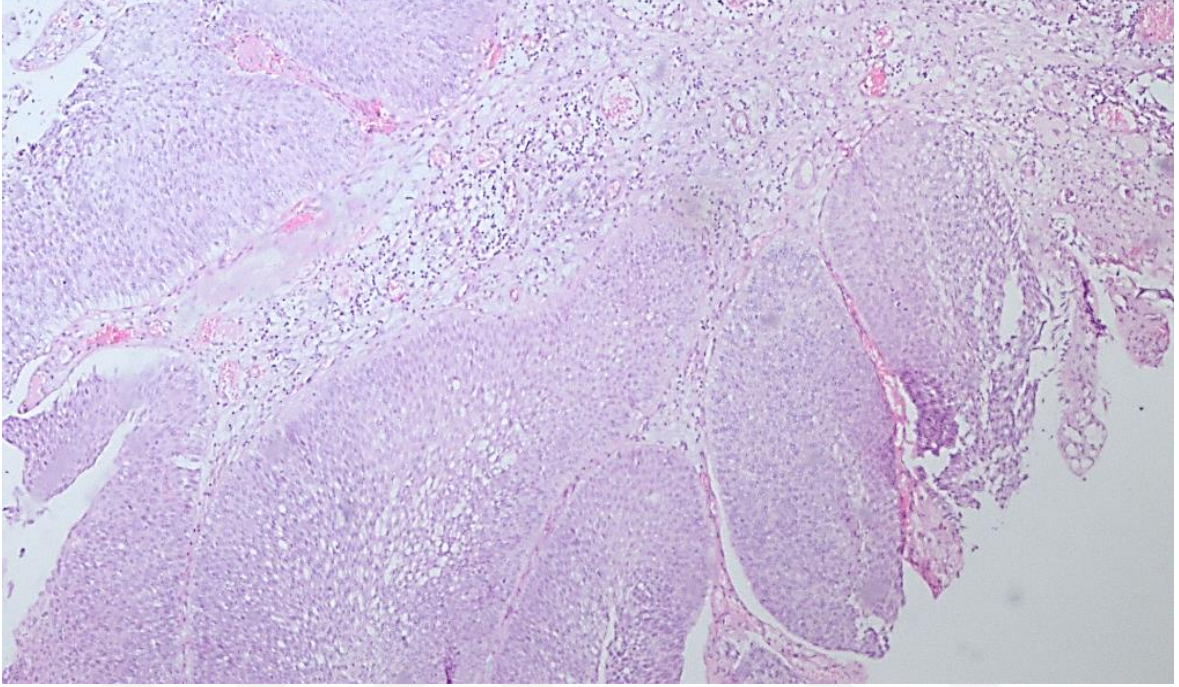
Mesane duvarında en sık lateral ve posterior duvara yerleşim göstermekle birlikte ürotelyal yüzeyin herhangi bir yerinde bulunabilirler. Noninvaziv ürotelyal karsinomların papiller ve düz (flat) olmak üzere 2 temel büyüme paterni vardır. (Yörükoğlu 2016) Bu iki tip büyüme paterninin patogenezinde iki farklı moleküler yolak olduğu düşünülmektedir. Sistoskopide genellikle ekzofitik büyüme gösteren papiller ürotelyal karsinomlar tek ya da multipl odaklı olabilirler. Yüksek dereceli lezyonlar genellikle hiperemik görülürler. (Herr ve ark 2001, Moch 2016)

2.2.5.2 Mikroskobik Özellikler

İnvaziv olmayan papiller ürotelyal karsinom çeşitli kalınlıktaki neoplastik ürotelyumun ince fibrovasküler bir kor etrafında dizelenmesiyle tanınır. Ürotelyal karsinomlar sitolojik (nükleer boyut, nükleer şekil, kromatin dağılımı) ve yapısal (hücrelerin birbirleri ve bazal membran ile ilişkilerinde oryantasyon anormallikleri) bozukluklara bakılarak düşük ve yüksek olmak üzere derecelendirilir. (Moch 2016) Düşük dereceli ve yüksek dereceli alanların birarada bulunması karakteristiktir. Bazı otörler yüksek dereceli demek için bu alanların %5'ten fazla olması gerektiğini belirtse de bazı araştırmacılar yüksek dereceli alanın %10'a kadarını klinik olarak düşük dereceli kabul etmek gerektiğini ifade etmişlerdir. (May ve ark 2010, Gofrit ve ark 2014) Bu nedenle yüksek dereceli demek için en az ne kadarlık bir alanda yüksek derecenin morfolojik özelliklerinin izlenmesi gerektiği konusunda görüş birliği sağlanamamıştır. (Moch 2016)

Düşük dereceli ürotelyal karsinomda geniş dallanmalarla karakterli papillalar baştan sona düzenli bir görünüm sergilemekle birlikte minimal sitolojik ve yapısal bozukluk söz konusudur. Lezyonu mikroskobik olarak değerlendirirken uzun eksene dik kesilmiş alanlardan ve komşu papillaların birleşim gösterdiği alanlar dışındaki sahalardan incelemek hatalı yüksek derecelendirmeyi en aza indirir. (Epstein 2016) Düşük dereceli

karsinomlarda küçük büyütmede (100x) genel olarak düzenli iken orta büyütmede (200x) bazı alanlarda polarite kaybı, hafif nükleer düzensizlik ve pleomorfizm belirgindir. (Moch 2016) Mitoz izlenebilir veya izlenmeyebilir. İzlenen mitozlar atipik değildir ve genellikle bazal membrana yakın (epitelin alt ½'sinde) yerleşimlidir. (Hansel ve ark 2013, Epstein 2016) (Şekil 2.5)

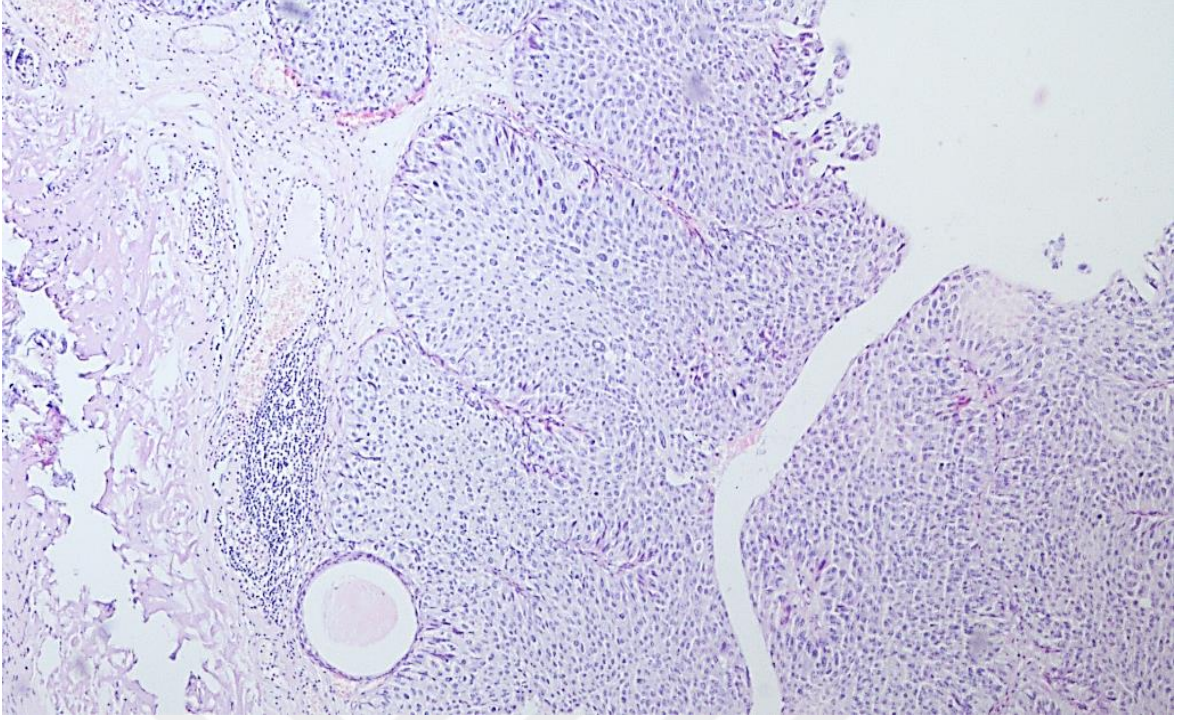


Şekil 2.5: Noninvaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (H&E x40)

Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom birbirleriyle birleşerek daha çok solid ekzofitik bir görünüm sergileyen papillalardan oluşur. Nükleer boyutlardaki değişkenlik ve düzensizlik, pleomorfizm küçük büyütmede bile dikkati çeker. Düzensiz belirgin nukleole sahiptirler. Bazıları atipik bazıları tipik olmak üzere çok sayıda mitoz ürotelyumun her seviyesinde görülür. (Hansel ve ark 2013, Epstein 2016) (Şekil 2.6)

Papiller ürotelyal karsinomlar immunhistokimyasal olarak GATA binding protein 3 (GATA-3), sitokeratin 20, p63, sitokeratin 5/6, trombomodulin, sitokeratin 7 ve yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin (HMWCK) eksprese ederler ancak derecelendirme için kullanılacak immunhistokimyasal belirteç yoktur. (Amin ve ark 2014)

Bazı ürotelyal karsinomlar genel olarak inverted/endofitik paternde büyür. Dallanan, anastomozlaşan ürotelyal kordların ekspansil büyümesi ile karakterli olup stroma ve epitel arası düzgün sınırlıdır. Karakteristik olarak stromal reaksiyondan yoksundurlar ve muskularis proprianın içinde bulunmazlar. (Moch 2016)



Şekil 2.6: Noninvaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom (H&E x40)

2.2.6 İnvaziv Ürotelyal Karsinom

Üriner traktın en sık görülen malign neoplazisi invaziv ürotelyal karsinomdur. Tanımlayıcı histolojik kriter olarak bazal membranın altına invazyon göstermesi olan invaziv ürotelyal karsinom farklı diferansiyasyon alanları bulundurma eğilimindedir. Mesane kanseri erkeklerde kadınlara göre 3-4 kat daha sık görülmekte olup tanı anında median hasta yaşı 65-70'dir. Ürotelyal karsinomların %90'ından fazlası mesanede, %5-10 kadarı üst üriner traktta görülmektedir. (Moch 2016) Mesanede ise daha çok trigonda olmak üzere, üreter orifislerinde ya da mesane yan duvarlarda daha fazla görülmektedir. Mesane boynuna yerleşen tümörler en kötü prognoza sahiptirler. (Bostwick ve ark 2008)

2.2.6.1 Makroskopik Özellikler

İnvaziv tümörler ise ekzofitik, endofitik veya ikisi birlikte olabilir. Tek odaklı ya da çok odaklı olabilirler. Genellikle tek solid polipoid kitleler şeklinde olmakla birlikte sesil ya da ülseroinfiltratif olarak da görülmektedirler. (Yörükoğlu 2016, Grignon ve ark 2016) Rutinde mesaneye ait en sık karşılaştığımız örnekler endoskopik biyopsiler ve transüretral rezeksiyon-mesane (TUR-M) materyalleridir. TUR-M ile çıkarılan tümörlerde koter histopatolojik değerlendirmeyi olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle 1cm den daha küçük tümörlerin 'cold cup' biyopsi ile rezeke edilmesi önerilmektedir. (Yörükoğlu 2016)

Mesaneden alınan biyopsi materyali ideal olarak alttaki kas tabakasından bir parça içermelidir. Ana tümörün örneklenmesine ek olarak normal görünümlü komşu mukozadan, her bir üreteral orifisin yanından ve üst posterior duvardan biyopsi alınarak gönderilmesi önerilir. (NBCCGA, 1977) Klinikte alınan biyopsi örnekleri dokunun en az 10 katı hacimde %10'luk tamponlu formaline konularak hastanın klinik bilgileri ve alınan materyallerin lokalizasyonları belirtilerek gönderilmelidir. TUR materyalleri patoloji laboratuvarında örneklenmeden önce ağırlık ölçümü yapılır. Bir kasete 1 gr'dan fazla doku konulmamasına ve 10 gr'a kadar olan materyallerin tamamının örneklenmesine özen gösterilmelidir. Daha fazla olan materyallerde ilk bloklardan alınan kesitlerde invaziv tümör izlenmemesi durumunda yeniden örnekleme yapılabilir. (Yörükoğlu 2016)

Radikal sistektomi materyalleri patoloji laboratuvarına kavimleri açılmadan, bütünlüğü bozulmadan ve taze iken gönderilmelidir. Mesane tespit için Y biçiminde veya ön-arka olacak şekilde açılır, parafin ya da mantara iğnelerle sabitlenir. Geniş bir kap içerisinde %10'luk tamponlu formalin ile 24 saat tespit edilir. Mesanenin mukozası ülserasyon, tümörler ya da diğer değişiklikler açısından dikkatlice incelenir. İzlenen herhangi bir lezyonun yerleşim yeri, boyutu ve konfigürasyonu belirtilerek tariflenir. Üreterler, orifislerine kadar açılır ve striktür, dilatasyon, ülserasyon, tümöral kitle gibi lezyonlar açısından incelenir, izlenen patolojik özellikler kaydedilir. Sonrasında mesane dilimlenerek taranır. Saptanan tümör varsa mesane duvarı boyunca tam kat olacak şekilde kesit alınır. Perivezikal yağlı doku içinde invazyon varsa cerrahi sınır doku boyası ile boyanarak örneklenmeli ve perivezikal yağlı dokudan lenf nodu disseksiyonu yapılmalıdır. Tümörden en az 3 parça olmak üzere mesane boynu, trigon, ön duvar, arka duvar, taban ve varsa hiperemik görünümde şüpheli alanlardan (karsinoma insitu açısından) örneklenir. Üreter orifislerinden de örnekleme yapılmalıdır. Prostatik üretra cerrahi doku boyası ile boyanarak parça alınmalıdır. Makroskopik olarak dikkati çeken bir özellik yoksa prostatın her kadranından 2 parça ve seminal veziküllerden 1'er parça örnek alınmalıdır. Gönderilen materyalde hangi organlar olduğu, bu organların tümör ile ilişkileri her organın cerrahi sınırı ve her organın diğer primer patolojileri makroskopik olarak değerlendirilmeli ve not edilmelidir. (Yörükoğlu 2016)

2.2.6.2 Mikroskopik Özellikler

İnvaziv ürotelyal karsinomlar oldukça çeşitli histomorfolojik paternler sergilemesiyle dikkati çekmektedir. Neoplastik hücreler çoğu kez dezmoplastik stroma ile

birbirinden ayrılmış düzgün sınırlı değişik boyutta yuvalar, kordonlar, trabeküller, küçük kümeler veya tek tek hücreler şeklinde mesane duvarını invaze eder. Bazen daha diffüz tabaka benzeri paternde büyüme gösterebilir ancak bu olgularda bile fokal yuvalanmalar ve kümeler genellikle izlenir. (Epstein 2016)

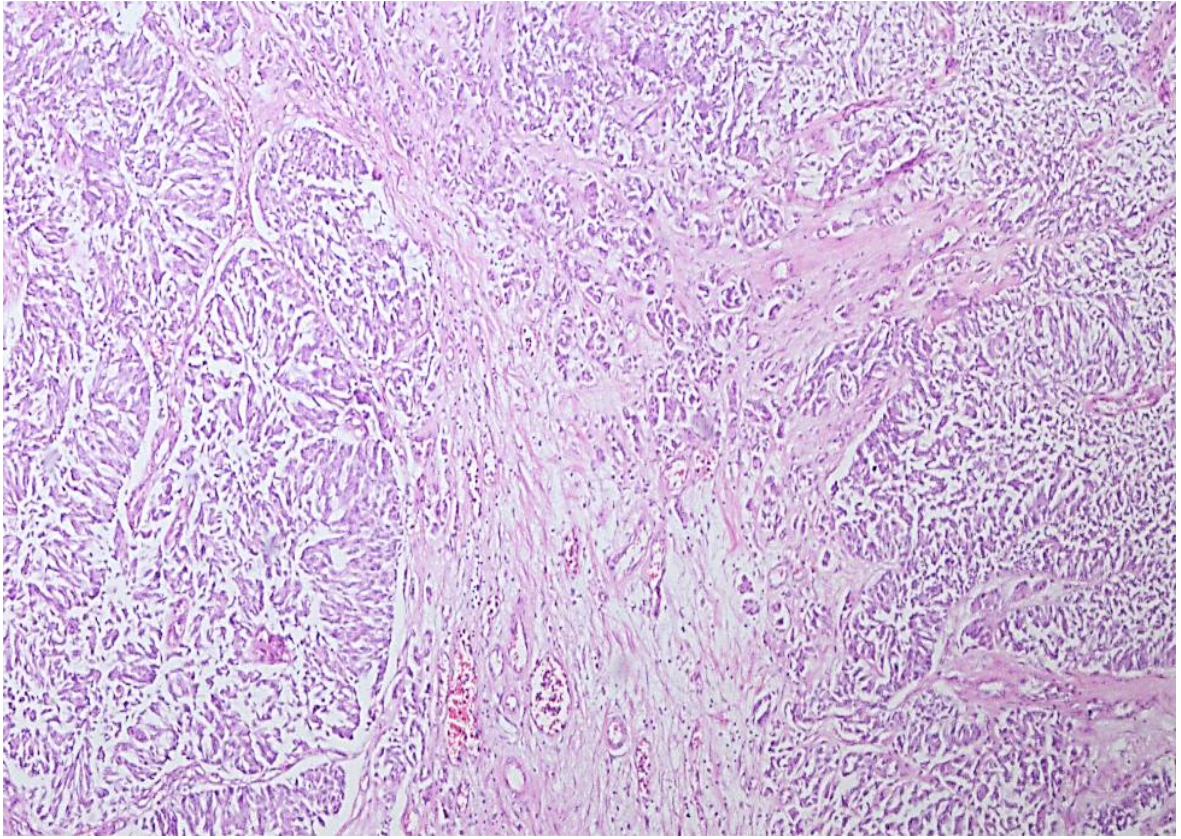
Neoplastik hücreler genellikle orta büyüklüktedir. Soluktan koyu eozinofiliğe kadar değişebilen sitoplazmaya sahiptir. Bazı tümörlerde fokal alanlarda geniş berrak sitoplazmalı hücrelerin olduğu görülebilir. Ürotelyal karsinomların nükleusları genellikle büyük, hiperkromatik, pleomorfik ve düzensiz konturludur. Bazıları büyük ve eozinofilik nükleol içerirken bazıları da küçük nükleole sahiptir. Hücrelerin ürotelyal karakterini gösteren özelliği ise uzun eksende nükleer çentik varlığıdır. (Eble ve ark. 2004, Epstein 2016)

Dünya sağlık örgütü 2004/ Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu (WHO 2004/ ISUP) invaziv ürotelyal karsinomları histolojik olarak düşük dereceli ve yüksek dereceli olmak üzere sınıflandırır. İnvaziv ürotelyal karsinomların sadece küçük bir yüzdesi düşük dereceli histoloji sergiler. Nükleer çentik varlığı tümörün histolojik derecesi arttıkça daha nadir görünür hale gelmektedir.

İnvaziv ürotelyal karsinomlarda en önemli prognostik gösterge evrelemedir. Evreleme invazyonun derinliğine göre olup noninvaziv karsinomlar Ta, lamina propriaya invaze muskularis propriaya invaze olmamış olanlar T1, muskularis propriaya invaze olanlar T2, perivezikal yumuşak dokuya invaze olanlar T3 ve ekstravezikal yayılım gösterenler (prostatik stroma, seminal veziküller, vajina, uterus, pelvik duvar, abdominal duvar) T4 olarak sınıflanır. (Dalbagni ve ark 2001, AJCC 8th 2017) Klinik olarak ürotelyal karsinomlar tedavi yaklaşımları farklı olduğu için kasa invaze olmayan ürotelyal karsinom ve kasa invaze ürotelyal karsinom olarak gruplanır. Kasa invaze olmayan ürotelyal karsinomlar Ta ve T1 olup klinik olarak genellikle yüzeysel mesane tümörleri adı altında bir arada değerlendirilir. Fakat Ta ve T1 tümörlerin progresyonlarının farklı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle invazyonun derinliğini tespit etmek önemlidir. (Angulo ve ark 1995, Epstein 2016)

Lamina propriaya invazyon; genellikle şekli bozulmuş, koterize ve tanjansiyel oryante olmuş spesmenlerle karşılaşan patologlar için tanı verilirken zorlanılan ve gözlemciler arasında uyum problemlerinin yaşandığı konulardan biridir. (Amin ve ark 1997) Lamina propria invazyonu düşük dereceli tümörlerde sık bir bulgu değilken T1 tümörlerin %90'ı yüksek dereceli olarak bildirilmiştir. İnvaze ürotelyum hücreleri stroma içerisinde tek tek hücreler veya düzensiz şekilli tümör adaları şeklinde olup bazal membran

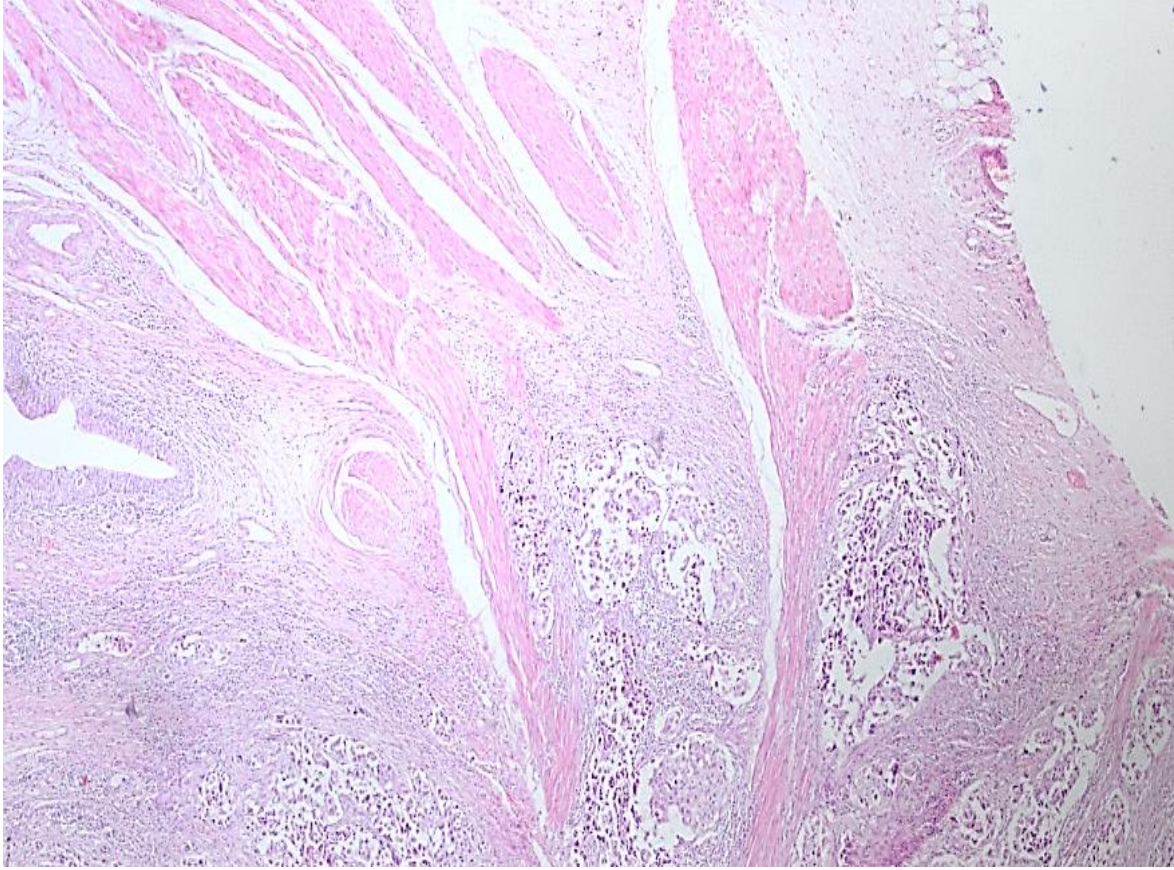
düzensizleşmiş veya kaybolmuştur. (Şekil 2.7) Bu alanda papiller tümörün düzenine uymayan yapısal kompleksite dikkat çekicidir ve bazen tümörün tabanından parmaklı uzanımlar görülebilir. İnvaze alandaki hücreler noninvaziv alandaki hücrelere göre daha yüksek derecelidir ve daha geniş eozinofilik sitoplazmaya sahiptir. İnvaze alanda stromal yanıt desmoplazi, skleroz, retraksiyon artefaktı, yoğun inflamasyon, mikzoid veya psödosarkomatöz görünümde olabilirken bazen de stromal yanıtın yokluğu izlenir. Lamina propria invazyonu değerlendirirken inverted papillom, Von Brunn adaları (özellikle karsinoma insitu ile tutuldukları olgularda) ve nefrojenik adenomun yalancı taklitçi olabileceği akılda tutulmalıdır. (Epstein 2016)



Şekil 2.7: Lamina propriaya invaze ürotelyal karsinom (H&E x40)

Muskularis propriaya invazyonun belirlenmesinde patoloğlar için temel problem kas tipinin belirlenemediği durumlardır. İnflamasyon, tanjansiyel kesit, koter artefaktı, güçlü desmoplastik yanıt, kötü oryantasyon gibi durumlarda kas demetlerinin çapının hipertrofik muskularis mukozayla mı yoksa muskularis propriayayla mı uyumlu olduğuna karar verilemeyebilir. Bu ayrım konservatif tedavi ve definitif tedavi arasında bir anlamda kavşak noktası konumunda olduğundan önemlidir. Muskularis mukoza kesintili seyrek ve dalgalı demetlerden oluşurken muskularis propria gevşek bağ doku ile beraber birbirini

çaprazlayan perimisyum tarafından çevrelenmiş kalın düz kas demetlerinden oluşur. (Şekil 2.8) Lineer geniş çaplı vasküler yapılara yakın yerleşim muskularis mukoza lehinedir. Karar verilemeyen durumlarda bunu raporda belirtmek gerekir. (Epstein 2016, Yörükoğlu 2016)



Şekil 2.8: Muskularis propriaya invaze ürotelyal karsinom (H&E, x20)

Mesane ürotelyumun altındaki tüm tabakalarda yağ doku görülür. Yağ dokunun sıklığı ve miktarı lamina propriadan derin tabakalara doğru artar. Bu nedenle TUR materyallerinde tümörün yağ dokuya invazyonu kesin olarak perivezikal yağlı dokuya invazyon (T3 tümör) olarak yorumlanmamalıdır. (Epstein 2016)

İnvaziv ürotelyal karsinom tanısı için immünohistokimyasal tetkik önemli bir yardımcı yöntemdir. Özellikle primer tümör ve metastaz ayırımında ürotelyal orjini saptamada oldukça faydalı olabilmektedir. Ancak yüksek ve düşük dereceli tümörler arasında immunhistokimyasal belirteçlerin ekspresyonu açısından belirgin fark olabileceği de akılda tutulmalıdır. (Moch 2016) Yapılan bir çalışmada ürotelyal karsinomların neredeyse %100 oranında sitokeratin7 ve %67 oranında sitokeratin 20 eksprese ettiği gösterilirken yüksek dereceli ürotelyal karsinomların %14'ünde sitokeratin 7 veya sitokeratin 20 ekspresyonu görülmediği belirtilmiştir. (McKenney ve ark 2005) Bir başka

çalışmada yüksek dereceli ürotelyal karsinomların önemli bir kısmında yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinlerin (sitokeratin 34betaE12 ve sitokeratin 5/6) eksprese edildiği gösterilmiştir. (Parker ve ark 2003) Ürotelyal diferansiasyon için üroplakin III, en spesifik belirteç olduğu halde sensitivitesi düşük olduğu için tanıda sağladığı katkı sınırlıdır. (Amin ve ark 2014) Ürotelyal karsinomlarda immunhistokimyasal olarak p63 (%70-%92), trombomodulin (%49-%69) ve GATA-3 (%67-%90) pozitifliği görülmektedir. (Moch 2016, Epstein 2016) TUR materyallerinde kasa invazyon görüldüğünde izlenen kas dokusunun tipinin belirlenemediği durumlarda muskularis propriada pozitif ekspresyon gösteren immunhistokimyasal smoothelin boyası kullanılabilir. (Epstein 2016)

2.2.6.3 Diferansiyasyonlar ve Histopatolojik Varyantlar

Ürotelyal karsinomların çok çeşitli diferansiasyon gösterebildikleri uzun zamandır bilinmekte olup bunlar skuamöz, glandüler, trofoblastik ve müllerian diferansiasyon olarak sayılabilir. Ürotelyal karsinomlarda en sık skuamöz diferansiasyon görülmektedir. (Moch 2016) Tümör içinde saptanan diferansiasyonun yüzdesi raporda belirtilmelidir. (Epstein 2016, Yörükoğlu 2016)

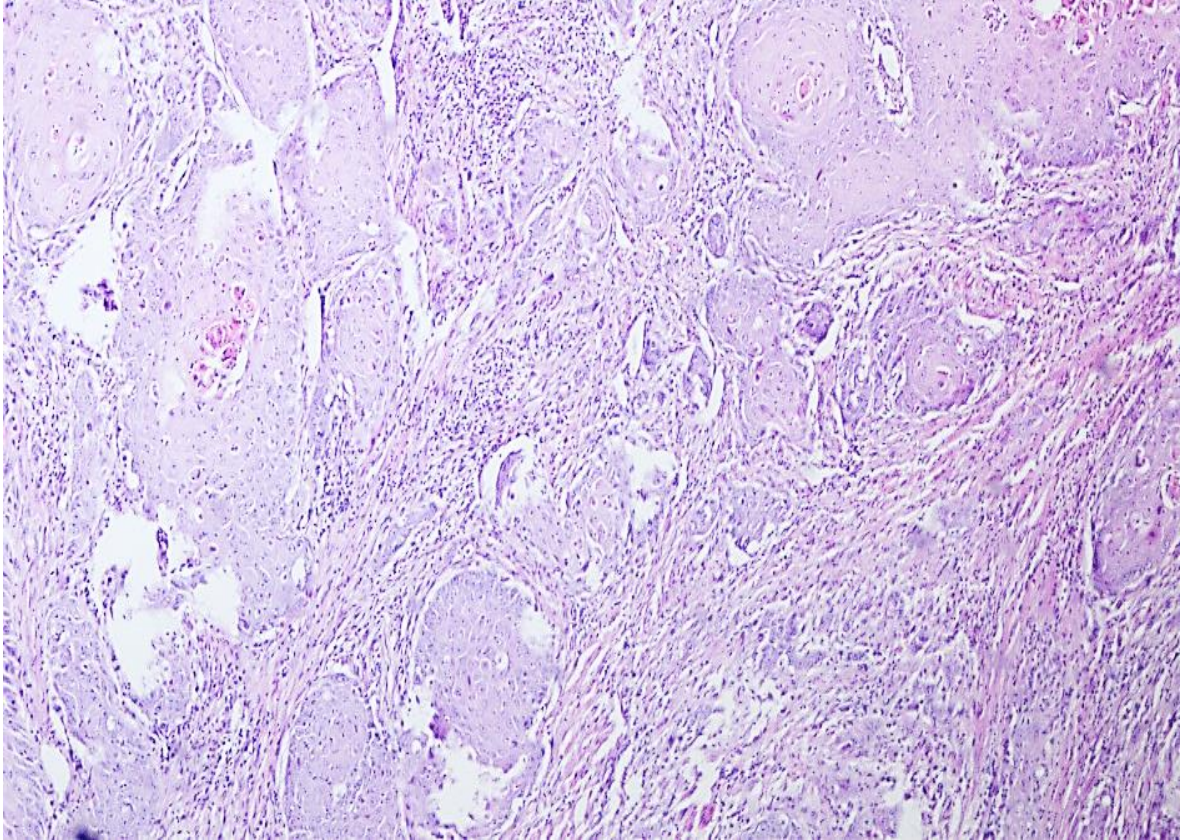
Skuamöz diferansiasyon intraselüler keratin, interselüler köprüleşme veya keratin incilerin bulunması şeklinde tanımlanır. (Şekil 2.9) Skuamöz diferansiasyon varlığı genellikle yüksek derece, ileri evre ve tedaviye yanıt oranı düşüklüğü ile ilişkili bulunmuştur. (Yörükoğlu 2016)

Glandüler diferansiasyon ise küçük tübüler veya gland benzeri boşluk ya da müsin sekrete eden enterik glandlar şeklinde görülmektedir. Glandüler diferansiasyon, ürotelyal karsinomda görülebilen psödoglandüler boşluklar ile karıştırılmamalıdır. İmmünohistokimyasal olarak glandüler diferansiasyon alanlarında enterik belirteçler olan CDX2 ve CK20 ile pozitif boyanma görülür. (Wasco ve ark 2007)

Trofoblastik diferansiasyon genellikle sinsityotrofoblastik dev hücrelere benzer tümör dev hücreleri ile tanınır. İmmünohistokimyasal olarak Beta Human Chorionic Gonadotropin (B-HCG) pozitifliği olabilmektedir. Sinsityotrofoblastik hücre varlığı kötü prognoz ile ilişkili olduğu için trofoblastik diferansiasyonun yüzdesi raporda belirtilmelidir. Klinik önemi göz önüne almak amacıyla trofoblastik diferansiasyon gösteren ürotelyal karsinomlar 3 gruba ayrılır; 1) dağınık sinsityotrofoblast içeren ürotelyal karsinom 2) koryokarsinomatöz farklılaşma gösteren ürotelyal karsinom veya saf koryokarsinom ve 3) B-HCG immunhistokimyasal ekspresyonu gösteren ancak tanınabilen

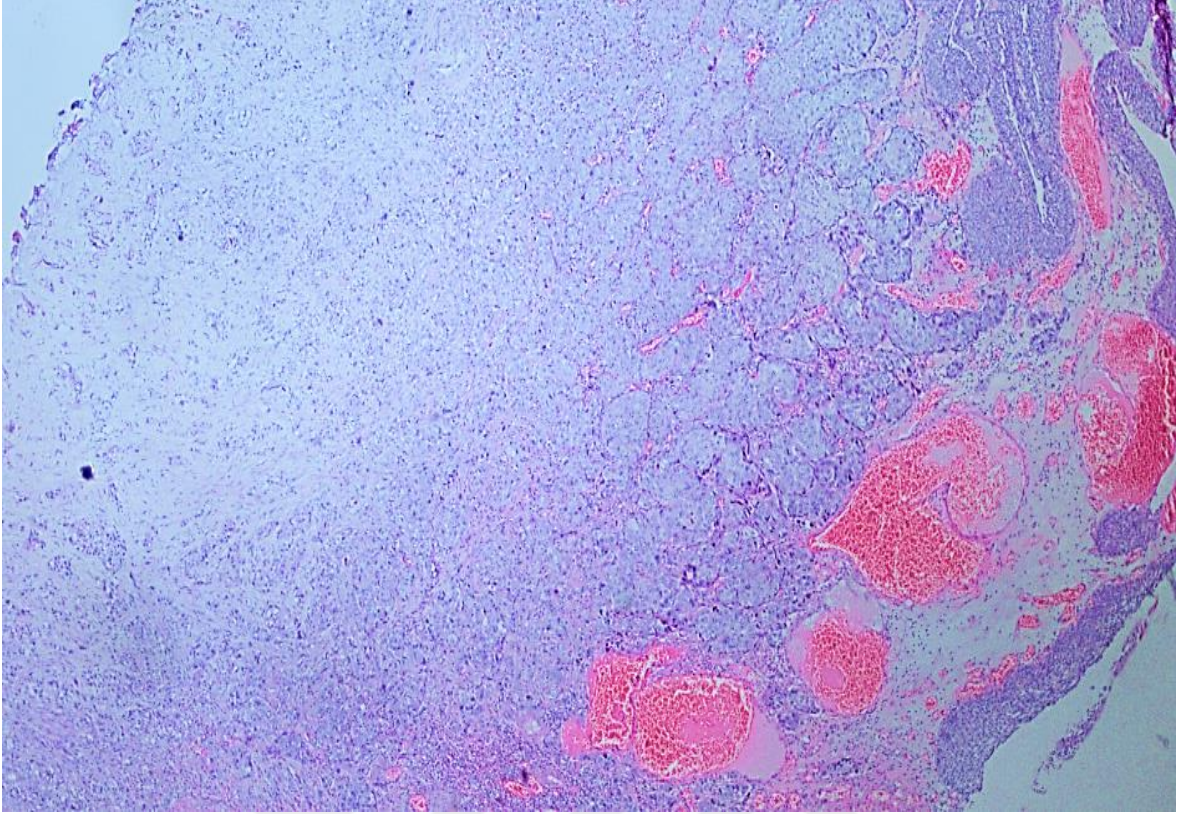
trofoblast içermeyen ürotelyal karsinom. Trofoblastik diferansiyasyon gösteren ürotelyal karsinom vakalarının çoğunda prezentasyon ve ölüm arasında 12 aydan daha kısa süre olduğu yayınlarda belirtilmiş olup bu nedenle trofoblastik morfoloji gösteren tümörlerin diferansiyasyon alanının tahmini yüzdesi raporda yer almalıdır. (Epstein 2016)

Müllerian diferansiyasyon çok nadir görülmektedir. En sık berrak hücreli adenokarsinom şeklinde kendisini gösterir. Bu tümörlerde hepatosit nükleer faktör (HNF) ekspresyonu bulunmaktadır. (Moch 2016)



Şekil 2.9: Skuamöz diferansiyasyon gösteren ürotelyal karsinom (H&E x100)

Nested Varyant Ürotelyal Karsinom, ürotelyumun altında birbirinden ayrı veya sıklıkla birleşme eğilimi gösteren, arada az miktarda stroma bulunduran kalabalık görünümlü adalar ve yuvalanmalar oluşturan tümöral hücrelerden oluşmaktadır. Tümöral hücrelerde tipik olarak nükleuslar atipi göstermez ya da minimal atipiyeye sahiptir. (Şekil 2.10) Masum sitolojik görünüme sahip bu varyantın en önemli ayırıcı tanıları nefrojenik adenom ve Von Brunn adalarıdır. Karsinomun Von Brunn adaları ve diğer benign durumlardan ayrılmasında yapısal kompleksite, konfluen ve birbiriyle anastomozlaşan adalar özellikle yardımcıdır. Konvansiyonel ürotelyal karsinomlara göre daha kötü klinik gidiş göstermektedir. (Epstein 2016)



Şekil 2.10: Nested varyant ürotelyal karsinom (H&E x40)

Mikropapiller Varyant Ürotelyal Karsinom; fibrovasküler koku bulunmayan ya da çok nadir bulunan, ince papiller yapılar, aynı laküner alanlarda çok sayıda küçük yuvalardan oluşmakta olup overin seröz papiller tümörlerinde görülen papiller konfigürasyonu anımsatır. Enine kesitlerde papillalar glomerüloid cisimcikler olarak görünür. Psammom cisimcikleri son derece nadirdir. Tümör hücreleri vasküler invazyonu taklit eder şekilde lakünler içinde buldukları için vasküler invazyon değerlendirilmesi dikkatli yapılmalıdır. Genellikle yüksek patolojik evrelerde prezente olur. Fokal olarak CEA ve CA125 pozitifliği gösterebilirler. (Amin ve ark 1994, Epstein 2016)

Mikrokistik Varyant Ürotelyal Karsinom histomorfolojisi aldatıcı olarak benign görünmekte olup genellikle ileri evrede prezente olan bir ürotelyal karsinom varyantıdır. Klasik olarak özelliiksiz ya da dökülmüş görünümde epitelle döşeli, yuvarlak-oval şekilli, farklı büyüklüklerde 1-2 mm çapında çok sayıda mikrokistlerden oluşmaktadır. Targetoid olarak salgı içerebilirler. Ayırıcı tanıda sistitis sistika ve sistitis glandularis gibi benign lezyonlara dikkat edilmelidir. Bu benign durumlardan ayırt etmede en kritik özellik epitelyal oluşumların boyut ve şeklinde çoğu kez dramatik fark bulunması ve mesane

duvarı içinde gelişigüzel infiltratif büyüme paternine sahip olmalarıdır. (Venyo 2013, Epstein 2016)

Lenfoepitelyoma Benzeri Ürotelyal Karsinom morfolojik olarak nazofarenksin lenfoepitelyomasına benzemektedir. (Moch 2016) Belirgin nükleollu, iri pleomorfik nükleuslu, belirsiz sitoplazmik sınırları ve sinsityal görünüme sahip tümör hücreleri adalar, kordonlar ve tabakalar oluşturur. Zeminde T ve B lenfositler, plazma hücreleri, histiositler, nadir nötrofiller ve eozinofiller izlenir. (Moch 2016) Bu tümörlerin daha iyi klinik gidiş gösterdiği yönünde çalışmalar mevcut olsa da daha güncel bir çalışmada 30 vakalık bir seride bu varyantın konvansiyonel ürotelyal karsinom ile benzer klinik gidişe sahip olduğu gösterilmiştir. (Tamas 2007)

Plazmasitoid Varyant Ürotelyal Karsinom gevşek veya miksoid stromada plazma hücrelerine benzeyen tek diskoheziv malign hücrelerin 'indian file' paterninde dizelenmesi ile karakterizedir. Tümör hücreleri berrak veya eozinofilik sitoplazmaya, ekzantrik yerleşmiş geniş hiperkromatik nükleusa ve küçük nükleole sahiptir. İntrasitoplazmik müsin içeren ya da içermeyen taşlı yüzük hücrelerine benzeyen hücreler de izlenebilir. Ancak ekstraselüler müsin görülmez. Küçük biyopsilerde bazen sadece plazmositoid patern izlenebilir ve bu durumda plazmositom ya da lenfomayı taklit edebilir. İmmunhistokimyasal çalışmalarda lenfoid belirteçler negatif olmasına rağmen CD138 ile pozitif boyanma mevcuttur. Dolayısıyla CD138 tek başına plazma hücreli bir neoplazinin kanıtı olarak kullanılmamalıdır. (Epstein 2016) Bu tümörlerin çoğunda E-kadherin ekspresyon kaybı izlenir. (Mai ve ark 2006) Plazmasitoid varyant ürotelyal karsinomların çoğu ileri evrede prezente olmaktadır. (Epstein 2016)

Sarkomatoid Varyant Ürotelyal Karsinom histomorfolojik olarak epitelyal ve mezenkimal diferansiyasyon bulguları gösteren bifazik malign tümörlerdir. Makroskopik olarak tıpkı sarkomlar gibi infiltratif sınırlı, kanama ve nekroz alanları içerebilen, büyük polipoid kitleler halinde görülürler. Hemen her zaman değişen oranlarda ürotelyal, glandüler ya da küçük hücreli komponent ile birlikte. Heterolog komponent olarak osteosarkom, kondrosarkom, rabdomyosarkom, leiomyosarkom, liposarkom ve anjiosarkom görülebilmektedir. Heterolog elemanın raporda bildirilmesi gerekmektedir. (Wright ve ark 2007, Yörükoğlu 2016)

Dev Hücreli Ürotelyal Karsinom genellikle konvansiyonel ürotelyal karsinom ile birlikte ve nadir olarak görülür. Nüvelerinde sıklıkla multipl nükleol içeren geniş eozinofilik veya amfofilik sitoplazmalı, büyük, koheziv, pleomorfik, kötü diferansiye multinükleer anaplastik hücrelerden oluşan izole ya da tabakalar şeklinde büyüme paterni

olan indiferansiye bir karsinomdur. Kötü prognozludur. Dev hücrelerde izlenen anaplazi bu tümörü ürotelyal karsinomlarda görülebilecek osteoklast tipi dev hücrelerden ayırt eder. (Epstein 2016)

Az Diferansiye Ürotelyal Karsinom (osteoklast benzeri dev hücreler içeren); bu grup karışık morfolojili sınıflanmayan indiferansiye tümörleri kapsar. Tümörler değişken oranlarda epitelyum belirteçleri ile pozitif ekspresyon gösteren mononükleer hücreler, benzeri dev hücreler ve tanınabilir ürotelyal neoplazi (karsinoma insitu, papiller veya invaziv karsinom)’den meydana gelir. Az sayıda olgu bildirilmiş olup, klinik gidiş kötüdür. (Baydar ve ark 2006, Moch 2016, Epstein 2016)

Yağdan Zengin Ürotelyal Karsinom büyük lipoblast benzeri şeffaf multivakuoler hücrelerin varlığıyla karakterize nadir görülen bir tümördür. Lipitten zengin alanlar tümörün %10-%50’sinden daha azını oluşturmaktadır. Hücreler S-100 negatiftirler. Beraberindeki ürotelyal karsinom hemen her zaman yüksek dereceli ve invazidir. Genellikle kötü klinik gidişe sahiptir. (Leroy ve ark 2007, Lopez-Beltran ve ark 2010, Epstein 2016)

Berrak Hücreli (Glikojenden Zengin) Ürotelyal Karsinom oldukça nadir görülen bir varyanttır. Şeffaf sitoplazmalı glikojenden zengin ürotelyal hücrelerin polisakkarit içeriği periodik asit-schiff boyasıyla boyanırken diastaz ile solar. (Knez ve ark 2014, Epstein 2016) Berrak hücreler, konvansiyonel ürotelyal karsinom ile aynı immünohistokimyasal profile sahiptir. (Paner ve ark 2014) Bu tümörleri mesanenin şeffaf hücreli adenokarsinomlarından, metastatik renal hücreli karsinomdan veya prostat karsinomlarından ayırt etmek gerekir. (Epstein 2016)

2.2.7 Klinik Bulgular ve Tanı

Mesane tümörlerinin en önemli belirtisi ağrısız hematüridir. Hematüri çoğu hastada makroskobik olarak izlenmekle birlikte mikroskobik düzeyde de olabilir. Mesane tümörünün yerleşim yerine ve tümörün büyüklüğüne göre semptomlar değişmektedir. Mesane boynuna yakın yerleşimli tümörlerde veya büyük boyutlu tümörlerde sık idrara çıkma görülebilir. (Gattuso ve ark 2010) Karsinoma insitu olan hastalarda irritatif işeme semptomları olabileceği gibi hastalar nonspesifik semptomlarla da başvurabilmektedir. (Richards ve ark 2016) Hasta değerlendirilirken öncelikle iyi bir anamnez alınmalı, sigara, mesleki maruziyet, aile öyküsü ve alt üriner sistem semptomları sorgulanmalıdır. İlk

istenecek tetkikler tam idrar tahlili, idrar sitolojisi ve ürener sistemin radyolojik görüntülenmesi olmalıdır. Ürener sistemin radyolojik görüntülenmesinde transabdominal ultrasonografi, tomografi ve magnetik rezonans görüntüleme kullanılır. Mesane kanseri şüphesi olan hastalarda tanı için sistoskopi yapılması önemlidir. Sistoskopi sırasında tespit edilen flat, papiller veya solid lezyonları mesane kanserini taklit eden benign lezyonlardan ayırt etmek için patolojik inceleme gerekir. İdrar sitolojisinde malign hücre varlığı sistoskopi ve biyopsi alınarak patolojik inceleme yapılmasını gerektirir. (Sanli ve ark 2017)

2.2.8 Tedavi

Yüzeyel mesane tümörlü hastalara öncelikle TUR uygulanması önerilir. Bu sayede hem histopatolojik evrelendirme için yeterli örneklemiş hem de tümöral kitle tümüyle rezeke edilmiş olunur. TUR materyalinde kas tabakası izlenmeyen olgularda tedavinin doğru olarak belirlenebilmesi için mutlaka tekrar TUR yapılması önerilmektedir. (Furuse ve ark 2010)

Genel olarak kılavuzlarda kasa invaze olmayan mesane kanseri olgularında endoskopik rezeksiyon ve risk gruplarına bağlı olarak intravezikal tedavi önerilirken, kasa invaze mesane kanseri olgularında kemoterapili veya kemoterapisiz sistektomi önerilmektedir.

Günümüzde karsinoma insitunun standart tedavisi intravezikal Bacillus Calmette-Guérin (BCG) uygulamasıdır. Yüksek riskli yüzeyel tümörler (T1G3 ve BCG dirençli karsinoma insitu) ile konservatif yöntemlerle kontrol edilemeyen geniş papiller tümörlerde sistektomi önerilebilmektedir. (Herr 1996, Malkowicz ve ark 2002)

2.2.9 Evreleme

Evrelendirme mesane karsinomlarında tedavi ve prognozun değerlendirilmesinde önemli bir faktördür. (Bostwick ve ark 2008) Mesane karsinomlarında AJCC (American Joint Committee on Cancer)'nin TNM Evreleme Sistemi önerilir. (Amin ve ark 2017) (Tablo 1.2)

Tablo 2.2: Mesane karsinomlarında TNM evreleme sistemi (AJCC 2017)

Patolojik Evreleme (pTNM)

Primer Tümör (pT):

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör bulgusu yok

Ta: Noninvaziv papiller karsinom

Tis: Karsinoma in situ “flat tümör”

T1: Tümör lamina propriaya invaze (subepitelyal bağ dokuya invaze)

T2: Tümör muskularis propriaya invaze

T2a: Tümör yüzeysel muskularis propriaya invaze (kas tabakanın iç yarısı)

T2b: Tümör derin muskularis propriaya invaze (kas tabakanın dış yarısı)

T3: Tümör perivezikal yağ dokuya invaze

T3a: Tümör mikroskopik olarak perivezikal yağ dokuya invaze

T3b: Tümör makroskopik olarak perivezikal yağ dokuya invaze
(ekstravezikal kitle)

T4: Tümör prostat stroması, veziküla seminalis, uterus, vajina, pelvik duvar veya karın duvarlarından herhangi birine invaze

T4a: Tümör prostat stroması, veziküla seminalis, uterus veya vajinaya invaze

T4b: Tümör pelvik duvar veya karın duvarına invaze

Bölgesel lenf nodları (pN):

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodları metastazı yok

N1: Gerçek pelviste tek bir lenf nodu metastazı mevcut (hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral)

N2: Gerçek pelviste multipl lenf noduna metastaz mevcut (hipogastrik, obturator, eksternal iliak veya presakral)

N3: Kommon iliak lenf nodlarına metastaz mevcut

Uzak metastaz (pM):

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Tablo 2.3: Mesane karsinomlarında evre grupları

Evre 0a	Ta	N0	M0
Evre 0is	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2a-b	N0	M0
Evre III	T3a-b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Evre IV	T4b	N0	M0
	Herhangi T	N1-3	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.9 Ürotelyal Karsinomlarda Prognostik Faktörler

Mesane karsinomunda prognoz birçok parametre ile ilişkilidir:

Evre: En önemli prognostik faktör evredir. (Jewet ve ark 1964) Yüzeysel mesane karsinomlarında 5 yıllık sağ kalım %90'ın üzerindeyken kasa invaziv mesane karsinomlarında bu oran %45 ile %55 arasında bildirilmiştir. (Scinner ve ark 1980, Cheng ve ark 2000)

Lenf nodu tutulumu: Evreleme şemasında da yer alan lenf nodu tutulumu kötü prognostik bulgudur. (Rosai 2004) Lenf nodu metastazlarında metastatik lenf nodunun boyutu ve ekstrakapsüler tutulum varlığında prognoz daha kötü olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. (Fleischmann ve ark 2005, Stephenson ve ark 2010)

Histolojik derece: Düşük dereceli tümörlerin çoğu yüzeysel yerleşimli iken yüksek dereceli tümörlerin kası invaze etme potansiyellerinin yüksek olduğu bilinmektedir. Tümör histolojik derecesi kasa invaziv karsinoma ilerlemede en önemli prognostik biyolojik göstergedir. Bu nedenle histolojik derece evre ile ilişkilidir. (Kern 1984, Rosai 2004)

Histolojik Varyant: Mikropapiller ürotelyal karsinom ve yuvalanan (nested) ürotelyal karsinom tanı anında genelde kasa invaziv olup kötü prognoz gösterirler. (Gaya ve ark 2010, Wasco ve ark 2010) Sarkomatoid karsinom ve plazmositoid ürotelyal karsinom gibi kötü diferansiye karsinomlar ileri evre ve artmış ölüm riski ile ilişkilidirler. (Black ve ark 2009) Küçük hücreli karsinomlar ise yüksek oranda metastaz yaparlar ve kötü prognozludurlar. (Amin ve ark 2013)

Hastanın yaşı: Yaşamın ilk iki dekadında görülen tümörler genellikle iyi diferansiye, noninvaziv ve çok iyi prognozludurlar. (Javadpour ve ark 1969)

Lokalizasyon: Mesane boynuna yerleşmiş tümörler daha kötü prognozludur. Mesane kubbesine yerleşenler daha yüksek dereceli; üreterik orifis ve lateral duvarlara yerleşenler daha düşük dereceli olma eğilimindedir. (Stephenson ve ark 1990)

Mesane mukozasındaki diğer lezyonlar: Ana tümör kitlesinden uzakta yerleşmiş daha küçük, ana kitleden bağımsız küçük tümörlerin varlığı veya displastik değişikliklerin varlığı yüksek rekürrens hızı ile ilişkilidir. Ürotelyal karsinoma insitu alanlarının varlığının rekürrens ve progresyon riskini arttırdığı gösterilmiştir. (Wolf ve ark 1983 Rosai 2004)

Vasküler invazyon: Lenfatik veya vasküler invazyonun artmış rekürrens ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Lapham ve ark 1997, Rosai 2004)

Tümör sınırları ve inflamatuvar yanıt: Lenfositik reaksiyonla birliktelik gösteren itici sınırlara sahip tümörler daha iyi prognoz taşırlar. Tümörü infiltre eden lenfositlerin yoğunluğu histolojik derece ve yüzeysel tümörlerde progresyon ile koreledir. (Lipponen ve ark 1992)

Tümör boyutu: Tümör çapı 30 mm'nin üzerinde olan olgularda rekürrens riskinin arttığı gösterilmiştir. (Sylvester ve ark 2006, Herr ve ark 2007)

Cerrahi Sınırların Durumu: Lokal rekürrens için başlıca prognostik parametredir. (Burger ve ark 2013)

Kan grup antijenlerinin durumu: ABO ve Lewis antijenleri ürotelyal mukoza tarafından normalde eksprese edilir, ancak özellikle yüksek dereceli tümörlerde yoktur veya azalmıştır. ABO kan grubu antijenlerinin kaybı ve yükselen Lewis X (Lex) antijen ekspresyonu ile ürotelyal hücrelerdeki malign transformasyonun ilişkili olduğunu gösterir çalışmalar mevcuttur. (Orntoft ve ark 1987)

DNA plöidisi: Anaploid hücre popülasyonları yüksek dereceli ürotelyal karsinom veya in situ karsinom varlığında tespit edilmektedir. Diploid tümörler genellikle düşük dereceli ürotelyal karsinomlarda görülürler ve bu tümörler daha iyi prognozludur. (Murphy ve ark 1986)

Hücre proliferasyonu: Yüksek proliferatif indeks tümör progresyonu ile pozitif korelasyon göstermektedir. (Oosterhuis ve ark 2000)

Kromozomal aberasyonlar: Y kromozomu kaybı veya 1. ve 17. genlerin polizomisi gibi bazı karyotipik sapmaların yüksek progresyon ile korele olduğu bildirilmiştir. (Neuhaus ve ark 1999)

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu: P53 aşırı ekspresyonunun tümör evresi, tümör derecesi ve hastalık seyri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Sarkis ve ark 1993) İnvazyon gösteren mesane tümörlerinin %30-80 kadarında Retinoblastom (Rb) geninin inaktive olduğu gösterilmiştir (Cairns ve ark 1991) Azalmış Rb protein ekspresyonu gösteren tümörlerin daha agresif seyrettikleri bildirilmiştir. (Logothetis ve ark 1992) Mesanenin ürotelyal kanserlerinin %50-70'inde Protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu (PTEN) ekspresyon kaybı saptanmış ve bu durum invazyon ile ilişkili bulunmuştur. (Platt ve ark 2008)

2.3 Tümör İmmünitesi

Yabancı istilacıların saldırılarına karşı vücudumuzu savunan bağışıklık sistemi, birlikte uyum içerisinde çalışan hücreler, dokular, lenfoid organlar ve sitokinlerden oluşur. Doğuştan gelen bağışıklık (doğal bağışıklık) ve uyarlanabilir (edinsel, kazanılmış, adaptif) bağışıklık olmak üzere iki komponente sahiptir. Doğal bağışıklık konağın yabancı istilacılardan korunmasını sağlayan immün sistem elemanlarını kapsar ve nonspesifik yanıt oluşturur. (Parkin ve Cohen 2001) Makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler ve doğal lenfoid hücreler gibi çeşitli hücreleri, lokal ve sistemik inflamatuvar değişiklikleri indükleyen sitokinleri ve kemokinleri içerir. Kazanılmış bağışıklık ise oldukça spesifik olup uzun süreli hafıza yanıtlarına sahiptir. Kazanılmış bağışıklık, antijene özgü reaksiyonları içermekte olup antikorları salgılayan bellek B hücrelerinin, sitotoksik CD8+ T lenfositlerin ve yardımcı CD4 + T lenfositlerinin gelişmesi ve sürece dahil olmasıyla oluşur. (Ernst ve Anderson 2015)

Doğal bağışıklık, önceleri aktif bağışıklık işlev kazanana kadar vücudun ön savunma mekanizması olarak düşünülse de yapılan son çalışmalarda doğal bağışıklığın aslında sağlıklı doku mikroçevresinin devamlılığı için hayati önem taşıyan bir anlamda nöbetçi sistem olduğu anlaşılmıştır (Hato ve Dagher 2015) Adaptif bağışıklık doğal bağışıklık cevabının bir enfeksiyonu kontrol etmek için yetersiz kaldığında etkin hale gelmektedir. Adaptif bağışıklık başlıca vücudumuza ait olan ve olmayan antijenlerin tanınması, spesifik patojenleri veya patojenler tarafından enfekte hücreleri ortadan kaldırılması ve buna yönelik immünolojik hafızanın geliştirilmesi gibi spesifik fonksiyonları içermektedir. (Warrington ve ark 2011)

Kanser hücreleri; hücre bölünmesinde çevresel stimülanlara ihtiyaç duymama, kendi büyüme faktörlerine sahip olabilme, büyümeyi inhibe edici ajanlara duyarsızlık,

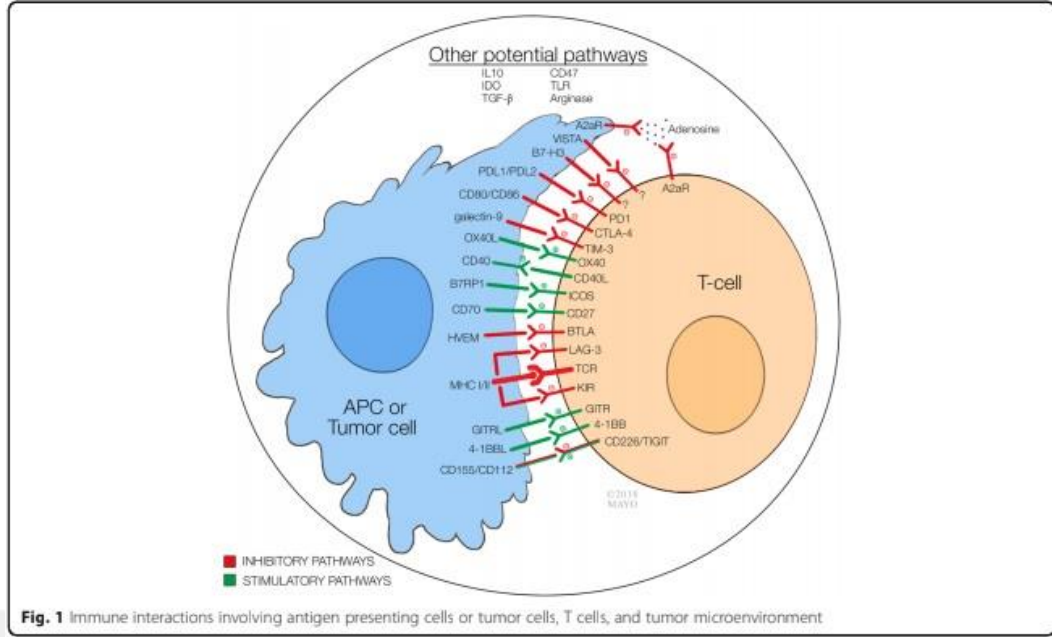
sürekli bölünme yeteneği sayesinde ölümsüzlük kazanabilme, apoptozu baskılama, yeni damar oluşumunu indükleme, invazyon/ metastaz yapabilme, enerji metabolizmasını yeniden düzenleyebilme gibi çok önemli özelliklere sahiptir. (Hanahan ve Weinberg 2011, Horne ve ark 2015) Kanser hücrelerinin bu karakteristik özellikleri onları normal hücrelerden ayırır ve bağışıklık sistemimiz tarafından "yabancı" olarak tanınmasını sağlar. Ancak, tümör hücreleri bazı manipülatif özellikler sergileyerek immünoşüpresif bir mikroçevre modülasyonu ile immün sistemden kaçış mekanizmalarına sahiptir. (Chen ve Mellman 2013) Teng ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada T lenfositler veya doğal öldürücü hücrelerin yokluğunda veya fonksiyon kayıplarında tümör insidansında artış olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tümörün yok edilmesinde hem adaptif hem de doğal bağışıklık sisteminin rol aldığı düşünülmüştür. Qian ve Pollard (2010) ise bir başka çalışmada bağışıklık sisteminin kansere karşı geliştirdiği inflamasyonun ve bu alandaki makrofajların aslında kanser gelişimi için gerekli olan büyüme sinyalleri ve anjiogenetik faktörleri indüklediğini bildirmiştir. Tümörü infiltre eden immün hücrelerin, tümör büyümesini ve ilerlemesini kontrol etmek için işlev görebileceği gibi aynı zamanda tümörün gelişebileceği bir immünoşüpresif ortamın yaratılmasına da yardımcı olabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. (Schreiber ve ark 2011)

Kanser hücrelerinde genetik mutasyonların neden olduğu değişmiş protein ürünleri bağışıklık sistemimiz tarafından "yabancı" olarak algılanır. Ayrıca tümörlerin enflamatuvar, hipoksik ve sıklıkla nekrotik mikroortamları, bağışıklık sistemine bir anlamda tehlike sinyalleri gönderir. Tümör dokusuna çeşitli lökositler çağırılır ve aktive edilirler. (Coulie ve ark 2014, Crusz ve Balkwill 2015) CD8+ sitotoksik T hücreleri, interferon- γ üreten yardımcı T1 (Th1) hücreleri ve NK hücreler, M1 fenotipinde makrofajlar ve DC1 fenotipinde dendritik hücreler ile birlikte antitümör immün yanıtıyla ilişkilidir. Yardımcı T2 (Th2) hücreleri, M2 fenotipinde makrofajlar, DC2 fenotipinde dendritik hücreler, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler ve interlökin 10 (IL-10) ve Transforming Growth Factor Beta (TGF β) üreten FOXP3+ düzenleyici T (Treg) hücreleri ise immünoşüpresif etkileriyle tümör progresyonuna katkıda bulunur. B hücreleri ve plazma hücreleri ise çeşitli faktörlere bağlı olarak tümör progresyonuna ya da tümör supresyonuna katkıda bulunabilir. İmmün infiltratın tam bileşimi çeşitli tümörler arasında ve her tümörün kendi içinde ve arasında geniş ölçüde değişebilir ve bu da antitümör yanıtın etkinliğini belirler. (Hendry ve ark 2017)

İmmün kontrol noktaları, immün homeostazı sürdürmede ve otoimmüniteyi önlemede önemli immün düzenleyicilerdir. Bunlar, otoimmün toleransı korumak ve

bağışıklık tepkisinin tipini, büyüklüğünü ve süresini düzenlemek için önemli olan hem uyarıcı hem de inhibe edici yollardan oluşur. Normal koşullar altında immun kontrol noktaları; immun sistem enfeksiyon veya malignitelere karşı tepki verirken dokuları bu işlemden kaynaklanabilecek zarardan korumakla yükümlüdürler. (Pardoll 2012, Chen ve Flies 2013) Kanser için immün kontrol noktası tedavisi, tümör hücrelerine karşı immun aktiviteyi arttırmak için, düzenleyici yolları hedef alan stratejileri içerir. (Sharma ve Allison 2015) En geniş şekilde incelenen kontrol noktaları, sitotoksik T lenfosit ile ilişkili molekül-4 (CTLA-4), programlanmış hücre ölümü reseptörü-1 (PD-1) ve programlanmış hücre ölümü ligand-1 (PD-L1) 'den oluşan inhibitör yolaklardır. Şu anda onaylanmış immun kontrol noktası inhibitörleri sadece hastaların küçük bir bölümünde etkilidir ve ilk müdahalenin ardından direnç ortak bir bulgudur. Yeni immün kontrol noktası ajanları ve kombinasyon tedavileri konusunda Faz I / II klinik çalışmaları halen devam etmektedir. (Marin-Acevedo ve ark 2018) Bağışıklık sisteminin antitümöral etkilerini güçlendirme, tümör indükleyici etkilerini baskılama konularında çok sayıda çalışma yapılmakta olup yeni terapilerin geliştirilmesi ile gelecekte kanser tedavisinde başarının artması beklenmektedir.

Lenfositlerin aktivasyonu iki sinyal yolağı tarafından kontrol edilir. Birincisi majör doku uygunluk kompleksine (MHC) sınırlı olan T hücre reseptörü (THR) tanıma ve ikincisi ise antijen sunan hücrelerde ve T hücrelerinde bulunan eş reseptörlerin karşılıklı etkileşimi ile verilen sinyallerdir. İkinci yolakta rol alan reseptörler inhibe edici ya da uyarıcı reseptörler olabilir. Sinyal moleküller, yapılarına göre, immunoglobulin (Ig) süper ailesi ve tümör nekrosis faktör (TNF)/tümör nekrosis faktör reseptör (TNFR) süper aileye bağlı olmak üzere iki süper aileden oluşur. Ig süper ailesi, homolojilerine göre B7/CD28 ve CD2 alt ailelerini içerir. THR'nin çapraz bağlaması ve MHC peptit ile gelen reseptörlerin eş sinyali T hücrelerinin tam aktivasyonuna yol açar. Sinyal moleküller, doğal bağışıklık tepkileri üzerindeki fonksiyonel etkilerine bağlı olarak kostimülatör ve inhibitör moleküller olarak da sınıflandırılabilirler. Bu moleküller, T hücre çoğalmasını, sitokin üretimini, sitotoksiteyi, T hücre apoptozisi ve T hücrenin yaşam sinyali almasını kontrol ederler. (Bretscher 1999, Greenwald ve ark 2005, Freeman ve ark 2006)



Şekil 2.11: Tümör hücreleri veya antijen sunan hücreler ile T hücreli

lenfositlerin immun etkileşimi, tümör mikroçevresi (Marin-Acevedo JA, Dholaria B,

Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol.* 2018; 11: 39.)

Marin-Acevedo ve arkadaşlarının (2018) yayınladığı kanserde immun kontrol noktaları ve tedavilerinin tartışıldığı bir derlemede immun kontrol noktaları inhibe edici yolaklar, kostimüle edici yolaklar ve diğer potansiyel yolaklar olmak üzere kategorize edilmiştir. (Şekil 2.11) İnhibe edici yolaklar ise T hücre aracılı ve T hücre ilişkili olmayan olmak üzere 2 grupta sınıflandırılmıştır. T hücre ilişkili inhibitör yolak reseptörleri LAG-3, TİM-3, TIGIT, VISTA, B7-H3, BTLA, A2aR ve CD73; T hücre ilişkili olmayan inhibitör yolak reseptörleri TGF-β, KIR, PI3Kγ ve CD47 olarak belirtilmiştir.

2.3.1 BTLA

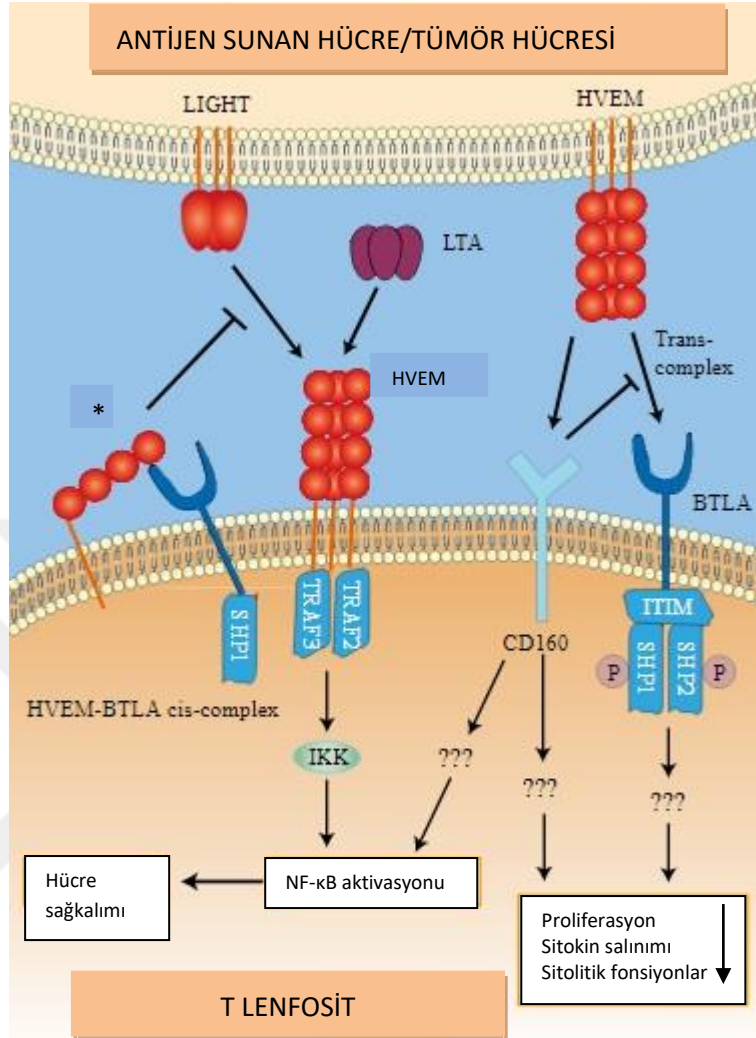
İmmün regülasyonda inhibitör reseptör ailesi giderek genişlemektedir. B7 ailesinin yeni bir reseptörü olan BTLA tip I transmembran glikoprotein yapısında olup immün yanıtlarda negatif düzenlemeye aracılık eder. (Saito ve Yamasaki 2003) Yapısal ve işlevsel olarak B7 ailesi üyelerinden olan CTLA-4 ve PD-1 ile benzer şekilde koinhibitör olup lenfositlerin çoğu tarafından eksprese edilen bir inhibitör reseptördür. (Paulos ve June 2010) İnhibitör reseptörlerin ortak özelliklerinden biri olan sitoplazmik uçlarında İmmüno-reseptör tirozin tabanlı inhibitör motiflerin (ITIM) varlığı BTLA'nın sitoplazmik uçlarında da tanımlanmıştır. Bu ITIM'lar hücre-içi Src homoloji-2 içeren tirozin fosfataz (SHP-1 ve

SHP-2) enzimleriyle ile ilişkilidir (Gavrieli ve ark 2003) İmmünglobülin variable domeini (IgV) bütün B7 ailesi reseptörlerinde ortak bulunan ligand bağlanmasından sorumlu ekstrasellüler bir domeindir. Yapısal özellik ve hücelere dağılımda polimorfizm gösteren BTLA için Ig domeininde aminoasid farklılıkları nedeniyle BALB/c, MRL/lpr ve C57BL/6 olmak üzere 3 adet allell tanımlanmıştır. BALB/c, BTLA alleli dendritik hücrelerde, B ve T lenfositlerinde sunulurken C57BL/6 BTLA ilave olarak CD11+ makrofaj ve NK hücrelerinden de sunulur. (Hurchla ve ark 2005) Esas olarak BTLA dinlenme halindeki T hücrelerinde çok düşük düzeylerde sunulur (Han ve ark 2004) BTLA ekspresyonunun primer olarak T hücre farklılaşmasını yöneten faktörlerden ziyade T hücre aktivasyonu ile kontrol edildiği gösterilmiştir. (Hurchla ve ark 2005)

BTLA, TNFR ailesi üyesi olan herpes virus entry mediatör (HVEM)'e bağlanarak B ve T hücre aktivasyonunu, proliferasyonunu ve sitokin üretimini bloke eder. (Sedy ve ark 2005)

Antijen sunan hücre veya tümör hücresi ile T hücre arasında etkileşimin genel kuralı, Ig reseptörü ile Ig ligandı ve TNFR ile TNF ligandının etkileşmesidir. BTLA ve HVEM'in ligasyonunda ise B7 aile üyesi BTLA için ligandının TNFR aile üyesi HVEM olması Ig süper ailesi üyesi ve TNFR süper ailesi üyesi etkileşiminin nadir örneklerindedir. (Cai ve ark 2008)

HVEM reseptörü TNFR ailesinden liganda sahip tip I transmembran glikoproteinidir. (Mauri ve ark 1998) HVEM reseptörünün B ve T hücrelerinde, denritik hücrelerde, nöronlarda, endotelyal hücrelerde ve epitelyal hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda HVEM'in LIGHT ve Lenfotoksin-a (LTa)'ya bağlanması eş uyarı sinyali oluştururken, BTLA veya CD160'a bağlanması eş inhibisyon sinyali ortaya çıkartır. Yani HVEM, T hücre aktivasyonunu iki yönlü düzenleyebilen, bağlandığı liganda göre eş uyarı veya inhibisyon oluşturabilen bir reseptördür. (Cai ve ark 2008) T hücreleri üzerindeki BTLA ve CD160'ın HVEM'e bağlanması, T hücre aktivasyonunu kısıtlayıcı bir sinyal gönderirken HVEM'in LTa ve LIGHT'a bağlanması ise doğal bağışıklık tepkilerini uyarır. Dolayısıyla, HVEM hangi ligandın içinde olduğuna bağlı olarak doğal bağışıklık tepkilerini düzenlemek için bimoleküler bir anahtar olarak iş görür. (Wang ve ark 2005) (Şekil 2.12)



Şekil 2.12: HVEM/BTLA/CD160 sinyal yolağı (<https://www.creative-diagnostics.com>)

*: HVEM-BTLA'nın T hücresi üzerinde etkileşmesi cis kompleks olarak adlandırılır ve HVEM-LIGHT etkileşimini inhibe ederek NF- κ B aktivasyonunu önler. Transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin aktivasyonu, IL-2'nin aktivasyonunu sağlamaktadır. NF- κ B proteini inflamatuvar işlevlere katılır ve hücre döngüsü ile sağ kalımını düzenler. (Los ve ark 1995) NF- κ B aktivasyonu ayrıca B hücresi çoğalmasını ve immüoglobulin salgılanmasını (Duhon ve ark 2004) ve DC'leri (Salio ve ark, 1999), NK hücrelerini (Kwon ve ark, 1997) uyarır.

BTLA'nın HVEM'e bağlanması, tirozin fosforlaşmasını ve SHP-1/SHP-2 ilişkisini engeller. Bu sinyal IL-2 üretimini ve T hücrelerinin çoğalmasını azaltır. BTLA bağlanması, T hücrelerinin ilk aktivasyonunu engellemez, ama aktivasyon sonucunu değiştirir. Bu

bulgular, BTLA'nın HVEM ile etkileşiminin kısıtlayıcı bir reseptör olarak işlev gördüğünü gösterir niteliktedir. (Gavrieli ve ark 2003, Krieg ve ark 2005) BTLA ilişkili inhibisyon, regülasyon T hücreleri ve apoptozisten bağımsızken interlekin-2 (IL-2) üretimini azalması ile ilgilidir. BTLA'nın inhibitör etkilerine CD8+ T hücreleri daha az hassastır. BTLA'nın CD4+ T hücrelerinde yüksek düzeylerde ekspresyonu ve IL-2'nin, CD8+ T hücresinin döngüsünün başlaması için gerekli olmaması bu durumu kısmen açıklayabilir. (D'Souza ve Lefrancois 2003, Han ve ark 2004, Krieg ve ark 2005) Bununla birlikte BTLA'nın, CD8 + lenfositlerin proliferasyonunu, pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini ve bellek T lenfositlerinin oluşumunu inhibe ederek T lenfositlerin hareketini negatif olarak düzenlediği de gösterilmiştir. (Fourcade ve ark 2012) BTLA yüksek ölçüde B hücrelerinde bulunması BTLA'nın humoral yanıtta da rol oynayabildiğini akla getirir. BTLA eksik olan B hücrelerinin, anti Ig-M'in uyarımına yanıtlarının daha fazla olduğu bildirilmiştir. BTLA, B hücre reseptörünü düzenler fakat Toll-like reseptör ilişkili stimülasyonu düzenleyemez. Yapılan birçok hayvan çalışmalarında BTLA ve HVEM'in otoimmün hastalıklarda da rol oynadığı gösterilmiş olsa da insanlarda otoimmün hastalıkların patojenitesindeki HVEM-BTLA yolunun rolü hala büyük oranda bilinmemektedir. (Watanabe ve ark 2003)

Tümör hücreleri ise bu yolu BTLA'yı sürekli olarak eksprese eden ve onları aktive edilmeye duyarlı hale getiren disfonksiyonel T hücrelerinin oluşumunu teşvik ederek veya melanomda olduğu gibi HVEM'yi eksprese ederek yararlanır. (Paulos ve June 2010) Melanom ve mide kanseri hastalarında yüksek BTLA/HVEM düzeyleri kötü prognoz ile koreledir. (Malissen ve ark 2017, Lan ve ark 2017)

2.3.2 TİM-3

Hepatit A virus selüler reseptör 2 (HAVCR2) olarak da bilinen TİM-3, TİM gen ailesine aittir. İnsanlarda, TİM ailesi TİM-1, TİM-3 ve TİM-4'ü içerir ve 5q33.2 kromozomunda bulunur. (Li ve ark 2013) TİM-3, tip I membran proteindir ve 281 aminoasitten oluşur. Hücre dışı bir alan, tek bir transmembran alan ve bir C-terminal sitoplazmik kuyruk içerir. Başlangıçta Th1 ve Th2 hücrelerinin spesifik yüzey molekülleri olarak tanınmış olsa da TİM ailesinin üyelerinin, Th1 ve Th2 hücrelerinin farklılaşmalarını düzenleme mekanizmalarında T hücrelerinin işlevsel rolünü hedefleyen ortak uyarıcı sinyaller sağlayabildiği bildirilmiştir. (Angiari ve Constantin 2014) İmmün kontrol noktası negatif düzenleyicilerinden biri olan TİM-3, T hücreleri, düzenleyici T hücreleri (Treg'ler),

dendritik hücreler, B hücreleri, makrofajlar, NK hücreler ve mast hücreleri dahil olmak üzere farklı immün hücrelerde tespit edilmiştir. (Phong ve ark 2015)

TİM-3, galektin-9 (Gal-9), karsinoembriyonik antijen hücre yapışma molekülü 1 (CEACAM-1), yüksek hareketli grup protein B1 (HMGB1) ve fosfatidilserin (PS) olmak üzere dört ligand içerir. TİM-3/Gal-9, T hücre immünitesini negatif olarak düzenleyerek kanser immünitesini inhibe eder. TİM-3 IgV bölgesinin Gal-9 ile bağlantısı Th1 hücrelerinin immün tepkilerini sonlandırır.

TİM-3 immün toleransı artırır. TİM-3 işlev bozukluğunun astım, gıda alerjisi, multipl skleroz ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarla ilgili olduğu tespit edilmiştir. TİM-3 T hücrelerinin immün tepkilerini inhibe edebildiği için kronik viral enfeksiyonu indükleyen immün tükenme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Freeman ve ark 2010, Zhu ve ark 2015) Sürekli antijene maruz kalma ve inflamasyon ile birlikte seyreden kronik enfeksiyon ve kanser durumlarında T hücrelerinde “tükenme” olarak adlandırılan immünolojik bir tablo görülür. Tükenme; T hücre efektör fonksiyonların kaybı, çoklu inhibitör reseptörlerinin ekspresyonu ve azalmış proliferasyon gibi birçok özellik ile karakterizedir. (Wherry ve Kurachi, 2015) Genel olarak TİM-3'ün, antitümör veya antiviral tepkilerde baskılayıcı bir reseptör olarak işlev gören T hücrelerinin temel tükenme belirteçlerinden biri olduğuna inanılmaktadır.

Bazı çalışmalar, TİM-3'ün hem solid hem de hematolojik malignitelerde baskılanmış veya disfonksiyonel CD8+ T hücrelerinin popülasyonunu işaret ettiğini göstermiştir. (Wherry 2011) TİM-3, T lenfosit tükenmesine aracılık ederek antitümör immünitesini inhibe eder. TİM-3+ CD8+ T hücreleri, bozulmuş Stat5 ve p38 sinyal yolu sergilerler. TİM-3 yolunun bloke edilmesinin kanser bağışıklığını arttırdığı ve T hücrelerinde interferon-gama üretimini (IFN- γ) arttırdığı gösterilmiştir. (Cai ve ark 2016)

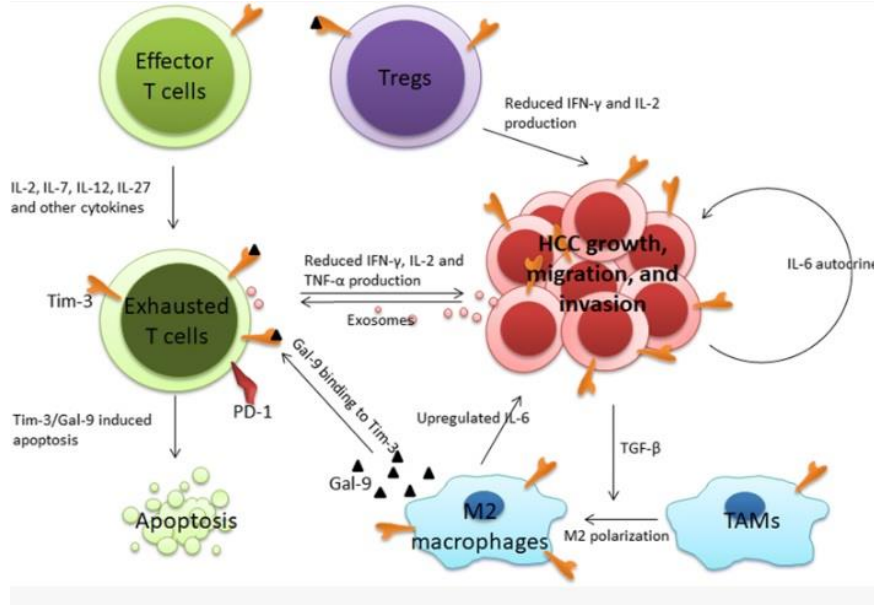
TİM-3, doğal immün hücreler üzerinde yapısal olarak eksprese edilir ve doğal antitümör immünitesini baskılar. TİM-3, IL-2 üretiminin proliferasyonunu ve efektörünü inhibe eder. (Zhou Q ve ark 2011) PD-1 ve TİM-3 pozitif CD8+ T hücreleri, TİM-3 negatif CD8+ T hücrelerinden daha az IFN- γ ürettiği ve anti-TIM-3 antikollarının ayrıca periferik NK hücrelerinde IFN- γ 'yı arttırdığı gösterilmiştir. (Takano ve ark 2016)

TİM-3, immün hücre fonksiyonlarını modüle etmenin yanı sıra, tümör hücrelerinin fonksiyonunu doğrudan düzenler. TİM-3 ekspresyonu küçük hücreli dışı akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, kolorektal kanser, serviks kanseri, over kanseri, baş ve boyun bölgesi kanserlerinde bildirilmiştir. (He ve ark 2018)

Liu ve arkadaşları (2018) hepatosellüler karsinomda TIM-3 ekspresyonu ve rolünü tartıştıkları derlemede tümör hücrelerindeki TIM-3 ekspresyonunun; interleokin-6 (IL-6)'nın otomatik salgılanması yoluyla tümör büyümesini hızlandırdığını ve epitelyal mezenkimal geçişi teşvik ederek tümör hücrelerinin metastatik yeteneğini geliştirdiğini bildirmiştir. IL-2, IL-7, IL-12, IL-17 ve TGF- β gibi sitokinler, T hücrelerinde TIM-3 ekspresyonunu indükler. TIM-3 efektör T hücrelerinde tükenme fenotipine aracılık eder IFN- γ , IL-2 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α)'nın üretimini azaltarak anti-tümör immünesini baskılar. Gal-9'un TIM-3+ efektör T hücrelerinin bağlanması ayrıca efektör T hücresi apoptozisine aracılık eder. TIM-3, Tregs hücrelerinde IFN- γ ve IL-2 üretimini azaltır. Tümör ilişkili makrofajlar (TAM) ve dendritik hücreler de dahil olmak üzere Gal-9 eksprese eden hücreler, Gal-9'un TIM-3 ile etkileşime girerek, Tim-3+ T hücre tükenmesi ve apoptozisine katkıda bulunur. Tümör hücrelerinin ürettiği TGF- β , TAM'larda TIM-3 ekspresyonunu artırır ve TIM-3'ün aşırı ekspresyonu TAM'ların M2 polarizasyonunu kolaylaştırır. M2 fenotipindeki makrofajlar tümör hücrelerinde IL-6 üretimini artırır. Tümör hücreleri üzerindeki TIM-3, IL-6'nın otokrin salınımı şeklinde tümör proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını artırır. (Şekil 2.13)

TIM-3 T hücreleri yanısıra dendritik hücreler, makrofajlar ve monositler gibi miyeloid hücrelerde eksprese edilir ve doğal immün hücre aracılı antitümör immün yanıtlarında önemli bir role sahiptir. TIM-3, çeşitli hücrelerde ekspresyonundan dolayı kanserde umut verici bir hedef olabilir.

Son çalışmalar, TIM-3'ün T hücre tükenmesinde önemli bir rolü olduğunu ve anti-PD-1 tedavisinin sonucuyla ilişkili olduğunu vurgulamıştır. (Chiba ve ark 2012) Koyama ve arkadaşları (2016), hastalar anti-PD-1 adaptif direnci ile karşı karşıya kaldıklarında TIM-3 ekspresyonunun arttığını bildirdi. Artan sayıda prelinik çalışma, TIM-3'ün kanser immünoterapisinin sonuçlarını iyileştirebileceğini bildirmiştir. (Chiba ve ark 2012)



Şekil 2.13: Hepatoselüler karsinom hücrelerinde TIM-3 regülasyonu ve fonksiyonları (Liu F, Liu Y, Chen Z. *Tim-3 expression and its role in hepatocellular carcinoma. J Hematol Oncol. 2018; 11:126.*)

2.3.3 B7-H3

Adaptif bağışıklık sisteminde T lenfositler, çok çeşitli yabancı ve doğal antijenleri tanıyıp spesifik yanıt oluşturabilir. Patojenleri yok etmek, otoimmün toleransı sürdürmek ve uygun bir T lenfosit yanıtını sağlamak için, T hücresi aktivasyonu iki bağımsız sinyal yolu ile düzenlenir. Birinci sinyal, antijen sunan hücrelerde bulunan MHC ile antijenin THR'lerce tanınması ile aktivasyonun gerçekleşmesi olarak kabul edilir. İkinci sinyalin ise, antijen sunan hücrelerde ve T hücrelerinde bulunan B7 ailesi ve TNF ailesine ait kostimülator ve koinhibitör moleküller aracılığıyla olduğu kabul edilir. Antijen sunan hücrelerdeki B7-1'in T lenfositlerdeki CD28 ile birleşmesi T lenfositlerin çoğalmasını ve IL-2 üretimini artırır. B7-1/B7-2: CD28/CTLA-4 sinyalleşmesi kostimülator yolağın karakteristik en iyi örneğidir. Bu eş zamanlı uyarıcı sinyalin yokluğunda, THR'nin bir antijenik peptid ile bağlanması, T hücresi işlev bozukluğu, intoleransı veya anerji ile sonuçlanır. (Abbas 2003) CTLA-4 ile B7-1 ve/veya B7-2'nin bağlanması, IL-2 sentezini inhibe eder ve T hücre yanıtının sona ermesine yol açar. (Greenwald ve ark 2005) Son zamanlarda, T hücrelerinde bulunan B7 ailesinin bazı üyeleri, antitümör immünitesinin potansiyel düzenleyicileri olarak gösterilmiştir. Örneğin, kanser hücrelerinin anormal B7-H1 ekspresyonu, farklı insan malignitelerinde kötü prognostik patolojik özellikler ile

ilişkilendirilmiş ve malign tümörlerin konakçı bağışıklığından kaçabileceği potansiyel bir mekanizma olarak öne sürülmüştür. (Liu ve ark 2008)

2001'de tanımlanan B7-H3, T hücreleri, dendritik hücreler ve monositler gibi çeşitli immün hücreler üzerinde indüklenebilir ekspresyona sahip bir tip I transmembran proteindir. Diğer B7 ailesi üyeleriyle %20-%27 oranında benzer aminoasit kimliğini paylaşan B7-H3, fareler ve insanlar arasında %88 aminoasit benzerliğe sahip en korunmuş olanıdır. (Chapoval ve ark 2001) Murin B7-H3, bir hücre dışı değişken tip IgV-IgC alanı ve bir hücre içi alandan (2Ig B7-H3) oluşurken, insan B7-H3'ü, 4Ig B7-H3 olarak adlandırılan ek bir izoforma sahiptir. (Steinberger ve ark 2004) 4Ig transkript insan dokularında baskın şeklidir.

Kesin reseptörlerin henüz belirlenmemiş olmasına rağmen, B7-H3'ün reseptöre bağlı olarak farklı immün modülatör yeteneklere (uyarıcı veya inhibe edici) sahip olduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar, TREM benzeri transkript 2 (TLT-2) gibi miyeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör olarak adlandırılan sadece farelerde gösterilmiş bir adet B7-H3 reseptörü tanımlandı. TLT-2, myeloid hücrelerde ifade edilen tetikleyici reseptör (TREM) ailesine aittir. (Klesney-Tait ve ark 2006) Her ne kadar murin B7-H3'ün TLT-2 ile etkileşimini araştıran in vitro veriler mevcut olup TLT2'nin B7-H3 için bir reseptör olarak işlev görebileceğini düşündürse de Leitner ve arkadaşları hem farelerde hem de insanlarda böyle bir etkileşime dair kanıt bulamadıklarını bildirdiler. (Leitner ve ark 2009)

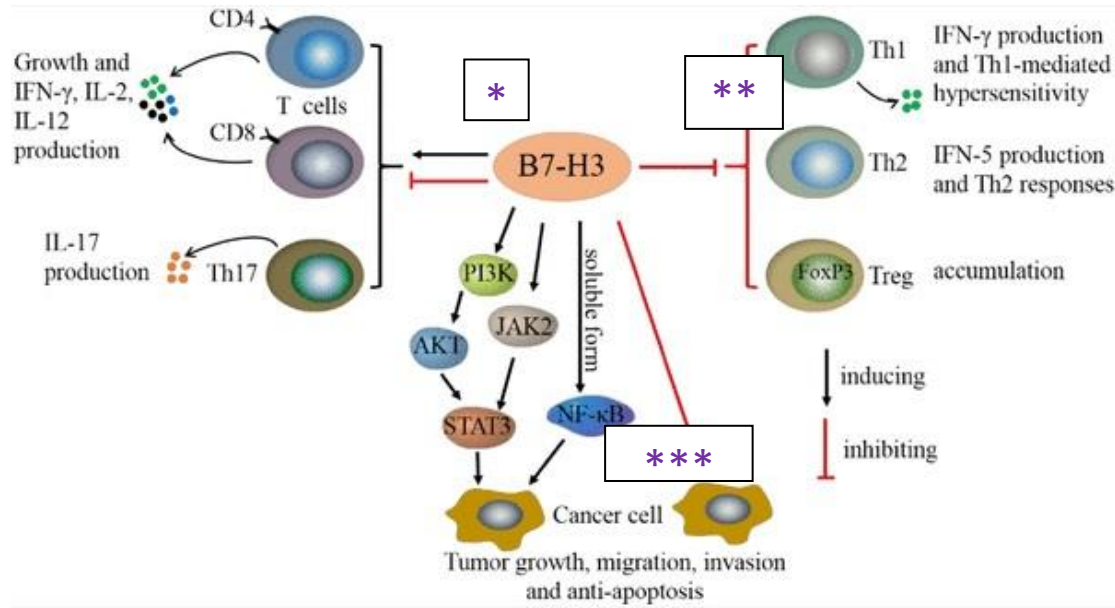
B7-H3-mRNA çoğu dokuda yaygın olarak gösterilmekle birlikte B7-H3 proteininin yapısal olarak ifade edilmeyebildiği gösterilmiştir. Çok az sayıda molekülün B7-H3 ekspresyonunun düzenlenmesine aracılık ettiği gösterilebilmiş olup B7-H3'ün düzenlenme mekanizmaları henüz keşfedilememiştir. (Li ve ark 2018)

Bu reseptörler hücrel tepkilerin modülatörleri olarak işlev görür ve hem doğal hem de adaptif bağışıklıklarda önemli roller oynar. (Klesney-Tait ve ark 2006) B7-H3'ün antijen spesifik T hücre proliferasyonu, sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu ve IFN- γ üretimini uyardığına dair bulgular mevcut olduğu gibi farklı çalışmalarda B7-H3'ün T hücre yanıtlarını inhibe edebildiği yönünde de bulgular elde edilmiştir. (Zhang ve ark 2010, Ueno ve ark 2012) (Şekil 2.14)

Bir ko-stimülatör molekül olan B7-H3'ün, CD4 + ve CD8 + T hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı bilinmekle birlikte, B7-H3 yokluğunda büyük ölçüde artan T hücresi proliferasyonu ve IL-2 seviyeleri gözlenmiştir. B7-H3'ün immun düzenlemede birçok çelişkili role sahip olması nedeniyle, TLT-2'nin B7-H3'ün tek reseptörü olmayabileceği ve

bilinmeyen başka reseptörler üzerinden B7-H3'ün fonksiyonlarının olduğu düşünülmüştür. (Li ve ark 2018)

İfadeleri çoğunlukla antijen sunan hücrelerdeki gibi immün hücrelerle sınırlı olan B7-1 ve B7-2'nin aksine, B7-H3 proteini osteoblastlarda, fibroblastlarda, fibroblast benzeri sinoviyositlerde ve epitel hücrelerinde, karaciğer, akciğer, mesane, testis, prostat, meme, plasenta ve lenfoid organlarda bulunur. Bu geniş ifade modeli, özellikle periferik dokularda da bulunması, B7-H3'ün immünolojik fonksiyonları yanı sıra ve muhtemelen immünolojik olmayan fonksiyonlarının olduğunu da göstermektedir.



Şekil 2.14: B7-H3'ün potansiyel rolleri (Li G, Quan Y, Che F, Wang L. *B7-H3 in tumors: friend or foe for tumor immunity?* *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018; 81(2):245–253.)

*: B7-H3, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde IFN-γ ve IL-12 üretimini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte IL-12, IL-17 ve IFN-γ üretimini azalttığına dair çalışmalar da literatürde mevcuttur.

** : B7-H3, Th1, Th2 ve Treg aktivitesini inhibe eder.

***: B7-H3'ün antitümör ve protümör etkisi olduğuna dair literatürde çalışmalar mevcuttur.

Son zamanlarda, B7-H3 ekspresyonu, prostat kanseri, berrak tipte renal hücreli karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, pankreas kanseri, mide kanseri, over kanseri, kolorektal kanser ve ürotelyal karsinomlarda gösterilmiştir. (Loos ve ark 2010) Pek çok

kanserde B7-H3 ekspresyonunun ileri evre, metastaz veya kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Zhang ve ark 2010, Ueno ve ark 2012)

B7-H3'ün, antitümör immünesinin düzenlenmesinde olası bir katılımı olduğunu öne sürülse de B7-H3'ün hem uyarıcı hem de inhibe edici özellikleri tanımlandığı için aldığı rol net olarak ifade edilememiştir. (Loos ve ark 2010)

Geçtiğimiz on yıl içerisinde, antitümör bağışıklığında kostimülatör sinyalin immünomodülatör kapasitelerine dair yeni görüşler ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda klinik Faz I/II çalışmaları, anti-CTLA-4 mAb'ler ile tedavinin, objektif antitümör tepkilerini indükleyebildiğine dair sağlam kanıtlar sağlamıştır. Kostimülatör moleküllerin B7/CD28 süper ailesinin yakın zamanda tanımlanmış bir üyesi olan B7-H3'ün immün düzenlemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiş ve bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. (Loos ve ark 2010) Ayrıca bir grup araştırmacı anti-B7-H3 antikorları ürettiğini ve in vitro/in vivo olarak tümör büyümesini baskıladığını bildirmiştir. (Loo ve ark 2012, Li ve ark 2018) Bu nedenle, B7-H3'ün, bir ko-stimülatör molekül olma rolünün yanı sıra, kanser teşhisinde ve tedavisinde önemli bir rol oynaması muhtemeldir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması

Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 2013-2018 yıllarına ait invaziv ya da noninvaziv mesanenin ürotelyal karsinomu tanısı almış vakalardan retrospektif olarak patoloji arşivi taranarak seçilmiştir. Noninvaziv ürotelyal karsinom tanılı TUR-M materyallerinin en az 2 cc, invaziv ürotelyal karsinom tanılı TUR-M materyallerinin en az 4 cc hacminde olanları çalışmaya dahil edildi. Noninvaziv ürotelyal karsinom tanılı olgularda lamina propria'nın görüldüğü bloklar seçildi. Lamina propria'ya invaze ancak muskularis propria'ya invaze olmayan invaziv ürotelyal karsinom tanılı olgularda biyopside aşikar muskularis propria tabakasının olduğu ancak tümör invazyonunun olmadığı vakalar çalışmaya dahil edildi. İnvaziv tümörlerde tümörün invaze olduğu histolojik tabakadan sonra gelen tümörün invaze olmadığı en az bir alt tabakanın da görülebiliyor olmasına özen gösterildi. Tekrarlayan ürotelyal karsinom tanısı alan ve birden fazla TUR-M materyalleri laboratuvarımıza gelen hastalarda invazyon derinliğinin en fazla olduğu ve histolojik derecenin en yüksek olduğu materyaller çalışmaya dahil edilirken aynı hastanın diğer materyalleri dahil edilmedi. Radikal sistektomi materyallerinin tümörlü blokları çalışmaya dahil edildi. Sistektomi materyallerinde rezidü tümör izlenmeyen olgular çalışmadan çıkarıldı. Sistektomi materyallerinde lezyon olmayan normal görünümlü sahalardan kontrol grubu oluşturuldu. Çalışmaya dahil olan 48-88 yaş arası kadın ve erkek hastaların sistektomi+lenfadenektomi (47 olgu) ya da TUR-M materyallerinin (43 olgu) lezyonlu lamları arşivden çıkarıldı ve lezyonlar değerlendirilerek sınıflandırıldı. Belirlenen kriterlere uyan olgular aşağıdaki gibi gruplandırıldı.

1. grup: Noninvaziv low grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (10 adet)
2. grup: Noninvaziv high grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (9 adet)
3. grup: Lamina propria'ya invaziv low grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (2 adet)
4. grup: Lamina propria'ya invaziv high grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (20 adet)
5. grup: Muskularis propria'ya invaziv high grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (14 adet)

6. grup; Perivezikal yağlı dokuya invaziv high grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (25 adet)

7. grup: Ekstravezikal uzanım gösteren high grade papiller ürotelyal karsinom tanılı olgular (10 adet)

8. grup: İnvaziv papiller ürotelyal karsinom (lamina propria, muskularis propria, perivezikal yumuşak dokuya invaze ya da ekstravezikal yayılım göstermiş olabilir) tanılı hastalardan lenf noduna ürotelyal karsinom metastazı olanların metastatik lenf nodları (17 adet)

9. grup: Normal ürotelyal epitelyum ile döşeli mesaneye ait kontrol grubu (13 adet)

Kesitlere immunhistokimyasal Ventana Benchmark marka otomatik boyama cihazıyla BTLA, B7-H3 ve TİM-3 boyamaları yapıldı. Lamlar entellan yardımıyla lamel ile kapatıldıktan sonra tüm materyaller Olimpos marka ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Boyama sonuçları yüzde olarak ve yoğunluğa göre rapor edildi ve istatistiksel olarak birbiriyle karşılaştırıldı.

3.2. Histopatolojik İnceleme

Seçilen olgulara ait %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş ve rutin doku takibi ile hazırlanmış parafin bloklardan elde edilen Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı preparatlar yeniden değerlendirildi. Olgular WHO 2016 sınıflamasına göre sınıflandırıldı ve TNM sistemine göre patolojik tümör (pT) evrelemesi yapıldı.

3.3. İmmunhistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal inceleme için tümörü en iyi yansıtan, nekroz ve kanama alanlarının en az izlendiği kesitlere ait parafin bloklar seçildi. Uygun lamların blokları blok arşivinden çıkarıldı. Seçilen her parafin bloktan BTLA, B7-H3 ve TİM-3 boyamaları yapmak üzere pozitif şarjlı lamlara 4-5 mikron kalınlığında bir lama iki farklı dokunun birer kesiti olmak üzere kesitler alındı. Lizinli lamlara alınan doku örnekleri deparafinizasyon için 60 C'de bir gece etüvde bekletildi. Firmanın önerisi de gözönüne alınarak inkübasyon süresi 2 saat kaynatma süresi 30 dk olarak belirlenerek lamlar otomatik yöntemle (VENTANA, Bench Mark XT) boyandı.

Çalışmamızda kullanılan antikorların özellikleri Tablo xx'de verilmiştir. Dilüsyonlar ve optimum boyama tekniği uygun pozitif kontroller kullanılarak ayarlandı. Sekonder antikor olarak Ultraview Universal DAB Detection Kit (Katalog no: 04015630972173, LOT NO: E29533, Ventana Medical Systems, USA) kullanıldı.

Tablo 3.1: Antikorların bazı özellikleri

Antikor	Üretici Firma	Klon	Dilüsyon	Pozitif Kontrol	Antikor Türü
BTLA	Abcam	Ab96560	1/400	Tonsil*	Tavşan poliklonal
B7-H3	Abcam	Ab21948	1/2000	Tonsil	Tavşan monoklonal
TİM-3	Abcam	Ab246852	1/100	Tonsil	Tavşan monoklonal

*: Firmanın ürün kataloğunda kontrol doku MDAMB468 xenograft olarak belirtilmiştir. Laboratuvarımızda bu kontrol bloğu mevcut olmadığı için üretici firma ile görüşüldü. Kontrol bloğu olarak tonsil dokusunun kullanılabilceği yazılı olarak bildirdi.

Kısaca deparafinizasyon, dehidratasyon, endojen peroksidaz inaktivasyonu ve antikorlar için uygun antijen açığa çıkarma yöntemleri sonrasında kesitler iki saat oda ısısında primer antikor ile inkübe edildi. Ardından camlara biotinlenmiş sekonder antikor sonrasında streptavidin konjuge horseradish peroksidaz uygulandı ve diaminobenzidin kromojeni ile işaretleme gerçekleştirildi. Boyama işlemi biten lamlar sıvı deterjanlı su ile yıkandı. Daha sonra 2 kez alkolden geçirildi ve kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra 2 kez ksilolden geçirildi ve kapama malzemesi olarak Entellan Mounting Medium marka balzam kullanıldı.

3.4 İmmunreaktivitenin Değerlendirilmesi

Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Japan) değerlendirildi. Daha önce yapılan çalışmalar dikkate alınarak BTLA için sitoplazmik ve membranöz boyanma, B7-H3 membranöz boyanma, TİM-3 için sitoplazmik ve membranöz boyanma pozitif olarak

kabul edildi. (Feng ve ark 2015, Lan ve ark 2017, Peng ve ark 2017, Soo ve ark 2017, Chen ve ark 2017)

İmmünohistokimyasal boyamaların sonuçları değerlendirilirken 200x ve 600x objektif kullanıldı. BTLA, B7-H3 ve TİM-3 için boyanma yoğunluğu tabloda belirtildiği şekilde değerlendirildi. (Tablo 3.2)

Tablo 3.2: İmmunhistokimyasal BTLA, B7-H3 ve TİM-3 için boyanma yoğunluğunun değerlendirilmesi

Hiç boyanma yok	(-) / 0 puan
Zayıf boyanma var	1(+) / 1puan
Orta şiddette boyanma var	2(+) / 2 puan
Kuvvetli boyanma var	3(+) / 3puan

BTLA için boyanma yaygınlığı değerlendirmesi daha önce yapılmış bazı çalışmalardaki skorlamalar referans alınarak yapıldı. (Feng ve ark 2015, Lan ve ark 2017). Değerlendirme boyanmanın en yoğun olduğu alanlarda 600x büyütmede en az 1000 hücre sayılmak koşuluyla yapılmıştır. Boyanma yaygınlığı tablo 3.3'te belirtildiği şekilde değerlendirildi.

Tablo 3.3: İmmunhistokimyasal BTLA için boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi

<%5	0 puan
%5-%25	1 puan
%26-%50	2 puan
>%50	3 puan

BTLA boyamasının değerlendirilmesinde İmmunhistokimyasal reaktivite skoru (IRS) kullanılmış olup bu skor şu şekilde hesaplanmaktadır;

$$\text{IRS} = \text{boyanma yoğunluğu} \times \text{boyanma yaygınlığı}$$

BTLA boyaması için IRS puanı ≤ 4 ise düşük ekspresyon; >4 ise yüksek ekspresyon olarak kabul edildi.

TİM-3 için boyanma yaygınlığı değerlerdirmesi daha önce yapılmış bazı çalışmalardaki skorlamalar referans alınarak yapıldı. (Peng ve ark 2017) Değerlendirme boyanmanın en yoğun olduğu alanlarda 600x büyütmede en az 1000 hücre sayılmak koşuluyla yapılmıştır. Boyanma yaygınlığı tabloda belirtildiği şekilde değerlendirildi. (Tablo 3.4)

Tablo 3.4: İmmunhistokimyasal TİM-3 için boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi

%0	0 puan
<%25	1 puan
%25-%50	2 puan
>%50	3 puan

TİM-3 boyamasının değerlendirilmesinde İmmunhistokimyasal reaktivite skoru (IRS) kullanılmış olup bu skor şu şekilde hesaplanmaktadır;

$$\text{IRS} = \text{boyanma yoğunluğu} \times \text{boyanma yaygınlığı}$$

TİM-3 için IRS puanı aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde değerlendirildi;

Tablo 3.5: İmmunhistokimyasal TİM-3 için IRS puanlama sisteminin değerlendirilmesi

0-2 puan	Negatif
3-4 puan	1(+)
5-6 puan	2(+)
7-8-9 puan	3(+)

0-2 puan negatif olarak kabul edilirken 1(+), 2(+) ve 3(+) olgular pozitif olarak kabul edildi.

B7-H3 boyamasının değerlerdirmesi daha önce yapılmış bazı çalışmalardaki skorlamalar referans alınarak yapıldı. (Soo ve ark 2017, Chen ve ark 2017). Değerlendirme 200x büyütmede tüm tümör alanı gözönüne alınarak yapılmış olup H-skor yöntemi kullanılarak yapılmıştır. H-skor şu şekilde hesaplanmaktadır;

H-skor = (0 x boyanma yoğunluğu 0 olan alanların yüzdesi) + (1 x boyanma yoğunluğu 1+ olan alanların yüzdesi) + (2 x boyanma yoğunluğu 2+ olan alanların yüzdesi) + (3 x boyanma yoğunluğu 3+ olan alanların yüzdesi)

H-skor 0-300 arasında bir değer olup herbir olgunun H-skoru hesaplanmıştır. Tüm çalışma grubunda B7-H3 için ortalama ve standart sapma değeri istatistiksel olarak belirlendi.

3.5 İstatistiksel Analiz

Katılımcıların kişisel özelliklerini değerlendirmek amacıyla araştırmada ortalama, yüzde ve standart sapma gibi betimleyici analizler kullanıldı. BTL-A ve TİM-3 değerleri yüksek ve düşük olan hastalar arasında kategorik özellikleri karşılaştırmak amacıyla Ki-Kare testi ve Fisher Kesin Ki-Kare Testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren ve denek sayısı 30'dan büyük olan iki grup arasında ortalamaları karşılaştırmak amacıyla Bağımsız Gruplar t testi, normal dağılım göstermeyen veya denek sayısı 30'dan düşük olan iki grup arasında ortalamaları karşılaştırmak amacıyla Mann-Whitney U testi kullanıldı. Araştırmada ikiden çok grup arasında skor ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla Kruskal Wallis-H testinden yararlanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS 22.0 programı kullanıldı. Tüm analizler için anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak belirlendi.

3.6 Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi 22.06.2018 tarihinde 71 nolu toplantıda 2018/1421 nolu karar ile yerel etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim’da 2013-2018 yıllarına ait sistektomi+lenfadenektomi (47 olgu) ya da TUR-M materyallerinde (43 olgu) ait invaziv ya da noninvaziv mesanenin ürotelyal karsinomu tanısı almış toplam 90 olgu çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamıza dahil olan hastaların prognostik parametreleri ve immünohistokimyasal boyanma özellikleri sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Hastaların yaş, cinsiyet, histolojik grade, invazyon derinliği, lenf nodu tutulum durumu, B7-H3/BTLA/TİM-3 immunhistokimyasal boyanmalarının istatistiksel değerleri

Parametreler;	n = vaka sayısı	Yüzde (%)
Yaş		
<60	21	23.3
≥60	69	76.7
Cinsiyet		
Erkek	82	91.1
Kadın	8	8.9
Histolojik Grade		
Düşük Dereceli	12	13.3
Yüksek Dereceli	78	86.7
İnvazyon Derinliği		
Ta+T1	41	45.6
T2+T3+T4	49	54.4
Lenf Nodu Metastazı		
N0	73	81.1
N1+N2+N3	17	18.9
İHK BTLA yaygınlığı		
<%5	42	46.7
%5-%25	15	16.7
%26-%50	20	22.2
>%50	13	14.4

Tablo 4.1 (Devam): Hastaların yaş, cinsiyet, histolojik grade, invazyon derinliği, lenf nodu tutulum durumu, B7-H3/BTLA/TİM-3 immunhistokimyasal boyanmalarının istatistiksel değerleri

İHK BTLA yoğunluğu		
(-)	30	33.3
(+)	47	52.2
(++)	10	11.1
(+++)	3	3.3
BTLA – IRS puanına göre;		
Düşük ekspresyon (<4)	79	87.8
Yüksek ekspresyon (≥4)	11	12.2
İHK TİM-3 yoğunluğu		
(-)	11	12.2
(+)	51	56.7
(++)	19	21.1
(+++)	9	10.0
İHK TİM-3 yaygınlığı		
0	18	20.0
<%25	16	17.8
%25-%50	23	25.6
>%50	33	36.7
İHK TİM-3 yoğunluğu		
(-)	11	12.2
(+)	51	56.7
(++)	19	21.1
(+++)	9	10.0
TİM-3 – IRS puanına göre;		
<3	50	55.6
≥3	40	44.4
	Ort.±Ss.	Maksimum- Minimum
B7-H3 – H skor	165.24±61.71	40-285

4.1.1 Yaş

Çalışmamızdaki olguların en genci 48, en yaşlısı 88 yaşında olup, yaş ortalaması $66,12 \pm 8,77$ olarak hesaplandı. Bu sonuç literatür ile uyumlu bulundu. (Rosai ve Ackerman 2004). İmmünohistokimyasal BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonları ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi. (Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4)

4.1.2 Cinsiyet

90 adet vakamızın 8 tanesi kadın (%8,9), 82 tanesi erkek (%91,1) idi. Literatürde erkek/kadın oranı:3-4/1 olarak bildirilmiştir. (Stenberg 2004). Çalışmamıza dahil olan vaka serisinde bu oran yaklaşık olarak 8/1 bulunmuştur. İmmünohistokimyasal BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonları ile cinsiyet farkı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi. (Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4)

Tablo 4.2: Yaş ve cinsiyet ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	BTLA		P-values
		Düşük ekspresyon n (%)	Yüksek ekspresyon n (%)	
Yaş				
60<	21	20 (25.3)	1 (9.1)	0.447 ^a
≥60	69	59 (74.7)	10 (90.9)	
Cinsiyet				
Kadın	8	7 (8.9)	1 (9.1)	1.000 ^a
Erkek	82	72 (91.1)	10 (90.9)	

a=Fisher's testi

Tablo 4.3: Yaş ve cinsiyet ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	TİM-3		P-values
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	
Yaş				
60<	21	13 (26.0)	8 (20.0)	0.504 ^b
≥60	69	37 (74.0)	32 (80.0)	
Cinsiyet				
Kadın	8	4 (8.0)	4 (10.0)	1.000 ^a
Erkek	82	46 (92.0)	36 (90.0)	

a=Fisher's testi, b=Ki-kare testi

Tablo 4.4: Yaş ve cinsiyet ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	B7-H3/ H-Skor		P-values
Yaş		Mean±Sd	İstatistik	
<60	21	149.05±74.34	Z=-1.63	0.101
≥60	69	170.17±57.04		
Cinsiyet				
Kadın	8	158.13±77.31	Z=-0.41	0.681
Erkek	82	165.94±60.52		

Z=Mann-Whitney U testi

4.1.3 Histolojik Derece

Çalışmamızda düşük dereceli ürotelyal karsinom tanılı olgu sayısı 12 (%13,3) yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı olgu sayısı 78 (%86,7) idi.

BTLA düşük dereceli ürotelyal karsinom olgularının tamamında (12 vaka) düşük ekspresyon gösterdi. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgularının 67 tanesinde düşük ekspresyon gösterirken 11 tanesinde yüksek ekspresyon gösterdi. 90 vaka arasında sadece 11 olguda BTLA ile yüksek ekspresyon saptanmış olup bu olguların tamamı yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgularıydı. Ancak bu verilerle p=0.348 saptanarak grade ile BTLA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. (Tablo 4.5)

Tablo 4.5: Histolojik grade ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	BTLA		P-values
		Düşük ekspresyon n (%)	Yüksek ekspresyon n (%)	
Histolojik grade				
Düşük dereceli	12	12 (15.2)	0 (0.0)	0.348 ^a
Yüksek dereceli	78	67 (84.8)	11 (100.0)	

a=Fisher's testi

TİM-3 ile düşük dereceli ürotelyal karsinom tanılı vakaların 2 tanesinde pozitif ekspresyon görülürken 10 tanesinde negatif saptandı. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı olguların ise 38 tanesinde pozitif ekspresyon tespit edilirken 40 tanesinde ekspresyon görülmedi. TİM-3'ün ekspresyon gösterdiği olguların %95'i yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı olgulardı. Bu verilerle istatistiksel olarak grade ile TİM-3 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olduğu söylenemedi. (p=0.059) Ancak p değerinin 0.05'in hafif üstünde olması nedeniyle yüksek dereceli ürotelyal karsinomlarda düşük dereceli karsinomlara göre daha fazla TİM-3 ekspresyonu görülebileceği, bu konuda daha geniş vaka serileriyle çalışma yapılması gerektiği düşünüldü. (Tablo 4.6)

Tablo 4.6: Histolojik grade ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	TİM-3		P-values
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	
Histolojik grade				
Düşük dereceli	12	10 (20.0)	2 (5.0)	0.059 ^a
Yüksek dereceli	78	40 (80.0)	38 (95,0)	

a=Fisher's testi

B7-H3 boyamada düşük dereceli ürotelyal karsinom olgularında H-skor 129.58±64.26 iken yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgularında H-skor 170.73±59.86 olarak hesaplandı. İstatistiksel olarak B7-H3 ekspresyonu ile grade arasında anlamlı ilişki

tespit edildi. ($p=0.043$) Yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgularında B7-H3 ekspresyonu düşük dereceli ürotelyal karsinom olgularına göre daha fazla saptandı. (Tablo 4.7)

Tablo 4.7: Histolojik grade ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	B7-H3/ H-Skor		P-values
		Mean±Sd	İstatistik	
Histolojik grade				
Düşük dereceli	12	129.58±64.26	Z=-2.02	0.043
Yüksek dereceli	78	170.73±59.86		

Z=Mann-Whitney U testi

4.1.4 İnvazyon Derinliği

Çalışmamızda; noninvaziv ürotelyal karsinom (Ta) tanılı 19 adet, lamina propriaya invaze ürotelyal karsinom (T1) tanılı 22 adet, musularis propriaya invaze ürotelyal karsinom (T2) tanılı 14 adet, perivezikal yağlı dokuya invaze ürotelyal karsinom (T3) tanılı 25 adet ve etraf yumuşak doku organlara invaze ürotelyal karsinom (T4) tanılı 10 adet olgumuz mevcuttu. Olguların 41 tanesi yüzeysel mesane tümörü iken 49 tanesi kas invaziv mesane karsinomu idi.

BTLA boyamasında yüksek ekspresyon gösteren 11 adet olgu mevcuttu. Bu olgulardan 4 tanesi noninvaziv ürotelyal karsinom, 3 tanesi muskularis propriaya invaze ürotelyal karsinom ve 4 tanesi perivezikal yağlı dokuya invaze ürotelyal karsinom tanılı iken etraf yumuşak doku/organlara invaze ürotelyal karsinom ve lamina propriaya invaze ürotelyal karsinomlarında BTLA ile yüksek ekspresyon gösteren olgu tespit edilmedi. Yüzeysel mesane tümörlerinin %9,8'inde (4 olgu) kasa invaze mesane tümörlerinin %14,3'ünde (7 olgu) BTLA yüksek ekspresyonu mevcuttu. Bu verilerle BTLA ekspresyonu ve invazyon derinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. ($p=0,075$ ve $p=0,748$) (Tablo 4.8)

Tablo 4.8: İnvazyon derinliği ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	BTLA		P-values
		Düşük ekspresyon n (%)	Yüksek ekspresyon n (%)	
İnvazyon derinliği				
Ta	19	15 (19.0)	4 (36.4)	0.075 ^a
T1	22	22 (27.8)	0 (0.0)	
T2	14	11 (13.9)	3 (27.3)	
T3	25	21 (26.6)	4 (36.4)	
T4	10	10 (12.7)	0 (0.)	
İnvazyon derinliği				
Yüzeyel tümörler (Ta+T1)	41	37 (90.2)	4 (9.8)	0.748 ^a
Kasa invaze tümörler (T2+T3+T4)	49	42 (85.7)	7 (14.3)	

a=Fisher's testi

TİM-3 boyamasında pozitif ekspresyon gösteren 40 adet olgu mevcuttu. Bu olgulardan 7 tanesi noninvaziv ürotelyal karsinom, 3 tanesi lamina propriaya invaze ürotelyal karsinom, 6 tanesi muskularis propriaya invaze ürotelyal karsinom, 18 tanesi perivezikal yağlı dokuya invaze ürotelyal karsinom ve 6 tanesi etraf yumuşak doku/organlara invaze ürotelyal karsinom tanılıydı. Yüzeyel mesane tümörlerinin %24,4'inde (10 olgu) kas invaziv mesane tümörlerinin %61,2'sinde (30 olgu) TİM-3 pozitif ekspresyonu mevcuttu. Bu verilerle TİM-3 ekspresyonu ve invazyon derinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. (p=0,001 ve p=0,001) İnvazyon derinliği arttıkça TİM-3 pozitif ekspresyonunun arttığı tespit edildi. (Tablo 4.9)

Tablo 4.9: İnvazyon derinliği ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	TİM-3		P-values
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	
İnvazyon derinliği				
Ta	19	12 (24.0)	7 (24.0)	0.001 ^a
T1	22	19 (38.0)	3 (7.5)	
T2	14	8 (16.0)	6 (15.0)	
T3	25	7 (14.0)	18 (45.0)	
T4	10	4 (8.0)	6 (15.0)	
İnvazyon derinliği				
Yüzeyel tümörler (Ta+T1)	41	31 (75.6)	10 (24.4)	0.001 ^b
Kasa invaze tümörler (T2+T3+T4)	49	19 (38.8)	30 (61.2)	

a=Fisher's testi, b=Ki-kare testi

B7-H3 boyamada H-skor değeri; noninvaziv ürotelyal karsinom için 169.84 ± 63.60 , lamina propriaya invaze ürotelyal karsinom için 133.41 ± 49.93 , muskularis propriaya invaze ürotelyal karsinom için 157.86 ± 57.57 , perivezikal yağlı dokuya invaze ürotelyal karsinom için 181.40 ± 60.35 ve etraf yumuşak doku/organlara invaze ürotelyal karsinom için $196,50 \pm 69,52$ olarak hesaplandı. Yüzeyel mesane tümörlerinde H-skor 150.29 ± 58.89 iken kas invaziv mesane tümörlerinde 177.76 ± 61.81 idi. Bu verilerle B7-H3 ekspresyonu ve invazyon derinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p=0,039$ ve $p=0,035$) Kasa invaze mesane tümörlerinde yüzeyel mesane tümörlerine göre B7-H3 ekspresyonu daha fazla görüldü. (Tablo 4.10)

Tablo 4.10: İnvazyon derinliği ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	B7-H3/ H-Skor		P-values
		Mean±Sd	İstatistik	
İnvazyon derinliği				
Ta	19	169.84±63.60	X ² =10.11	0.039
T1	22	133.41±49.93		
T2	14	157.86±57.57		
T3	25	181.40±60.35		
T4	10	196.50±69.52		
İnvazyon derinliği				
Yüzeysel tümörler (Ta+T1)	41	150.29±58.89	t=-2.14	0.035
Kasa invaze tümörler (T2+T3+T4)	49	177.76±61.81		

X²= Kruskal Wallis-H Testi, t=Bağımsız gruplar t testi

4.1.5 Lenf Nodu Metastazı

Çalışmamıza dahil olan 90 adet hastanın 17 (%18,9) tanesinde lenf nodu metastazı mevcutken 73(%81,1) tanesinde lenf nodu metastazı mevcut değildi.

BTLA boyamada lenf noduna metastaz yapmış 17 adet ürotelyal karsinom olgusunun 3 tanesinde (%17,6'sında) yüksek ekspresyon 14 tanesinde (%82,4'ünde) düşük ekspresyon izlendi. Lenf noduna metastaz yapmamış 73 adet ürotelyal karsinom olgusunun 8 tanesinde (%11'inde) BTLA ile yüksek ekspresyon, 65 tanesinde (%89'unda) düşük ekspresyon görüldü. BTLA ile yüksek ekspresyon gösteren toplam 11 olgunun 3 tanesi lenf noduna metastatik ürotelyal karsinom iken 8 tanesi lenf noduna metastaz yapmamış ürotelyal karsinom olgusu idi. Bu verilerle BTLA ekspresyonu ile lenf noduna metastaz yapmış olmak arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi. (p=0,429) (Tablo 4.11)

Tablo 4.11: Lenf nodu metastazı ile immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	BTLA		P-values
		Düşük ekspresyon n (%)	Yüksek ekspresyon n (%)	
Lenf nodu metastazı				
Yok (N0)	73	65 (89.0)	8 (11.0)	0.429 ^a
Var (N1+N2+N3)	17	14 (82.4)	3 (17.6)	

a=Fisher's testi

TİM-3 boyamada lenf noduna metastaz yapmış 17 adet ürotelyal karsinom olgusunun 11 tanesinde (%64,7'sinde) pozitif ekspresyon 6 tanesinde (%35,3'ünde) negatif ekspresyon izlendi. Lenf noduna metastaz yapmamış 73 adet ürotelyal karsinom olgusunun 29 tanesinde (%39,7'sinde) TİM-3 ile pozitif ekspresyon, 44 tanesinde (%60,3'ünde) negatif ekspresyon görüldü. TİM-3 ile pozitif ekspresyon gösteren toplam 40 olgunun 11 tanesi lenf noduna metastatik ürotelyal karsinom iken 29 tanesi lenf noduna metastaz yapmamış ürotelyal karsinom olgusu idi. Bu verilerle TİM-3 ekspresyonu ile lenf noduna metastaz yapmış olmak arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi. (p=0,062) (Tablo 4.12)

Tablo 4.12: Lenf nodu metastazı ile immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	TİM-3		P-values
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	
Lenf nodu metastazı				
Yok (N0)	73	44 (60.3)	29 (39.7)	0.062 ^b
Var (N1+N2+N3)	17	6 (35.3)	11 (64.7)	

b=Ki-kare testi

B7-H3 boyamada lenf noduna metastaz yapmış 17 adet olgunun H-skoru 170.59±65.11, lenf noduna metastaz yapmamış 73 adet ürotelyal karsinom olgusunun H-skoru 164.00±61.29 olarak hesaplandı. Bu verilerle B7-H3 ekspresyonu ile lenf noduna metastaz yapmış olmak arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi. (p=0,812) (Tablo 4.13)

Tablo 4.13: Lenf nodu metastazı ile immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	n	B7-H3/ H-Skor		P-values
Lenf nodu metastazı		Mean±Sd	İstatistik	
Yok (N0)	73	164.00±61.29	Z=-0.23	0.812
Var (N1+N2+N3)	17	170.59±65.11		

Z=Mann-Whitney U testi

Çalışmamızda ayrıca metastaz yapmış 17 olgunun ana tümör dokularından alınan örneklerle yapmış oldukları lenf nodu metastazından alınan örneklerle immunhistokimyasal BTLA, TİM-3 ve B7-H3 boyamaları yapıldı ve reseptör ekspresyonları istatistiksel olarak değerlendirildi.

Metastatik lenf nodlarına uygulanan immunhistokimyasal BTLA boyamada olguların 13 tanesinde (%76,5) yüksek ekspresyon tespit edildi. Lenf nodu metastazı bulunan 17 olgunun 14 tanesinde (%82,4) BTLA yüksek ekspresyonu tespit edildi. Metastatik lenf noduna sahip olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodundaki metastatik tümör dokusunun arasında BTLA ekspresyonları açısından anlamlı fark görülmedi. (Tablo 4.14)

Tablo 4.14: Metastatik olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodu metastaz dokusunun immunhistokimyasal BTLA ekspresyonlarının istatistiksel analizi

Parametre		Metastatik lenf nodu dokusu	Ana tümör dokusu	İstatistik	P-values
		n(%)	n(%)		
BTLA	Düşük ekspresyon	4 (%23,5)	3 (%17,6)	X ² =0,18	p=1,000 ^a
	Yüksek ekspresyon	13 (%76,5)	14 (%82,4)		

a=Fisher Kesin Ki-Kare testi

Metastatik lenf nodlarına uygulanan immunhistokimyasal TİM-3 boyamada olguların 11 tanesinde (%64,7) yüksek ekspresyon tespit edildi. Lenf nodu metastazı bulunan 17 olgunun 11 tanesinde (%64,7) TİM-3 yüksek ekspresyonu tespit edildi. Metastatik lenf noduna sahip olgularda ana tümör dokuları ile lenf nodundaki metastatik tümör dokularında pozitif boyanan vaka sayıları tesadüfi aynı olduğu için istatistiksel analiz anlamlı değildi. (Tablo 4.15)

Tablo 4.15: Metastatik olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodu metastaz dokusunun immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonlarının istatistiksel analizi

Parametre		Metastatik lenf nodu dokusu	Ana tümör dokusu	İstatistik	P-values
TİM-3	Negatif ekspresyon	6 (%35,3)	6 (%35,3)	X ² =ad	p=ad
	Pozitif ekspresyon	11 (%64,7)	11 (%64,7)		

ad=anlamlı değil

Metastatik lenf nodlarına uygulanan immunhistokimyasal B7-H3 boyamada olguların H-skoru ortalaması 209.71±62,21 saptandı. Lenf nodu metastazı bulunan hastalarda ana tümör dokusunun H-skor ortalaması 170,59±65,11 tespit edildi. Metastatik lenf noduna sahip olgularda ana tümör dokusuna göre lenf nodundaki metastatik tümör dokusunun daha yüksek B7-H3 ekspresyonu görülmesine rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Tablo 4.16)

Tablo 4.16: Metastatik olgularda ana tümör dokusu ile lenf nodu metastaz dokusunun immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonlarının istatistiksel analiz

Parametre	n	B7-H3/ H-Skor		P-values
		Mean±Sd	İstatistik	
Metastatik lenf nodu dokusu	17	209.71±62,21	Z=-1,52	0,133
Ana tümör dokusu	17	170,59±65,11		

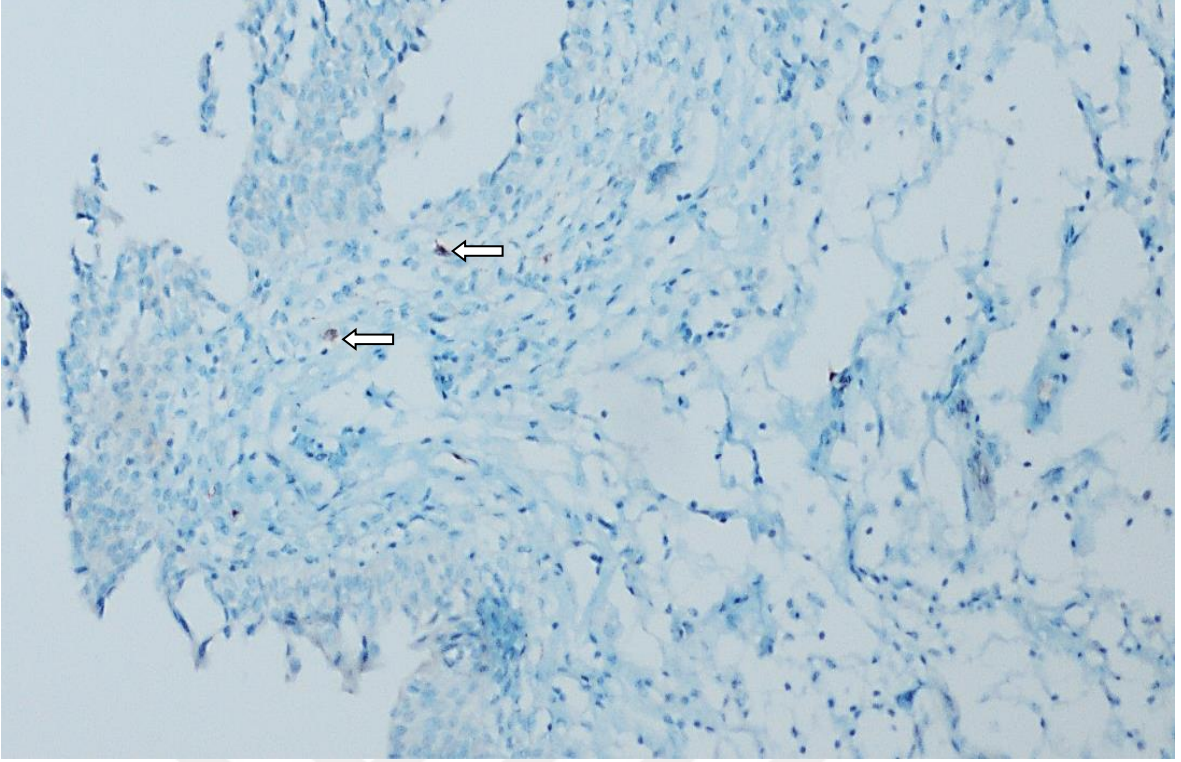
Z=Mann-Whitney U testi

4.2 İmmunhistokimyasal Bulgular

İmmunhistokimyasal çalışmada tümör hücrelerinde BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonları semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi.

4.2.1 BTLA

Sistektomi materyallerinde normal görünümlü mesane alanlarından alınan örneklerden oluşturulmuş kontrol grubunda BTLA boyama ile ekspresyon görülmedi. (Şekil 4.1)



**Şekil 4.1: Normal ürotelyumda immunhistokimyasal BTLA boyanması
(ok: BTLA (+) lenfosit, x100)**

90 adet ürotelyal karsinom tanılı olguda immunhistokimyasal BTLA boyama uygulandı. İmmunhistokimyasal BTLA boyanma özellikleri aşağıda belirtilmiştir. (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5)

- Boyanma yaygınlığı;
<%5 olan olgu sayısı 42 (olguların %46,7'si),
%5-%25 olan olgu sayısı 15 (olguların %16,7'si)
%26-%50 olan olgu sayısı 20 (olguların %22,2'si)
>%50 olan olgu sayısı 13 (olguların %14,4'ü)
- Boyanma yoğunluğu;
(-) olan olgu sayısı 30 (olguların %33,3'ü),
1(+) olan olgu sayısı 47 (olguların %52,2'si)
2(+) olan olgu sayısı 10 (olguların %11,1'si)
3(+) olan olgu sayısı 3 (olguların %3,3'ü)

- İmmunreaktivite skoru;

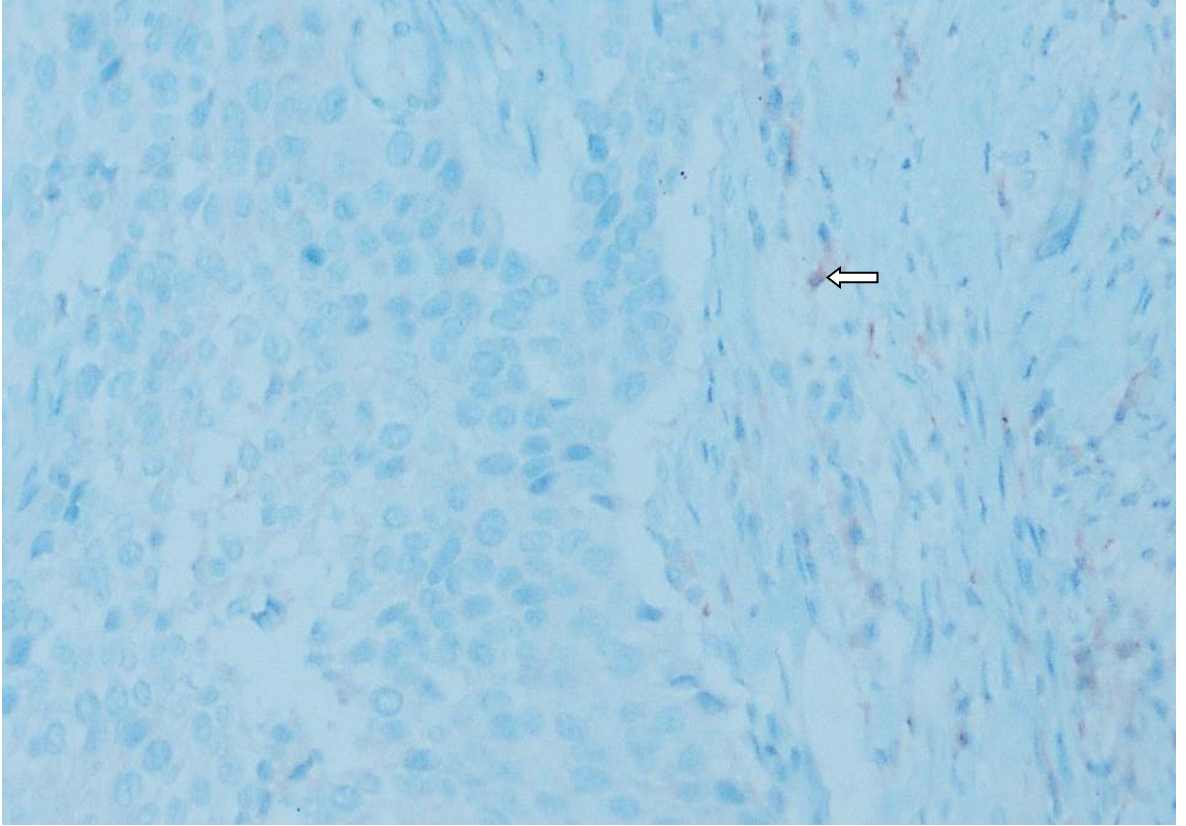
<4 (düşük ekspresyon) olan olgu sayısı 79 (olguların %87,8'i)

≥4 (yüksek ekspresyon) olan olgu sayısı 11 (olguların %12,2'si) olarak belirlendi.

17 adet metastatik lenf nodundan immünohistokimyasal çalışılan BTLA boyamasında;

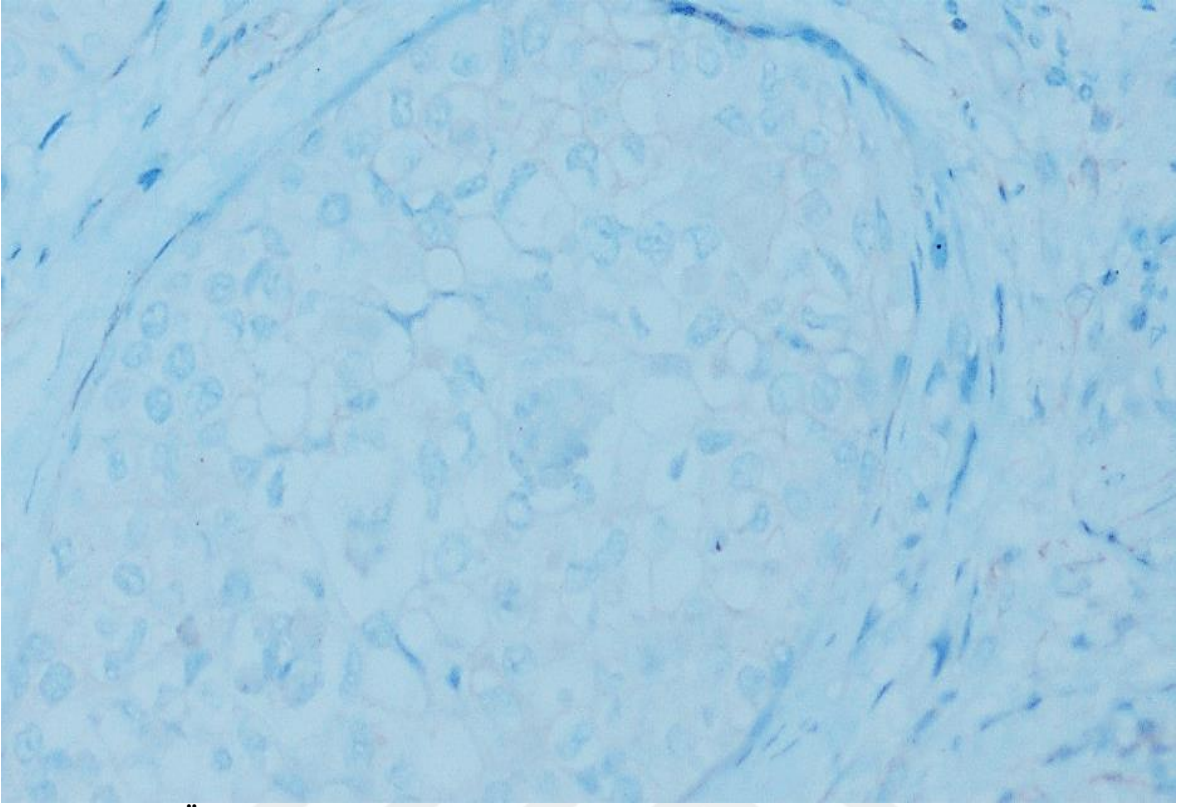
<4 (düşük ekspresyon) olan olgu sayısı 4 (olguların %23,5'i)

≥4 (yüksek ekspresyon) olan olgu sayısı 13 (olguların %76,5'i) olarak belirlendi.

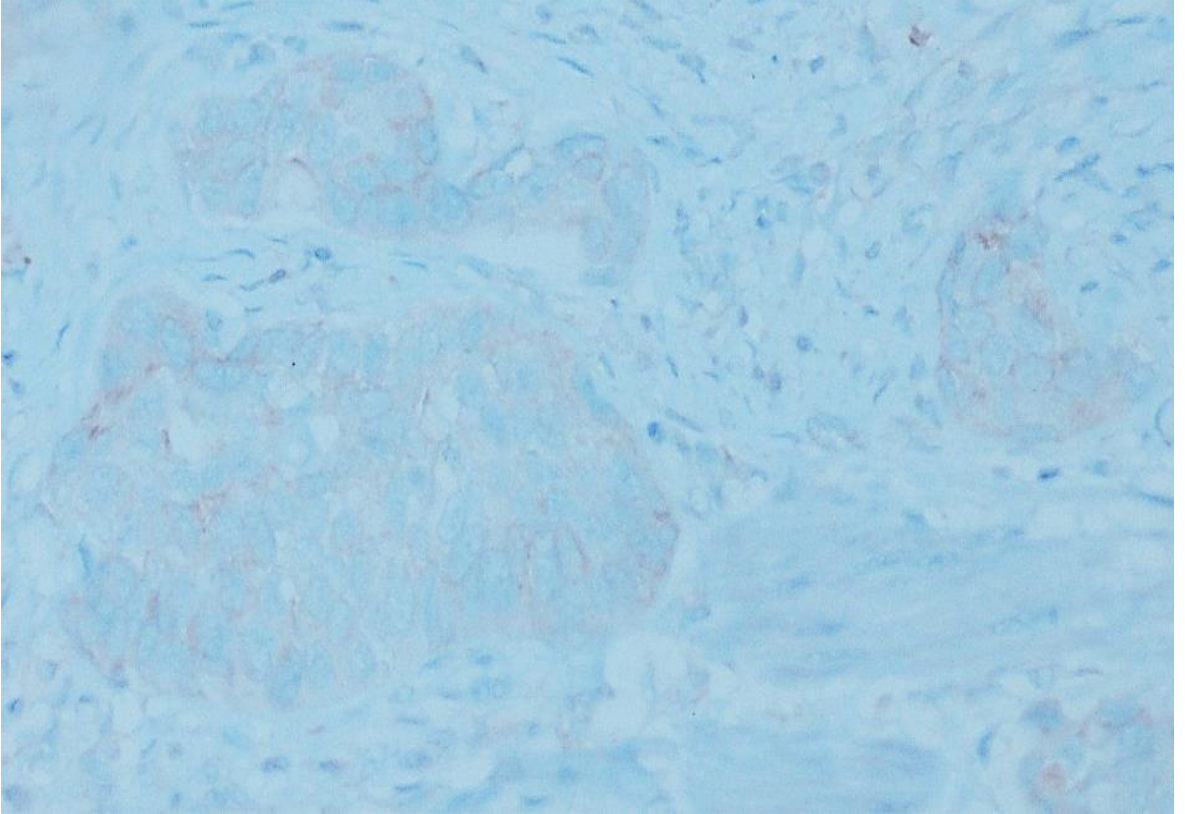


Şekil 4.2: Ürotelyal karsinomda immünohistokimyasal BTLA ile (-) boyanma

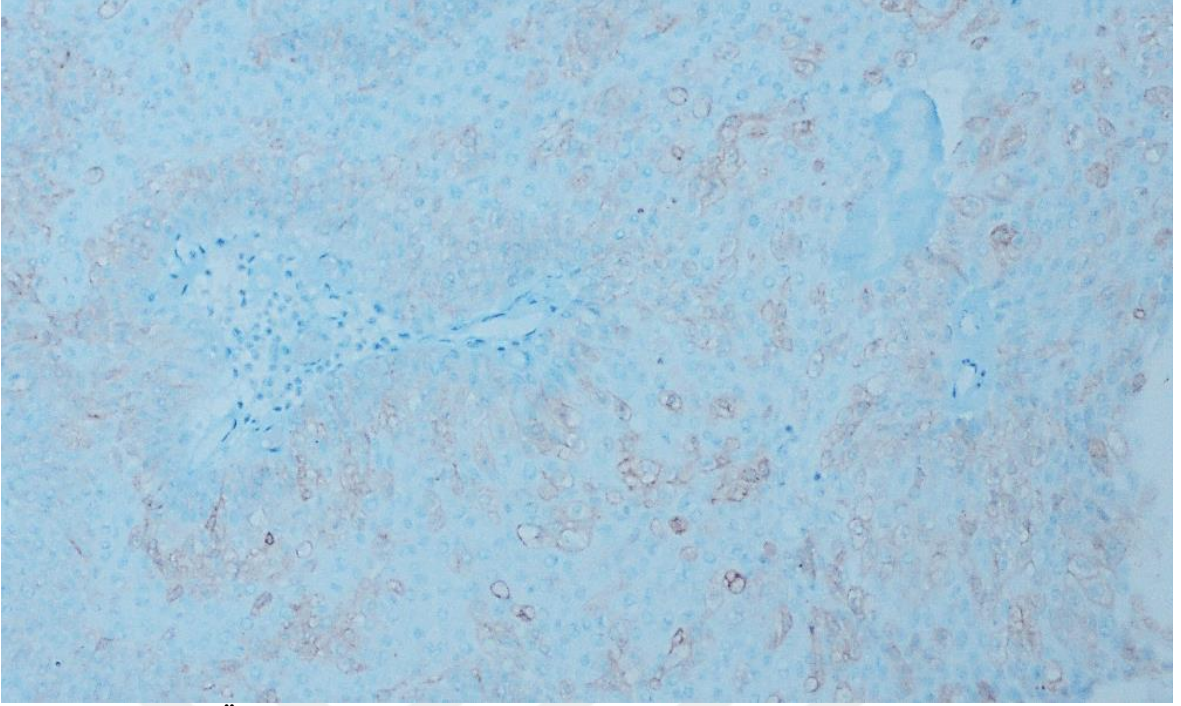
(ok: BTLA (+) lenfosit, x200)



Şekil 4.3: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile 1(+) boyanma (x200)



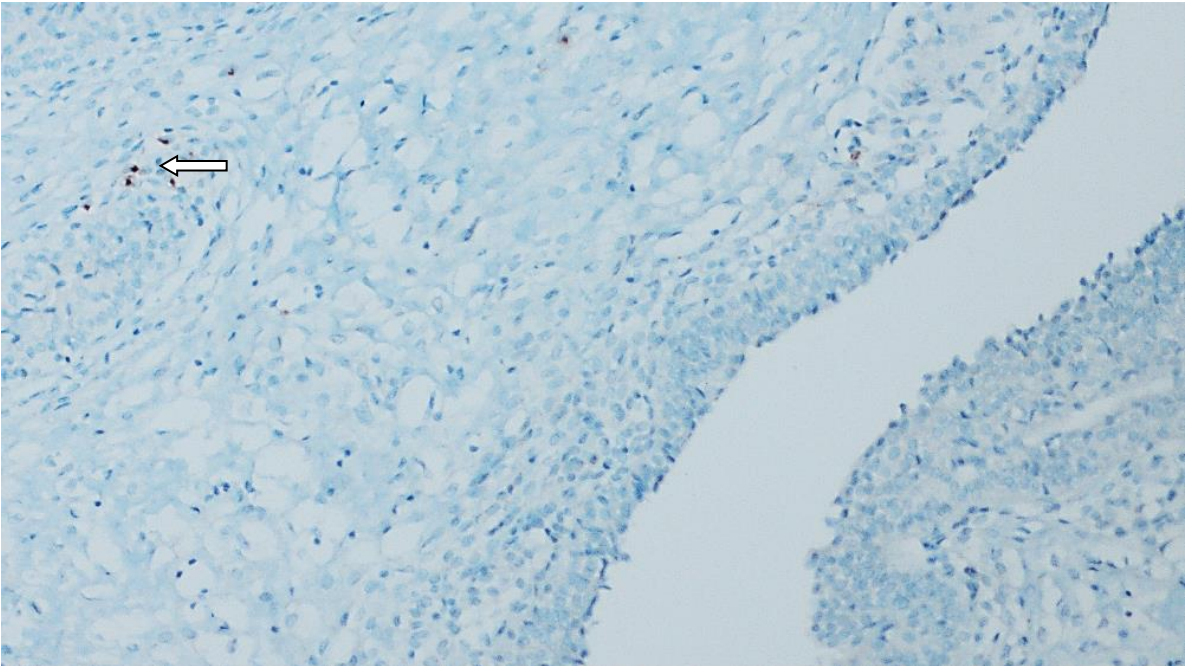
Şekil 4.4: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile 2(+) boyanma (x200)



Şekil 4.5: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal BTLA ile 3(+) boyanma (x100)

4.2.2 TİM-3

Sistektomi materyallerinde normal görünümlü mesane alanlarından alınan örneklerden oluşturulmuş kontrol grubunda TİM-3 boyama ile ekspresyon görülmedi. (Şekil 4.6)



Şekil 4.6: Normal ürotelyumda immunhistokimyasal TİM-3 ile boyanma (ok: TİM-3 (+) lenfositler, x100)

90 adet ürotelyal karsinom tanılı olguda immunhistokimyasal TİM-3 boyama uygulandı. İmmunhistokimyasal TİM-3 boyanma özellikleri aşağıda belirtilmiştir. (Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10)

- Boyanma yaygınlığı;

0 olan olgu sayısı 18 (olguların %20,0'si),

<%25 olan olgu sayısı 16 (olguların %17,8'i)

%25-%50 olan olgu sayısı 23 (olguların %25,6'sı)

>%50 olan olgu sayısı 33 (olguların %36,7'si)

- Boyanma yoğunluğu;

(-) olan olgu sayısı 11 (olguların %12,2'si),

1(+) olan olgu sayısı 51 (olguların %56,7'si)

2(+) olan olgu sayısı 19 (olguların %21,1'i)

3(+) olan olgu sayısı 9 (olguların %10,0'u)

- İmmunreaktivite skoru;

<3 (negatif ekspresyon) olan olgu sayısı 50 (olguların %55,6'sı)

≥3 (pozitif ekspresyon) olan olgu sayısı 40 (olguların %44,4'ü) olarak belirlendi.

Ayrıca IRS puanlamaya göre

0-2: (-)

3-4: (+)

5-6: (++)

7-8-9: (+++)

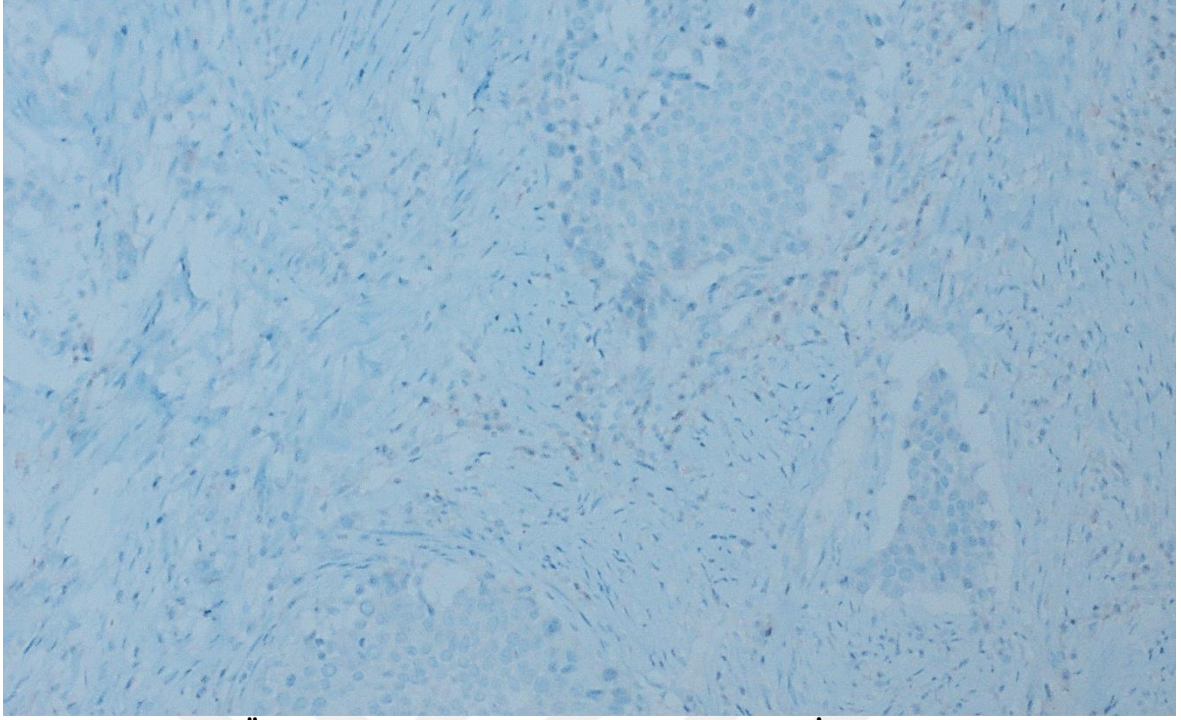
olarak belirlendi.

TİM-3 boyaması IRS puanına göre; histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu açısından istatistiksel olarak analiz edildiğinde; histolojik grade ve lenf nodu tutulumu ile anlamlı oransal fark görülmezken invazyon derinliği arttıkça TİM-3 immunreaktivite skorunun (IRS) arttığı tespit edildi. (Tablo 4.17)

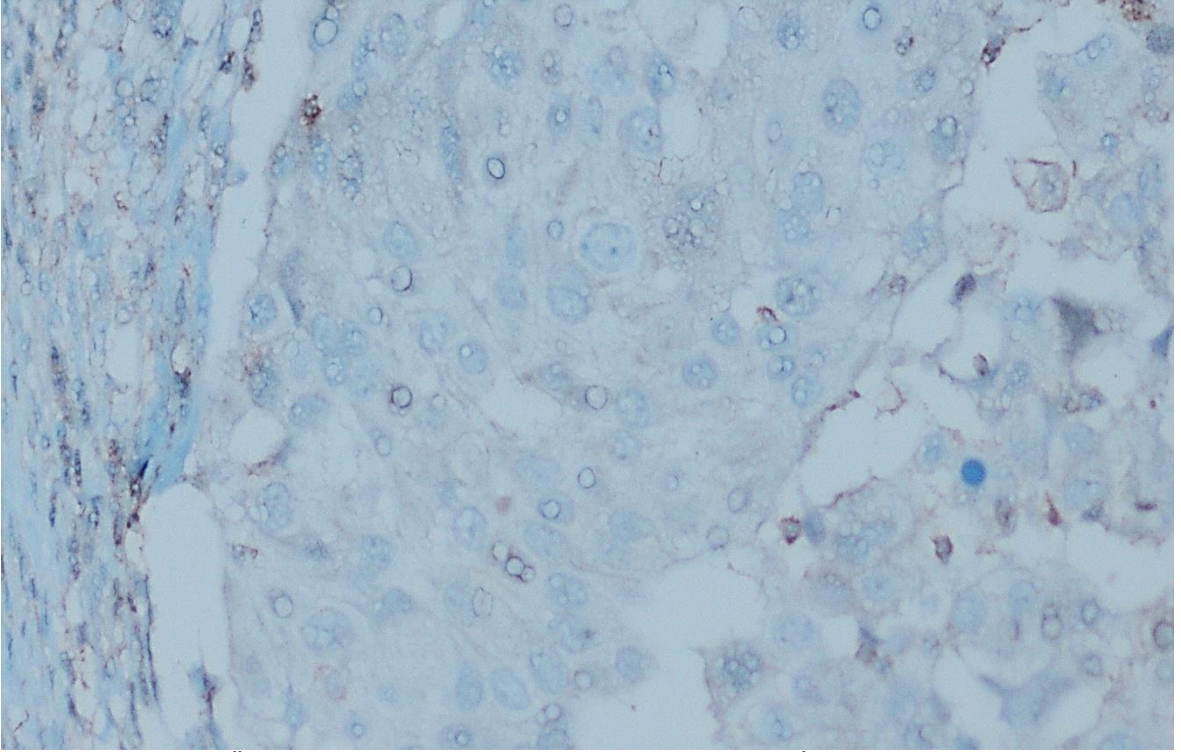
17 adet metastatik lenf nodundan immunhistokimyasal çalışılan TİM-3 boyamasında;

<3 (negatif ekspresyon) olan olgu sayısı 6 (olguların %35,3'ü)

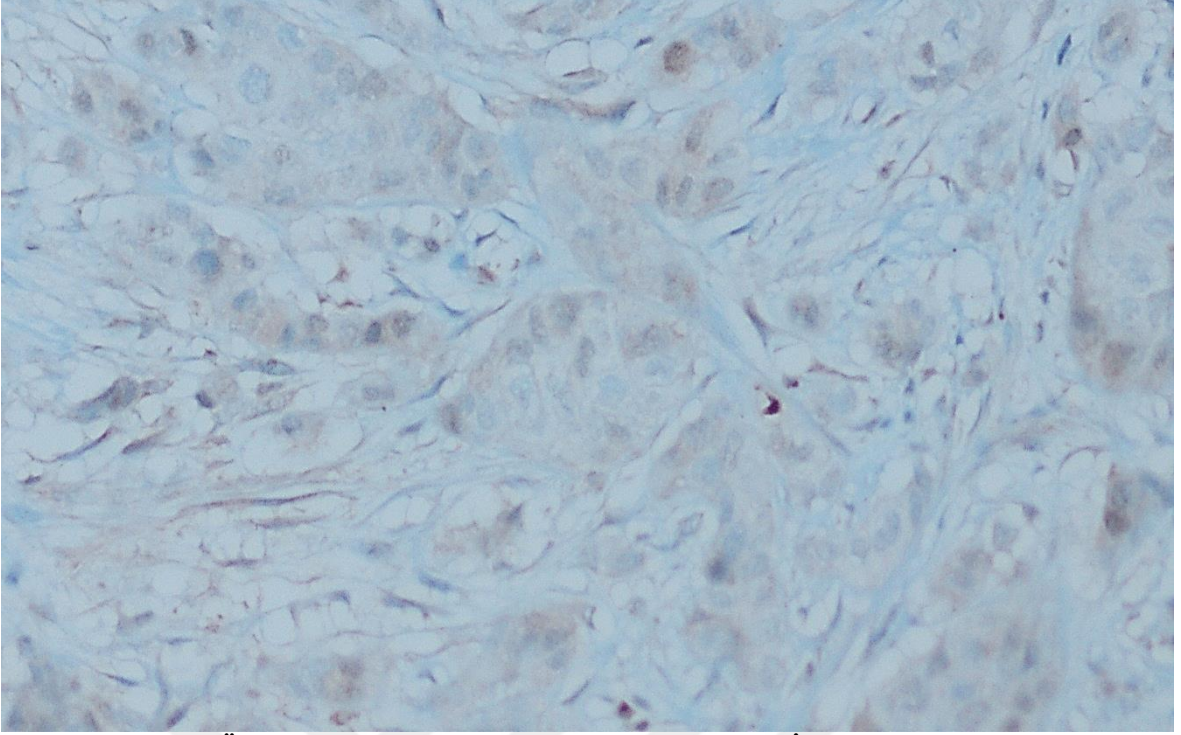
≥3 (pozitif ekspresyon) olan olgu sayısı 11 (olguların %64,7'si) olarak belirlendi.



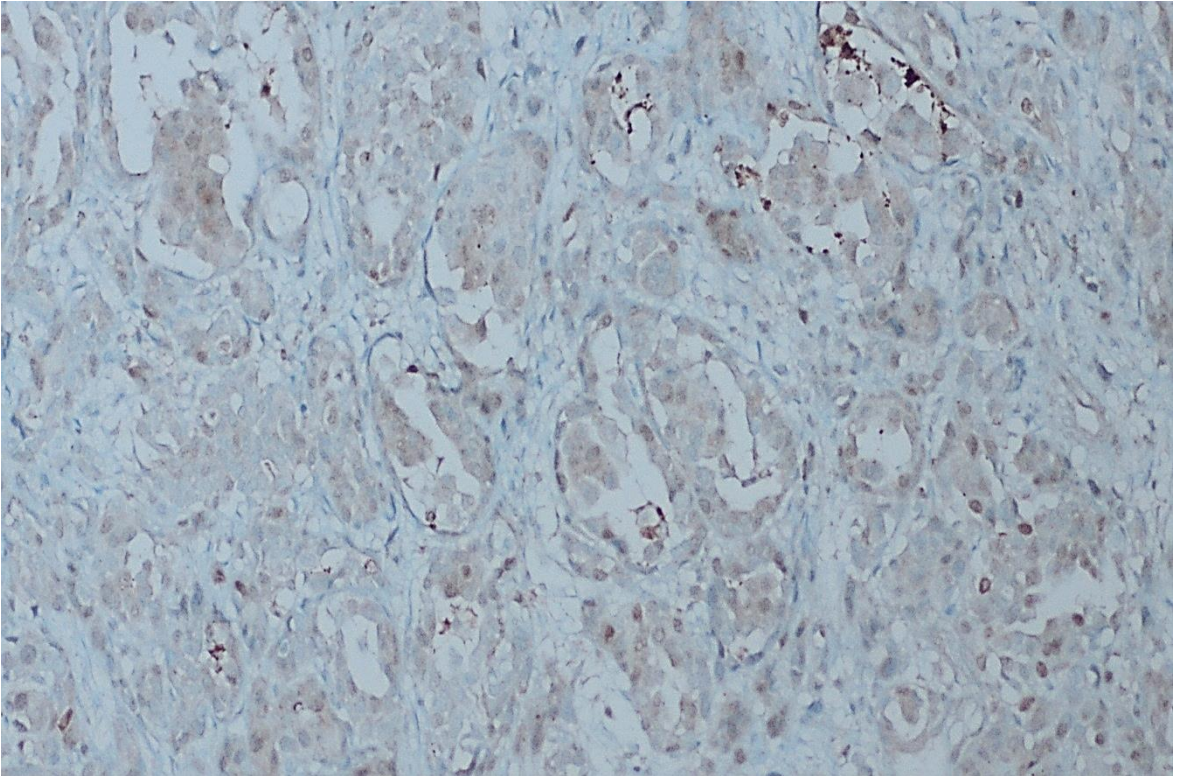
**Şekil 4.7: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TIM-3 ile (-) boyanma
(ok: TIM-3 (+) lenfosit, x100)**



Şekil 4.8: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TIM-3 ile 1(+) boyanma (x200)



Şekil 4.9: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TIM-3 ile 2(+) boyanma (x200)



**Şekil 4.10: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal TIM-3 ile 3(+) boyanma
(x100)**

Tablo 4.17: Histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazının TİM-3 IRS puanlamasına göre istatistiki analizi

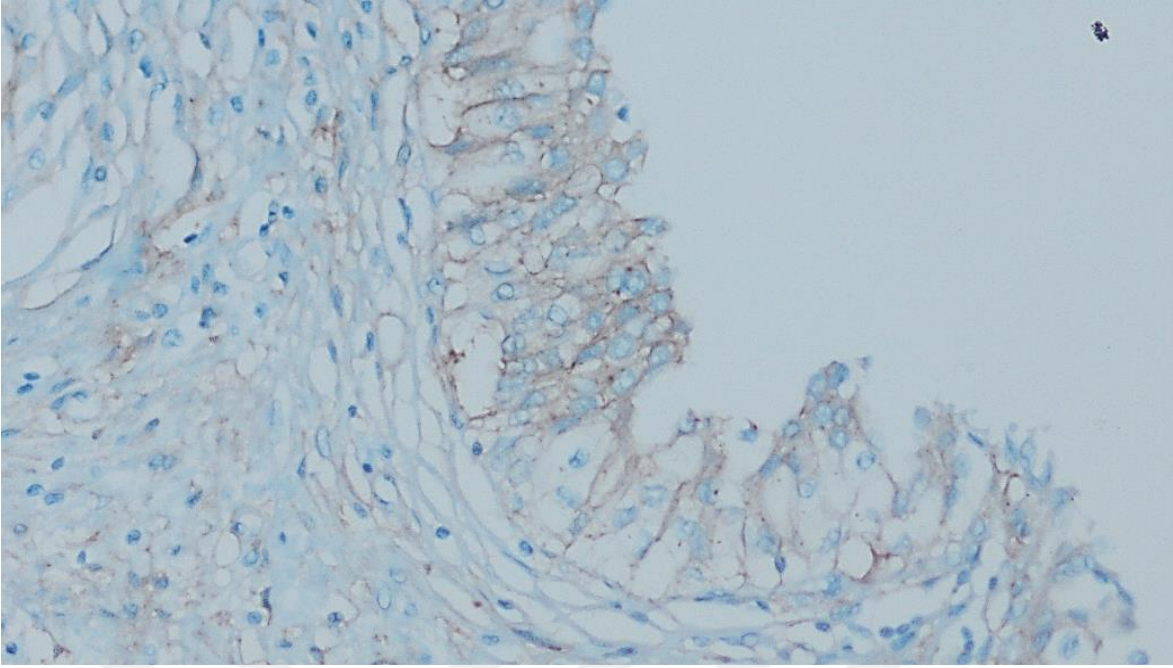
Parametre	TİM-3 IRS puanlama				
	-	+	++	+++	
Histolojik grade					
Düşük dereceli	10 (20.0)	1 (4.8)	1 (9.1)	0 (0)	Fisher's test=3.524
Yüksek dereceli	40 (80.0)	20 (95.2)	10 (90.9)	8 (100)	p=0.280
İnvazyon derinliği					
Ta	12 (24.0)	5 (23.8)	2 (18.2)	0 (0)	Fisher's test=23.751
T1	19 (38.0)	3 (14.3)	0 (0)	0 (0)	p=0.006
T2	8 (16.0)	2 (9.5)	2 (18.2)	2 (25.0)	
T3	7 (14.0)	9 (42.9)	4 (36.4)	5 (62.5)	
T4	4 (8.0)	2 (9.5)	3 (0)	1 (12.5)	
Lenf nodu metastazı					
Yok (N0)	44 (88.0)	17 (81.0)	8 (72.7)	4 (50.0)	Fisher's test=3.524
Var (N1+N2+N3)	6 (12.0)	4 (19.0)	3 (27.3)	4 (50.0)	p=0.280
Toplam	50 (55.6)	21 (23.3)	11 (12.2)	8 (8.9)	

Histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazının TİM-3 IRS puanlamasına göre istatistiki analizi aşağıda belirtilmiştir. (Tablo 4.17)

4.2.3 B7-H3

Sistektomi materyallerinde normal görünümlü mesane alanlarından alınan örneklerden oluşturulmuş kontrol grubunda bazı alanlarda B7-H3 boyama mevcut olup H-skor 51.54 ± 27.64 idi. (Şekil 4.11)

90 adet ürotelyal karsinom tanılı olguda immunhistokimyasal B7-H3 boyamasında H-Skor 165.24 ± 61.71 idi. Normal görünümlü ürotelyum ve ürotelyal karsinom arasında B7-H3 ekspresyonu açısından anlamlı oransal fark mevcut olup tümörde B7-H3 ekspresyonunun arttığı saptandı. (Tablo 4.18)



Şekil 4.11: Normal ürotelyumda immunhistokimyasal B7-H3 boyaması (x200)

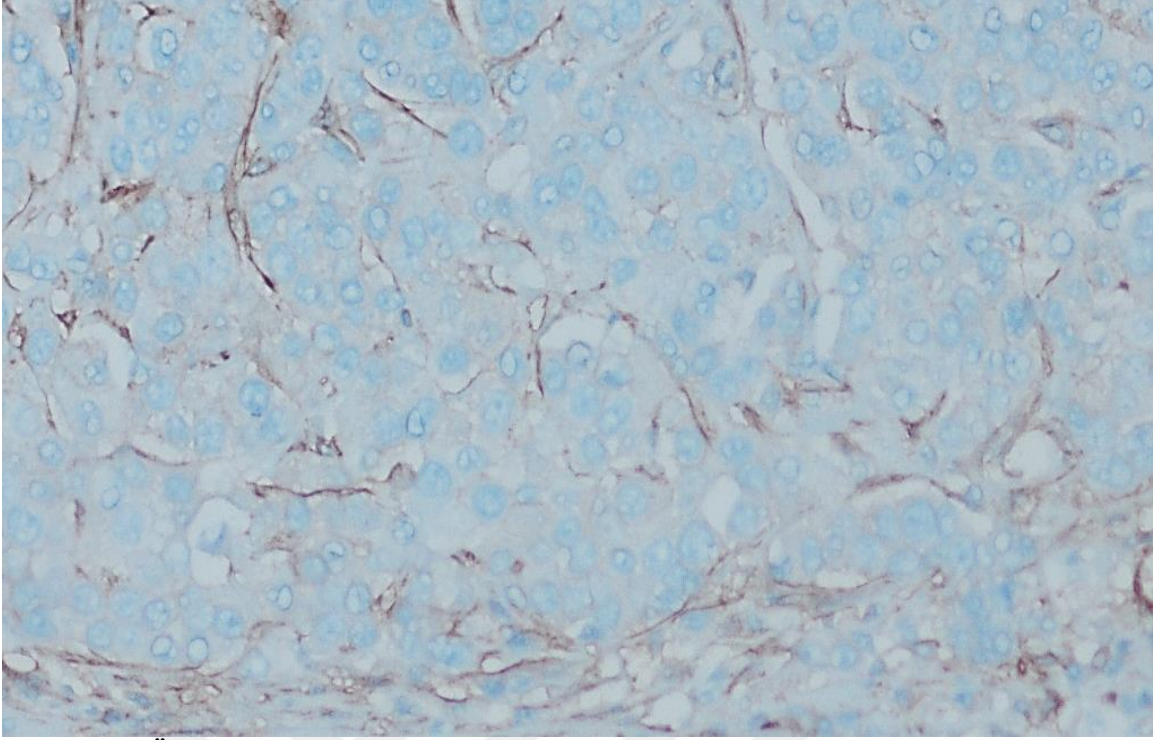
Tablo 4.18: Ürotelyal karsinom tanılı tüm hastaların tümör dokuları ile normal ürotelyumun immunhistokimyasal B7-H3 ekspresyonlarının istatistiksel analizi

Parametre	n	B7-H3/H -skor		P-values
		Mean±Sd	İstatistik	
Tüm olgular	90	165.24±61.71	Z=-5.30	<0.001
Normal ürotelyum	13	51.54±27.64		

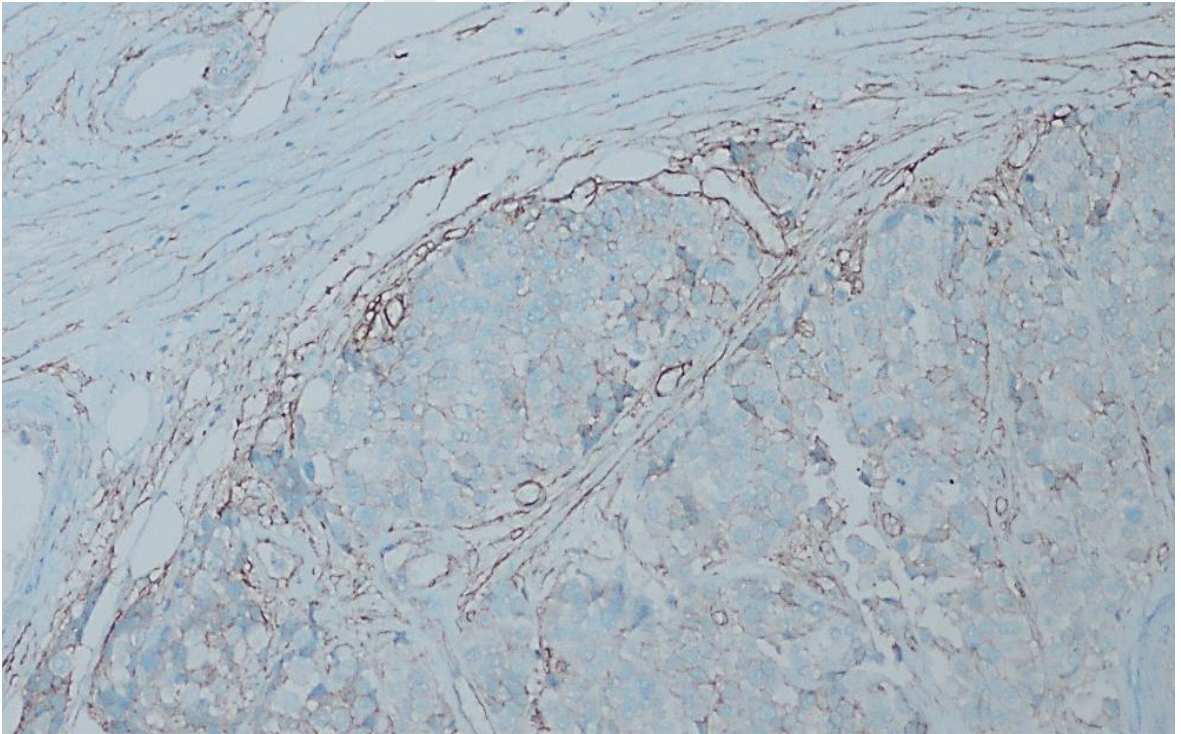
Z=Mann-Whitney U testi

Ayrıca 17 adet metastatik lenf nodundan immunhistokimyasal çalışılan B7-H3 boyamasında H-skor $209.71 \pm 62,21$ idi.

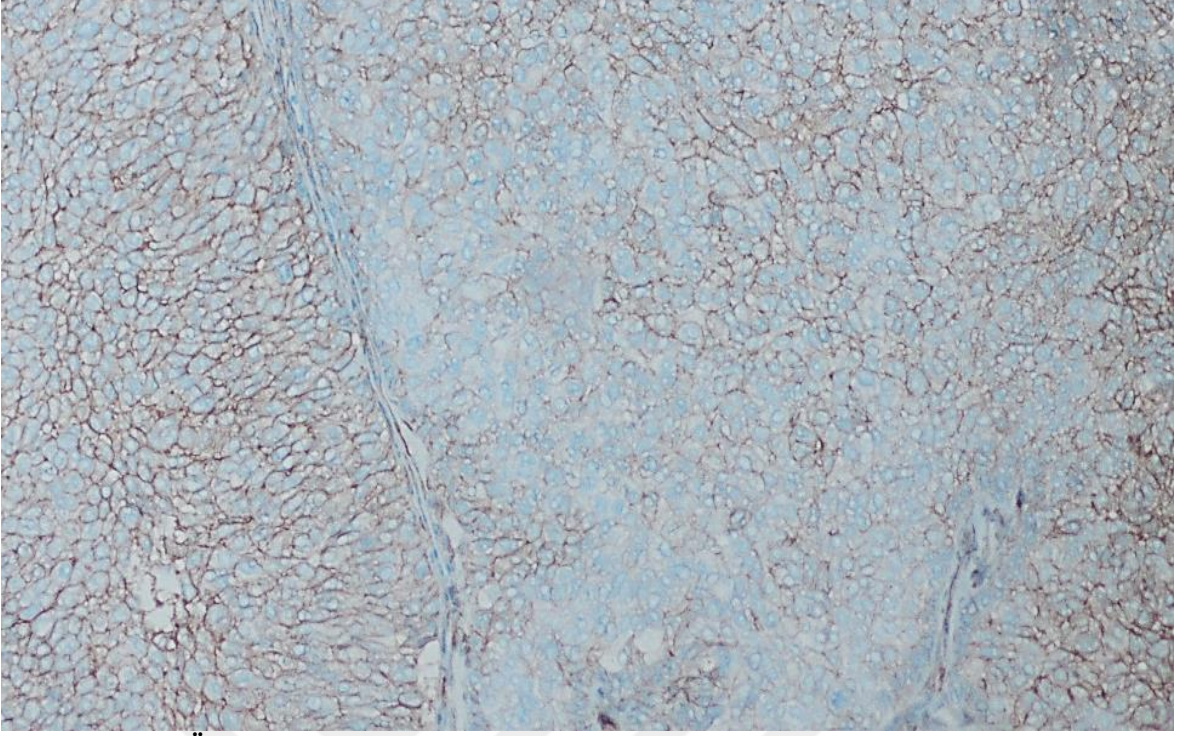
İmmunhistokimyasal B7-H3 boyanma örnekleri Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da belirtilmiştir.



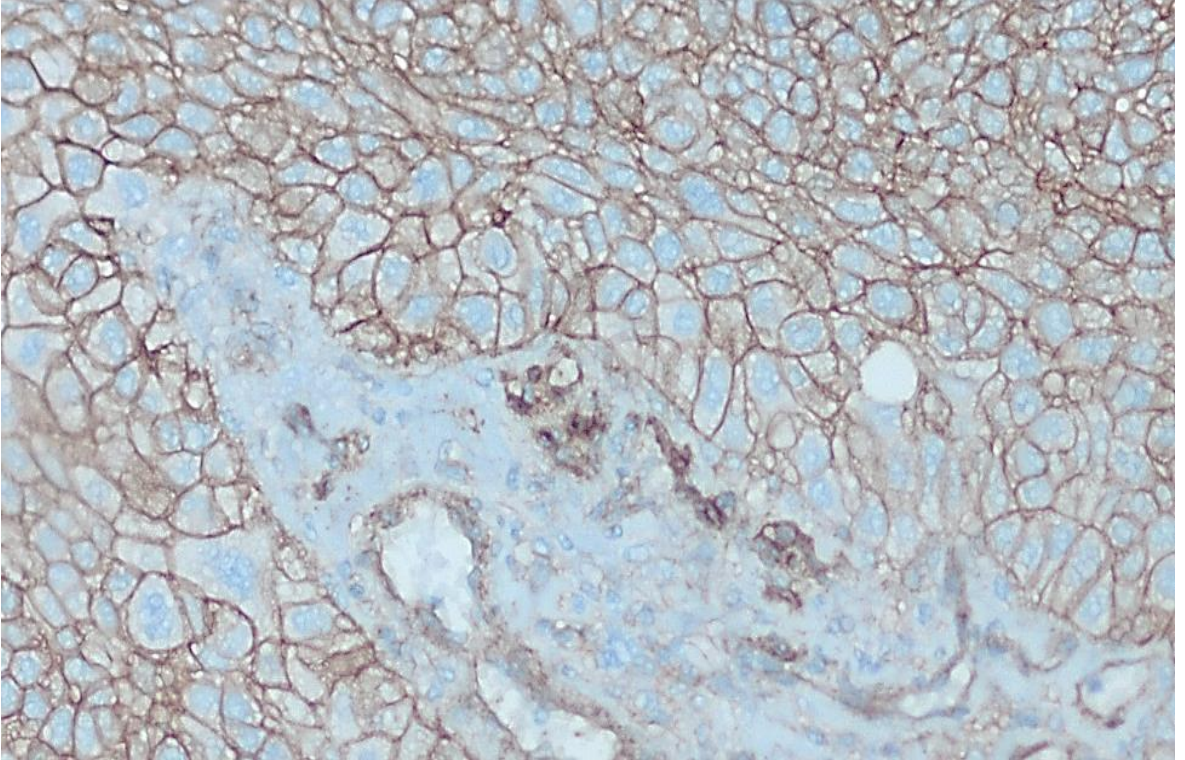
Şekil 4.12: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile negatif boyanma (x200)



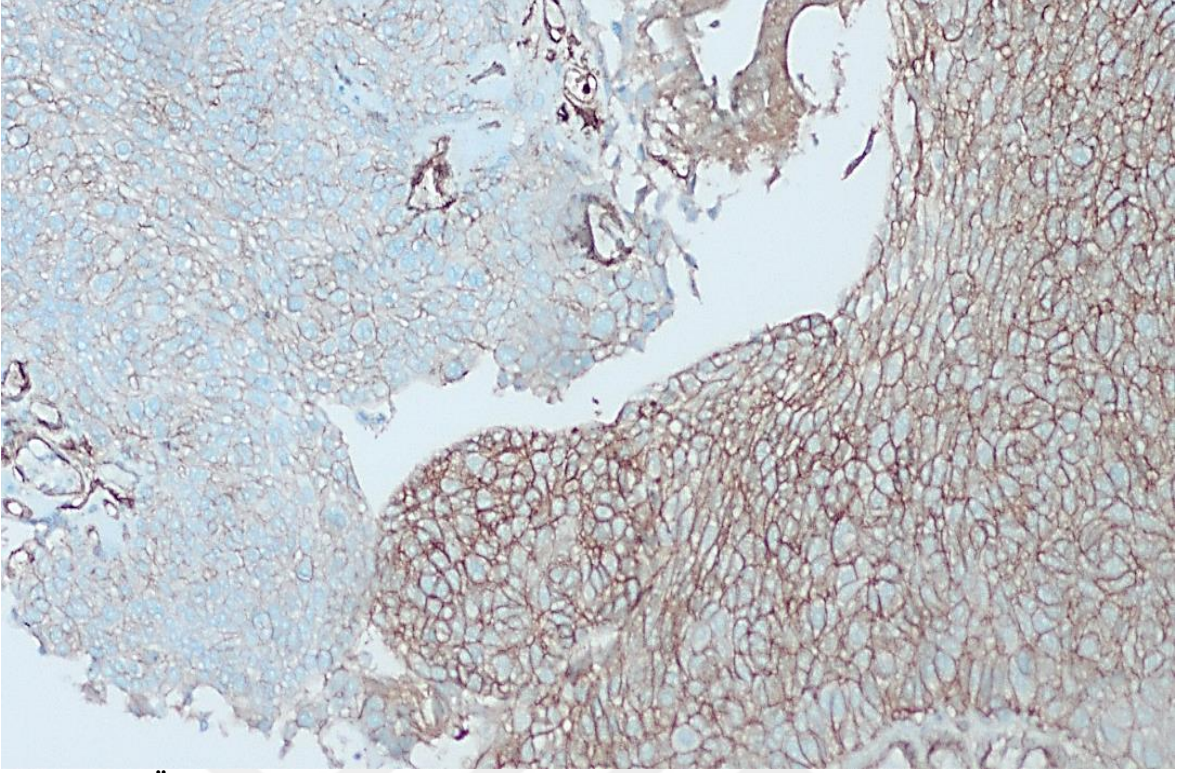
Şekil 4.13: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 1(+) boyanma (x100)



Şekil 4.14: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 2(+) boyanma (x100)



Şekil 4.15: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 3(+) boyanma (x200)



**Şekil 4.16: Ürotelyal karsinomda immunhistokimyasal B7-H3 ile 1(+), 2(+) ve 3(+) boyanma
(x40)**

5. TARTIŞMA

Mesane kanseri, üriner sisteminin ikinci en sık görülen malignitesi olup, mesanenin ürotelyal hücreli karsinomu en sık görülen mesane kanseri tipidir. Mesane kanseri insidansı ve mortalitesinde dünya genelinde genetik ve çevresel faktörler sebebiyle coğrafi farklılıklar olduğu bilinmektedir. (Siegel ve ark 2014)

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar Türkiye’de mesane kanserlerinin dünya ortalamasının üstünde olduğunu düşündürmektedir. Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda prostat, akciğer ve kolon kanserleri ilk üç sırada yer alırken Türkiye’de Sağlık Bakanlığı’nın 2015 yılındaki verilerine göre sırasıyla akciğer, prostat ve 3. olarak da mesane kanseri en yüksek insidans oranlarına sahiptir. (Aydin ve ark 2015)

Ürotelyal karsinom için tanı anındaki medyan yaş yaklaşık 70 olarak bildirilmiştir. Yaş, ürotelyal karsinom gelişimi için güçlü ve bağımsız bir risk faktörüdür. Çeşitli demografik çalışmalar, 65 yaş ve üstündeki yaşlarda olan bireylerin 65 yaş altındaki bireylere göre ürotelyal kanser oranını 10 kat arttırdığını ve yine bu hastaların 15 kat daha fazla ölüm oranına sahip olduğunu göstermiştir. (Messing 2008) Çalışmamıza dahil olan olgular 48-88 yaş arasında olup yaş ortalaması $66.12 \pm 8,77$ olarak hesaplandı. Bu sonuç literatür ile kısmen uyumlu bulundu.

Ürotelyal karsinom erkeklerde kadınlara oranla 3-4 kat daha fazla görülmektedir. (Ferlay ve ark 2015) Son yıllarda kadınlarda sigara kullanımı ve kimyasallara maruziyetin yaygın olması nedeniyle ürotelyal karsinom hastalarında kadın oranının arttığı ancak buna rağmen erkek hakimiyeti devam ettiği bildirilmiştir. (Shariat ve ark 2010) Çalışmamızdaki 90 vakamızın 8 tanesi kadın (%8,9), 82 tanesi erkek (%91,1) olup erkek/kadın oranı yaklaşık olarak 8/1 bulunmuştur. Çalışmamızda erkek/kadın oranı literatür ile uyumsuz gibi görünse de Türk ve arkadaşlarının (2017) Türkiye’de 2011-2017 yılları arasında ürotelyal karsinom tanılı 589 olgunun ilk defa yapılan TUR-M materyallerinin dahil edildiği çalışmalarında erkek sayısı 497 (%87,3) ve kadın sayısı 72 (%12,7) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada da erkek/kadın oranı yaklaşık 7 olarak bulunmuştur. Mesane kanseri insidansı ve mortalitesi coğrafi farklılıklar gösterebilmesi, Türk ve arkadaşlarının çalışması ve bizim çalışmamızda benzer sonuç elde edilmesi Türkiye’de ürotelyal karsinomlarda erkek hakimiyetinin literatürden daha fazla olabileceğini akla getirmiştir. Ancak Türkiye’de görülen mesane ürotelyal karsinomlarında erkek/kadın oranının yaklaşık değerinin belirlenmesi ve literatür ile karşılaştırılması için daha geniş vaka serileriyle yapılacak yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Mesane karsinomunda prognoz birçok parametre ile ilişkili olup en önemli prognostik faktör evre olarak bildirilmiştir. (Jewet ve ark 1964) Yapılan çalışmalarda mesane kanserlerinde muskularis propriaya invazyon kısa sağkalım ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur. (Cheng ve ark 2000) Histolojik grade ile ilgili olarak yüksek dereceli ürotelyal karsinomların kasa invaze olma riskinin yüksek olduğu bildirilmiş olup yüksek histolojik grade'in evreyi etkileyerek düşük dereceli ürotelyal karsinoma göre daha kötü prognoz gösterdiği belirtilmiştir. (Rosai 2004) Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer bir prognostik faktör olan lenf nodu metastazının varlığının, boyutunun büyük olmasının ve ekstrakapsüler tutulum göstermesinin daha kötü prognozla ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. (Fleischmann ve ark 2005, Stephenson ve ark 2010)

Ferlay ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada kansere bağlı ölümlerin 13. en sık sebebi olarak mesane kanserini bildirdiler. 2016 yılında Amerika'da yapılan bir çalışmada 76,960 hasta yeni mesane kanseri tanısı alırken, 16,390 hastada mesane kanserine bağlı ölüm bildirildi. (Siegel ve ark 2016)

Kanser tedavisinde yeni araştırmalar ışığında kemoterapi yanında artık immunoterapi ajanları da kullanılmaktadır. Normal koşullar altında immun kontrol noktaları; immun sistem enfeksiyon veya malignitelere karşı tepki verirken dokuları bu işlemde kaynaklanabilecek zarardan korumakla yükümlüdür. (Pardoll 2012, Chen ve Flies 2013) Tümörü infiltre eden immün hücreler, çoklu ko-inhibitör reseptörleri eksprese ederler ve bu sayede tümöre karşı immunitenin geliştirilmesini engellerler. T hücreleri tarafından aşırı eksprese edilen inhibitör reseptörlerin ikili veya üçlü bloke edilmesi, antitümör immün yanıtını arttıracaktır varsayılmaktadır. Bu terapötik yaklaşımın mesane kanserinde umut verici olduğu ve hastanın hayatta kalma süresini uzatabileceği yönünde çalışmalar literatürde mevcuttur. (Oguro ve ark 2015, Chevalier ve ark 2017)

Kanser hücrelerinin immün sistemden kaçış yollarının tanımlanması ve bu yolların blokaj ajanlarının geliştirilmesi ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. B7-H3, TIM-3 ve BTLA kanser immün kontrol noktalarından biri olan T hücre ilişkili inhibitör molekülleri grubunda yer almaktadır. İmmün kontrol noktası tedavileri kapsamında B7-H3, TIM-3 ve BTLA ile ilgili ilaç geliştirme çalışmaları klinik fazI/fazII araştırmaları olarak devam etmektedir.

BTLA'nın CD4 + ve CD8 + T hücrelerinde, B lenfositlerinde, dendritik hücrelerde, NK hücrelerinde ve ayrıca endotel hücrelerinde bulunduğu bildirilmiştir. (McGrath ve Najafian 2012) Ancak tümör hücrelerinde BTLA ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışma vardır.

Feng ve arkadaşları 2015 yılında 123 gastrik karsinom olgusunda tümör hücrelerinde immunhistokimyasal yöntemle BTLA ekspresyonunu araştırdı. İmmunhistokimyasal BTLA boyanmasını bizim çalışmamızda kullandığımız şekilde IRS<4 düşük ekspresyon; IRS≥4 yüksek ekspresyon kabul ederek olgularını değerlendirdiler. 123 olgunun 93 tanesinde (%75,6) BTLA ekspresyonu ve 39 tanesinde (%31,7) yüksek ekspresyon tespit ettiler. Çalışmada BTLA ekspresyonu ile histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu prognostik faktörleri arasında anlamlı ilişki tespit edilememiş olsa da yüksek BTLA ekspresyonunun kısa süreli sağkalım ve relaps ile ilişkili olduğu bulundu. Bu çalışmada mide kanserlerinde yüksek BTLA ekspresyonu kötü prognoz açısından bağımsız biyobelirteç olarak tanımlanabileceği bildirildi. Lan ve arkadaşları 2017 yılında 136 gastrik karsinomlu olguda immunhistokimyasal yöntemle BTLA ve HVEM ekspresyonları ile prognostik faktörlerin ilişkilerini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada aynı IRS puanlama sistemini kullandı. Olguların %74,3'ünde BTLA; %89'unda HVEM ekspresyonu tespit etti. Çalışmalarında yüksek BTLA ekspresyonu ile lenf nodu metastazı; yüksek HVEM ekspresyonu ile invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olduğu gösterildi.

Trougouboff ve Shefer 2013 yılında 253 B hücreli non hodgkin lenfoma tanılı (kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma, mantle hücreli lenfoma, foliküler lenfoma Marjinal zon lenfomada, diffüz büyük B hücreli lenfoma, Burkitt lenfoma) seride immunhistokimyasal BTLA ekspresyonunu değerlendirdi. BTLA, kronik lenfositik lösemi / küçük lenfositik lenfomada oldukça belirgin eksprese edildiğine ve olgun B hücreli lenfoma ayırıcı tanısında ek bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesine işaret etti.

Fu ve arkadaşları 592 meme kanseri olgusunda saptadıkları BTLA gen polimorfizmlerinin Çinli kadınlarda sporadik meme kanseri riskini ve prognozunu etkileyebileceğini öne sürdü. (Fu ve ark 2010)

Literatürde mesanenin ürotelyal karsinomlarında BTLA'nın rolünü araştıran tek çalışma mevcut olup bu çalışmada da BTLA ekspresyonuna tümör hücrelerinde değil tümörü infiltre eden dendritik hücrelerde bakılmıştır. Chevalier ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 40 adet ürotelyal karsinomlu hastadan ve 15 adet sağlıklı gönüllüden aldıkları kan numunelerinde flow sitometri yöntemi ile CD1c + dendritik hücreler, CD141 + dendritik hücreler ve plazmasitoid dendritik hücrelerde inhibitör reseptörlerden PD-1, CTLA-4, BTLA, TIM-3 ve CD160 varlığını araştırdı. Farklı dendritik hücre alt kümelerinde BTLA ve TIM-3 ekspresyonu saptanırken diğer inhibitör reseptörlerde

anlamli istatitksel veri kabul edilebilecek ekspresyon tespit edilmedi. Daha da önemlisi BTLA ve TIM-3'ün, lokal olarak mesane tümörüne infiltre dendritik hücrelerde, aynı zamanda eşleştirilmiş nontumoral dokudaki dendritik hücrelere kıyasla aşırı eksprese olduğu saptandı. Chevalier ve arkadaşları bu çalışmalarında ürotelyal karsinomun, dendritik hücrelerde BTLA ve TIM-3'ün lokal ve sistemik aşırı ekspresyonunu indüklediğini gösterdiler ve bu reseptörlerin ürotelyal karsinom tedavisi için potansiyel hedefler olabileceğini bildirdiler.

Çalışmamız literatürde şu ana kadar mesanenin ürotelyal karsinomlarında tümör hücrelerinde BTLA ekspresyonunu araştıran ilk araştırmadır. Çalışmamıza dahil olan 90 adet ürotelyal karsinom olgusunun 60 tanesinde (%67,4) BTLA ekspresyonu tespit edilirken 13 adet normal mesane dokusunun hiçbirinde BTLA ekspresyonu görülmedi. Olguların 11 tanesinde (%12,2) yüksek ekspresyon mevcuttu. BTLA ekspresyonunun; yaş, cinsiyet, histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı ile arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Ancak 11 adet yüksek ekspresyon gösteren olgunun tamamının yüksek dereceli ürotelyal karsinom vakası olması dikkat çekici bulundu. Literatür ile karşılaştırmamız da mesanenin ürotelyal karsinomlarında tümör hücrelerinde BTLA ekspresyonunun gösterilmesi açısından literatüre katkı sağladığımızı düşünüyoruz.

T hücre tükenmesinde önemli bir rolü olan TIM-3'ün immun hücreleri modüle ederek antitümör immünitesini baskıladığı bilinmektedir. Bunun yanısıra melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, osteosarkom, malign plevral mezotelyoma, berrak hücreli tipinde renal hücreli karsinom, servikal karsinom, mesanenin ürotelyal karsinomu, hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde tümör hücrelerinde TIM-3 ekspresyonu saptanmıştır. (Wiener ve ark 2007, Zhuang ve ark 2012, Cao ve ark 2013, Shang ve ark 2013, Komohara ve ark 2015, Yang ve ark 2015, Marcq ve ark 2017, Liu ve ark 2018) Bununla birlikte tümör hücrelerinde TIM-3'ün ekspresyonuna odaklanan az sayıda çalışma vardır.

Literatürde şu ana kadar mesanenin ürotelyal karsinomlarında TIM-3 ekspresyonunu immunhistokimyasal yöntem ile araştıran tek çalışma mevcuttur. Yang ve arkadaşları (2015) mesanenin ürotelyal karsinomlu 100 olgusunda immunhistokimyasal TIM-3 ekspresyonunun prognostik faktörler ve sağkalım ile ilişkisini araştırdı. İmmunhistokimyasal TIM-3 boyanmasını H-skor yöntemi ile değerlendirerek H-skor<100 olan olguları düşük ekspresyon, H-skor ≥100 olan olguları yüksek ekspresyon olarak sınıflandırdı. 100 adet ürotelyal karsinom tanılı olgunun 96 tanesinde (%96) TIM-3 ekspresyonu, 50 tanesinde (%50) yüksek TIM-3 ekspresyonu tespit etti. Kontrol grubu

olarak kullanılan 20 adet normal mesane dokusunun sadece 3 tanesinde düşük ekspresyon olduğu ancak ürotelyal karsinomlu olgularda normal mesane mukozasına göre anlamlı derecede TİM-3 ekspresyonu görüldüğünü bildirdi. Biz çalışmamızda IRS puanlama sistemini kullanarak 90 mesane ürotelyal karsinomlu olgunun 40'ında (%44,4) pozitif ekspresyon tespit ettik. 13 adet normal mesane epitelinde hiç TİM-3 ekspresyonu saptamadık. Yang ve arkadaşları çalışmalarında TİM-3 ekspresyonunun yüksek histolojik grade, ileri Tivre (Ta+T1 / T2+T3+T4 karşılaştırmasında) ve daha kısa genel sağkalım ile korele olduğunu saptayıp TİM-3 ekspresyonunun, mesane ürotelyal karsinomlu hastalarda prognozunu öngörmede bağımsız bir faktör olduğunu öne sürdü. Lenf nodu metastazı ise çalışmalarında değerlendirilen parametrelerden biri değildi. Biz çalışmamızda prognostik faktörlerden histolojik grade ve lenf nodu metastazı varlığı ile TİM-3 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulamadık. (Sırasıyla p=0,059 p=0,062) Ancak biz de en önemli prognostik faktör olan invazyon derinliğinin arttıkça TİM-3 ekspresyonunun arttığını tespit ettik. (p=0,001) Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile bizim çalışmamızın vaka sayıları birbirine yakın olmasına rağmen onların çalışmasında TİM-3 ekspresyonu ile histolojik grade arasında anlamlı korelasyon saptanırken bizim çalışmamızda saptanmadı. Aynı zamanda onlar vakalarının %96'sında pozitif TİM-3 ekspresyonu tespit edilirken biz %44,4'ünde tespit ettik. İki çalışma arasındaki bu farklılığın immunhistokimyasal TİM-3 boyamasının değerlendirilmesinde farklı yöntemler kullanılmasına bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca olgularımızda TİM-3 ekspresyonu gösterenlerin %95'i yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı olup, yüksek histolojik derece ve lenf nodu tutulumu ile TİM-3 ekspresyonu arasında istatistiksel ilişki değerlendirildiğinde p değerleri sırasıyla 0,059 ve 0,062 ile sınırdaki yüksek saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu söylenemese de histolojik grade arttıkça TİM-3 ekspresyonunun daha fazla görülebileceği ve lenf noduna metastaz yapan tümörlerde TİM-3 ekspresyonunun daha fazla görülebileceği dikkati çekti. Ancak yüksek histolojik grade, lenf nodu metastazı varlığı ile yüksek TİM-3 ekspresyonunun korelasyonu daha kesin söyleyebilmek için daha geniş vaka serilerinde yeni çalışmalara vardır.

Literatürde mesane kanserinde immunhistokimyasal TİM-3 ekspresyonunu değerlendiren başka çalışma olmasa da genitoüriner sistem tümörlerinden berrak hücreli tipte renal hücreli karsinom ve metastatik prostat kanserlerinde TİM-3 ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Komohara ve arkadaşları (2015) 91 adet berrak hücreli tipte renal hücreli karsinomlu olgunun 63'ünde TİM-3 pozitif ekspresyon tespit etti. Normal böbrek

tübüllerinde de TİM-3 ile pozitif ekspresyon görüldüğü ayrıca belirtilen çalışmada TİM-3-pozitif kanser hücrelerini, daha yüksek klinik T evreye sahip olgularda ve nükleer derecesi yüksek olgularda olduğu bildirildi. TİM-3 ekspresyonunun daha kısa hastaliksız sağkalım ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu, ancak genel sağkalım ile anlamlı ilişki olmadığını tespit etti. Wu ve arkadaşları (2017) ise 139 metastatik prostat kanserli olguda TİM-3 ekspresyonu ile prognostik faktörler ve genel sağkalım ilişkisini araştırdı. 139 olgunun 35'inde pozitif ekspresyon tespit etti. TİM-3 ekspresyonu ile Gleason skor, Nevre ile TİM-3 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki tespit edilemezken Tvre ile anlamlı korelasyon saptadı.

Bu bilgiler ışığında literatürde tümör hücrelerinde yüksek TİM-3 ekspresyonunun bazı kötü prognostik faktörler ve daha kısa sağkalım ile korele olduğunu tespit eden çalışmalar olduğunu söylemek mümkündür. Ancak immunhistokimyasal TİM-3 boyamasının değerlendirilmesinde standart bir yöntem henüz yoktur.

. İmmunhistokimyasal TİM-3 boyamasının değerlendirilmesinde Yang ve arkadaşları (2015) H-skor yöntemini kullanırken Komohara ve arkadaşları (2015) TIM-3'ün boyama yoğunluğuna göre olguları üç gruba (skor 0, negatif veya zayıf; skor 1, orta; skor 2, güçlü) ayırarak değerlendirmişlerdi. Wu ve arkadaşları (2017) immunhistokimyasal TİM-3 boyamasını değerlendirirken IRS puanlama sistemini kullanmış olup; boyama yoğunluğu 0'dan 2'ye (0, boyama yok; 1, zayıf boyama; 2 güçlü boyama), boyanma yaygınlığı, immünoreaktif tümör hücrelerinin yüzdesine bağlı olarak 0'dan 4'e (% 0: 0, % 1-5: 1, % 6-25: 2, % 26-75: 3, % 76-100: 4) kadar derecelendirdi. Boyama yoğunluğu skoru ile boyama yoğunluğu skoru çarpılarak sonuçta her örnek için negatif (0-4) boyama veya pozitif (6-8) boyama elde etti. Biz çalışmamızda Peng ve arkadaşlarının (2017) pankreas kanserlerinde TİM-3 ekspresyonunu araştırmak için kullandıkları IRS puanlama sistemini kullandık. Boyama yoğunluğunu 0'dan 3'e (0, boyama yok; 1, zayıf boyama; 2 orta boyama; 3, güçlü boyama), boyanma yaygınlığı, immünoreaktif tümör hücrelerinin yüzdesine bağlı olarak 0'dan 3'e (%0: 0, <%25: 1, %25-50: 2, >%50: 3) kadar derecelendirdik. Boyama yoğunluğu skoru ile boyama yoğunluğu skoru çarpılarak sonuçta her örnek için negatif (0-9) arası IRS puanı elde ettik. IRS puanı <3 olanları negatif boyama ≥ 3 olanları pozitif boyama kabul ettik. İmmunhistokimyasal TİM-3 değerlendirme yöntemlerindeki bu farklılıkların istatistik verileri etkilediğini düşünüyoruz. Bu nedenle TİM-3 boyamasının değerlendirmesinde standardizasyon geliştirebilmek adına geniş vaka serilerinde hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım verilerinin de değerlendirmeye alındığı çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda mesane ürotelyal karsinomlarında ekspresyonunu araştırdığımız bir diğer immün kontrol noktası inhibitör molekülü olan B7-H3'ün son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda çeşitli kanser hücrelerinde ve dokularında yüksek ekspresyon gösterdiği bulunmuştur. Bu da B7-H3'ün antitümör immünitesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. (Li ve ark 2018) Meme kanseri hastalarında, yüksek B7-H3 ekspresyonunun tümör boyutu ile negatif bir ilişki olduğu bulundu (Bachawal ve ark 2015). Sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında, over tümörlerinin %93'ünün B7-H3 eksprese ettiği ve B7-H3 tümör ekspresyonunun ileri evre, yüksek nüks riski ve kısa sağkalım ile ilişkili olduğu gösterildi. (Fauci ve ark 2012). Kolorektal karsinomlarda B7-H3 ekspresyonunun yüksek olduğu ve kolorektal karsinom gelişiminde rol oynayabileceği bildirildi. (Sun ve ark 2010). Ayrıca B7-H3 proteininin; prostat kanseri, pankreas kanseri, skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve gastrik karsinomlarda aşırı eksprese olduğu bulundu. (Xu ve ark 2010, Zhao ve ark 2013, Zhang ve ark 2015, Benzon ve ark 2017, Li ve ark 2017)

Bununla birlikte çalışmalar B7-H3'ün tümör baskılayıcı etkisini de göstermiştir. Sun ve arkadaşları (2003) hayvan deneyi çalışmalarında fare B7-H3 / pcDNA3.1 ekspresyon plazmidi oluşturup ve intratumoral olarak EL-4 lenfomalara enjekte ettiler. Tümör büyümesinde yavaşlama tespit ettiler. Bir başka hayvan deneyi çalışmasında murin prostat tümör modelinde, B7-H3'ten yoksun olan tümörlerin kontrol grubundaki tümörlerden daha büyük boyutta oldukları gösterildi. (Kreymborg ve ark 2015) Başka bir klinik çalışmada ise pankreas kanseri hasta verileri, hastaların %88'inin B7-H3 eksprese ettiğini ve yüksek B7-H3 ekspresyonu olan hastaların postoperatif sağkalımı daha iyi olduğunu ortaya koydu. (Loos ve ark 2009)

Genel olarak literatüre bakıldığında B7-H3 için ko-stimülatör, ko-inhibitör, pro-tümör veya antitümör molekülü olarak görev yapabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. TLT2, B7-H3'ün tanımlanan tek potansiyel reseptörü olup, literatürde B7-H3'ün farklı fonksiyonlarının gösterilmiş olması farklı işlevlere aracılık eden başka keşfedilmemiş reseptörleri olabileceğini akla getirmektedir. Tümör biyolojisinde B7-H3'ün birbiriyle çelişen rolleri için daha fazla araştırma yapılmasını gerektiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. (Li ve ark 2018)

Mesane ürotelyal karsinomlarında B7-H3 ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Xylinas ve arkadaşları (2014) 302 mesane ürotelyal karsinom tanılı sistektomi materyali ve 50 adet tümöre komşu normal mesane dokusunu dahil ederek yaptıkları çalışmada B7-H1, B7-H3 ve PD-1 ekspresyonunun prognostik faktörler ve

sağkalım ile ilişkisini araştırdılar. Çalışmalarında immunhistokimyasal B7-H3 boyanmasını <%10 ise negatif %10 ve üstü boyanmaları pozitif kabul ederek değerlendirdiler. B7-H3'ün, 302 ürotelyal karsinomlu olgunun 177'sinde (%58,6) eksprese edildiğini; 50 normal ürotelyal epitelin 17'sinde (%34) ekprese edildiğini ve tümörlü dokularda istatistiksel anlamlı fark gösterecek şekilde normal ürotelyal epitelden daha yüksek ekspresyon oranına sahip olduğunu gösterdiler. Ayrıca B7-H3 ekspresyonu ile patolojik Tvre, histolojik derece, lenf nodu metastazı varlığı, eşlik eden karsinoma insitu varlığı veya pozitif yumuşak doku cerrahi sınırlarının varlığı arasında anlamlı ilişki tespit edemediler. Çalışmalarında B7-H3 ekspresyonunu ile genel sağkalım, rekürrens ile ilişkili bulmadıklarını bildirdiler. Boorjian ve arkadaşları (2008) 222 vaka serilik çalışmalarında aynı yöntemle B7-H3 boyanmasını değerlendirmiş ve prognostik faktörlerle anlamlı ilişki tespit edememişlerdi.

Xu ve arkadaşları (2018) kasa invaze ürotelyal karsinom nedeniyle sistektomi yapılmış 115 vakalık serinin tümör dokularında B7-H3 ekspresyon seviyeleri ve klinopatolojik özellikler, sağkalım ile ilişkisini analizi etti. Çalışmada immunhistokimyasal yöntem, western blot yöntemleri kullanıldı. İmmunhistokimyasal değerlendirme IRS puanlama sistemine göre değerlendirilmiş olup boyama yoğunluğu 1'den 3'e (1: boyama yok/zayıf boyama; 2: orta boyanma, 3: güçlü boyanma), boyanma yaygınlığı, immünoaktif tümör hücrelerinin yüzdesine bağlı olarak 1'den 3'e (<%33: 1, %33-66: 2, ≥%66: 3) kadar derecelendirildi. Boyama yoğunluğu skoru ile boyama yoğunluğu skoru çarpılarak sonuçta her örnek için düşük ekspresyon (≤ 3) veya yüksek ekspresyon (> 3) boyama elde edildi. B7 - H3 ekspresyon seviyesinin sadece uzak metastaz ($p=0.014$) ve vasküler invazyon ($p=0.031$) ile anlamlı olarak ilişkisinin olduğunu, buna karşın histolojik derece, tümör evresi, nüks ve lenfatik metastaz ile ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ortaya koydu.

Biz çalışmamızda 90 mesane ürotelyal karsinomlu olgu ve 13 adet normal görünümlü mesane dokusuna immunhistokimyasal B7-H3 boyanmasını daha önce yapılan çalışmalar gözönüne alarak H-skor yöntemi ile değerlendirdik. (Soo ve ark 2017, Chen ve ark 2017) Tüm vakalarımızın H-skor ortalama değeri 165 iken normal mesane dokusunda ortalama H-skor 51 idi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Mesane ürotelyal karsinom hücrelerinde normal ürotelyuma göre B7-H3 ekspresyonunun arttığını tespit ettik. Prognostik faktörlerden yüksek histolojik grade ve ileri Tvre ile B7-H3 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptanırken lenf nodu metastazı yapan olgularla metastaz yapmayan olgular arasında B7-H3 ekspresyonu açısından anlamlı fark bulamadık. Daha

önce mesane ürotelyal karsinomunda B7-H3 ekspresyonu gösterilmiş olup çalışmamız bu veriyi destekler nitelikteydi. Literatürdeki diğer çalışmalarda B7-H3 ekspresyonu ile histolojik derece ve invazyon derinliği arasında anlamlı ilişki bulunmazken bizim çalışmamızda yüksek histolojik dereceli ve/veya ileri patolojik T evreye sahip olgularda B7H3 ekspresyonunun daha fazla olduğunu gösterdik. Loos ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları derlemede immunhistokimyasal B7-H3 boyanmasının değerlendirilmesinde bir standardizasyon olmadığını ve belki bu nedenle farklı çalışmalarda farklı tümör gruplarında B7-H3 ekspresyon varlığının tanımı ve değerlendirmesinin farklı sonuçlandığını belirttiler. Daha önce mesane ürotelyal karsinomlu olgularda B7-H3 ekspresyonunu prognostik faktörlerle ilişkisini değerlendiren çalışmalarda histolojik grade ve invazyon derinliği ile ilişki tespit edilememesinin immunhistokimyasal boyanmayı farklı yöntemlerle değerlendirmemize bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Bu nedenle B7-H3 boyanmasının değerlendirmesinde de aynı TİM-3 immunhistokimyasal boyanmasında olduğu gibi standardizasyon geliştirebilmek adına geniş vaka serilerinde hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım verilerinin de değerlendirmeye alındığı çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Xylinas ve arkadaşları (2014) 302 mesane ürotelyal karsinomlu olguda 117 metastatik lenf nodu ile primer tümör arasında B7-H1, PDL-1 ve B7-H3 ekspresyonlarının yüksek oranda uyumlu olduğunu bulmuşlardı. Bizim çalışmamızda 90 vakanın 17'sinde lenf nodu metastazı mevcuttu. Bu 17 olgunun primer tümör dokusunda ve metastatik lenf nodu dokusunda BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonlarını immunhistokimyasal yöntemle değerlendirdik. Her 3 belirteç için de istatikselsel olarak metastatik lenf nodlarında primer tümör dokusuna göre artmış ekspresyon saptamadık.

Tümör mikroçevresi ve tümör immünitesi klinik ve prelinik araştırmaların devam ettiği güncel bir konudur. Tümör mikroçevresinin düzenlenmesinde ve antitümör immünitesinin oluşmasında immun kontrol noktalarının başlıca rol aldığı bilinmektedir. Çeşitli tümörlerde immün kontrol noktalarından biri olan T hücre ilişkili inhibitör molekülleri araştırılmakta ve bu inhibitör reseptörler üzerinden immunoterapiye yönelik prelinik çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Literatürde mesanenin ürotelyal karsinomlarında T hücre ilişkili inhibitör moleküllerden BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda bu belirteçlerin ekspresyonları, prognostik faktörlerden histolojik grade, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı ile ilişkilerini araştırmayı ve sonuçlarımızla literatüre yeni bir katkı sunmayı hedefledik.

Çalışmamızın zayıf yönleri; olgu sayımızın sınırlı oluşu, prognostik faktörlerden bazılarının araştırılması, genel sağkalım ve hastalısız sağkalım verilerimizin olmayışı nedeniyle çalışmada değerlendirilememsi, histopatolojik değerlendirmelerin tek gözlemci tarafından yapılması, immunhistokimyasal değerlendirme yöntemlerinde standardizasyon olmayışıdır. Geniş serilerle, klinik verilerle ve birden çok gözlemci ile yapılacak araştırmalar, bu konuda literatüre daha çok katkıda bulunacaktır.



6. SONUÇLAR

- Olguların cinsiyetlere göre dağılımında 90 adet hastanın 82 (%91,1) adeti erkek iken 8 (%8,9) adeti kadındı.
- Ortalama tanı yaşı $66.12 \pm 8,77$ olarak tespit edildi. Yaş aralığı 48-88 idi.
- Çalışmamızda normal mesane dokularının (13 adet) hiçbirinde BTLA ekspresyonu saptanmazken, 90 adet ürotelyal karsinomlu olgunun 11 tanesinde (%12,2'si) yüksek BTLA ekspresyonu saptandı. Bu veriyle literatürde mesane ürotelyal karsinomlarında tümör hücrelerinde immunhistokimyasal BTLA ekspresyonu ilk defa gösterilmiş oldu.
- Normal mesane dokularının (13 adet) hiçbirinde TİM-3 ekspresyonu saptanmazken, 90 adet ürotelyal karsinomlu olgunun 40 tanesinde (%44,4'ü) TİM-3 ekspresyonu saptandı.
- Mesane ürotelyal karsinom tanılı olgularımızda (90 adet) normal mesane dokularına (13 adet) kıyasla immunhisokimyasal B7-H3 ekspresyonu daha fazla tespit edildi. ($p < 0.001$)
- Çalışmamızda düşük dereceli ürotelyal karsinom tanılı olgu sayısı 12 (%13,3) yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı olgu sayısı 78 (%86,7) idi.
- Histolojik grade ile BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonlarının ilişkisi değerlendirildi. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom ile düşük dereceli ürotelyal karsinom olgularında BTLA ve TİM-3 ekspresyonlarında anlamlı oransal fark tespit edilmedi. (Sırasıyla $p=0.348$ ve $p=0.059$) B7-H3 ekspresyonu yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgularında düşük dereceli ürotelyal karsinom olgularına göre istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek saptandı. ($p=0.043$) Ayrıca histolojik grade ile TİM-3 ekspresyonunun istatistiki analizinde p değerinin 0.05'in hafif üstünde olması dikkati çekti. TİM-3 ekspresyonu ve histolojik grade ilişkisinin daha geniş vaka serileriyle yeni çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği düşünüldü.
- BTLA, TİM-3 B7-H3 ekspresyonları ile invazyon derinliği ilişkisi hem Ta/T1/T2/T3/T4 olarak hem de yüzeysel tümörler (Ta+T1) / kasa invaze tümörler (T2+T3+T4) olarak araştırıldı, her iki durumda da benzer sonuçlar elde edildi. İmmunhistokimyasal BTLA ekspresyonu ile invazyon derinliği arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. ($p=0.075$, $p=0.748$) İnvazyon derinliği arttıkça TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonunun tespiti oransal olarak anlamlı derecede fazlaydı. Kasa

invaze ürotelyal karsinomlarda yüzeyel ürotelyal karsinoma oranla daha fazla TİM-3 ve/veya B7-H3 ekspresyonu tespit edildi. (p değerleri TİM-3 için sırayla $p=0.001$, $p=0.001$; B7-H3 için sırayla $p=0.039$, $p=0.035$)

- Lenf nodu metastazı varlığı ile immunhistokimyasal BTLA, TİM-3, B7-H3 ekspresyonlarının ilişkisi değerlendirildi. Lenf noduna metastaz yapan olgularda lenf nodu metastazı olmayan olgulara kıyasla BTLA, TİM-3 ve B7-H3 ekspresyonlarında anlamlı oransal fark tespit edilmedi. (Sırasıyla $p=0.429$, $p=0.062$, $p=0.812$) Ancak lenf nodu metastazı varlığı ile TİM-3 ekspresyonunun istatistiki analizinde p değerinin 0.05'in hafif üstünde olması göreceli olarak anlamlı ilişki saptanabileceğini akla getirmiş olup daha geniş vaka serileriyle yeni çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği düşünüldü.
- Lenf nodu metastazı olan olgularda metastatik dokular ile primer tümör dokularında immunhistokimyasal BTLA, TİM-3, B7-H3 ekspresyonlarında farklılık olup olmadığı araştırıldı, ancak anlamlı fark tespit edilmedi. (Sırasıyla $p=1.0$, $p=\text{anlamlı değil}$, $p=0.13$)

7. KAYNAKÇA

REFERANSLAR

- Abbas AK. The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmunity Reviews*. 2003;2:3:115–118.
- Abern MR, Dude AM, Tsivian M, Coogan CL. The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer. *Urol Oncol*. 2013;31(8):1628-34.
- Amin MB, Edge SB, Greene FL, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK et al. eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Ed. New York: Springer; 2017.
- Amin MB, McKenney JK, Paner GP, Hansel DE, Grignon DJ, Montironi R et. al. International Consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. *ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Pathology Eur Urol* 2013;63:16-35.
- Amin MB, Murphy WM, Reuter VE, Ro JY, Ayala AG, Weiss MA. Controversies in the pathology of transitional cell carcinoma of urinary bladder. Part II. In: Rosen PP, Fechner RE, eds. *Review of pathology, vol. 2*, Chicago IL: ASCP Press, 1997:72-100.
- Amin MB, Ro JY, el-Sharkawy T, Lae KM, Troncso P, Silva EG, et al. Micropapillary variant of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Histologic pattern resembling ovarian papillary serous carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994, 18:1224-32.
- Amin MB, Trpkov K, Lopez-Beltran A, Grignon D, Members of the IiDUPG. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the bladder lesions: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):(20-34.)
- An Y, Li H, Wang KJ, Liu XH, Qiu MX, Liao Y et al. Meta-analysis of the relationship between slow acetylation of N-acetyl transferase 2 and the risk of bladder cancer. *Genet. Mol. Res.* 14. 2015:16896–16904
- Anafarta Kadir, Bedük Yaşar, Arıdan Nihat. *Temel Üroloji* 3, bölüm 1. Güneş Kitabevi. 2010: 7-14, 725-740, 680-682
- Angiari S and Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. *Trends Mol Med* 2014;20: 675-684.

- Angulo JC, Lopez JI, Grignon DJ, Sanchez-Chapado M. Muscularis mucosa differentiates two populations with different prognosis in stage T1 bladder cancer. *Urology* 1995 Jan;45(1):47-53.
- Aydin S, Boz MY. Rapid changes in the incidence of urinary system cancers in Turkey. *Turkish journal of urology*. 2015 Dec;41(4):215-20.
- Bachawal SV, Jensen KC et al Breast cancer detection by B7-H3-targeted ultrasound molecular imaging. *Cancer Res* 2015; 75(12):2501–2509.
- Başaklar AC. Skandalakis Cerrahi Anatomi-Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri II, Bölüm: 24, Palme Yayıncılık, Ankara 2008:1345-1377
- Baydar D, Amin MB, Epstein JI. Osteoclast-rich undifferentiated carcinomas of the urinary tract. *Mod Pathol*. 2006;19(2):161-71.). (88, 90)
- Benzon B, Zhao SG et al. Correlation of B7-H3 with androgen receptor, immune pathways and poor outcome in prostate cancer: an expression-based analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2017; 20(1):28–35.
- Black PC, Brown GA, Dinney CP. The impact of variant histology on the outcome of bladder cancer treated with curative intent. *Urol Oncol*. 2009; 27:3-7.
- Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res*. 2008; 1;14(15):4800-8.
- Bostwick GD, Cheng L. *Urologic Surgical Pathology 2 nd Ed. Chapter 6*. Mosby Elsevier, China 2008: 216-227, 274-275, 287-296
- Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:185–190.
- Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: PC Walsh et al. eds. *Campbell's Urology*. 9th Ed. 2007; 1:41-80.
- Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63:234-241.
- Burger M, Oosterlinck W, Konety B, Chang S, Gudjonsson S, Pruthi R et. al.; International Consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2013; 63:36-44.

- Cai C, Xu YF, Wu ZJ, Dong Q, Li MY, Olson JC et al. Tim-3 expression represents dysfunctional tumor infiltrating T cells in renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2016;34(4):561–567.
- Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 2008;9:176–185.
- Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 1991;6:2305-9.
- Cao Y, Zhou X, Huang X, Li Q, Gao L, Jiang L, Huang M, Zhou J. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PLoS One.* 2013;8(1):e53834.
- Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C, Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol* 2010;28: 401-8
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D et al., B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nature Immunology.* 2001;2:3:269–274.
- Chen DS, Mellman I. *Oncology Meets Immunology: the cancer immunity cycle.* 2013; 39(1):1-10
- Chen L, Chen J, Xu B, et al. B7-H3 expression associates with tumor invasion and patient's poor survival in human esophageal cancer. *Am J Transl Res.* 2015;7:2646–2660.
- Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and coinhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:227–42.
- Cheng L, Weaver AL, Leibovich BC, Ramnani DM, Neumann RM, Scherer BG, Nehra A, Zincke H, Bostwick DG. Predicting the survival of bladder carcinoma patients treated with radical cystectomy. *Cancer* 2000, 88:2326-32
- Chevalier MF, Bohner P, Pieraerts C, Lhermitte B, Gourmaud J, Nobile A, Rotman S, Cesson V, Martin V, Legris A-S, et al. Immunoregulation of dendritic cell subsets by inhibitory receptors in urothelial cancer. *Eur Urol.* 2017;71:854–857.
- Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol.* 2012;13(9):832–842.

- Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Zhang Z, Rosai J et al. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56:347-53.
- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fukset Z et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1251-6
- Coulie PG, Van den Eynde BJ, Van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:135–146.
- Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12:584–596.
- Dalbagni G, Genega E, Hashibe M, Zhang Z, Russo P, Herr H. et al. Cystectomy for bladder cancer; a contemporary series. *J Urol* 2001 Apr;165(4):1111-1116
- D'Souza WN, Lefrancois L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol*. 2003;171:5727-5735.
- Duhon T., Pasero C., Mallet F., Barbara, B., Olive D., and Costello RT. LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *Eur. J. Immunol*. 2004;34, 3534–3541.
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2004. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. pp. 90–157.
- Emil A, Tanagho MD, Jack W. McAninch, MD. *Smith & Tanagho's General Urology*. 2012.
- Epstein JI, Amin MB, Reuter VE. *Bladder biopsy interpretation*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2016.
- Ernst B, Anderson KS. Immunotherapy for the treatment of breast cancer. *Current oncology reports*. 2015; 17(2): 5
- Eser S, Zorlu F, Divrik RT et al. Incidence and epidemiological features of cancers of the genitourinary tract in İzmir between 1993-2002. *Asian Pac J Cancer. Prev.* 2009, 10(3): 491-6

- Fauci JM, Michael Straughn J Jr et al. A review of B7-H3 and B7-H4 immune molecules and their role in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 127(2):420–425.
- Feng XY, Wen XZ, Tan XJ, Hou JH, Ding Y, Wang KF et al. Ectopic expression of B and T lymphocyte attenuator in gastric cancer: a potential independent prognostic factor in patients with gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* 11(1), 658–664 (2015).
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136: E359-E386
- Fleischmann A, Thalmann GN, Markwalder R, Studer UE. Prognostic implications of extracapsular extension of pelvic lymph node metastases in urothelial carcinoma of the bladder. *Am J Surg Pathol* 2005, 29:89-95
- Fourcade J., Sun Z., Pagliano O., Guillaume P., Luescher I.F., Sander C., Kirkwood J.M., Olive D., Kuchroo V., Zarour H.M.: CD8+ T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.*, 2012; 72: 887-896.
- Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, Dekruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010;235(1):172–189.
- Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 2006;203:2223–2227.
- Fu Z, Li D, Jiang W, Wang L, Zhang J, et al. Association of BTLA gene polymorphisms with the risk of malignant breast cancer in Chinese women of Heilongjiang Province. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 120: 195–202.
- Furuse H, Ozono S. Transurethral resection of the bladder tumour (TURBT) for non-muscle invasive bladder cancer: Basic skills. *Int J Urol.* 2010;17:698-9.
- Gattuso P, Reddy VB, David O, Spitz DJ, Haber MH. Ureter, Urinary bladder and Kidney in *Differential Diagnosis in Surgical Pathology*. 2nd ed. Saunders, 2010.
- Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM. Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1236-1243.
- Gaya JM, Palou J, Algaba F, Arce J, Rodriguez-Faba O, Villavicencio H. The case for conservative management in the treatment of patients with non-muscle- invasive

- micropapillary bladder carcinoma without carcinoma insitu. *Can J Urol*. 2010; 17:5370-6.
- Gofrit ON, Pizov G, Shapiro A, Duvdevani M, Yutkin V, Landau EH et. al. Mixed high and low grade bladder tumours-are they clinically high or low grade? *J Urol*. 2014;191:1693-6.
 - Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH, The B7 family revisited, *Annual Review of Immunology*. 2005; 23:515–548.
 - Grignon DJ, Al-Ahmadie H, Algaba F, et al. Tumours of the urinary tract. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, et al. *World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2016:77-133.
 - Han P, Goularte OD, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol*. 2004;172:5931-5939.)
 - Hanahan D, Weinberg RA. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011;144(5): 646–74
 - Hansel DE, Amin MB, Comperat E, Cote RJ, Knüchel R, Montironi R et. al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol*. 2013; 63:321-32.
 - Hato T, Dagher PC. How the innate immune system senses trouble and causes trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*.2015; 10(8):1459-69)
 - He Y, Cao J Zhao C, Li X Zhou C, Hirsch, F. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *OncoTargets Ther*. 2018; 11: 7005–7009.
 - 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 Immunooncology 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. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235–251.
 - Herr HW, Donat SM, Reuter VE. Management of low grade papillary bladder tumors. *J Urol* 2007;178:1201-5; discussion 5
 - Herr HW. Uncertainty and outcome of invasive bladder tumors. *Urol Oncol* 2:92-97, 1996

- Herr HW. Does cystoscopy correlate with the histology of recurrent papillary tumours of the bladder? *BJU Int.* 2001;88:683-5.
- Horne SD, Pollick SA, Heng HHQ. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. *International Journal of Cancer.* 2015;136(9): 2012-21
- Hurchla MA, Sedy JR, Gavrieli M, Drake CG, Murphy TL, Murphy KM. B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4+ T cells. *J Immunol.* 2005;174:3377-3385.
- Javadpour N, Mostofi FK. Primary epithelial tumors of the bladder in the first two decades of life. *J Urol* 1969, 101: 706-10.
- Jewet HJ, King RL, Shelley WM, A study of 365 cases of infiltrating bladder cancer. Relation of certain pathological characteristics to prognosis after extirpation. *J Urol* 1964, 92: 668-78.
- Kern WH. The grade and pathologic stage of bladder cancer. *Cancer* 1984, 53:1185-9.
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L et al. Bladder cancer: Epidemiology, Staging and Grading and Diagnosis. *Urology* 2005; 66: 4-34
- Klesney-Tait J, Turnbull IR and Colonna M, The TREM receptor family and signal integration. *Nature Immunology*, 2006;7:12:1266–1273, 2006.
- Knez VM, Barrow W, Lucia MS, Wilson S, La Rosa FG. Clear cell urothelial carcinoma of the urinary bladder: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2014;8:275.
- Komohara Y, Morita T, Annan DA, Horlad H, Ohnishi K, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Suzu S, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Akashi K, Takeya M, Jinushi M. The coordinated actions of TIM-3 on cancer and myeloid cells in the regulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(9):999–1007.
- Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun.* 2016;7:10501.
- Kreymborg K, Haak S et al. Ablation of B7-H3 but Not B7-H4 Results in highly increased tumor burden in a murine model of spontaneous prostate cancer. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(8):849–854.

- Krieg C, Han P, Stone R, Goularte OD, Kaye J. Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2005; 175:6420-6427.
- Kwon, BS., Tan KB., Ni J., Oh KO., Lee ZH., Kim KK., et. al. A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 14272–14276.
- Lan X, Li S, Gao H, Nanding A, Quan L, Yang C et al. Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis. *Onco Targets Ther.* 2017;10:919–26.
- Lapham RL, Grignon D, Ro JY. Pathologic prognostic parameters in bladder urothelial biopsy, transurethral resection, and cystectomy specimens. *Semin Diagn Pathol* 1997, 14: 109-22.
- Leitner J, Klauser C, Pickl WF, Stöckl J, Majdic O, Bardet AF et al., B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: no evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *European Journal of Immunology.* 2009; 39:7:1754–1764.
- Leroy X, Gonzalez S, Zini L, Aubert S. Lipoid-cell variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(5):770-3.
- Li G, Quan Y, Che F, Wang L. B7-H3 in tumors: friend or foe for tumor immunity? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018; 81(2):245–253.
- Li Y, Yang X et al (2017) B7-H3 promotes gastric cancer cell migration and invasion. *Oncotarget.* 2017; 8(42): 71725–71735.
- Li Z, Ju Z, Frieri M. The T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity. *Allergy Asthma Proc.* 2013;34(1):21–26.
- Liebert M, Seigne J. Characteristics of invasive bladder cancers: histological and molecular markers. *Semin Urol Oncol* 1996;14:62-72.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumor infiltrating lymphocytes as an independent prognostic facton in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer* 1992, 29A: 69-75.
- Liu F, Liu Y, Chen Z. Tim-3 expression and its role in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2018; 11:126.

- Liu Y, Zeng B, Zhang Z, Zhang Y, Yang R, B7-H1 on myeloid-derived suppressor cells in immune suppression by a mouse model of ovarian cancer. *Clinical Immunology*, 2008;129:3:471–481.
- Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer *J Natl Cancer Inst.* 1992, 84:1256-61.
- Loo D, Alderson RF et al. Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2012; 18(14):3834–3845.
- Loos M, Hedderich DM et al. Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2009; 9:463.
- Loos M, Hedderich DM, Friess H, Kleeff J. B7-h3 and its role in antitumor immunity *Clin. Dev. Immunol.*, 2010 : 683875
- Lopez-Beltran A, Amin MB, Oliveira PS, Montironi R, Algaba F, McKenney JK, et al. Urothelial carcinoma of the bladder, lipid cell variant: clinicopathologic findings and LOH analysis. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):371-6
- Los M, Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Droge W, and Schulzeosthoff K. IL-2 gene expression and NF-kB activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J* 1995; 14: 3731–3740.
- Mai KT, Park PC, Yazdi HM, Saltel E, Erdogan S, Stinson WA, et al. Plasmacytoid urothelial carcinoma of the urinary bladder report of seven new cases. *Eur Urol.* 2006;50(5):1111-4
- Malissen N, Macagno N, Granjeaud S, Granier C, Moutardier V, Marqueste CG et al. HVEM: a novel cosignaling molecule of major interest in melanoma. *J Clin Oncol* 2017; 35: e14591-e14591.
- Malkowicz SB. Management of superficial bladder cancer. In PC Walsh, AB Retik, E Darracott Vaughan, AJ Wein eds, *Campbell’s Urology*, Eighth Edition. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2002: 2789– 92
- Marcq E, Siozopoulou V, De Waele J, van Audenaerde J, Zwaenepoel K, Santermans E, Hens N, Pauwels P, van Meerbeeck JP, Smits EL. Prognostic and predictive aspects of the tumor immune microenvironment and immune checkpoints in malignant pleural mesothelioma. *Oncoimmunology.* 2017;6(1):e1261241.

- Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol.* 2018;11:39.
- Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI. LIGHT, a new member of the TNF superfamily and lymphotoxin are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity.* 1998;8:21-30.
- May M, Brookman-Amisshah S, Roigas J, Hartmann A, Störkel S, Kristiansen G et. al. Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. *Eur Urol.* 2010; 57:850-8.
- McGrath, M. M., and N. Najafian. The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. *Front. Immunol.* 2012; 3: 47.
- McKenney JK, Amin MB. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of urinary bladder neoplasms. *Semin Diagn Pathol.* 2005;22(1):69-87.
- Messing EM. Etiology and Risk Factors. In PC Walsh et al. eds. *Campbell's Urology.* 9th Ed. 2007
- Messing EM. Urothelial tumors of the bladder. *Campbell-Walsh Urology.* In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Ninth Edition. Saunders-Elsevier; Philadelphia: 2008. pp. 2407–46. Chapter 75.
- Mills SE. *Histology for pathologists, 3 nd Ed, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2007, p.910-921.*
- Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. *World Health Organization Classification of Tumours-Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 4th ed. IARC: Lyon 2016.*
- Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO Classification of Bladder Tumors: A Summary and Commentary. *International Journal of Surgical Pathology* 2005; 13(2): 143-153
- Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy. 3rd ed. Williams & Wilkins, 1992*
- 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.
- Murphy WM, Chandler RW, Trafford RM. Flow cytometry of deparaffinized nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinoma. *J Urol.* 1986, 135: 694-7.

- National Bladder Cancer Collaborative Group A (NBCCGA). Development of a strategy for a longitudinal study of patients with bladder cancer. *Cancer Res* 1977, 37: 2898-906.
- Nesi G, Nobili S, Cai T, Caini S, Santi R. Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch*. 2015;467(6):623-33.
- Neuhaus M, Wagner U, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Mock H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Hum Pathol*. 1999, 30: 81-6
- Oguro S, Ino Y, Shimada K, et al. Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer. *Cancer Sci*. 2015; 106: 1750- 1760.
- Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 2000; 88: 2598-605.
- Orntoft TF, Nielsen MJS, Wolf H, Olsen S, Clausen H, Hakomori S-I, Dabelsteen E. Blood group ABO and Lewis antigen expression during neoplastic progression of human urothelium. Immunohistochemical study of type 1 chain structures. *Cancer* 1987, 60: 2641-8.
- Otto W, May M, Fritsche HM, et al. Analysis of sex differences in cancer-specific survival and perioperative mortality following radical cystectomy: results of a large German multicenter study of nearly 2500 patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Gend Med* 2012;9:481-489.
- Paner GP, Annaiah C, Gulmann C, Rao P, Ro JY, Hansel DE, et al. Immunohistochemical evaluation of novel and traditional markers associated with urothelial differentiation in a spectrum of variants of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*. 2014;45(7):1473-82)
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–64.
- Parker DC, Folpe AL, Bell J, Oliva E, Young RH, Cohen C, et al. Potential utility of uroplakin III, thrombomodulin, high molecular weight cytokeratin, and cytokeratin 20 in noninvasive, invasive, and metastatic urothelial (transitional cell) carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(1):1-10.)

- Parkin, J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*, 2001; 357(9270):1777-89
- Paulos CM, June CH. Putting the brakes on BTLA in T cell-mediated cancer immunotherapy. *J Clin Invest*. 2010;120(1):76-80.
- Peng P-Ji, Li Y, Sun S. On the significance of Tim-3 expression in pancreatic cancer. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(8):1754–1757.
- Phong BL, Avery L, Sumpter TL, Gorman JV, Watkins SC, Colgan JD, and Kane LP. Tim-3 enhances FcεRI-proximal signaling to modulate mast cell activation. *J. Exp. Med*. 2015;212:2289–2304.
- Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2009 ;15:6008-17
- Pollard C, Smith SC, Theodorescu D. Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert Rev Mol Med* 2010:12
- Putz R, Pabst R. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Houten, the Netherlands: Bohn Stafleu van Loghum. 2006.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
- Richards KA, Ham S, Cohn JA, Steinberg GD. Urinary tract infection-like symptom is associated with worse bladder cancer outcomes in the Medicare population: implications for sex disparities. *Int. J. Urol*. 23, 42–47 (2016)
- Rosai J. Urinary Tract. In *Ackermann's Surgical Pathology*, 9th ed. Mosby 2004: 1317-1359.
- Rubenwolf PC, Eder F, Ebert AK, Hofstaedter F, Woodhouse CR, Roesch WH. Persistent histological changes in the exstrophic bladder after primary closure-a cause for concern? *The Journal of urology*. 2013;189(2):671-7
- Rübber H, Sauer R, Schenck M, Schmid K W, Stief C, Stöckle M, Zaak D. *Uroonkologie Harnblasenkarzinom*, Kapital 19. Springer 2007. p: 302-358
- Sadler TW. *Medical Embryology*. Williams&Wilkins; 1995.
- Saito T, Yamasaki S. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev* 2003;192:143-160.
- Salio M., Cella M., Suter M., and Lanzavecchia A. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol*. 1999; 29, 3245–3253.

- Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, Lotan Y. Bladder Cancer, *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Apr 13;3:17022
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:53-9
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's role in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331:1565–1570.
- Scinner DG. Current perspectives in the management of high grade invasive bladder cancer. *Cancer* 1980, 45:1866-74.
- Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 2005;6:90-98.
- Shang Y, Li Z, Li H, Xia H, Lin Z. TIM-3 expression in human osteosarcoma: correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition-specific biomarkers. *Oncol Lett*. 2013;6(2):490–4.
- Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S and Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int*. 2010; 105(3): 300–308.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015;348:56–61.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin*. 66, 7–30
- Sievert KD, Amend B, Nagele U, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol* 2009 ;27:295-300
- Simon R, Richter J, Wagner U, Fijan A, Bruderer J, Schmid U et al. High-throughput tissue microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer. *Cancer Res* 2001;61:4514-9.
- Sivrioğlu K. Mesane Anatomisi ve İşeme Fiziyojisi. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2005; 51 (Özel Ek A): A16-A18.
- Smeulders N, Woodhouse CR. Neoplasia in adult exstrophy patients. *BJU Int*. 2001;87(7):623-8.

- Smith AB, Deal AM, Woods ME, Wallen EM, Pruthi RS, Chen RC et al. Muscle-invasive bladder cancer: evaluating treatment and survival in the National Cancer Data Base. *BJU Int.* 114, 719–726 (2014).
- Smith JH, Christie JD. The pathobiology of *Schistosoma haematobium* infection in humans. *Hum Pathol.* 1986;17(4):333-45.
- Soo RA, Kim HR, Asuncion BR, Fazreen Z, Omar MFM, Herrera MC et.al. Significance of immune checkpoint proteins in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2017 ;105:17-22.
- Steinberger P, Majdic O, Derdak SV, et al., Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *Journal of Immunology.* 2004 ;172:4:2352–2359.
- Stephenson AJ, Gong MC, Campbell SC, Fergany AF, Hansel DE. Aggregate lymph node metastasis diameter and survival after radical cystectomy for invasive bladder cancer. *Urology* 2010; 75:382-6
- Stephenson WT, Holmes FF, Noble MJ, Gerald KB. Analysis of bladder carcinoma by subsite. Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer* 1990, 66: 1630-5.
- Sternberg SS, Mills SE, Carter D, Greenson JK, Reuter VE, Stoler MH. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology Volum II, 4 nd Ed, Chapter: 14, Philadelphia 2004: 2035-2088
- Sternberg SS. *Histology for Pathologist.* New York: Lippincott-Raven Press; 1997. 2nded. 835-47
- Sun J, Chen L et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59(8):1163–1171.
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466-5; discussion 75-7.
- Şahinoğlu K. *Kliniğe Yönelik Anatomi.* 4. Baskı, Bölüm 3. Nobel Tıp Kitabevi. 2007: 358-363
- Takano S, Saito H, Ikeguchi M. An increased number of PD-1+ and Tim-3+ CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer. *Surg Today.* 2016;46(11):1341–1347.

- Tamas EF, Nielsen ME, Schoenberg MP, Epstein JI. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary tract: a clinicopathological study of 30 pure and mixed cases. *Mod Pathol.* 2007;20(8):828-34.
- Tanagho EA. Anatomy of the lower urinary tract. In: Walsh PC et al (editors): *Campbell's Urology.* 6th ed. vol. 1. Saunders 1992. p.40.
- Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immunemediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):988-993.
- Trougouboff, P., Kreizman Shefer, H. B and T lymphocyte attenuator expression in mature B cell lymphomas *J Hematopathol* 2013; 6: 57.
- Türk H, Ün S, Ergani B. The Effect of Sex and Age Differences on Pathology Results in Primary Bladder Cancer Patients. *Bulletin of Urooncology* 2017 ;16:81-85.
- Ueno, T, Yeung MY, McGrath M, Yang S, Zaman N, Snawder B et. al., Intact B7-H3 signaling promotes allograft prolongation through preferential suppression of Th1 effector responses. *Eur J Immunol.* 2012. 42(9):2343-53.
- Venyo AK. Microcystic variant of urothelial carcinoma. *Adv Urol.* 2013;654751
- Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (eds) *Campbell's urology*, 8th edn. Saunders, Philadelphia 2002
- Wang Y, Subudhi SK, Anders RA, Lo J, Sun Y, Blink S et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cellmediated responses. *J Clin Invest* 2005 ;115 :711–717.
- Warrington, R, Watson W, Kim HL, Antonetti F. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 2011; 7(Suppl 1) :S1.
- Wasco MJ, Daignault S, Bradley D, Shah RB. Nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemisterical study of 30 pue and mixed cases. *Hum Pathol.* 2010; 41:163-71
- 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.
- Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 2003; 4:670-679.
- Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:486–99.

- Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12:492–9.
- Wiener Z, Kohalmi B, Pocza P, Jeager J, Tolgyesi G, Toth S, Gorbe E, Papp Z, Falus A. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):906–14.
- Wolf H, Hojgaard K. Prognostic factors in local surgical treatment of invasive bladder cancer, with special reference to the presence of urothelial dysplasia. *Cancer* 1983, 51: 1710-5.
- Wright JL, Black PC, Brown GA, Porter MP, Kamat AM, Dinney CP, et al. Differences in survival among patients with sarcomatoid carcinoma, carcinosarcoma and urothelial carcinoma of the bladder. *The Journal of urology.* 2007;178(6):2302-6; discussion 7
- Wu J, Lin G, Zhu Y, Zhang H, Shi G, Shen Y, Zhu Y, Dai B, Ye D. Low TIM3 expression indicates poor prognosis of metastatic prostate cancer and acts as an independent predictor of castration resistant status. *Sci Rep.* 2017;7(1):8869.
- Xu YH, Zhang GB, Wang JM, Hu HC et al. B7-H3 and CD133 expression in non-small cell lung cancer and correlation with clinicopathologic factors and prognosis. *Saudi Med J* 2010; 31(9):980–986.
- Xu ZL, Zhang Y, Wang L, Li F, Man HW, Li PF, Shan BE. B7-H3 promotes malignant progression of muscle-invasive bladder cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(5):2722-2733.
- Xylinas E, Robinson BD, Kluth LA, Volkmer BG, Hautmann R, Küfer R. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol.*2014;40(1):121-7
- Yang M, Yu Q, Liu J, Fu W, Cao Y, Yu L et al. T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in bladder urothelial carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *J Surg Oncol.* 2015; 112: 430– 435.
- Yörükoğlu K, Tuna B, Çulhacı N, Neşe N, Sarsık B, Şen S ve ark. Üropatoloji. Kongre Kitabevi. İzmir; 2016:193-285
- Zhang G, Wang J, Kelly J, Gu G, Hou J, Zhou Y et. al. B7-H3 augments the inflammatory response and is associated with human sepsis. *J Immunol,* 2010. 185(6): 3677-84.
- Zhang SS, Tang J et al. Expression levels of B7-H3 and TLT-2 in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2015; 10(2):1063–1068.

- Zhao X, Li D et al. B7-H3 overexpression in pancreatic cancer promotes tumor progression. *Int J Mol Med* 2013; 31(2):283–291.
- Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;117(17):4501–4510.
- Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Sun Z, Zaghoulani S, Gu G et al. An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. *Nat Commun*. 2015; 6:6072.
- Zhuang X, Zhang X, Xia X, Zhang C, Liang X, Gao L, Zhang X, Ma C. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(6):978–85.