



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ  
ANABİLİM DALI

# **RENAL HÜCRELİ KARSİNOMLARDA PCR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU) VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM İLE PD-L1 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Işıl CANDANER**

**Antalya, 2018**



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ  
ANABİLİM DALI

# **RENAL HÜCRELİ KARSİNOMLARDA PCR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU) VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM İLE PD-L1 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Işıl CANDANER**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bahar AKKAYA**

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TTU-2017-2507 Proje No ile desteklenmiştir.**

**“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”**

**Antalya, 2018**

## TEŐEKKÖR

Bu çalıřmanın yűrűtűlmesi ve sonuçların yorumlanması ařamalarında bilimsel gűrűřlerini ve desteęini hiçbir zaman esirgemeyen bařta tez danıřmanım Prof. Dr. Bahar AKKAYA ve tűm hocalarıma, tűm çalıřma sűrecinde en bűyűk űzveriyi gűsteren ve manevi destekleriyle yanımda olan canım aileme, her ařamada yardımcı ve destekleyici olan deęerli arařtırma gűrevlisi arkadařlarıma, molekűler çalıřmaları uygulayan sayın Mualla ŐZCAN'a, istatistiksel incelemeyi gerçekleřtiren sayın Deniz ŐZEL ERKAN'a ve Akdeniz Őniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalımın tűm çalıřanlarına teőekkűr ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>                                   | <b>iv</b> |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                           | <b>vi</b> |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                           | <b>vi</b> |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                         | <b>4</b>  |
| 2.1. Böbrek Embriyolojisi ve Histolojisi                         | 4         |
| 2.2. Böbrek Anatomisi                                            | 9         |
| 2.3. Renal Hücreli Karsinom                                      | 10        |
| 2.3.1. Epidemiyoloji                                             | 10        |
| 2.3.2. Etiyoloji ve Patogenez                                    | 12        |
| 2.3.3. Renal Hücreli Karsinom Sınıflaması                        | 14        |
| 2.3.4. Renal Hücreli Karsinom Evrelemesi                         | 22        |
| 2.3.5. Prognostik Faktörler                                      | 24        |
| 2.3.6. Renal Hücreli Karsinomda Moleküler Mekanizmalar ve Tedavi | 26        |
| 2.4. Tümör İmmünitesi ve İmmün Kontrol Noktaları                 | 28        |
| 28_Toc476921858                                                  |           |
| <b>3. MATERYAL VE METOD</b>                                      | <b>33</b> |
| 3.1. Etik Kurul                                                  | 33        |
| 3.2. Hasta Seçimi ve Hazırlık                                    | 33        |
| 3.3. PD-L1 İHK Prosedürü ve Değerlendirilmesi                    | 34        |
| 3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile PD-L1 İnceleme Prosedürü  | 36        |
| 3.5. İstatistiksel Analiz                                        | 41        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                               | <b>42</b> |
| 4.1. Demografik Veriler                                          | 42        |
| 4.2. Histolojik Alt Tipler                                       | 43        |
| 4.3. Evre                                                        | 45        |
| 4.4. Uzak metastaz                                               | 46        |
| 4.5. Nükleer grade                                               | 48        |
| 4.6. Diğer Prognostik Faktörler                                  | 48        |

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7. Sağkalım                                                                  | 49        |
| 4.8. İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları                                    | 54        |
| 4.9.Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile PD-L1 Gen Ekspresyonu İnceleme Sonuçları | 55        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                             | <b>60</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                    | <b>70</b> |
| <b>7. ÖZET</b>                                                                 | <b>71</b> |
| <b>8. ABSTRACT</b>                                                             | <b>72</b> |
| <b>9.KAYNAKLAR</b>                                                             | <b>73</b> |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                 |                                                                  |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>AFIP</b>                     | Amerika Birleşik Devletleri Silahlı Kuvvetler Patoloji Enstitüsü |
| <b>BMP7</b>                     | Kemik morfogenetik protein 7                                     |
| <b>CTLA-4</b>                   | Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4                         |
| <b>DSÖ</b>                      | Dünya Sağlık Örgütü                                              |
| <b>FGF2</b>                     | Fibroblast büyüme faktörü 2                                      |
| <b>HIF1-<math>\alpha</math></b> | Hipoksi uyarılabilir faktör-1 alfa                               |
| <b>HSP70</b>                    | Isı şok proteini-70                                              |
| <b>IGF-1</b>                    | İnsülin benzeri büyüme faktörü-1                                 |
| <b>ISUP</b>                     | Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği                           |
| <b>İHK</b>                      | İmmünohistokimya                                                 |
| <b>KHDAK</b>                    | Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu                             |
| <b>MAPK</b>                     | Mitojen-aktivasyonlu protein kinaz                               |
| <b>MHC</b>                      | Majör histokompatibilite kompleksi                               |
| <b>MiT</b>                      | Mikroftalmi transkripsiyon faktör                                |
| <b>m-TOR</b>                    | Rapamisin'in memelilerdeki hedefi                                |
| <b>NF-KB</b>                    | Nükleer faktör kappa beta                                        |
| <b>PAS</b>                      | Periodic asid- Schiff                                            |
| <b>PCR</b>                      | Polimeraz zincir reaksiyonu                                      |
| <b>PD1</b>                      | Programlı hücre ölümü reseptörü 1                                |
| <b>PD-L1</b>                    | Programlı hücre ölümü reseptörü ligandı 1                        |
| <b>PD-L2</b>                    | Programlı hücre ölümü reseptörü ligandı 2                        |
| <b>PPIA</b>                     | Peptidilprolil izomeraz A                                        |
| <b>RHK</b>                      | Renal hücreli karsinom                                           |
| <b>SDH</b>                      | Süksinat dehidrogenaz                                            |
| <b>TFE3</b>                     | Transkripsiyon faktör E3                                         |
| <b>TFEB</b>                     | Transkripsiyon faktör EB                                         |
| <b>TKR</b>                      | Tirozin kinaz reseptörleri                                       |

|             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| <b>TNM</b>  | Tümör, lenf nodu, metastaz         |
| <b>VEGF</b> | Vasküler endotelyal büyüme faktörü |
| <b>VHL</b>  | von Hippel Lindau                  |
| <b>WT-1</b> | Wilms tümörü 1                     |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>                                                                                                | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 1. Böbreğin embriyolojik gelişimi (19)                                                                |              |
| <b>Error! Bookmark not defined.</b>                                                                         |              |
| Şekil 2. Nefronun yapısı (21)                                                                               | 6            |
| Şekil 3. Kanseri-immünite siklusunda uyarıcı ve inhibe edici faktörler (91)                                 | 30           |
| Şekil 4. Berrak hücreli alt tip                                                                             | 43           |
| Şekil 5. Papiller alt tip                                                                                   | 44           |
| Şekil 6. Kromofob hücreli alt tip                                                                           | 44           |
| Şekil 7. Hastaların evresine göre sağkalım grafiği                                                          | 50           |
| Şekil 8. Hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği                                               | 52           |
| Şekil 9. Metastatik hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği                                    | 53           |
| Şekil 10. Metastatik olmayan hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği                           | 53           |
| Şekil 11. PD-L1 immünohistokimyasal boyanma sonuçları                                                       | 54           |
| Şekil 12. RHK'lı tüm hastaların gerçek zamanlı PCR ile kantitasyon analizleri                               | 56           |
| Şekil 13. PD-L1 gen ekspresyonu izlenen 2 RHK'lı hastanın cevap eğrileri                                    | 57           |
| Şekil 14. A. PD-L1 gen ekspresyonu pozitif ve negatif olan 2 RHK'lı hastanın karşılaştırmalı cevap eğrileri |              |
| B. PD-L1 gen ekspresyonu negatif RHK'lı hastanın cevap eğrisi                                               | 58           |
| Şekil 15. İHK'sal test sürecinde preanalitik, analitik ve postanalitik dönem                                | 67           |



## TABLOLAR DİZİNİ

| <b><u>Tablo</u></b>                                                                           | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Tablo 1. Renal Hücreli Karsinomlar DSÖ 2016 Sınıflaması (3)                                   |                     |
| <b>Error! Bookmark not defined.6</b>                                                          |                     |
| Tablo 2. Renal Hücreli Karsinomların 8. TNM Sınıflaması (6)                                   | 23                  |
| Tablo 3. Renal Hücreli Karsinomlarda Evreleme (6)                                             | 23                  |
| Tablo 4. Renal Hücreli Karsinomlarda DSÖ/ISUP derecelendirme sistemi (5)                      | 25                  |
| Tablo 5. cDNA dönüşümünde genomik DNA eliminasyonu karışımı bileşenleri                       | 39                  |
| Tablo 6. cDNA dönüşümünde revers transkripsiyon karışımı bileşenleri                          |                     |
| <b>Error! Bookmark not defined.</b>                                                           |                     |
| Tablo 7. Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonu oluşturulmasında bir reaksiyon için gerekli bileşenler | 40                  |
| Tablo 8. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu sıcaklık ve süre değerleri                             | 41                  |
| Tablo 9. Hastaların cinsiyete göre dağılımı                                                   | 42                  |
| Tablo 10. Hastaların histolojik alt tipe göre dağılımı                                        | 45                  |
| Tablo 11. Hastaların tanı anındaki evrelerine göre dağılımı                                   | 46                  |
| Tablo 12. Metastatik hastalarda PD-L1 ekspresyonu                                             | 47                  |
| Tablo 13. Hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre ortalama sağkalım süreleri                      | 51                  |
| Tablo 14. PD-L1 için PCR ve İHK sonuçlarının karşılaştırılması                                | 55                  |
| Tablo 15. Prognostik faktörlerin PD-L1 ekspresyon durumları                                   | 59                  |
| Tablo 16. RHK’da PD-L1 ekspresyonunu gösteren çalışmalar                                      | 63                  |

## 1. GİRİŞ

Böbrek kanserleri dünya genelinde tüm kanserlerin %2,4ünü oluşturmaktadır. Her yıl 338 bin hasta böbrek kanseri tanısı almakta ve bu kansere bağlı yıllık 144 bin ölüm gerçekleşmektedir. (1). Renal hücreli karsinomlar (RHK) primer böbrek malignitelerinin %90'ını oluşturmaktadır. Etiyolojisinde obezite, sigara, hipertansiyon, kazanılmış kistik böbrek hastalığı, mesleksi trikloroetilen maruziyeti bulunmaktadır. %2-4'ünde genetik geçiş söz konusudur. Renal hücreli karsinom hastalarının %25-30'u tanı anında metastatik hastalığa sahiptir ve buna ek olarak nefrektomi uygulanan hastaların %20'sinde takipleri sırasında metastatik hastalık gelişmektedir (2).

Renal hücreli karsinomlar Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP) Vancouver sınıflaması temelinde güncellenen Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 sınıflamasına göre çok sayıda histopatolojik alt tipe ayrılmaktadır. Farklı RHK alt tiplerinin spesifik histopatolojik ve genetik karakteristikleri bulunmaktadır. Bu alt tipler, baskın sitoplazmik özellikler ve boyanma karakteristiklerine (berrak hücreli, kromofob, müsinöz tübüler ve içsi hücreli), yapısal paternlere (papiller, berrak hücreli papiller, tübülokistik), tümörün anatomik lokalizasyonuna (toplayıcı duktus karsinomu ve renal meduller karsinomlar), spesifik bir renal hastalıkla ilişkisine (kazanılmış kistik hastalık ilişkili RHK) göre ayrılmasının yanında ayrıca RHK alt tipleri için patognomonik moleküler değişikliklere (Mit ailesi translokasyon karsinomları ve süksinat dehidrogenaz [SDH]-eksikliği izlenen renal karsinomlar) ve familial predispozisyon sendromları ile ilişkisine (herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom ilişkili RHK) göre de sınıflandırılmıştır. Ayrıca düşük malign potansiyelli multiloküler kistik renal neoplazi ve sınıflandırılmayan alt tipleri de mevcuttur. En sık izlenen RHK tipleri berrak hücreli, papiller ve kromofob alt tiplerdir (3).

Histopatolojik tanıda RHK alt tipi yanında, nükleer grade, sarkomatoid/rabdoid özellikler içermesi, vasküler invazyon, tümör nekrozu, perirenal yağ dokusu ve toplayıcı sistem invazyonu da değerlendirilir. Bu parametreler histolojik prognostik faktörleri oluşturur (4). Nükleer grade belirlenmesinde özellikle berrak hücreli ve papiller alt tipler için 2013 yılında

güncellenen DSÖ/ISUP nükleer derecelendirme sistemi önerilmektedir ve nükleer grade tek başına bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (5). Güncel renal hücreli karsinom evrelemesi, 8. TNM sistemine göre yapılmaktadır. Bu evreleme sisteminde tümör boyutu, venöz invazyon, renal kapsül invazyonu, adrenal tutulum, Gerota fasyası tutulumu, lenf nodülü tutulumu ve uzak metastaz değerlendirilen parametrelerdir. Bu nedenle bu parametreler hastalık prognozunda önemli anatomik faktörlerdir (6).

Renal hücreli karsinom immünojenik bir tümördür ve karakteristik olarak çok sayıda tümör infiltrate lenfosit içerir (7). Birçok çalışmada renal hücreli karsinomun konak antitümör immünitesinin gelişimini engelleyici özellikleri olduğu gösterilmiştir (8). Birçok tümörde olduğu gibi renal hücreli karsinomda da bu durum özellikle sitotoksik T lenfositlerin apoptozisinin uyarılması sonucu oluşur. T lenfosit apoptozisinin uyarılması, temelde 2 mekanizmayla; tümör hücrelerindeki FasL ekspresyonunun arttırılması yolu ve immün kontrol noktalarının uyarılması yolu ile gerçekleşir (9). İmmün kontrol noktalarının uyarılması lenfositlerdeki eş uyarıcı değişiklikleri ile meydana gelir. Tümör, lenfositlerdeki aktive edici eş uyarıcıların reseptör sayısında azalmaya veya inhibe edici eş uyarıcıların reseptör sayısında artmaya neden olur. Eş uyarıcı reseptör ailesi iki büyük süper antijen ailesinden oluşur: immünglobulin süper ailesi (IgSF) ve tümör nekroz faktör reseptör süper ailesi (TNFRSF). (10).

Bu eş uyarıcılardan immünoglobülin süper ailesinde bulunan T hücre ko-inhibitör reseptörü olan PD-1, aktive T lenfositler, B lenfositler, NK hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve Treg hücreler gibi immün sistem hücrelerinde sentezlenen bir yüzey glikoproteinidir (11,12). PD1'in etkileşimde bulunduğu iki ligand mevcuttur: PD-L1 (B7-H1, CD274) ve PDL2 (B7-DC, CD273). Bu ligandlardan PD-L1, tümör hücreleri ve antijen sunan hücreler üzerinde bulunur (13). Normal immün yanıtta PD-L1, immün yanıtın sürekliliğini sağlamak için sentezlenirken tümör hücrelerinden salınan bazı sitokinler bu molekülün sentezlenmesini arttırarak tümör hücrelerini aktive T hücrelerinin sitolizinden korumaya çalışır. PD-L1 ligandının, tümör spesifik T hücrelerindeki PD-1 reseptörüne bağlanması T hücrelerinin apoptozuna yol açarak tümör hücrelerinin immün yanıtta kaçışına olanak sağlar. Bu nedenle immün kontrol noktası olarak

adlandırılır (14). Bu immün yanıttan kaçış mekanizmasını anlamak yeni bir tedavi yaklaşımı olarak immünoterapinin gelişimine neden olmuştur. İmmün kontrol noktalarının keşfi kanser tedavisinde yeni bir çıkır açmış ve tedavi hedefine tümör yerine immün sistemi oturtmuştur. (15).

Renal hücreli karsinomlarda lokalize hastalıkta temel tedavi yöntemi cerrahiyken, metastatik hastalıkta sistemik tedavi protokollere eklenmektedir. Standart ilk sıra tedavide tirozin kinaz inhibitörleri, bevacizumab, interferon kombinasyonları ve berrak hücreli dışı varyantlarda m-TOR inhibitörleri yer alır (16). İkinci sıra tedavide ise PD-1 inhibitörü olan nivolumabın tek başına veya tirozin kinaz inhibitörleri ile kombine kullanımı tedavi kılavuzlarına eklenmiştir. PD-L1 inhibitörleri olan atezolizumab ve durvalumab moleküllerinin RHK'larda kullanımı açısından henüz çalışmalar devam etmektedir. (17).

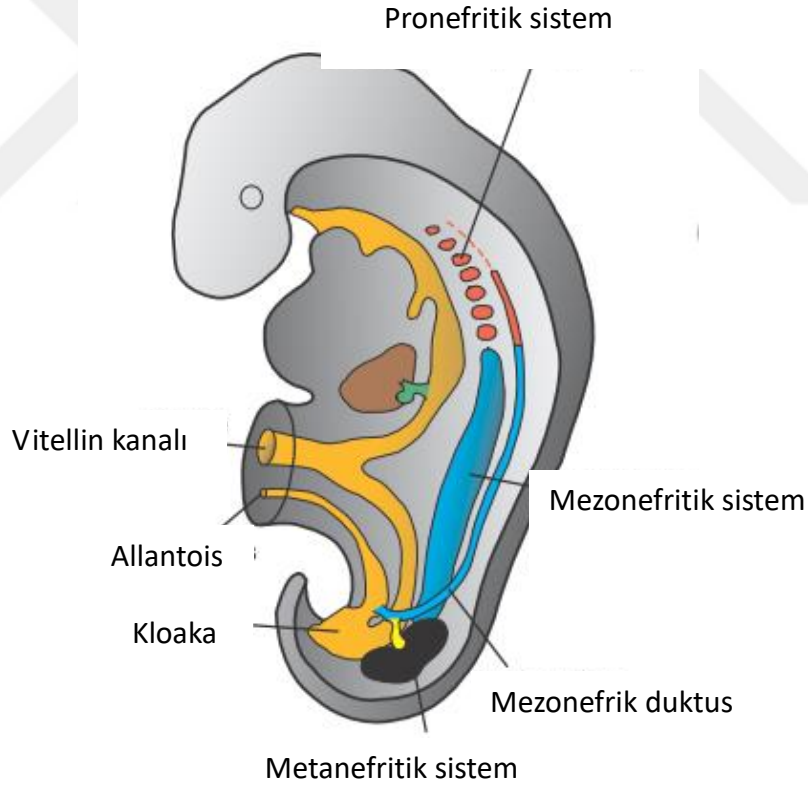
Son zamanlardaki çalışmalarda immün kontrol noktası mekanizmaları malign melanom, mide, karaciğer, meme, serviks, akciğer, mesane karsinomları ve renal hücreli karsinomlar gibi pek çok karsinomda gösterilmiştir. Ancak bu alanda prediktif faktörler ve hangi immün kontrol noktasının hangi tümör için can alıcı olduğu iyi bilinmemektedir. Onkolojik açıdan pratik değıştirici sonuçlar şimdilik RHK, malign melanom, KHDAK ve belli kolorektal kanser tipleriyle sınırlıdır. Yeni immünojenik tedavi stratejileri yetersiz immün yanıt oluşturan tümörlerde dahi, bazı indükleyici tedavilerle (kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler vs) tümördeki immün yanıtı oluşturup PDL1 ekspresyonunu artırmak ve böylece PD1 hedefli tedavileri uygulanır hale getirmek üzerine de geliştirilmektedir.

Bu çalışmada, henüz gelişim aşamasında olan bu tedavi yöntemlerinin uygulanabileceği, 2008-2013 yılları arasında cerrahi rezeksiyon sonucu renal hücreli karsinom tanısı alan 81 hastadan alınan spesimenlerin immünohistokimyasal ve PCR yöntemi ile PD-L1 ekspresyon oranlarının belirlenmesi ve bu ekspresyonun hastaların metastaz durumları, evre ve sağkalım gibi prognostik parametreleri ile korelasyon ilişkisinin saptanması ile literatüre katkıda bulunmak amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbrek Embriyolojisi ve Histolojisi

İntrauterin hayatta ürogenital sistem gelişimi santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemin oluşumunun ardından 3. haftanın sonunda başlar ve doğumdan sonra da devam eder (18). Ürogenital sistem, aortanın lateralinde bulunan intermediate mezoderm kökenlidir. Nefrojenik kord olarak bilinen yedinci somitin kaudal parçasından embriyoda servikal bölgeden kaudal bölgeye uzanım gösteren, birbirinin peşi sıra oluşan üç nefrojenik yapı oluşur: pronefroz, mezonefroz ve metanefroz (Şekil 1). Pronefroz ve mezonefroz geçici evreler olmakla birlikte kalıcı böbrekler metanefrozdan oluşur (19).



Şekil 1 Böbreğin embriyolojik gelişimi: Pronefroz, mezonefroz ve metanefroz (19).

Pronefroz, embriyonik gelişimin üçüncü haftasının sonunda servikal bölgede yedi-on hücre grubu şeklinde ortaya çıkar, insanlarda rudimenter bir organ olup bir çeşit taslak görevi yapar. Pronefroz; duktus, tübüller ve tübüllerle anatomik olarak bağlantılı olmayan glomus (glomerül benzeri yapı) yapılarından oluşur. Glomus çöломik kaviteye uzanarak kanı filtre eder, tübül yapıları bu filtratı çöломik kaviteden toplayarak pronefrik duktusa iletir. Pronefrik duktus kaudale doğru geliştikçe glomus ve tübül yapıları regrese olur. Pronefrik duktustan ise daha kaudal yerleşimli mezonefrik duktus (Wolfian kanalı) gelişir (18).

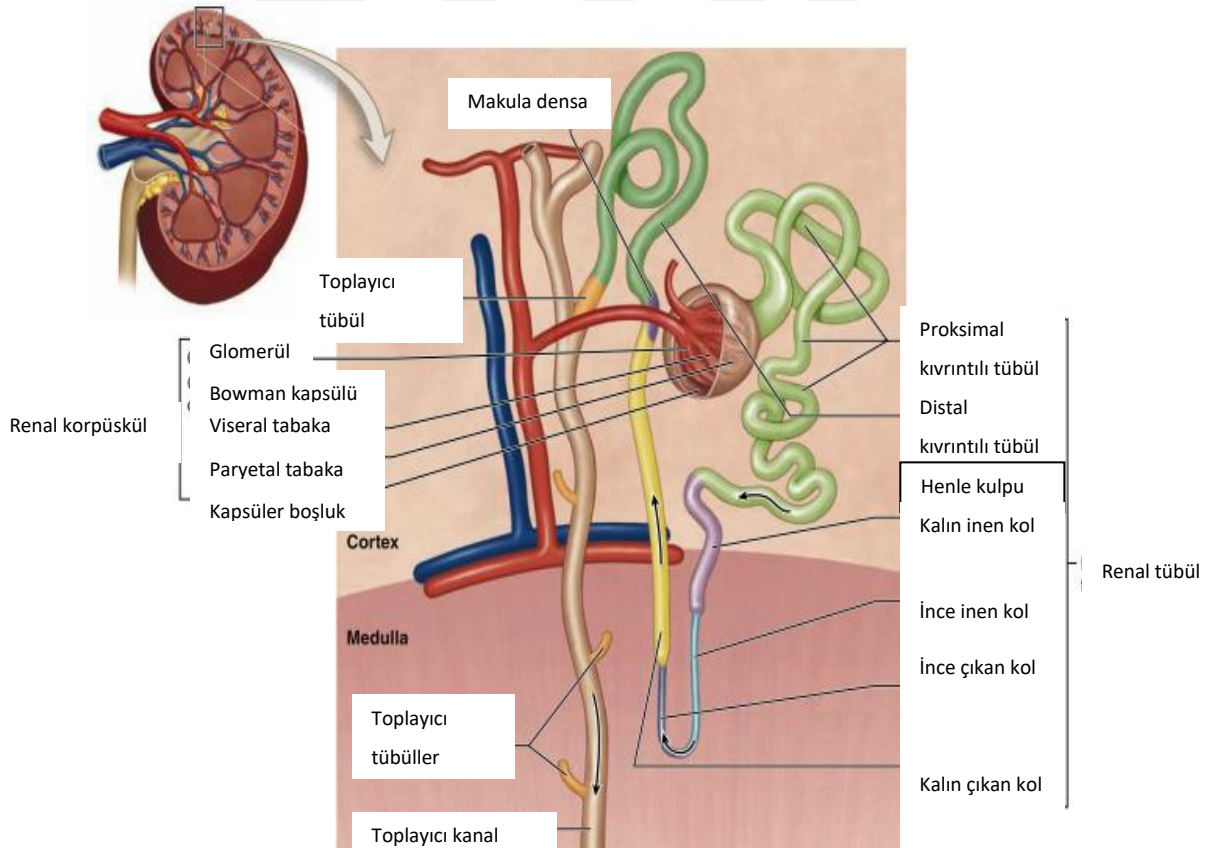
Mezonefroz, embriyolojik gelişimin dördüncü haftasının ortasında pronefrozun kaudalinde torasik bir organ olarak gelişir ve gestasyonun dördüncü ayının sonuna kadar fonksiyonel olarak kalır. Tübüllerle anatomik olarak bağlantılı 20-40 glomerül içeren nefron yapısından oluşur. Bazı glomerüller ise direkt olarak mezonefrik duktus ile ilişkilidir. Distal mezonefrik duktus, mesanenin öncülü olan kloaka ile birleşir.

Metanefroz, embriyolojik gelişimin beşinci haftasında oluşmaya başlar ve kalıcı böbreği oluşturur. İntermediate mezodermin kaudal kısmındaki metanefrik mezoderm veya blastem olarak adlandırılan mezenkimal hücreler ile mezonefrik duktus etkileşimi metanefrik gelişimi başlatan aşamadır. Üreter tomurcuğu, mezonefrik duktusun kloakaya girişine yakın olarak izlenen bir parçasıdır. Metanefrik mezenkimal hücrelerden WT-1 başta olmak üzere üreter tomurcuğunu uyaran transkripsiyonel faktörler salınmasıyla üreter tomurcuğu renal pelvis, kaliksler ve toplayıcı kanalları oluşturacak şekilde dallanır. Üreter tomurcuğunun karşılıklı olarak metanefrik mezenkimi uyarması sonucunda ise glomerüller, proksimal ve distal tübüller, Henle kulpu gelişir. Bu uyarım apoptozisi inhibe ederek proliferasyonu arttıran FGF2 (fibroblast büyüme faktörü 2), BMP7 (kemik morfogenetik protein 7) ile ve epitelyal-mezenkimal dönüşümü uyaran WNT sinyal yolları başta olmak üzere çeşitli uyaranlarla gerçekleşir (20).

Metanefrik böbreğin hücreleri iki farklı seriden köken alarak toplayıcı duktuslar ve nefronları oluşturur. Bu gelişim süreci birlikte gerçekleşmekte olup yeni oluşan toplayıcı duktusların ucundaki metanefrik doku agregatları renal vezikülleri meydana getirir. Bu veziküllerin içinde onuncu haftada başlayan

kapiller gelişim ile birlikte glomerül farklılaşması tamamlanmış olur. Glomerüller, beraberinde oluşan proksimal ve distal tübüller ile birlikte nefron yapısını oluşturur. Glomerüllerin proksimalinde Bowman kapsülü farklılaşır, distalinde ise toplayıcı kanallarla bağlantı sağlanır. Nefron oluşumu embriyolojik gelişimin 32-36. haftalarında tamamlanır, maturasyonu ise doğumdan sonra erişkin döneme kadar devam eder (18).

Böbrek histolojik olarak dışta korteks ve içte medulla olmak üzere iki ana bölümde incelenmektedir. Korteks yapısal olarak medüller ışınları çevreleyen kortikal labirentten oluşur. Kortikal labirentte glomerüller, proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, interlobüler damarlar ve zengin kapiller ağ bulunurken medüller ışınlar, proksimal ve distal tübüllerin düz bölümleri ile medullaya giren toplayıcı kanalları içerir. Medullada ise proksimal tübüllerin düz bölümü, toplayıcı kanallar ve gelişmiş bir vasküler ağ ile çevrelenmiş Henle kulpu bulunur.



Şekil 2 Nefronun yapısı (21).

Her böbrekte böbreğin yapısal ve fonksiyonel birimi olan ortalama bir milyon nefron bulunur. Nefronu oluşturan yapılar renal korpüskül, proksimal tübül, Henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı tübüllerdir (21) (Şekil 2).

Renal korpüskül, glomerül adı verilen anastomozlaşan kapiller ağ ve bu kapiller ağı çevreleyen visseral ve paryetal epitel tabakalarından oluşan Bowman kapsülünden oluşur.

Glomerüler kapiller yumak glomerüle vasküler polünden giren afferent arteriolün çok sayıda lobüle ayrılması ve bu lobüllerin aralarında anastomozlaşmasıyla oluşur. Kapillerlerin yeniden bir araya gelerek glomerülün vasküler polünden çıkması sonucunda ise efferent arteriol meydana gelir. Kapillerler ince fenestreli bir endotel ile döşelidir. Işık mikroskopunda eozinofilik sitoplazmalı ve oval nükleuslu olarak izlenen bu ince epitelyal tabakanın nükleusları kapiller lümenin iç kısmındadır (18). Endotelin yüzeyinde fenestraları örten ince bir glikokaliks tabakası bulunur ve bu tabaka glomerüler filtrasyon bariyerinde önemli işlevlere sahiptir (22). Podositler tarafından salgılanan VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü), glomerül endotel hücre fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisidir. VEGF, fenestrasyon oluşumunu uyarır, kapiller permeabilitesini artırır, endotel diferansiyasyonunun korunmasında önemli işlevleri vardır (23).

Endotel tabakasının altında glomerül bazal membranı bulunur. Glomerül bazal membranı ışık mikroskopunda PAS (Periodic asid- Schiff) ve methenamin silver boyama yöntemleri ile gösterilebilir. Elektron mikroskopik incelemede bazal membranın kalın elektron geçirmeyen merkezi kısım (lamina densa) ve elektron geçiren periferik katmanlardan (lamina rara interne ve lamina rara eksterna) oluştuğu görülür. Glomerüler bazal membranı oluşturan temel bileşenler; tip 4 kollajen, laminin, entaktin ile perlekan ve agrin gibi proteoglikanlardır (24).

Glomerül bazal membranın altında, lamina rara eksternaya uzanan ve birbirleriyle anastomozlaşan ayaksız çıkıntılara sahip podositler bulunur. Podositler Bowman kapsülünün visseral epitelini oluşturan hücrelerdir. Bu uzantılar glomerül kapillerlerini de sarar ve aralarında boşluklar bırakarak filtrasyon



yarıklarını oluştururlar. Işık mikroskobunda glomeröl kapiller duvarın dışında yerleşmiş, belirgin nükleuslu, geniş eozinofilik sitoplazmalı büyük hücreler olarak görölürler. Elektron mikroskobik olarak çok sayıda kontraktıl protein ve filtrasyon yarıkları bölgesinde nefrin proteinini içerirler (18). Podosit fonksiyon ve yapısının devamlılığında WT-1 önemli bir yere sahiptir (20).

Mezengiyal hücreler ve bunları çevreleyen matriksten oluşan mezengiyum ise glomerüler kapiller yumaklara yapısal destek sağlar. Mezenkimal orijinli bu hücreler kasılabilme, fagositoz yapabilme, proliferasyon yeteneğine sahiptir ve aktif mediyatörler salgırlar. Işık mikroskobunda mezengiyal hücreler, endotel ile GBM arasında yerleşmiş, düzensiz sınırlı, iğsi, koyu nükleuslara sahip hücrelerdir. Mezengiyal hücreler yapısında kontraktıl proteinler taşırlar.

Kapiller endoteli, bazal membran ve podositler bir arada glomeröl filtrasyon bariyerini oluşturur.

Proksimal tüböl, Bowman kapsölünün paryetal epitel tabakasının tek sıralı yassı epiteliyle devamlılık gösteren kübik-alçak kolumnar epitel hücrelerinden oluşur. Kortekste bulunan kıvrıntılı kısmı ve daha çok medullada bulunan düz kısmı mevcuttur. Hücrelerin lüminal kısmında fırçamsı kenarı oluşturan belirgin PAS pozitifliği gösteren çok sayıda mikrovillus bulunur (18).

Henle kulpu, kalın ve ince inen kol ile kalın ve ince çıkan koldan oluşan, medullada bulunan U şeklinde bir yapı olup idrarın konsantre hale getirilmesinde önemli rol oynar. İnce kolu basık, tek sıralı, lümene doğru hafif çıkıntı yapan hücrelerden oluşurken kalın kolu fırçamsı kenar içermeyen, lateral parmaksı çıkıntılar içeren, sitoplazmik çizgilenmelere sahip kübik şekilli hücrelerden oluşmaktadır.

Distal tübüller, Henle kulpu kalın koluna benzer özellikte fakat lateral parmaksı çıkıntılar içermeyen hücrelere sahiptir. Kortekste kolumnar bir hal alıp nükleusların birbirine yaklaşmasıyla, daha koyu görünümlü, renin salgılayan özelleşmiş bir bölge olan makula densayı oluşturur.

Toplayıcı tübüller ise belirgin hücresel heterojenite içeren, idrarın konsantre edilerek toplayıcı kanallara taşındığı son bölümdür (18).

## 2.2. Böbrek Anatomisi

Böbrekler retroperitoneal yerleşimli, 12. torakal ve 3. lomber vertebralar arasında uzanan organlardır. Sağ böbrek, sol böbreğe göre daha aşağıda yerleşmiştir. Ağırlıkları yaklaşık olarak kadınlarda 115-155 gr, erkeklerde 125-170 gr'dır. Erişkin böbrek ortalama uzunluğu 11-12 cm, genişliği 5-7,5 cm, kalınlığı 2,5-3 cmdir (25).

Böbreğin konkav yüzünde 3 cm'lik bir alanda yarık şeklinde hilus izlenir. Renal hilus açıklığından renal sinüs adı verilen pelvis, renal arter, ven, lenfatik ve nöral yapıların bulunduğu boşluğa girilir. Bu bölgede renal arter, renal ven, üreter ve sinirler, perirenal yağ dokunun devamı olarak yağ doku ile çevrelenmiştir. Hiler bölgede ana renal arter anterior ve posterior dallarına ayrılır. Bunlar parankimin apikal, üst, orta, alt ve posterior segmentlerini besleyen segmental arterlere ayrılır. Bu arterler arasında kollateral dolaşım bulunmaz. (18). Segmental arterler renal sinüste interlobar arterlere dallanır. Bunlar kortikomedüller bileşkede kıvrılarak arkuat arterleri oluşturur ve bunlardan dik olarak korteks içine interlobüler arterler ayrılır. Glomerüler kapiller yumağı oluşturan afferent arterioller bu arterlerden oluşur. Renal ven ise benzer sistemi izleyerek meydana gelir ve vena cava inferiora açılır. İntrarenal venler segmental dağılım göstermez ve aralarında çok sayıda anastomoz bulunur (26).

Böbrek kesit yüzünde dışta soluk renkli, granüler görünümlü yaklaşık 1 cm kalınlığında korteks ve içte daha koyu renkli medulla makroskopik olarak ayırt edilebilir. Medullada 8-10 adet, tabanı kortikomedüller bileşkeye oturan, apeksi minör kaliksler içine papilla denilen yapılarla açılan koni şeklinde renal piramitler bulunur. Minör kaliksler majör kalikslere, majör kaliksler de üretere açılır. Her papillanın ucunda toplayıcı kanalların distal kısımlarını temsil eden küçük açıklıklar bulunur. Korteks piramitleri çevreleyip piramitler arasındaki alana uzanarak Bertin septumlarını oluşturur. Bir piramit ve onu saran korteks lobül olarak adlandırılır. Her böbrekte ortalama 14 lobül bulunur (18).

Böbrekler fibroelastik bir kapsülle çevrili olup etrafında perirenal yağ dokusu bulundurulur. Böbrekleri perirenal yağ doku ve adrenal bez ile birlikte en dıştan Gerota fasyası sarar. Bu fasya yukarda diyafragmadan başlayıp aşağıda üreter boyunca uzanır, kalın arka yaprağı kolumna vertebralisin lateral kenarına

yapışır ve ince ön yaprağı peritonun altından, aort ve vena kavanın önünden geçerek karşı tarafın Gerota fasyası ile birleşir (26).

Böbreği drene eden rejyonel lenf nodülleri; renal hiler, kaval (prekaval, interaortokaval, parakaval, retrokaval) ve aortik (preaortik, paraaortik ve retroaortik) lenf nodülleridir. Sağ yerleşimli tümörlerde ilk drenaj bölgesi interaortokaval bölge, sol yerleşimli tümörler için ilk drenaj bölgesi aortik bölgedir. Bu lenf nodülleri dışında kalanlar distal lenf nodülleri olarak adlandırılır (6).

### **2.3. Renal Hücreli Karsinom**

#### **2.3.1. Epidemiyoloji**

Tüm dünyada böbrek kanseri, günümüz verilerine göre erkeklerde 9. sırada (213.924 vaka), kadınlarda 14. sırada (123.936 vaka) izlenmektedir ve tüm kanserlerin %2,4ünü oluşturmaktadır (1). Dünyada böbrek kanseri insidansı genel olarak 100 binde 4,4 iken yüksek bölgesel farklılıklar göstermektedir. Vakaların yaklaşık %70 kadarı yüksek sosyoekonomik düzeye sahip ülkelerde ortaya çıkmaktadır. En yüksek böbrek kanseri oranları Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da izlenirken, Hindistan, Afrika, Çin ve Japonya'da oranlar daha düşüktür. Bu durumun genetik faktörler, yaşam tarzına bağlı ve çevresel risk faktörlerinin etkisi yanında gelişmiş tanısal görüntüleme yöntemlerine ve sağlık kaynaklarına ulaşımındaki farklılıktan da kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (2).

Dünya genelinde böbrek kanserleri, kanserden ölüm sebepleri içinde 16. sırada olup bu kansere bağlı yıllık 143.406 ölüm gerçekleşmektedir. Yüksek sosyoekonomik düzeye sahip bölgelerde böbrek kanserleri daha sık görülmesine rağmen fatalite oranları daha düşüktür (1). Mortalite oranları son on yılda düşüş eğilimi göstermektedir. Bu düşüş, gelişen görüntüleme yöntemleri ile böbrek kanserlerinin daha erken evrede insidental olarak tanı almasının artmasına ve hedefe yönelik tedaviler gibi yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkışına bağlanmaktadır. Bu durum tedavi sonrası sağ kalım oranlarında artış olarak yansımıştır (27). Böbrek kanserlerinin tanı anındaki beş yıllık sağ kalım oranları

Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre lokalize hastalıkta (Evre I-II) %93, bölgesel yayılım izlendiğinde (Evre III) %66 iken, metastatik hastalıkta (Evre IV) bu oran %12'ye düşmektedir. (28).

Türkiye'de ise 2014 yılı verilerine göre yaşa göre standardize edilmiş insidans hızı erkeklerde 100 binde 6,4 iken kadınlarda 100 binde 3,3 olarak bildirilmiştir. Böbrek kanseri insidansı Türkiye'de 2012 yılına kadar yıllık olarak artma eğilimindeyken sonraki yıllarda düşüş göstermiştir (29). Daha güncel olan 2016 yılı verilerine göre "Böbreğin kötü huylu tümörü" başlığı altında sınıflandırılmış 1093 kişi (747 erkek, 346 kadın) bu kanser grubu nedeniyle hayatını kaybetmiştir (30).

Antalya'da 2008-2012 yılları arası verilerine göre böbrek kanserinin yaşa göre standardize edilmiş insidansı erkeklerde 100 binde 4,9 (232 vaka), kadınlarda 100 binde 2,8 (139 vaka)'dır (31).

Böbrek tümörleri içinde RHK, primer böbrek malignitelerinin %90'ını oluşturmaktadır. RHK hastalarının %25-30'u tanı anında metastatik hastalığa sahiptir ve buna ek olarak nefrektomi uygulanan hastaların %20'sinde takipleri sırasında metastatik hastalık gelişmektedir (2).

RHK insidansı erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha fazladır. Bu durumun sigara içimi ve mesleksi maruziyet prevalansındaki farklılıklar bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca 59 yaş altı kadınların daha erken evrede prezente olduğu ve kadınlardaki mortalitenin %19 daha düşük olarak izlendiği bildirilmiştir. (32).

Genel popülasyonda RHK en yüksek insidans oranları altıncı ve yedinci dekatlarda görülmekle birlikte yaşla birlikte artış göstermektedir. Bir çalışmada RHK'ların yaklaşık %80'inin 40-69 yaş aralığında olduğu belirtilmiştir (33). Başka bir çalışmada ise RHK'ların ortalama tanı yaşı 64 olarak belirtilmiş olup pek çok ülkede ortalama yaşam beklentisindeki artış nedeniyle tanı yaşının yedinci ve sekizinci dekatlara doğru kaymakta olduğu ifade edilmiştir (34).

### 2.3.2. Etiyoloji ve Patogenez

#### Obezite

Obezitenin kadın ve erkeklerde RHK için önemli bir risk faktörü olarak kabul edildiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Tüm RHK'ların yaklaşık %40'ının obezite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (35). Vücut kitle indeksi-kanser ilişkisini araştıran bir meta-analizde RHK, endometrium ve özofagus kanserlerinden sonra obezite ile ilişkisi gösterilen üçüncü kanser olarak belirtilmiştir. Vücut kitle indeksindeki her 5 kg/m<sup>2</sup> lik artışta, erkekte 1.24, kadında ise 1.34 kat bir risk artışı ortaya konulmuştur (36). Obezite RHK oluşumunda önemli bir sebep olarak ortaya çıkarken aynı zamanda vücut kitle indeksi yüksekliği olan hastalarda nefrektomi sonrası kansere özgü sağ kalımı iyileştirici bir faktör olduğu da gösterilmiştir (37).

Obezite ile ilişkili yağ dokudan adipokin olarak adlandırılan çok sayıda hormon ve sitokin salınmaktadır. Bunlardan özellikle adiponektin, leptin, inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin kronik inflamasyonu uyararak tümör mikroçevresini ve tümöre karşı oluşan immün yanıtı etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca kronik hipoksi yolu ile anjiyogenezi arttırdığı ve epitelyal-mezenkimal dönüşüme katkıda bulunarak RHK karsinogenezi ve metastaz gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (38). Karsinogeneizde etkili diğer mekanizmalar ise artmış lipid peroksidasyonu ve renal hücre proliferasyonunu direkt endokrin reseptör ilişkili yollarla etkileyen insülin direncine bağlı IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1) gibi büyüme faktörlerinin seviyesindeki artıştır (39).

#### Sigara

Meta-analizlerde devamlı sigara içiciler ile hiç sigara içmemiş kişiler karşılaştırıldığında RHK oluşumunda erkeklerde risk artışı %54 (relatif risk 1,54), kadınlarda risk artışı %22 (relatif risk 1,22) olarak bulunmuştur ve bu artış doz bağımlıdır. Ayrıca sigarayı bırakalı 10 seneden fazla olanlarda 1-10 sene arası bırakanlara göre daha düşük risk olduğu tespit edilmiştir (40).

Sigarada bulunan ve nükleik asit hasarına yol açan çok sayıda polisiklik aromatik hidrokarbon, aromatik amin ve N-nitroz bileşen, kişinin genetik yatkınlığı ile birleşerek karsinom patogeneğinde rol oynamaktadır. Sigara oluşturduğu serbest oksijen radikalleri ile özellikle obezite ve hipertansiyonla bir arada olduğunda lipid peroksidasyonunu, IGF-1 ve VEGF düzeylerini arttırmaktadır. Sigara içicisi hastalarda daha agresif RHK fenotipleri olduğu ve nefrektomi sırasında sigara içicisi olanların daha düşük sağ kalım oranlarına sahip olduğu gösterilmiştir (41).

### **Hipertansiyon**

Yapılan prospektif çalışmalarda hipertansiyon (sistolik kan basıncı  $\geq 160$  mmHg ve diastolik kan basıncı  $\geq 100$  mmHg) RHK için obeziteden bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmuştur (42). Hipertansiyon öyküsünün böbrek kanseri gelişiminde %67 risk artışına sebep olduğu ve sistolik kan basıncındaki her 10 mmHg'lık artışın %10, diastolik kan basıncındaki her 10 mmHg'lık artışın %22 böbrek kanseri risk artışına neden olduğu gösterilmiştir (43).

Hipertansiyonun karsinogenez üzerindeki etkisinin anjiyogenez ve büyüme faktörleri üzerinden gerçekleşen ortak süreçler olduğu düşünülmektedir (42). Ayrıca hipertansiyon tedavisinde kullanılan proksimal tübül üzerinde etkili diüretikler gibi bazı ilaçların artmış karsinom riski ile ilişkili olduğu öne sürülse de son çalışmalarda risk artışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı öne sürülmüştür (43).

### **Kazanılmış Kistik Böbrek Hastalığı**

Son dönem böbrek yetmezliğine bağlı uzun dönem hemodiyaliz tedavisi alan hastalarda böbrek kanseri insidansında belirgin artış bildirilmiştir (44). Son dönem böbrek yetmezliğinde gelişen RHK'nın kendine özgü karakteristik özellikleri olup DSÖ 2016 sınıflamasında ayrı bir histolojik alt tip olarak ele alınmıştır.

## **Mesleksel Maruziyet**

Metal yüzeylerindeki yağı temizlemede kullanılan endüstriyel bir çözücü olan trikloroetilen maruziyetinin RHK'ların berrak hücreli alt tipinin gelişme sıklığını anlamlı şekilde arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Bu etkinin Von Hippel Lindau geninde mutasyon sonucu tümör supresör etkisinin bozulması sonucu olduğu düşünülmektedir (45).

## **Genetik**

RHK'ların %2-4'ünde genetik geçiş söz konusudur (3). Böbrek kanseri ile ilişkili genetik durumlar, Von Hippel Lindau hastalığı, herediter papiller böbrek kanseri, herediter leiomyomatöz ile ilişkili böbrek kanseri, BirtHugg-Dube Sendromu, tuberoskleroz kompleksi şeklinde örneklenebilir.

### **2.3.3. Renal Hücreli Karsinom Sınıflaması**

RHK'lar primer böbrek malignitelerinin %90'ını oluşturmaktadır. Tarihsel süreçte ilk olarak böbrekteki adrenal kalıntılardan kaynaklandıkları düşünülerek hipernefroma olarak adlandırılmışlardır (46). 1959'de Oberling tarafından bu tümörlerin adrenal kalıntılardan değil renal epitelden kaynaklandığı ultrastrüktürel olarak gösterilmiştir (47). Zaman içerisinde yapılan histolojik, sitogenetik ve moleküler çalışmalarla RHK'ların tek bir tümör olmadığı, farklı antitelerden oluşan bir tümör grubu olduğu anlaşılmıştır (46). 1975'te Amerika Birleşik Devletleri Silahlı Kuvvetler Patoloji Enstitüsü (AFIP) böbrek tümörleri sınıflamasında bu karsinomlar berrak hücreli karsinom ve granüler hücreli karsinom olarak ikiye ayrılmıştır. Ardından gelen geniş olgu sayılı çalışmalar sonucunda RHK'ların alt gruplarının farklı histolojik görünümlemler yanında, prognostik farklılıklar içerdiği, genetik mekanizmalarının ve dolayısıyla tedavi yaklaşımlarının değişebileceği gösterilmiştir.

1981 yılında başlayan DSÖ böbrek epitelyal tümörleri sınıflaması, yeni alt tiplerin dahil edilmesiyle genişlemiş ve Kovacs ile başlayan moleküler

Çalışmaların eklenmesiyle DSÖ 2004 sınıflamasına kadar ilerlemiştir. Bu sınıflamadaki RHK alt tipleri; berrak hücreli RHK, multiloküler berrak hücreli RHK, papiller RHK, kromofob RHK, Bellini'nin toplayıcı duktuslarının karsinomu, renal medüller karsinom, Xp11 translokasyon karsinomu, nöroblastom ilişkili karsinom, müsinöz tübüler ve iğsi hücreli karsinom ve sınıflandırılmayan RHK olarak belirtilmiştir (48).

2013 yılında yayımlanan ISUP Vancouver Erişkin Böbrek Tümörleri Sınıflamasına göre 2004 DSÖ sınıflamasındaki altgruplara beş yeni antite eklenmesi önerilmiştir. Bunlar; tübülökistik RHK, herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom ilişkili RHK, Mit ailesi translokasyonu olan RHK, SDH eksikliği ile giden RHK, edinilmiş kistik hastalık ilişkili RHK, berrak hücreli-papiller RHK olarak belirtilmiştir. Eski sınıflamadaki multiloküler berrak hücreli RHK, düşük malignite potansiyelli olarak kabul edilerek, isimlendirmesi düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik renal neoplazi olarak değiştirilmiştir. Bunların yanında eski sınıflamada altgrup olarak belirtilen nöroblastom ilişkili karsinom, sınıflamadan çıkarılarak provizyonel bir antite olarak yer almıştır. Nadir görülen, belirleyici morfolojik, immünohistokimyasal ve moleküler çalışmalarla ayrımları daha iyi belirlenmesi gereken diğer provizyonel antiteler ise tiroid benzeri foliküler RHK, ALK yeniden düzenlenmesi ile ilişkili RHK, anjiyoleiomyomatöz stroma içeren renal karsinom olarak belirlenmiştir (49).

2016 yılında DSÖ sınıflaması, ISUP Vancouver sınıflaması temelinde güncellenmiştir (Tablo 1) (3).

Bu güncellemeye göre alt tipler; baskın sitoplazmik özellikler ve boyanma karakteristiklerine (berrak hücreli, kromofob, müsinöz tübüler ve iğsi hücreli), yapısal paternlere (papiller, berrak hücreli papiller, tübülökistik), tümörün anatomik lokalizasyonuna (toplayıcı duktus karsinomu ve renal meduller karsinomlar), spesifik bir renal hastalıkla ilişkisine (kazanılmış kistik hastalık ilişkili RHK) göre ayrılmasının yanında ayrıca RHK alt tipleri için patognomonik moleküler değişikliklere (Mit ailesi translokasyon karsinomları ve SDH-eksikliği izlenen renal karsinomlar) ve famiyal predispozisyon sendromları ile ilişkisine (herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom ilişkili RHK) göre de sınıflandırılmıştır. Ayrıca düşük malign potansiyelli multiloküler kistik renal



neoplazi ve sınıflandırılmayan altipleri de mevcuttur. En sık izlenen RHK tipleri berrak hücreli, papiller ve kromofob alt tiplerdir (3).

**Tablo 1. Renal Hücreli Karsinomlar DSÖ 2016 Sınıflaması (3).**

#### **Renal Hücreli Tümörler**

- Berrak hücreli RHK
- Düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik renal neoplazi
- Papiller RHK
- Herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom ilişkili RHK
- Kromofob RHK
- Toplayıcı duktus karsinomu
- Renal medüller karsinom
- MiT ailesi translokasyonu olan RHK
- Süksinat dehidrogenaz eksikliği ile giden RHK
- Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom
- Tübülökistik RHK
- Edinilmiş kistik hastalık ilişkili RHK
- Berrak hücreli-papiller RHK
- RHK, sınıflandırılmayan
- Papiller adenom
- Onkositom

**Berrak hücreli RHK**, berrak veya eozinofilik sitoplazmalı hücrelerin oluşturduğu morfolojik olarak heterojen bir alt tip olarak tanımlanır. RHK'ların %65-70'ini oluşturur (3). VHL (von Hippel Lindau) geninde inaktivasyon ve HIF1- $\alpha$  (hipoksi uyarılabilir faktör-1 alfa) artışı karakteristik moleküler mekanizmasıdır (50,51). Tipik olarak soliter kortikal tümörler olarak prezente olmakla birlikte özellikle VHL gibi herediter kanser sendromlarında multifokalite ve bilateralite izlenir. Hücrelerdeki yüksek lipid içeriği nedeniyle makroskopik olarak tipik altın sarısı rengi izlenir. Mikroskopik olarak glikojen ve lipid içeriği nedeniyle berrak olarak izlenen sitoplazmaya sahip hücreler yanında küçük ince duvarlı kan damarlarından zengin olması tanıda önemli ipucu verir (3). İmmünohistokimyasal olarak PAX8, Karbonik anhidraz-9, Sitokeratin AE1/AE3, CAM 5.2, EMA, bir proksimal tübül belirteci olan CD10, Vimentin, RCC belirteci pozitif olarak izlenirken CK-7 ekspresyonu nadirdir (52).

**Düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik renal neoplazi**, ekspansil büyüme göstermeyen, aralarında bulunan septalarda tek tek ya da gruplar halinde berrak hücreler içeren çok sayıda kist içeren bir alt tip olarak tanımlanır. Tüm renal tümörlerin %1'inden azını oluşturur (3). Çoğu kitle insidental olarak fark edilmekle birlikte rekürrens ve metastaz bildirilmemiştir. Prognoz çok iyidir (53). %25'inde VHL mutasyonları ve %74'ünde 3p delesyonları görülmesi nedeniyle genetik olarak berrak hücreli karsinom ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (54).

**Papiller RHK**, renal tübüler epitel kaynaklı, iyi sınırlı, ince fibrovasküler korlar taşıyan papiller veya tübülopapiller yapılardan oluşan bir alt tip olarak tanımlanmıştır. Renal hücreli karsinomların %18,5'ini oluşturur. (3). Geleneksel olarak 2 gruba ayrılır. Tip 1 papiller RHK'larda papiller yapılar etrafında soluk sitoplazmalı tek sıralı hücreler dizilim gösterirken tip 2 papiller RHK'larda nükleer psödostratifikasyon ve bol eozinofilik sitoplazma izlenir. Tip 2 karsinomlar, daha yüksek nükleer grade içermeye eğilimindedir. Son moleküler çalışmalarda tip 2 papiller RHK'ler hasta sağkalımları açısından farklılıklar içediği için üç ayrı moleküler alt tipe daha ayrılmıştır. Kromozom 7'de trizomi ve

tetrazomiler, kromozom 17’de trizomi ve Y kromozom kaybı papiller RHK ile ilişkilendirilmiş karakteristik moleküler değişikliklerdir (55). Ayrıca sporadik papiller RHK’ların %13’ünde MET mutasyonları gösterilmiştir (56). Papiller RHK’lar berrak hücreli, herediter leiomyomatozis ve RHK ilişkili, toplayıcı duktus karsinomu alt tiplerinden daha iyi prognozludur (5). İmmünohistokimyasal olarak Sitokeratin AE1/AE3, CAM 5.2, EMA, YMAK, CD10, Vimentin, RCC markerı ve tip 1’de daha sık olmak üzere CK-7 pozitif olarak izlenir. (52).

**Herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom ilişkili RHK,** ortalama 30 yaşta görülen, karakteristik olarak cilt ve uterusu çok sayıda leiomyom, adrenal nodüler hiperplazi ve RHK’lar ile karakterize “herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom” hastalığında izlenir. Papiller morfolojide olmakla birlikte toplayıcı duktus karsinomunda izlenen infiltratif büyüme paterni dikkati çeker. Nükleuslarda inklüzyon benzeri nükleoller ve perinükleolar berraklaşma görülür (57). Karakteristik moleküler özelliği 1q42.3-q43’ta FH (fumarat hidrataz) geninde germline mutasyonların varlığıdır (58). Nadir görülen bu alt tipin kötü prognozlu olduğu ve erken yaygın yayılım yaptığı gösterilmiştir (59).

**Kromofob RHK,** soluk-eozinofilik sitoplazmalı, belirgin hücre membranları olan, perinükleer haloya sahip buruşuk nükleuslu bir alt tip olarak tanımlanmıştır. Mikroskopik olarak solid-tabaka benzeri paterne sahip, inkomplet hyalinize vasküler septalarla ayrılmış tümör hücreleri izlenir. Tüm RHK’ların %5-7’sini oluşturur (3). Moleküler çalışmalar bu alt tipin berrak hücreli RHK’dan farklı olarak distal nefrondan kaynaklandığını, kromozom Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 ve 21’de kayıplarla birlikte mitokondriyal DNA’da somatik mutasyonlar ve TP53 ile PTEN mutasyonları içerdiğini göstermiştir (60). Follikülin geninde mutasyon izlenen otozomal dominant bir hastalık olan Birt-Hogg-Dube sendromunda ve renal onkositozda hibrid onkositik/kromofob tümörler izlenebilir (61). İmmünohistokimyasal olarak KIT, parvalbumin, böbrek-spesifik-kaderin ve CK-7 ile pozitifdir. Vimentin genellikle negatiftir (62).

**Toplayıcı duktus karsinomu**, böbrekte Bellini'nin toplayıcı duktuslarından kaynaklanan malign epitelyal tümör olarak tanımlanır. Tanı kriterleri arasında, meduller tutulum, baskın tübüler morfoloji, desmoplastik stromal yanıt, yüksek nükleer grade, infiltratif büyüme paterni ve diğer RHK alt tipleri ile ürotelyal karsinomun görülmemesi yer alır. Nadir bir neoplazi olup renal tümörlerin %1-2'sini oluşturur (3). Moleküler çalışmalar bu alt tipte az sayıda ve minimal olmakla birlikte çeşitli kromozomlarda aberasyonlar ve DNA kayıpları izlenir. Bu alt tipin histolojik olarak belirlenmesi kötü prognoz göstergesidir, agresif klinik gidiş, tanı anında yüksek metastaz oranı ve tedaviye sınırlı yanıt izlenir (63).

**Renal medüller karsinom**, renal medulla yerleşimli, orak hücreli anemi ve diğer hemoglobinopatilerle ilişkili, mikroskobik olarak toplayıcı duktus karsinomuna benzer yüksek gradeli adenokarsinom morfolojisi izlenen agresif bir alt tip olarak tanımlanır. Genç erişkinlerde 200 vaka tanımlanmıştır (3). Orak hücreli anemiye bağlı medullada oluşan iskemik değişiklikler ve medüller epitelin buna bağlı kronik rejeneratif proliferasyonu sonucunda, HIF, p53 ve VEGF yolları üzerinden neoplastik değişimin oluşturduğu ileri sürülmektedir. Bu alt tipte izlenen temel moleküler değişiklikler, HIF-1 $\alpha$ 'da artış, DNA remodeling ve tamirinde bozukluklar olarak tanımlanmıştır (64).

**MiT ailesi translokasyonu olan RHK**, Mit ailesi transkripsiyon faktörlerinden TFE3 ve TFEB'nin diğer genlerle oluşturduğu füzyonlar sonucu ortaya çıkan tümör grubu olarak tanımlanmıştır. Mikroftalmi transkripsiyon faktör (MiT) gen grubu, TFE3, TFEB, TFEC ve MiTF'genlerinden oluşmaktadır. Bu faktörler hücre farklılaşmasını sağlarken, TFE3 ve TFEB, özellikle melanosit ve osteoklast farklılaşmasında görev alır. TFE3 ve TFEB'nin başka genlerle oluşturduğu füzyonlar sonucu açığa çıkan tümör MiT ailesi translokasyonu olan RHK olarak adlandırılmaktadır. TFE3'ü içeren Xp11 translokasyon RHK, 2004 yılında, TFEB'i içeren t (6:11) RHK ise 2016 yılında DSÖ Böbrek Tümörleri Sınıflandırmasında yerini almıştır (3). Mikroskopik olarak epiteloid berrak hücrelerin oluşturduğu papiller neoplaziler olarak izlenir ve çok

sayıda psammom cisimcikleri görülür. Bifazik bir tümör olarak tanımlanır ve RHK'nin diğer alt tipleri ile morfolojik benzerlik gösterebilir. Bazı TFE3 gen füzyonu içeren renal kanserler melanin pigmenti içerebilir (65). İmmünohistokimyasal açıdan diğer RHK'lardan farklı olarak sitokeratinler ve epitelyal membran antijeni gibi epitelyal markerlarla boyanma azdır; fakat PAX-8 ve diğer tübüler markerlarla boyanma izlenir. t (6:11) RHK'larda melanin ve HMB45 pozitifliği görülür (66). Sağkalım açısından berrak hücreli RHK'larla benzerlik göstermekle birlikte tanıdan 20-30 yıl sonra metastaz yapma eğilimi vardır (67).

**Süksinat dehidrogenaz eksikliği ile giden RHK**, vakuollü eozinofilik-berrak hücrelerden oluşan ve SDHB (Süksinat dehidrogenaz B) belirtecinin immünohistokimyasal olarak kaybının izlendiği malign epitelyal tümör olarak tanımlanmıştır. Nadir olup tüm RHK'ların %0.05-0.2'sini oluşturur. Çoğu hastada SDH (Süksinat dehidrogenaz) geninde germline mutasyonlar görülür (3). Süksinat dehidrogenaz; SDHA, SDHB, SDHC ve SDHD olmak üzere dört alt grup proteinden oluşan bir enzim kompleksidir. Mitokondrinin iç membranında yerleşerek mitokondriyal kompleks II'yi oluşturur, süksinatın fumarata dönüşümünü katalize eder ve krebs siklüsünde rol alır. SDH alt tiplerini kodlayan genlerde oluşan germline mutasyonlar sonucu, herediter paraganglioma-feokromasitoma sendromları ve gastrointestinal stromal tümörler gelişir. Bu alt tip ilk kez paraganglioma ve germline SDHB mutasyonu olan iki ailede tanımlanmıştır (68). Mikroskopik özellikleri arasında değişen boyutlarda kistler içeren adalar, tübüler ve solid yapılanma, sitoplazmik vakuoller, inklüzyonlar, köpüksü görünüme sahip küboidal eozinofilik hücreler, homojen, düzgün kontür ve kromatine sahip nükleus bulunmaktadır. Tümör periferinde hapsolmuş glomerül ve tübül yapıları ile tümör stromasına dağılmış mast hücreleri görülebilmektedir (3).

**Müsinöz tübüler ve iğsi hücreli karsinom**, tübüler yapılanmalar, bunlarla iç içe izlenen iğsi hücreler ve miksoid stroma ile karakterli bir renal epitelyal neoplazi olarak tanımlanmıştır. Tüm renal neoplazilerin %1'inden azını

oluşturur (3). Moleküler olarak kromozomal kayıp izlenir. İmmünohistokimyasal olarak tümör hücreleri genellikle CK7, PAX2 ve AMACR pozitifdir. Rekürrens nadir olmakla birlikte metastatik olgular bildirilmiştir (69).

**Tübülökistik RHK**, nadir görülen küçük-orta boyutlu tübüllerle iç içe izlenen tek sıralı küboidal/kolumnar ve hobnail epitelle döşeli daha büyük kistlerden oluşan alt tip olarak tanımlanmıştır (3). Bu alt tipteki moleküler olarak izlenen kromozom 7 ve 17'deki kazanımlar ve Y kromozom kaybı, papiller RHK ile yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. Rekürrens ve metastaz nadirdir (70).

**Edinilmiş kistik hastalık ilişkili RHK**, son dönem böbrek yetmezliğine ve edinilmiş kistik hastalığa sahip hastaların böbreklerinde en sık izlenen tümör olup değişken morfolojik patern, mikrokistik yapılanmalar ve çok miktarda intratümöral okzalit kristal birikiminin izlendiği bir alt tip olarak tanımlanır (3). Moleküler olarak Y kromozomunda, kromozom 3 ve 16'daki kazanımlar bu tümörü papiller RHK'dan ayırmaktadır (71).

**Berrak hücreli-papiller RHK**, berrak hücrelerden oluşan tübüler yapılar ve küçük papiller alanlar içeren, papiller alanların fokal odaklarda izlendiği ve geniş dallanmalar yapmadığı, tübüler alanlardaki berrak hücrelerin çizgisel olarak dizilip, nükleuslarının apikale veya ortaya yerleştiği, düşük nükleer dereceye sahip bir alt tip olarak tanımlanır. Tüm renal tümörlerin %1-4'ünü oluşturur (3). Moleküler olarak berrak hücreli RHK ve papiller RHK'dan farklı özellikleri vardır, lokal rekürrens ve metastaz bildirilmemiştir. İmmünohistokimyasal olarak diffüz CK7, karbonik anhidraz IX pozitifliği ve rasemaz ile CD10 negatifliği izlenir (72).

**Sınıflandırılmayan RHK** ise RHK'ların diğer alt tiplerine uymayan, tüm RHK'ların %5'ini oluşturan, düşük ya da yüksek gradeli olarak izlenebilen tümör grubudur (3).

#### 2.3.4. Renal Hücreli Karsinom Evrelemesi

RHK değerlendirilmesinde, klinik muayene, abdominal/pelvik bilgisayarlı tomografi (BT) ya da manyetik rezonans (MR) gibi yöntemlerle primer tümörün lokal ve uzak yayılımının değerlendirilmesi gerekmektedir. Perkütan biyopsi, renal hücreli karsinom dışı bir tümörden şüphelenildiğinde uygulanabilir ve diğer durumlarda cerrahi öncesi gerekli değildir. BT’de RHK genellikle solid, kontrast tutan kitle veya solid komponentleri olan kistik kitle şeklinde izlenir. Cerrahi rezeksiyon, primer tümörün üzerindeki perirenal yağ dokusu ve Gerota fasyası ile birlikte çıkarılması şeklinde uygulanır. Total veya lokalize tümörlerde parsiyel olarak yapılabilir. Retroperitoneal lenf nodülü diseksiyonu ve ipsilateral adrenal bezin çıkarılması da evreleme açısından önerilmektedir (4).

RHK, Tablo 2 ve Tablo 3’teki 8. TNM sınıflamasına göre evrelendirilmektedir. 8. TNM evreleme sistemi 2017 yılında çıkmış ve Ocak 2018’den itibaren yürürlüğe girmiştir.

Evreleme için patolojik tümör boyutu gereklidir. Ekstrarenal yayılım izlenen tümörlerde, en büyük tümör boyutu ekstrarenal alanı da kapsayacak şekilde verilmelidir. İntravasküler yayılımı olan tümörlerde tümör trombusu en büyük boyuta dahil edilmemektedir. Benzer makroskopik özellikteki multiple tümör nodüllerinin izlendiği materyallerde, en büyük 5 nodülün boyutu ölçülmeli ve en büyüğünün çapı T sistemi için T(m) şeklinde belirtilerek kullanılmalıdır.

Adrenal bez tutulumu M1 olarak sınıflandırılmakla birlikte, ipsilateral adrenal beze tümörün direkt invazyonu söz konusu ise T4 olarak sınıflandırılmaktadır.

T3a sınıflamasında renal ven ve segmental dallarına tümörün uzanımdaki makroskopik ibaresi artık kullanılmamaktadır ve segmental dalların tespiti için kas tabakasının görülme zorunluluğu kaldırılmıştır. Vasküler invazyon mutlaka mikroskopik olarak doğrulanmalıdır.

Perirenal/renal sinüs yağ dokusu invazyonu, desmoplastik yanıt oluşturmaya bakılmaksızın yağ dokusunda izlenen tümör hücrelerinin görülmesi ile konulur ve mutlaka mikroskopik olarak doğrulanmalıdır (6).

**Tablo 2. Renal Hücreli Karsinomların 8. TNM Sınıflaması (6).**

| T-Primer Tümör            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TX                        | Primer tümör değerlendirilemiyor.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| T0                        | Primer tümör kanıtı yok.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| T1                        | Tümör en büyük çapı $\leq 7$ cm, böbreğe sınırlı.<br>T1a: Tümör en büyük çapı $\leq 4$ cm, böbreğe sınırlı.<br>T1b: $4 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 7 \text{ cm}$ , böbreğe sınırlı.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| T2                        | Tümör en büyük çapı $> 7$ cm, böbreğe sınırlı.<br>T2a: $7 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 10 \text{ cm}$ , böbreğe sınırlı.<br>T2b: Tümör $> 10 \text{ cm}$ , böbreğe sınırlı.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| T3                        | Tümör ana venlere veya perirenal dokulara yayılmış fakat ipsilateral adrenal beze veya Gerota fasyasının dışına yayılım göstermiyor.<br>T3a: Tümör renal ven veya segmental dallarına yayılmış, veya pelvikalisijel sistemi invaze etmiş, veya perirenal ve/veya renal sinüs yağ dokusunu invaze etmiş fakat Gerota fasyasının dışına yayılım göstermiyor.<br>T3b: Tümör diyafragmanın altında vena kavaya yayılmış.<br>T3c: Tümör diyafragmanın üzerinde vana kavaya yayılmış, veya vena kava duvarını invaze etmiş. |
| T4                        | Tümör Gerota fasyasının dışına yayılmış (ipsilateral adrenal beze direkt invazyon dahil).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| N-Bölgesel Lenf Nodülleri |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Nx                        | Bölgesel lenf nodülleri değerlendirilemiyor.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| N0                        | Bölgesel lenf nodülü tutulumu yok.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| N1                        | Bölgesel lenf nodülü tutulumu var.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| M-Uzak Metastaz           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| M0                        | Uzak metastaz yok.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| M1                        | Uzak metastaz var.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

**Tablo 3. Renal Hücreli Karsinomlarda Evreleme (6).**

|                 | T             | N             | M  |
|-----------------|---------------|---------------|----|
| <b>Evre I</b>   | T1            | N0            | M0 |
| <b>Evre II</b>  | T2            | N0            | M0 |
| <b>Evre III</b> | T1            | N1            | M0 |
|                 | T2            | N1            | M0 |
|                 | T3            | N0            | M0 |
|                 | T3            | N1            | M0 |
| <b>Evre IV</b>  | T4            | Herhangi<br>N | M0 |
|                 | Herhangi<br>T | Herhangi<br>N | M1 |



### 2.3.5. Prognostik Faktörler

Güncel RHK evrelemesi olan 8. TNM sisteminde kullanılan, tümör boyutu, venöz invazyon, renal kapsül invazyonu, adrenal tutulum, Gerota fasyası tutulumu, perirenal yağ dokusu invazyonu, toplayıcı sistem invazyonu, lenf nodülü tutulumu ve uzak metastaz RHK için prognozda önemli anatomik faktörlerdir (6).

Aynı evredeki tümörlerde daha ileri prognostik parametreler histolojik alt tip, tümör derecesi (grade), tümör nekrozu varlığı, sarkomatoid ve rabdoid diferansiyasyon alanlarının varlığı olarak belirtilmiştir (5). RHK için çok sayıda histokimyasal ve moleküler biyomarker potansiyel prognostik faktörler olarak araştırılmakta olup henüz rutin kullanıma geçmemişlerdir (73).

#### Histolojik Alt tip

Toplayıcı duktus karsinomu, herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom ilişkili RHK ve renal medüller karsinomlar kötü prognozlu olduğu bilinen histopatolojik alt tiplerdir (59, 63, 64).

#### Nükleer Derece (Grade)

Nükleer derece, evre dışında tek başına en önemli bağımsız prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Tarihsel süreçte 2013'e kadar en yaygın kullanılan nükleer derecelendirme sistemi, zaman içinde çeşitli modifikasyonlara uğramakla birlikte temelde Fuhrman ve ark.'nın RHK tanısı alan 103 hastada tümör boyutu, patolojik evre, nükleus derecesi, hücre tipi ve paternini değerlendirerek oluşturduğu nükleer derecelendirme sistemidir. Bu sisteme göre nükleus yaklaşık 10 µm boyutunda olup, küçük, uniform ve nükleoller belirsiz ise derece 1; nükleus 15 µm, düzensiz sınırlı ve nükleolü ancak büyük büyütmede (x400) görülebiliyorsa derece 2; düzensiz sınırlı ve iri nükleusa sahip tümörlerde nükleol x100'lük büyütmede görülebiliyorsa derece 3 olarak sınıflandırılmıştır. Bizar şekilli ve multilobüle nükleuslara sahip tümörler ise derece 4 olarak kabul edilmiştir (74). Bu sistemin heterojen yapısından dolayı gözlemciler arası uyumun ve tekrarlanabilirliğinin son derece düşük olduğu vurgulanmıştır (3).

Bu nedenlerle 2013 yılında ISUP tarafından gerçekleştirilen toplantıda RHK derecelendirmesi için nükleol yapısına ve pleomorfizme dayanan yeni bir derecelendirme sistemi (ISUP derecelendirme sistemi) önerilmiştir. Bu yeni sistem DSÖ 2016 sınıflamasında kabul görmüştür. Yapılan çalışmalarda bu sistem sadece berrak hücreli RHK ve papiller RHK'larda prognoz belirteci olarak doğrulanmış olup diğer alt tiplerde validasyon sağlanamamıştır, yine de bu tümörlerde morfolojik özellikleri belirtmek için kullanılabileceği vurgulanmıştır (5). Kromofob RHK'larda nükleer derecelendirme sistemlerinden hiçbirinin prognostik değeri olmadığı için derecelendirme yapılması önerilmemektedir (73). Berrak hücreli RHK ve papiller RHK'larda DSÖ/ISUP nükleer derecelendirme sistemi tablo 4'te belirtilmiştir. Bu sistemde en önemli belirleyici nükleer belirginlik olarak ifade edilmiş olup derecelendirme en yüksek pleomorfizme sahip tek büyük büyütme alanında yapılmalıdır (75).

**Tablo 4. RHK'larda DSÖ/ISUP Nükleer Derecelendirme Sistemi (5).**

| Derece | Nükleol belirginliği                                                                               |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Yok ya da x400 büyütmede görülebilir, belirgin değil.                                              |
| 2      | Nükleol x100 büyütmede yok, x400 büyütmede belirgin                                                |
| 3      | Nükleol x100'lük büyütmede belirgin                                                                |
| 4      | Belirgin nükleer pleomorfizm, tümör dev hücreleri ve/veya sarkomatoid veya rabdoid diferansiyasyon |

### **Tümör Nekrozu**

Tümör nekrozunun prognostik önemi evreden bağımsız olarak berrak hücreli ve kromofob RHK'larda gösterilmiştir. Hem makroskopik hem de mikroskopik (koagülatif) nekroz belirtilmelidir (76). Papiller RHK'larda ise tartışmalıdır. Hastalara cerrahi öncesi arteriyel embolizasyon işlemi uygulandığında nekroz prognostik bir faktör olarak değerlendirilememektedir. Son çalışmalarda nekrozun yaygınlığının prognostik bir faktör olarak değerlendirilmesi tartışmalı olmakla birlikte yüzde olarak raporda belirtilmesi önerilmiştir (75).

### **Sarkomatoid ve Rabdoid Diferansiyasyon**

Kötü prognozla ilişkili olan bu faktörler çeşitli çalışmalarla incelenmiş olup sarkomatoid değişiklik gösteren tümörlerin 5 yıllık sağkalım oranları %15-22, rabdoid morfoloji içeren tümörlerin medyan sağkalım değerleri 8-31 ay olarak bildirilmiştir (5).

### **2.3.6. Renal Hücreli Karsinomda Moleküler Mekanizmalar ve Tedavi**

#### **Renal Hücreli Karsinom Moleküler Mekanizmaları**

RHK heterojen tümör biyolojisi olan bir kanserdir. Klinik bulgu vermemesi ve rutin tarama testlerinin mevcut olmaması nedeniyle çoğu zaman tanı anında ileri evre ve metastatik tümörlerin görülmesi söz konusu olmaktadır.

**VHL (von Hippel Lindau) geni**, RHK moleküler patogenezinde rol oynayan en önemli tümör supresör genlerdendir. İlk olarak von Hippel-Lindau ailesel kanser sendromuna sahip bireylerde 3. Kromozomun kısa kolunda 3p25-26 geni olarak tanımlanmıştır. Ardından hereditör RHK'ların tümünde ve sporadik berrak hücreli RHK'ların %50'sinde bu gende her iki allelde inaktivasyon tespit edilmiş ve tümör oluşumu, tümör progresyonu ile metastazda rolü olduğu gösterilmiştir (77). Berrak hücreli RHK olgularının %20'sinde ise genin promotor bölgesinde metilasyon ile epigenetik olarak fonksiyon kaybı gösterilmiştir (50).

Bu genin kodladığı protein olan von Hippel-Lindau proteini, çeşitli efektör proteinleri hedef proteinlere ulaştıran bir aracı görevi yapar. Etkilenen hedef proteinlerden en önemlisi heterodimer yapıdaki HIF-1 $\alpha$  (Hipoksi uyarılabilir faktör-1 alfa) proteini olup bu protein hipoksiye hücre yanıtını düzenleyen oksijen bağımlı ubiquitin aracılı proteolitik yıkım yolağında bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. HIF-1 $\alpha$  geni ise kromozom 14q'da yer alır. Demir düşüklüğü veya hipoksik şartlarda VHL proteini HIF-1 $\alpha$  'yı yıkamaz, HIF-1 $\alpha$  stabilize olarak çekirdeğe geçer ve kanser oluşumuna sebep olan birçok transkripsiyon ve büyüme faktörünü stabilize eder (51).

**VEGF-R(Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü)**, VHL gen kaybı ile artan büyüme faktörlerinden olan VEGF bağlandığı bir tirozin kinaz reseptörüdür. Gerek anjiogenik büyüme faktörleri, gerekse dolaylı yoldan konak

immün hücrelerinin salgıladığı aracı moleküller damarlanmayı artırır. HIF yolağının uyarılmasıyla VEGF-R1 (yeni kapiller organizasyonu) ve VEGF-R2 (endoteliyal hücre proliferasyonu, migrasyon, vasküler geçirgenlik) tirozin kinaz reseptörleri uyarılır. VEGF'in immünosupresif etkisi de gösterilmiştir, baskılanması antitümöral immüniteyi güçlendirir (78).

**m-TOR (rapamisinin memelilerdeki hedefi)** yolağı da RHK gelişiminde önemlidir ve bu yolağın sinyal iletimi HIF-1 $\alpha$  seviyesini artırır (79). m-TOR çok sayıda serin/treonin kinaz içeren, dörtlü kompleks yapıda, apoptozis, hücre büyümesi, tümör proliferasyonu, hücre katabolizma ve anabolizmasını kontrol ederek etkileyen anahtar bir mediatördür. m-TOR düzenleyici protein ile kompleks oluşturarak m-TORC1 ve m-TORC2 üzerinden etkisini yapar. Rapamisin m-TOR yolağının inhibitörüdür. m-TOR yolağı HIF-1 $\alpha$ 'nın etkisini de artırır (80).

**NF-KB (nükleer faktör kappa beta)**, proliferasyon, anjiogenez, apoptozun baskılanması, doku invazyonu, ilaç direnci, hücre döngüsü ile ilişkili bir transkripsiyon faktör ailesidir. VHL kaybı ile NF-KB aktivasyonu, HIF-1 $\alpha$  birikimine sebep olur. pVHL adaptör bir protein olarak NF-KB'ı azaltır (81).

**NOx**, en önemli kaynağı NADPH oksidaz sistemi olan ROS (reaktif oksijen türleri) türevidir. ROS'lar malign büyümede sinyal iletimine katılır. VHL mutant hücrelerde NOx4 protein seviyesi ve NADPH bağımlı süperoksid üretimi artmıştır. Bu durum RHK'nın metabolik bir kanser olduğunu düşündürmektedir (82).

**Tirozin kinaz reseptörleri (TKR)**, ekstrasellüler büyüme faktörlerinden hücre içine sinyal iletimini sağlayan transmembran protein süper ailesine ait reseptörlerdir. Neovaskülarizasyon, angiogenez, hücre yaşam süresinin uzatılması ve göç kapasitesi üzerinde etkileri bulunur (83).

**Mitojen-aktivasyonlu protein kinaz (MAPK)** yolağının aktivasyonu RHK'larda gösterilmiş diğer bir moleküler mekanizmadır. Bu enzim hücrenin hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenler. Fosforile MAPK'lara örnek olarak ekstrasellüler sinyal düzenleyici protein kinaz (ERK), c-JUN-NH2 kinaz (JNK) ve p38 MAPK (P38) verilebilir. ERK'nin sürekli aktivasyonu anjiogenez için gerekliliktir (84).

**Isı şok proteini-70 (HSP70)**, MHC bölgesinde bulunan inflamasyon ve strese yanıtta yer alan en az yedi geni içeren sınıf IV bölgesidir. HSP 70-2 kanser patogeneğinde rol oynayan, hücre döngüsü gibi düzenleyici işlemlerde immünolojik tümör ilişkili peptidler için bir şaperon molekülü gibi etki eden, antitümör bağışıklığını düzenleyen bir moleküldür. HSP 70-2 şaperon mutasyonu tümör hücrelerinde baskın etki yapar, son çalışmalarda berrak hücreli karsinomlarda agresif davranışla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (85).

### **Renal Hücreli Karsinomlarda Tedavi**

RHK'larda lokalize hastalıkta temel tedavi yöntemi total ve parsiyel nefrektomiyken, ileri ve metastatik hastalıkta sistemik tedavi protokollere eklenmektedir. Metastatik hastalıkta 5-florourasil immünoterapötik ajanlarla kombine edilerek kullanılmaktadır.

Standart ilk sıra tedavide yukarıda moleküler mekanizmaları açıklanan tirozin kinaz inhibitörleri (sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib), VEGF'ye karşı hedefe yönelik tedavi olan monoklonal antikor bevacizumab, m-TOR inhibitörleri (temsirolimus, everolimus) yer alır (16). İkinci sıra tedavide ise immün kontrol noktası inhibitörlerinden PD-1 inhibitörü olan nivolumabın tek başına veya tirozin kinaz inhibitörleri ile kombine kullanımı tedavi kılavuzlarına eklenmiştir (86, 87). PD-L1 inhibitörleri olan atezolizumab (88) ve durvalumab (89) moleküllerinin renal hücreli karsinomlarda kullanımı açısından henüz çalışmalar devam etmektedir (17).

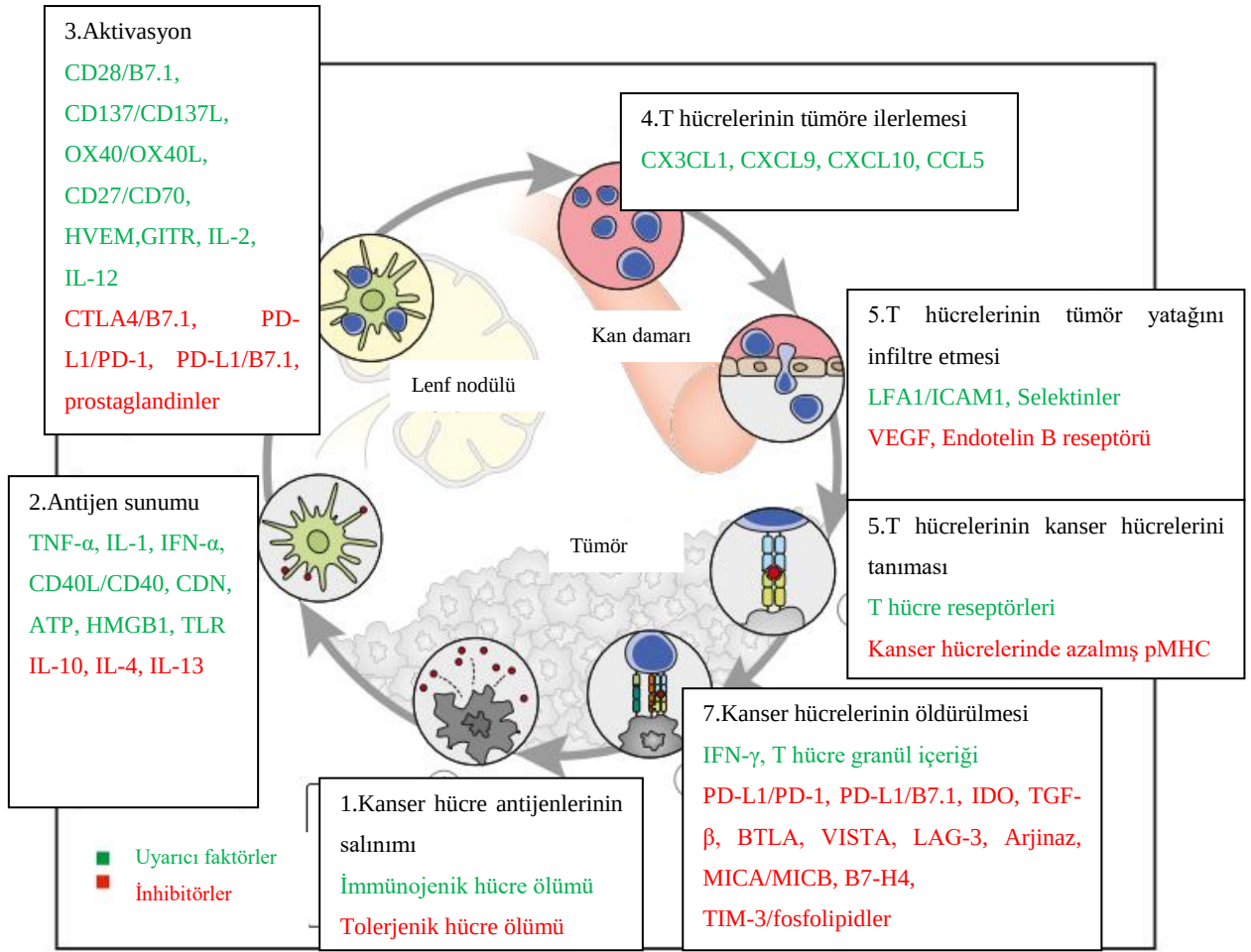
### **2.4. Tümör İmmünitisi ve İmmün Kontrol Noktaları**

Neoplastik hastalıkların ortaya çıkma ve devam etme sürecinde bu hücrelerin geçirdiği önemli değişiklikleri özetleyen 6 madde tanımlanmıştır. Bunlar; proliferatif sinyallerde devamlılık, büyüme inhibitörlerinden kaçınmak, hücre ölümüne direnç geliştirmek, replikatif ölümsüzlüğü mümkün kılmak, angiogenez, invazyon aktivasyonu ve metastazdır. Bu özelliklere son çalışmalarla neoplastik çoğalmayı en etkili şekilde desteklemek için hücresel metabolizmayı değiştirme veya yeniden programlama kabiliyeti (hücre enerji metabolizmasının

yeniden programlanması) ile kanser hücrelerinin, özellikle T ve B lenfositleri, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından sağlanan immünolojik yıkımdan kaçma kabiliyeti (immun yıkımdan kaçınmak) eklenmiştir (90).

Kansere karşı immün yanıt temel olarak yedi basamakta incelenebilir. İlk basamakta kanser hücrelerine ait antijenlerin salınması ve bunların işleminden geçmek üzere dendritik hücrelerce yakalanması yer alır. Bu durumun gerçekleşmesi için immünojenik sinyallerle bu sürecin desteklenmesi gereklidir. Bu sinyallerin proinflamatuvar sitokinler ve ölen tümör hücrelerinden veya barsak bakterilerinden salınan proinflamatuvar faktörler olduğu düşünülmektedir. İkinci basamakta dendritik hücrelerin yakalanan antijenleri MHCI ve MHCII molekülleri ile T hücrelerine sunması yer alır. Ardından üçüncü basamakta kanser spesifik antijenlere efektör T hücre yanıtlarının başlaması ve aktivasyonu izlenir. Oluşacak immün yanıtın çeşidi, regülatuar T hücreleri ve efektör T hücreleri arasındaki orana bağlı olarak bu basamakta belirlenir. Dördüncü basamakta aktive efektör T hücreleri tümör yatağına doğru ilerler ve beşinci basamakta tümör yatağını infiltre eder. Ardından kanser hücresi - T hücresi bağlanması T hücre reseptörleri (THR) – MHCI bağlanması ile gerçekleşir ve son basamakta hedef kanser hücreleri öldürülür. Kanser hücre ölümü ile ortaya çıkan tümör ilişkili antijenler siklusu yeniden ilk basamağa döndürür. Bu süreç, basamakları etkileyen uyarı ve inhibitör faktörlerle birlikte Şekil-3'te özetlenmiştir.

Bu süreç tümöre karşı oluşan temel immün mekanizma olmakla birlikte nadiren yeterli immün cevap ortaya çıkmakta ve tümör hücrelerinin geliştirdiği savunma mekanizmalarının da etkisiyle göreceli olarak zayıf bir T hücre yanıtı ortaya çıkmaktadır. Bu durum kansere karşı immünoterapide karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir (91).



Şekil-3: Kanser immünite siklusunda uyarıcı ve inhibitör faktörler (91).

Naiv CD8 T hücrelerinin aktive olarak çoğalması ve efektör fonksiyonlarını kazanması üç sinyal yolağı ile gerçekleşir. Sinyal 1 olarak adlandırılan başlangıç basamağında, antijen sunan hücreler tarafından yakalanarak MHC moleküllerine yüklenmiş kısa antijenik peptid parçaları (pMHC) halinde yüzeyde eksprese edilen tümör hücrelerine ait antijenler, T hücre reseptörleri tarafından tanınır. Tek başına bu tanınma yeterli değildir, sinyal 2 olarak adlandırılan basamakta antijen sunan hücreler ve T lenfositler arasında inhibitör veya stimülatör karakterde pek çok etkileşim meydana gelir (kostimülasyon). Bu basamağın en önemli bileşenleri, antijen sunan hücre ile T hücresi arasında gerçekleşen CD80/CD28, CD80/CTLA-4 ve PD-L1/PD1 etkileşimleridir. Sinyal 3 olarak adlandırılan süreçte ise IL-12 başta olmak üzere sitokinlerce T hücrelerindeki diferansiyasyon ve efektör kapasite düzenlenmektedir. Bu üç sinyalin bir arada olmaması sonuçta oluşacak efektör yanıtın gelişmemesine ve tümör hücrelerinin immüniteden kaçışına zemin hazırlamaktadır (92).

Tümör hücreleri üzerindeki güçlü ve zayıf antijenler tümörün immüniteden kaçınma mekanizmalarını ortaya koyar. Bu antijenler düzenlenerek tümöre karşı T hücre cevabı durdurulmaya çalışılır. Tümör immün yanıtının sinyal 2 aşamasında görev alan CTLA-4, PD-1, PDL-1 CD28, CD80 ve CD86 immün kontrol noktaları başlığında incelenmiştir.

### **İmmün Kontrol Noktaları**

Renal hücreli karsinom immünojenik bir tümördür ve karakteristik olarak çok sayıda tümör infiltre lenfosit içerir (7). Birçok çalışmada renal hücreli karsinomun konak antitümör immünitesinin gelişimini engelleyici özellikleri olduğu gösterilmiştir (8). Birçok tümörde olduğu gibi renal hücreli karsinomda da bu durum özellikle sitotoksik T lenfositlerin apoptozisinin uyarılması sonucu oluşur. T lenfosit apoptozisinin uyarılması, temelde 2 mekanizmayla; tümör hücrelerindeki FasL ekspresyonunun artırılması yolu ve immün kontrol noktalarının uyarılması yolu ile gerçekleşir (9). İmmün kontrol noktalarının uyarılması lenfositlerdeki koreseptör değişiklikleri ile meydana gelir. Tümör, lenfositlerdeki aktive edici koreseptörlerin reseptör sayısında azalmaya veya inhibe edici koreseptörlerin reseptör sayısında artmaya neden olur. Koreseptör ailesi iki büyük süper antijen ailesinden oluşur: immünglobulin süperailesi (IgSF) ve tümör nekroz faktör reseptör süperailesi (TNFRSF).

CD28 ve B7 en iyi tanımlanmış IgSF reseptörleridir. Bu iki reseptör ailesinin üyeleri primer olarak birbirleriyle etkileşmektedir. CTLA-4 ise B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) molekülleri ile CD28'in bağlanmasını engelleyen bir negatif düzenleyici olarak görev yapmaktadır (10).

#### **CTLA-4 (Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4)**

CTLA-4, naiv T hücre yüzeyinde bulunmayan, ancak T hücresi aktive olduğunda yüksek düzeyde eksprese edilerek CD28'in bağlandığı B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) moleküllerinin her ikisine birden yüksek afinite ile bağlanarak immün sistem üzerinde negatif düzenleyici bir etki yapan 36 aminoasitlik bir uzantıya sahip moleküldür. CTLA-4 bir yüzey reseptörü olmayıp hücrede



intraselüler veziküller içinde bulunur ve bir ligand bağlandığında yapısal değişikliğe uğrar. T hücre supresör fonksiyonlarının yerine getirilerek periferik tolerans gelişiminin sağlanması ve otoimmünitenin gelişiminin önlenmesinde fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. Tümöre karşı immün yanıtta ise, inhibitör etki göstererek tümörün immüniteden kaçışını hızlandırmaktadır (93).

#### **CD 28 – CD80/CD86**

CD28, T hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve efektör fonksiyonlarının oluşmasında görevli, T hücrelerinde bir yüzey reseptörü olarak eksprese edilen 44 kDa ağırlığında bir transmembran proteinidir. T lenfositlerde eksprese edilen bu reseptör, B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen glikoprotein yapıdaki moleküller olan CD80 ve CD86 ile bağlanarak T hücrelerinin efektör fonksiyonu kazanmasını sağlar. Sinyal 1 olarak adlandırılan THR-pMHC bağlanmasını kostimüle ederek ve bundan bağımsız sinyal oluşturarak hücre döngüsünü uyarma, sitokin seviyelerini artırma, T hücre sağkalımı ve diferansiyasyonunu düzenleme işlevleri olduğu gösterilmiştir. CD80, hücrede bazal düzeyde bulunan CD86'nın ekspresyonunu arttırarak bu işlevini gerçekleştirir.

Tümöre karşı immün yanıtta, CD80 geni güçlendirilmiş hücrelerde CD8 pozitif T hücreleri aracılı daha güçlü ve spesifik bir immün yanıt ortaya çıktığı bildirilmiştir (94).

#### **PD-1 ve PD-L1**

İmmüoglobülin süper ailesinin bir üyesi olan T hücre ko-inhibitör reseptörü olan PD-1, aktive T lenfositler, B lenfositler, NK hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve Treg hücreler gibi immün sistem hücrelerinde sentezlenen bir yüzey glikoproteinidir (11,12). PD1'in etkileşimde bulunduğu iki ligand mevcuttur: PD-L1 (B7-H1, CD274) ve PDL2 (B7-DC, CD273). Bu ligandlardan PD-L1, tümör hücreleri ve antijen sunan hücreler üzerinde bulunur (13). Normal immün yanıtta PD-L1, immün yanıtın sürekliliğini sağlamak için sentezlenirken tümör hücrelerinden salınan bazı sitokinler bu molekülün sentezlenmesini arttırarak tümör hücrelerini aktive T hücrelerinin sitolizinden korumaya çalışır.

PD-L1 ligandının, tümör spesifik T hücrelerindeki PD-1 reseptörüne bağlanması T hücrelerinin apoptozuna yol açarak tümör hücrelerinin immün yanıtta kaçışına olanak sağlar. (14).

Bu immün yanıtta kaçış mekanizmalarını anlamak yeni bir tedavi yaklaşımı olarak immünoterapinin gelişimine neden olmuştur. İmmün kontrol noktalarının keşfi kanser tedavisinde yeni bir çığır açmış ve tedavi hedefine tümör yerine immün sistemi oturtmuştur. (15).

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Etik Kurul**

Bu çalışmanın yapılmasına, bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına 01.03.2017 tarih ve 146 nolu karar ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nca karar verilmiştir.

#### **3.2. Hasta Seçimi ve Hazırlık**

Çalışmamızda 2008-2013 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde RHK tanısı ile radikal nefrektomi uygulanmış 103 hasta değerlendirildi. Hasta kayıt yazılımı olan MIAMED (2014 yılı temmuz ayından günümüze) ve MEDİ-PİS (2014 yılı temmuz ayı öncesi) programları üzerinden hastalara ait tanı yaşı, cinsiyet gibi demografik veriler, tanı tarihi, tümör lokalizasyonu, klinik evre, klinikçe son görülme tarihleri, metastaz gelişmişse lokalizasyonu ve gelişme tarihleri gibi klinik veriler tarandı. Ölen hastaların ölüm tarihi bilgileri hem hastane arşiv yazılımları (MIAMED ve MEDİ-PİS), Tıbbi Onkoloji ve Üroloji Bilim Dalı arşivindeki hasta dosyaları hem de "Ölüm Bildirim Sistemi" yazılımı taranarak elde edildi. Hastaların parafin blokları ve preparatları Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkarılarak incelendi. Bu materyallerden tümörlerin histolojik alt tipleri, tümör çapları, böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu durumları, renal pelvis-hiler yağ

doku invazyon durumları, cerrahi sınır değerlendirmesi, sarkomatoid/rabdoid diferansiyasyon gösterme durumları, nekroz içirme durumları veri olarak kayda alındı. Tüm hastaların 2016 yılı DSÖ sınıflamasına göre histolojik alt tipleri, 2013 DSÖ/ISUP nükleer derecelendirme sistemine göre nükleer gradeleri ve 8. AJCC TNM sistemine göre klinik evreleri yeniden belirlendi.

Çalışmaya dahil olma kriterleri, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılan incelemede renal hücreli karsinom tanısı almış olmak, hastanın parafin bloklarının ve preparatlarının tanı ve incelemeye uygun olması şeklinde belirlendi. Renal hücreli karsinom tanısı almamış olan, parafin blokları arşivde mevcut olmayan ve parafin bloklarında yeterli tümör hücresi izlenmeyen (<100 tümör hücresi) 3 hasta çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca yapılan gerçek zamanlı PCR incelemesinde yeterli RNA izolasyonu sağlanamayan 19 hasta da çalışma kapsamından çıkarıldı.

Bu kriterlerle çalışma için incelenen 103 hastadan 22 tanesi dışlanmış olup çalışma 81 hasta üzerinden yürütüldü.

### **3.3. PD-L1 İmmünohistokimyasal İnceleme Prosedürü ve Değerlendirilmesi**

Çalışmaya dahil edilen hastaların parafin bloklarının 4 mikronluk kesitleri hematoksilin-eozin ile boyanarak, Patoloji Anabilim Dalı mikroskopları (Olimpus) ile iki patolog tarafından incelenerek çalışma parametreleri açısından değerlendirildi ve en uygun tümör alanları cama yazar suya dayanıklı kalem ile işaretlendi. İşaretlenen preparatların ait oldukları bloklardan İHK'sal değerlendirme için Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na ait mikrotom cihazları kullanılarak her bir bloktan pozitif şarjlı lama 4 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler 50°C'de bir gece boyunca bekletildi. Alınan kesitlerde immünohistokimyasal PD-L1 antikoru uygulaması tam otomatik Daco boyama makinesinde standart prosedür kullanılarak yapıldı. Aşağıda maddeler halinde uygulanan immünohistokimya (İHK) prosedürü belirtilmiştir:

- Kesitlere, iki seri halinde 10 dakika ksilol, 5 dakika %100'lük alkol, 5 dakika %85'lik alkol, 5 dakika %75'lik alkol uygulandı ve deparafinizasyon işlemi yapıldı.

- Deparafinize edilen kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitler, 90°C'ye kadar ısıtılmış uygun antijen retrieval solüsyonunda önce 20 dakika süre ile sonra iki defa 5 dakika süre ile kaynatıldı.
- Kaynatma işleminden sonra kesitler 30 dakika soğumaya bırakıldı.
- Soğuma işleminin ardından kesitler tekrar distile su ve PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Kesitler endojen peroksit blokajının yapılması için hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solüsyonunda 1 dakika bekletildi.
- Bu muamelenin ardından kesitler tekrar distile su ve PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Boyama için kullanılacak primer antikor (Anti PD-L1 antibody [28-8, ab205921], RabMAb, abcam) 1/100 oranında dilüe edildi.
- Uygun şekilde dilüe edilen PD-L1 primer antikorları kesitlerin üzerine damlatıldı ve kesitler nemli ortamda 1 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda kesitler üzerine sekonder antikor (Dako Omnis, GV82311-2 EnVision FLEX Mini Kit, High pH) damlatıldı ve 10 dakika beklendi.
- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler üzerine HRP (streptavidin peroksidaz) damlatılarak 10 dakika beklendi.
- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler üzerine DAB (diaminobenzidin) solüsyonu damlatılarak 2 dakika beklendi.
- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler şale içine alınarak hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletildi.
- Süre bitiminde kesitlere çeşme suyunda yıkama yapıldı.
- Kesitler %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri halinde ksilolde 5 dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı.
- Dehidratasyonun tamamlanmasının ardından kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda analiz edildi.

Her bir vaka için antikorun boyanma değerlendirmesi yapıldı. PD-L1 boyanması tümör hücrelerinde ve tümör infiltrate lenfositlerde değerlendirildi.

Pozitif PD-L1 boyanması, zeminden ayırım yapılabilir şekilde, tam veya parsiyel olarak, lineer membranöz boyanma ve nükleer boyanma olarak tanımlandı. Negatif PD-L1 boyanması ise hiç boyanma izlenmemesi ve sitoplazmik granüler boyanma olarak tanımlandı. İHK'sal boyamalarda kontrol grubu olarak reaktif lenfoid doku hiperplazisi gösteren tonsil dokusu kesitleri kullanıldı.

#### **3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile PD-L1'in İnceleme Prosedürü**

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait parafin bloklarda PD-L1 gen ekspresyonu varlığını belirlemek için ilk basamakta RNA izolasyonu yapıldı, ikinci basamakta elde edilen RNA'dan cDNA (komplementer DNA) dönüşümü sağlandı. Üçüncü ve son basamakta ise PD-L1 için gerçek zamanlı PCR reaksiyonu hazırlandı.

Formalinle fikse olmuş parafine gömülü doku olması nedeniyle takiple ilişkili olduğu düşünülen durumlardan dolayı bazı örneklerden RNA elde edilemedi. Geriye kalan 81 renal hücreli karsinom olgusunda, bu hastalara ait tümör içermeyen böbrek alanları kontrol grubu olarak kullanılarak PD-L1 gen ekspresyon varlığı araştırıldı. Aşağıda maddeler halinde belirtildiği şekilde bu basamaklara ait prosedürler uygulandı.

#### **Formalinle Fikse Olmuş Parafine Gömülü Dokulardan RNA İzolasyonu**

- Çalışmaya dahil edilen hastaların parafin bloklarının hematoksil-eozin boyalı kesitleri Patoloji Anabilim Dalı mikroskopları (Olimpus) ile iki patolog tarafından incelendi ve en uygun tümör alanları cama yazar suya dayanıklı kalem ile işaretlendi.

- %80 ve daha fazla tümör alanı içeren parafin bloklardan doku büyüklüğüne bağlı olarak 5-20 µm'lik 3-5 adet ince kesit yapıldı. Tümör alanının küçük olması durumunda 5 µm kalınlığında kesitler lam üzerine alınarak tümör alanı lam üzerinden kazındı.

- Elde edilen kesitler RNase içermeyen 1,5 ml'lik steril santrifüj tüpleri içine alındı.

- RNA izolasyonu için parafine gömülü dokudan RNA izolasyon kiti kullanıldı (RNeasy FFPE kit, Kat No:73504; Qiagen).

- Dokunun deparafinizasyonu için santrifüj tüplerine 160 µl deparafinizasyon solüsyonu eklendi, vortekslendi ve kısa süreli santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı. Dokudaki parafin kalıntısına bağlı olarak aynı işlem bir kez daha tekrarlandı.

- 3 dakika boyunca 56°C'de inkübe edildi ve ardından oda sıcaklığında soğuması sağlandı.

- Üzerine 150 µl Buffer PKD eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı.

- 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj uygulandı.

- Süre sonunda 10 µl proteinaz K eklendi ve pipetle karıştırılarak dokunun parçalanması sağlandı.

- Önce 56 °C'de 15 dakika, ardından 80 °C'de 15 dakika inkübe edilerek DNA çapraz bağlantılarının açılması sağlandı.

- Süpernatant kısmı atılarak geriye kalan karışım yeni 2 ml'lik santrifüj tüplerine alındı.

- 3 dakika buzda inkübe edildi. Ardından 13,500 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulandı ve pellet hasarlandırılmadan süpernatant kısım yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı.

- 16 µl DNase Booster Buffer (total örnek hacminin 1/10'u) ve 10 µl DNase I stock solüsyonu eklendi. Kısa süreli santrifüj uygulandı.

- Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

- Bağlanma durumunu dengelemek için 320 µl Buffer RBC eklendi ve lizat iyice karıştırıldı.

- 720 µl %100 etanol eklendi ve santrifüj edilmeden pipetlenerek karıştırıldı.

- Örneğin 700 µl'si oluşan presipitatlarla birlikte 2 ml'lik tüplere yerleştirilmiş spin kolonuna aktarıldı. Ardından 15 saat 10.000 rpm'de santrifüj uygulandı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.

- Spin kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi ve 15 saat 10.000 rpm’de santrifüj uygulandı.
- 2 dakika daha 10.000 rpm’de santrifüj uygulanarak kolon membranı yıkandı.
- Spin kolonu yeni 2 ml’lik bir tüpe aktarıldı, kolonun ağzı açılarak son hızda 5 dakika santrifüj uygulandı.
- Spin kolonu, 1,5 ml’lik yeni bir tüpe aktarılarak kolon membranına 14 µl RNase içermeyen su eklendi. 1 dakika son hızda santrifüj uygulanarak RNA’nın ayrılması sağlandı.

### **RNA’ların Spektrofotometrik Ölçümü**

- Nanodrop kullanılarak her bir örnekte elde edilen RNA’ların miktar ve kalite ölçümü yapıldı.
- cDNA dönüşüm reaksiyonu için tüm örneklerde RNA miktarı 50 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde sulandırma işlemi yapıldı.

### **cDNA Dönüşümü**

cDNA dönüşümü için kit (RT<sup>2</sup> First Strand Kit, Kat. No: 330404, Qiagen) kullanıldı. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- RNA örneklerinden genomik DNA’nın eliminasyonu için steril bir tüpte kit içerisindeki bileşeler pipetlenerek ve kısa süreli santrifüj edilerek karıştırıldı. Bu aşamada gerekli bileşenler Tablo-5’de belirtilmiştir.

**Tablo 5. cDNA dönüşümünde genomik DNA eliminasyonu karışımı bileşenleri**

| Bileşen | Miktar |
|---------|--------|
|---------|--------|

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| <b>RNA</b>                | 25 ng- 5 µg  |
| <b>Buffer GE</b>          | 2 µl         |
| <b>RNase içermeyen su</b> | Değişken     |
| <b>Total volüm</b>        | <b>10 µl</b> |

- Oluşturulan genomik DNA eliminasyon karışımı 5 dakika 42 °C’de inkübe edildi ve 1 dakika boyunca buzda bekletildi.
- Revers transkripsiyon karışımı Tablo 6’da belirtildiği şekilde hazırlandı ve genomik DNA eliminasyon kiti içeren her tüpe 10 µl miktarında eklendi. Pipetlenerek karıştırıldı.

**Tablo 6. cDNA dönüşümünde revers transkripsiyon karışımı bileşenleri**

| <b>Bileşen</b>                          | <b>1 reaksiyon için gerekli miktar</b> |
|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>5x Buffer BC3</b>                    | 4 µl                                   |
| <b>Kontrol P2</b>                       | 1 µl                                   |
| <b>RE3 Revers Transkriptaz Karışımı</b> | 2 µl                                   |
| <b>RNase içermeyen su</b>               | 3 µl                                   |
| <b>Total volüm</b>                      | <b>10 µl</b>                           |

- 42 °C’de 15 dakika inkübe edildi ve hemen ardından 95 °C’de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu.
- Her reaksiyona 91 µl RNase içermeyen su eklendi. Pipetlenerek karıştırıldı.
- Reaksiyonlar buza yerletirilerek gerçek zamanlı PCR protokolüne geçildi.



### Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

PD-L1 gen ekspresyonunun belirlenmesi için PCR kiti (RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix, Kat. No:330520, Qiagen) kullanılmıştır. Endojen kontrol için insan PPIA (peptidilprolil izomeraz A, PPH013196, Qiagen) referans geni kullanılmıştır.

- PD-L1 genine spesifik primerler (CD274, PPH21094A, Qiagen) kullanılarak hem hedef gen hem de endojen referans gen için gerçek zamanlı PCR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon karışımı Tablo-7’de belirtildiği şekilde hazırlandı.

**Tablo 7. Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonu oluşturulmasında bir reaksiyon için gerekli bileşenler**

| Bileşen                              | 1 reaksiyon için gerekli miktar |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix | 12,5 µl                         |
| cDNA sentez reaksiyonu               | 1 µl                            |
| RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay    | 1 µl                            |
| RNase içermeyen su                   | 10,5 µl                         |
| <b>Total volüm</b>                   | <b>25 µl</b>                    |

- Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazında gerçek zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR döngüsü sıcaklık ve süreleri Tablo 8’de belirtilmiştir.

**Tablo 8. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu sıcaklık ve süre değerleri**

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| 95 °C | <b>10 dakika</b>      |
| 95 °C | 15 saniye (40 tekrar) |
| 60 °C | 30 saniye (40 tekrar) |

- Cihazın analiz yazılımı kullanılarak yeşil kanalda sonuç analizi yapıldı ve sonuçlar 'PD-L1 gen ekspresyonu var' ve 'PD-L1 gen ekspresyonu yok' şeklinde raporlandı.

### 3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi İstatistik Danışma Merkezi tarafından SPSS paket programı v20 (IBM, ABD) ile yapıldı. Veriler değerlendirilirken PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilerek 'PD-L1 ekspresyonu var' ve 'PD-L1 ekspresyonu yok' olarak gruplandırıldı ve demografik veriler ile prognostik parametrelerle ilişkisi bu gruplar üzerinden araştırıldı.

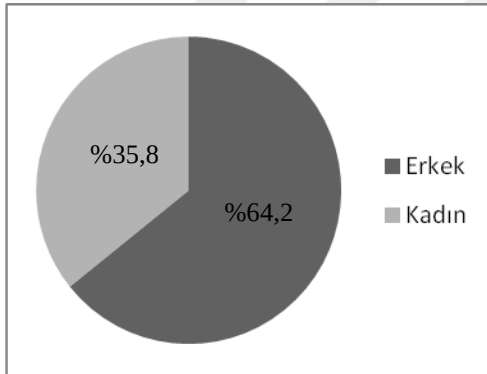
Çalışmada elde edilen verilere ait kategorik değişkenler olgu sayıları, ortalama±standart sapma ve frekans dağılımları (yüzde) olarak verildi. Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde, bağımsız t testi, iki eş arası ortalama fark testi, Pearson ki-kare testi, Fisher'in kesin testi, Mann Whitney U testi ile sağkalım analizleri için Life table, Kaplan-Meier ve Cox regresyon analizleri uygulandı. Yapılan değerlendirme sonucunda 0,05'ten daha düşük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve test sonuçları %95 güven aralığında değerlendirilerek tablolara eklendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik Veriler

Çalışmamız kapsamında 81 RHK tanılı hasta değerlendirilmiştir. Hastaların %64,2'si erkek (n=52), %35,8'i (n=29) kadındır (Tablo 9). Hastaların yaş aralığı 32-88 olup yaş ortalaması 58,74'dir (standart sapma 12,27). Tanı anından günümüze kadar yapılan incelemede hastaların mortalite oranı %29,6 (n=24)'dır. Erkeklerde mortalite oranı %34,6 (n=18), kadınlarda mortalite oranı %20,6 (n=6) olup iki cinsiyet arasında mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmemiştir (p= 0,352).

**Tablo 9. Hastaların cinsiyete göre dağılımı**



Çalışmamız kapsamında değerlendirilen 81 hastanın 16'sında PD-L1 ekspresyonu pozitif bulunmuştur.

Erkek hastaların %17,3 (n=9)'unda PD-L1 ekspresyonu izlenirken kadın hastalarda bu oranın %24,1 (n=7) olduğu izlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede cinsiyetler arasında PD-L1 ekspresyonu açısından anlamlı fark izlenmemiştir (p=0,459).

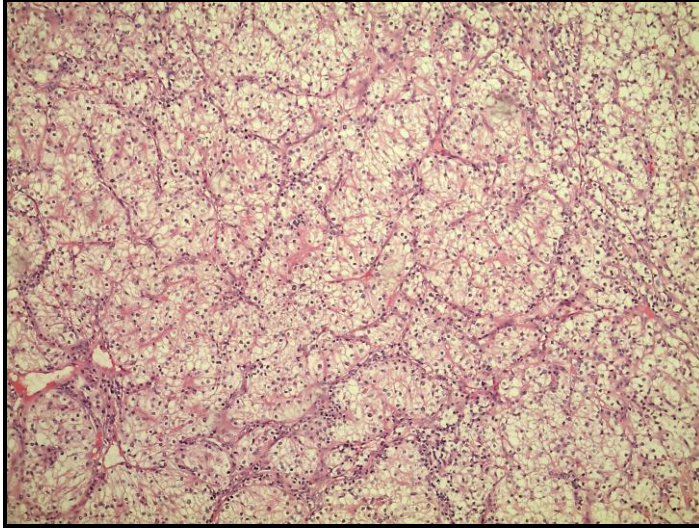
Yaş ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik yapılan değerlendirmede, PD-L1 ekspresyonu izlenen hastaların yaş aralığı 37-74 olup yaş ortalaması 57,43 (standart sapma 13,29)'tür. PD-L1 ekspresyonu ile yaş arasında

istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmemiştir ( $p=0,638$ ).

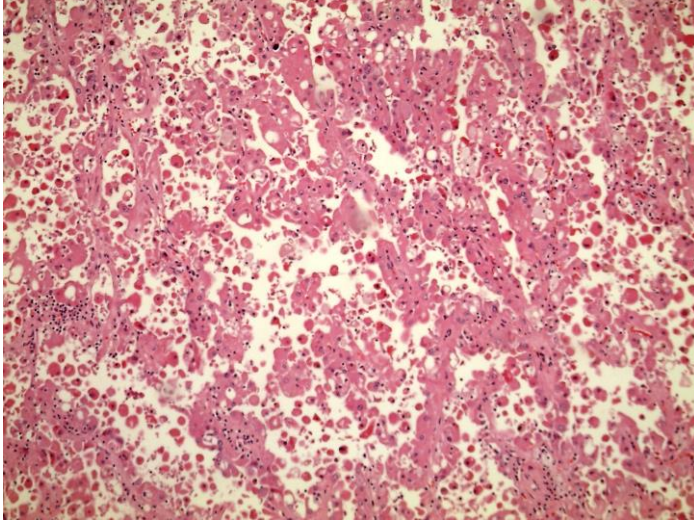
PD-L1 ekspresyonu izlenen hastalarda (toplam 16) mortalite oranı %37,5 ( $n=6$ ) olup, ekspresyon olan ve olmayan gruplarla mortalite oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ( $p=0,357$ ).

#### 4.2. Histolojik Alt Tipler

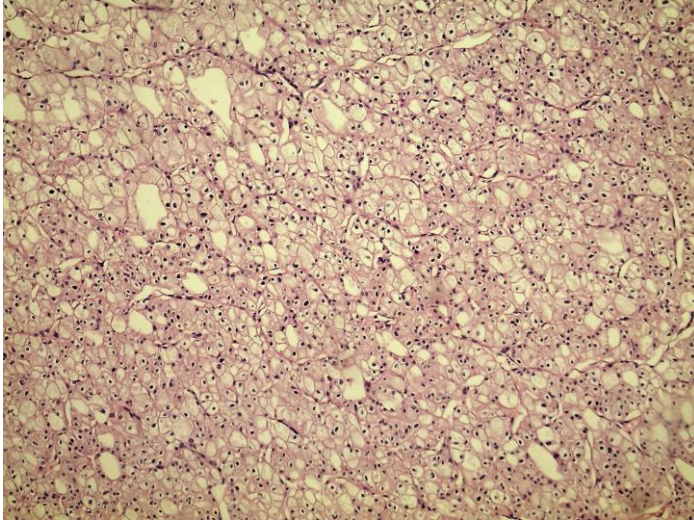
Hastalar 2016'da güncellenen DSÖ RHK sınıflamasına göre yeniden değerlendirilmiş ve histopatolojik olarak berrak hücreli, papiller ve kromofob hücreli olarak üç alt tip saptanabilmiştir (Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6). Bu alt tipler içinde %69,1 ( $n=56$ )'i berrak hücreli, %17,3 ( $n=14$ )'ü papiller ve %13,6 ( $n=11$ )'sı kromofob hücreli alt tiptir (Tablo 10). Berrak hücreli alt tipte mortalite oranı %32,1 ( $n=18$ ), papiller alt tipte mortalite oranı %35,7 ( $n=5$ ) ve kromofob hücreli alt tipte mortalite oranı % 9,1 ( $n=1$ ) olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında mortalite oranlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p=0,292$ ).



*Şekil 4 Berrak hücreli alt tip*

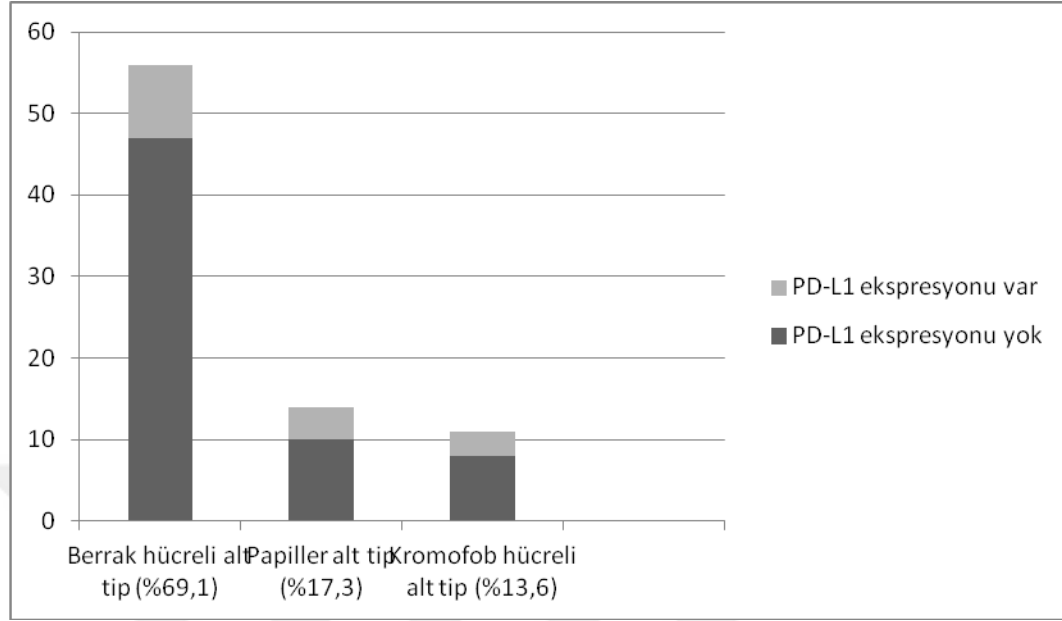


*Şekil 5 Papiller alt tip*



*Şekil 6 Kromofob hücreli alt tip*

**Tablo 10. Hastaların histolojik alt tipe göre dağılımı**



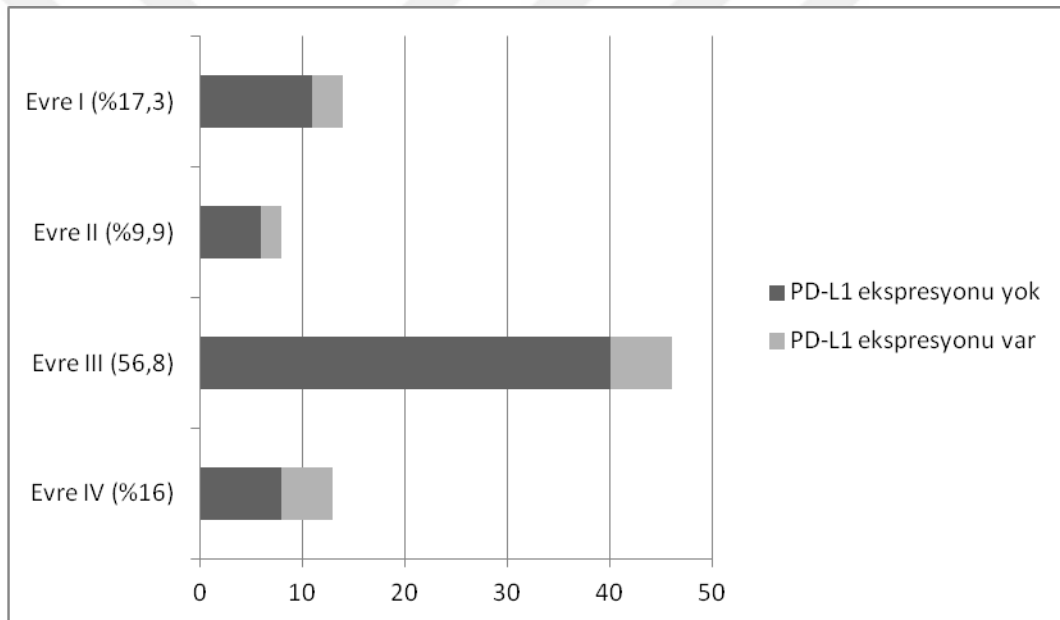
PD-L1 ekspresyonu, berrak hücreli alt tipe sahip hastaların %16,1 (n=9)'inde, papiller alt tipe sahip hastaların %28,6 (n=4)'sında, kromofob hücreli alt tipe sahip hastaların %27,3 (n=3)'ünde izlenmiştir. Bu alt tipler arasında PD-L1 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,386).

#### **4.3. Evre**

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik ve patolojik evreleri 2018 yılında kullanılmaya başlanan 8. TNM evreleme sistemine göre güncellenmiştir. Tanı anında hastaların %17,3 (n=14)'ü Evre I, %9,9 (n=8)'u Evre II, %56,8 (n=46)'i Evre III ve %16 (n=13)'sı Evre IV olarak bulunmuştur (Tablo 11).

Prognostik faktörlerin kendi aralarındaki karşılaştırmalarında istatistiksel olarak evre ile cinsiyet ( $p=0,439$ ), histolojik alt tip ( $p=0,134$ ), sarkomatoid ve rabdoid diferansiyasyon ( $p=0,205$ ) ve nekroz ( $p=0,506$ ) arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Diğer prognostik faktörlerden böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu durumu ( $p<0,001$ ), renal pelvis ve hiler yağ doku invazyonu durumu ( $p<0,001$ ), nükleer grade ( $p<0,001$ ) ve mortalite ( $p<0,001$ ) yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı şekilde ileri evre hastalarda gözlenmiştir.

**Tablo 11. Hastaların tanı anındaki evrelerine göre dağılımı**



.PD-L1 ekspresyonu evre I hastaların %21,4 ( $n=3$ )'ünde, evre II hastaların %25 ( $n=2$ )'inde, evre III hastaların %13 ( $n=6$ )'ünde, evre IV hastaların %38,5 ( $n=5$ )'inde izlenmiştir. İstatistiksel olarak evre ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki yoktur ( $p=0,196$ ).

#### 4.4. Uzak metastaz

Hastaların %14,8 (n=12)'i tanı anında metastatik olarak izlenmiştir. Bunlardan %41,7 (n=5)'sinde PD-L1 ekspresyonu mevcuttur. Hastaların klinik takiplerinde ilerleyen dönemlerde 10 hastada daha metastaz ortaya çıkmış olup metastatik hasta oranı %27,2 (n=22)'ye yükselmiştir. Metastaz izlenen tüm hastalar değerlendirildiğinde PD-L1 ekspresyonu %22,7 (n=5) oranında görülmüştür. İstatistiksel olarak tanı anında metastatik olan hastalardaki PD-L1 ekspresyonu pozitifliği sınırda olarak görülmüştür (p=0,054). Takipler sonucunda tüm metastaz gelişen hastalar değerlendirildiğinde ise PD-L1 ekspresyonu pozitifliği ile anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,756). Metastatik hastalarda PD-L1 ekspresyon durumları Tablo 12'de özetlenmiştir.

**Tablo 12. Metastatik hastalarda PD-L1 ekspresyonu**

|    | Yaş | Cinsiyet | Metastaz tarihi | Metastaz yeri        | Alt tip     | Tanı evresi | PD-L1 ekspresyonu |
|----|-----|----------|-----------------|----------------------|-------------|-------------|-------------------|
| 1  | 65  | E        | Tanı anında     | Akciğer              | Berrak h.   | 4           | -                 |
| 2  | 45  | E        | Tanı anında     | Akciğer              | Papiller    | 4           | +                 |
| 3  | 61  | E        | 8 ay sonra      | Beyin                | Berrak h.   | 3           | +                 |
| 4  | 53  | E        | 7 yıl sonra     | Akciğer              | Berrak h.   | 3           | -                 |
| 5  | 67  | E        | Tanı anında     | Karaciğer ve akciğer | Berrak h.   | 4           | +                 |
| 6  | 53  | E        | 4 yıl sonra     | Akciğer              | Berrak h.   | 2           | -                 |
| 7  | 68  | K        | 2 ay sonra      | Karaciğer            | Berrak h.   | 3           | -                 |
| 8  | 60  | K        | Tanı anında     | Karaciğer ve akciğer | Berrak h.   | 4           | -                 |
| 9  | 72  | K        | Tanı anında     | Karaciğer            | Berrak h.   | 4           | -                 |
| 10 | 76  | K        | Tanı anında     | Kemik                | Berrak h.   | 4           | +                 |
| 11 | 61  | E        | Tanı anında     | Karaciğer ve akciğer | Papiller    | 4           | -                 |
| 12 | 52  | E        | 1 ay sonra      | Akciğer              | Berrak h.   | 3           | -                 |
| 13 | 57  | E        | Tanı anında     | Kemik                | Kromofob h. | 4           | +                 |
| 14 | 47  | E        | 7 ay sonra      | Akciğer              | Berrak h.   | 3           | -                 |
| 15 | 44  | E        | Tanı anında     | Akciğer-kemik        | Berrak h.   | 4           | -                 |
| 16 | 62  | E        | 4 yıl sonra     | Akciğer              | Kromofob h. | 3           | -                 |
| 17 | 66  | E        | Tanı anında     | Akciğer              | Berrak h.   | 4           | -                 |
| 18 | 56  | E        | 3 yıl sonra     | Akciğer              | Kromofob h. | 3           | -                 |



|    |    |   |             |           |             |   |   |
|----|----|---|-------------|-----------|-------------|---|---|
| 19 | 37 | E | 2 yıl sonra | Karaciğer | Kromofob h. | 3 | - |
| 20 | 78 | E | Tanı anında | Akciğer   | Berrak h.   | 4 | - |
| 21 | 51 | K | 3 yıl sonra | Akciğer   | Berrak h.   | 3 | - |
| 22 | 59 | E | Tanı anında | Beyin     | Berrak h.   | 4 | - |

#### 4.5. Nükleer grade

Çalışmaya dahil edilen hastaların nükleer gradeleri 2013 yılında revize edilen DSÖ/ISUP nükleer derecelendirme sistemine göre güncellenmiştir. Kromofob hücreli RHK'lara nükleer grade verilmemiştir. Diğer alt tiplere sahip hastaların %61,4 (n=43)'ü grade 2, %24,2 (n=17)'si grade 3, %1,4 (n=10)'ü grade 4 olarak izlenmiştir. Hastalarda grade 1 nükleer özellikler izlenmemiştir.

PD-L1 ekspresyonu nükleer grade 2 olan hastaların %23,5 (n=12)'inde, grade 3 olan hastaların %15,8 (n=3)'inde ve grade 4 olan hastaların %9,1 (n=1)'inde görülmüştür. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde PD-L1 ekspresyonu ile nükleer grade arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,558).

#### 4. 6. Diğer Prognostik Faktörler

Sarkomatoid ve rabdoid diferansiyasyon hastaların %4,9 (n=4)'unda görülmüş olup bu hastalarda PD-L1 ekspresyonu görülmemiştir.

Nekroz makroskopik ve/veya mikroskopik olarak hastaların %61,7 (n=50)'sinde görülmüştür. Nekroz görülen hastaların %20 (n=10)'sinde PD-L1 ekspresyonu izlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,943).

Böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu evreyi değiştiren parametrelerden olup hastaların %23,5 (n=19)'inde izlenmiştir. Bu hastalarda PD-L1 ekspresyonu %26,3 (n=5) oranında görülmüştür. İstatistiksel açıdan anlamlı değildir (p=0,511).

Renal pelvis ve hiler yağ doku invazyonu evreyi değiştiren parametrelerden olup hastaların %66,7 (n=54)'sinde görülmüştür. Bu hastalarda

PD-L1 ekspresyonu %18,5 oranında izlenmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı değildir ( $p=0,693$ ).

Hastalarda izlenen tümör çapı ortalaması 6,55 cm (standart sapma 2,62) olup tümör çapları 2-13,6 cm arasında değişmektedir. Tümör çapı ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik yapılan değerlendirmede, PD-L1 ekspresyonu izlenen hastalarda tümör çapı 3-11,5 cm arasında değişmekte olup ortalama 6,8 cm (standart sapma 2,65)'dir. PD-L1 ekspresyonu ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmemiştir ( $p=0,638$ ).

#### 4.7. Sağkalım

Çalışmamıza dahil olan tüm hastaların genel olarak ortalama sağkalım süresi 89,38 aydır (standart sapma 5,31). Tanı konulduktan sonra tüm hastaların 1 yıl içinde hayatta kalma oranı %78 iken 5 yıl içinde hayatta kalma oranı %71'e düşmektedir.

Cinsiyetler arası yapılan karşılaştırmalarda kadınlarda ortalama sağkalım süresi  $98,56 \pm 7,92$  ay, erkeklerde  $83,88 \pm 6,95$  ay olarak bulunmuştur. 1 yıllık sağkalım oranları kadınlarda %86 ve erkeklerde %84 iken 5 yıl sonunda bu oran kadınlarda %79'a, erkeklerde %67'ye düşmektedir. İstatistiksel olarak kadın ve erkeklerde sağkalım açısından anlamlı fark görülmemiştir ( $p=0,2$ ).

Çalışma grubumuzdaki hastalarda izlenen 3 histolojik alt tip içinde ortalama sağkalım süresi en yüksek olan alt tip kromofob hücreli ( $112,90 \pm 6,76$  ay) olarak bulunmuştur. Berrak hücreli alt tipte ortalama sağ kalım süresi  $87,03 \pm 6,46$  ay ve 1 ile 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %71 ve %69 olarak belirlenmiştir. Ortalama sağkalım süresi en düşük olan alt tip ise papiller alt tiptir ( $80,92 \pm 13,92$  ay). Alt tipler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak incelendiğinde ise sağkalımla anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0,266$ ).

Evreyi belirleyen parametrelerden böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu izlenen hastalarda ortalama sağkalım süresi  $49,21 \pm 11,34$  ay olup 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %68 ve %29 olarak hesaplanmıştır. Böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu izlenen hastalarda sağkalımın belirgin şekilde azaldığı istatistiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,001$ ). Diğer bir parametre olan renal pelvis ve hiler yağ doku invazyonu değerlendirildiğinde ise invazyon

olanlarda ortalama sağkalım süresi  $80,64 \pm 5,97$  ay, 1 ile 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %85 ve %70 olarak izlenmiştir. Bu parametre ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0,521$ )

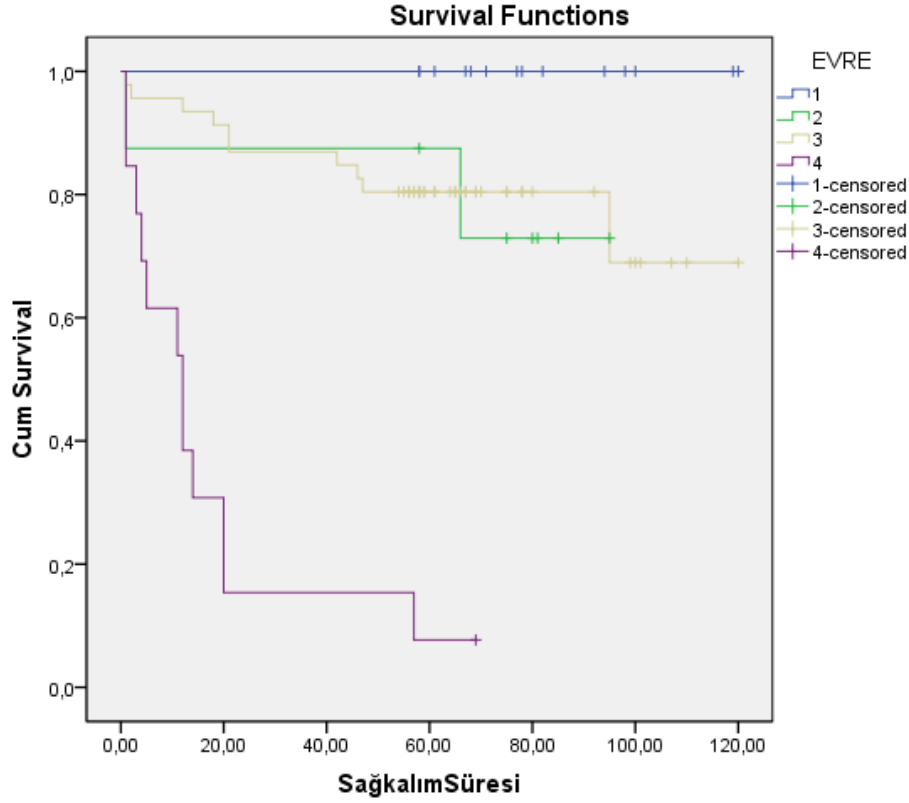
Sarkomatoid veya rabdoid diferansiyasyon izlenen hastalarda ortalama sağkalım süresi  $21,5 \pm 11,45$  ay olup 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %87 ve %75 olarak belirlenmiştir. Sarkomatoid veya rabdoid diferansiyasyonun sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir ( $p=0,005$ ).

Makroskopik veya mikroskopik olarak nekroz bulunan hastalarda ortalama sağkalım süresi  $77,98 \pm 7,12$  ay iken 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %80 ve %59 olarak bulunmuştur. Bu parametrenin sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir ( $p=0,004$ ).

Çalışmamızdaki hastalarda nükleer grade'ler incelendiğinde nükleer grade 2 olan hastaların ortalama sağkalım süresi  $101,99 \pm 5,54$  ay iken, bu değer nükleer grade 3 olan hastalarda  $81,15 \pm 8,74$  aya, nükleer grade 4 olan hastalarda ise  $19,18 \pm 6,73$  aya kadar düşmektedir. Nükleer grade istatistiksel olarak sağkalımı belirgin şekilde azaltan parametrelerden biri olarak bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

Evre ile sağkalım ilişkisinin araştırıldığı log rank analizlerine göre özellikle evre IV hastalıkta sağkalım süresinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı izlenmiştir ( $p=0,002$ ). Evre IV hastalarda 1 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %38 ve %7 olarak bulunmuştur. Evre sağkalım ilişkisinin gösterildiği Kaplan-Meier analizi Şekil 7'de gösterilmiştir. Uygulanan tek değişkenli Cox regresyon analizlerinde evre I ile karşılaştırıldığında evre III hastalığın ölüm riskini 9,3 kat, evre IV hastalığın ise ölüm riskini 10,6 kat arttırdığı görülmüştür

( $p<0,001$ ).



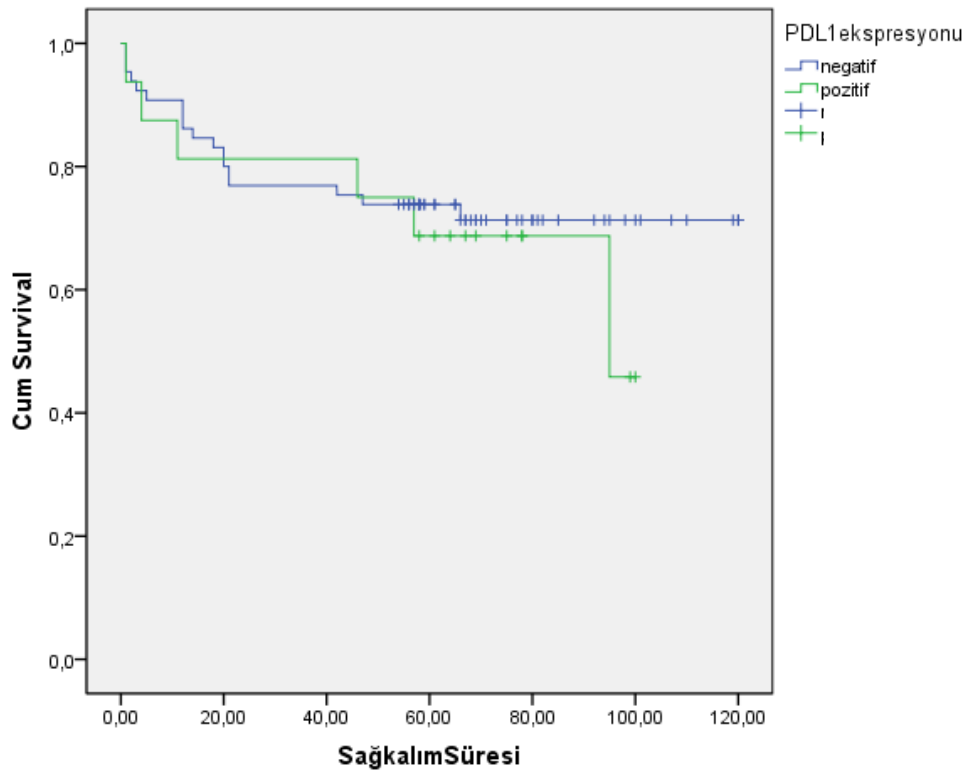
Tanı anında metastatik olan hastalarda ortalama sağkalım süresi  $28,16 \pm 10$  ay iken 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %50 ve %16 olarak bulunmuştur. Tanı anında metastatik olan hastalarda istatistiksel olarak belirgin şekilde sağkalımda azalma izlenmiştir ( $p<0,001$ ). Takipleri sırasında metastaz gelişen hastalar da bu grupla birlikte değerlendirildiğinde ise tüm metastaz gelişen hastalarda ortalama sağkalım süresi  $40,5 \pm 7,97$  ay, 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %63 ve %22 olarak hesaplanmıştır, metastatik olma durumunun sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir ( $p<0,001$ ).

Çalışmamıza dahil edilen PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastaların ortalama sağkalım süresi  $75,04 \pm 9,26$  ay olarak bulunmuştur. Hastaların 1 yıllık sağkalım oranları %81 iken 5 yıllık sağkalımda bu oran %67'ye düşmektedir. Hastaların PD-L1 ekspresyon durumlarına göre ortalama sağkalım süreleri tablo 13'te gösterilmiştir. Log Rank analizlerine göre istatistiksel olarak incelendiğinde PD-L1 ekspresyonu gösterme durumu ile sağkalım arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,526$ ). Hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği şekil 8'de gösterilmiştir.

**Tablo 13. Hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre ortalama sağkalım süreleri**

| PD-L1 ekspresyonu | Ortalama sağkalım (ay) | Standart sapma | %95 güven aralığı |           |
|-------------------|------------------------|----------------|-------------------|-----------|
|                   |                        |                | Alt sınır         | Üst sınır |
| <b>Pozitif</b>    | 75,04                  | 9,26           | 56,87             | 93,20     |
| <b>Negatif</b>    | 91,11                  | 5,85           | 79,65             | 102,58    |
| <b>Genel</b>      | 89,38                  | 5,31           | 78,97             | 99,79     |

Yapılan tek değişkenli Cox regresyon analizlerinde ise PD-L1 ekspresyonu izlenen hastalarda, izlenmeyenlere göre ölüm riskinin 1,3 kat arttığı görülmüştür; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,530$ ).



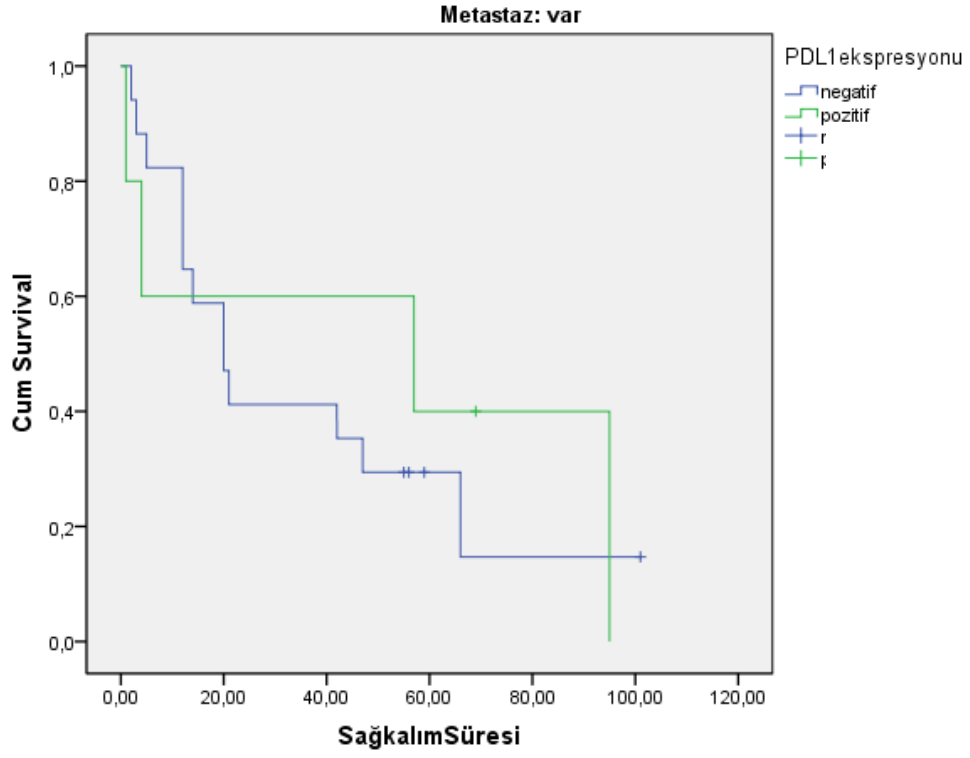
*Şekil 8 Hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği*

Ayrıca metastatik RHK'ye sahip hastalarda PD-L1 ekspresyonu izlenen ve PD-L1 ekspresyonu izlenmeyen alt gruplar arasında sağkalım kıyaslaması yapılmıştır. Buna göre metastatik hastaların PD-L1 ekspresyonu gösteren alt grubunda ortalama sağkalım süresi  $50,4 \pm 21,43$  ay olup, 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %50 ve %40 olarak bulunmuştur.

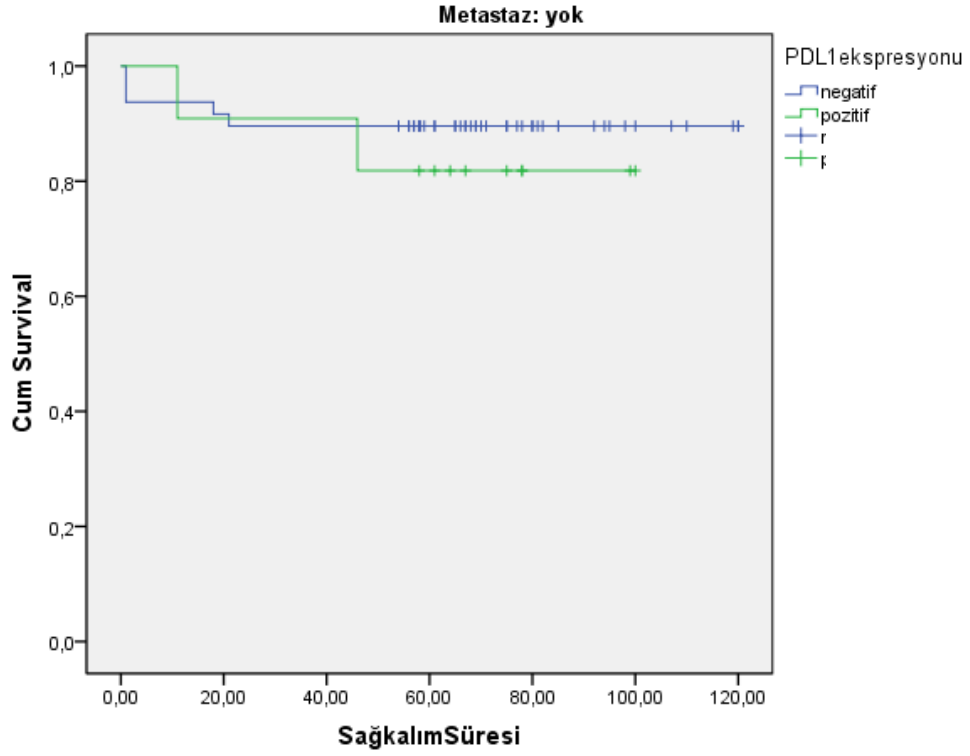
PD-L1 ekspresyonu göstermeyen alt grupta ise ortalama sağkalım süresi  $36,91 \pm 8,6$  ay olarak izlenmiştir. 1 yıllık ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %64 ve %14 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak incelendiğinde bu iki alt grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir ( $p=0,729$ ).

Metastatik hastalardaki PD-L1 ekspresyon durumuna göre sağkalım grafiği şekil 9'da, metastaz görülmeyen hastalardaki PD-L1 ekspresyon durumuna göre sağkalım grafiği şekil 10'da gösterilmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen tüm prognostik faktörlerin PD-L1 gen ekspresyon durumları tablo 15'te özetlenmiştir.



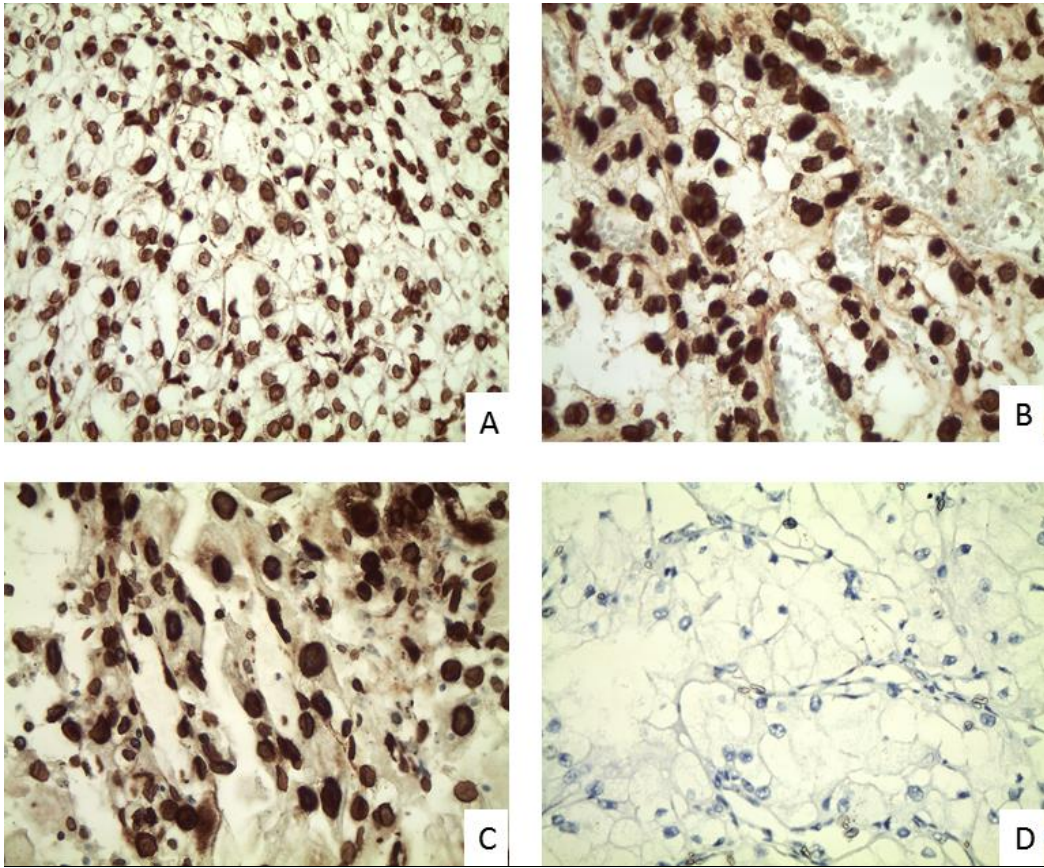
Şekil 9 Metastatik hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği



Şekil 10 Metastatik olmayan hastaların PD-L1 ekspresyonuna göre sağkalım grafiği

#### 4.8. İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları

İHK'sal olarak, zeminden ayırım yapılabilir şekilde, tam veya parsiyel olarak, lineer membranöz boyanma ve nükleer boyanma olarak tanımlanan pozitif PD-L1 boyanması 3 hastada (%3,7) izlenmiştir. Diğer hastalarda hiç boyanma izlenmemesi veya sitoplazmik granüler boyanma izlenmesi olarak tanımlanan negatif PD-L1 boyanması görülmüştür. Boyanma sonuçları şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11 PD-L1 immünohistokimyasal boyanma sonuçları. A) Kromofob hücreli RHK'da tümör hücrelerinde membranöz ve nükleer boyanma (PD-L1x400) B) Papiller RHK'da tümör hücrelerinde membranöz ve nükleer boyanma (PD-L1x400) C) Berrak hücreli RHK'da tümör hücrelerinde zayıf membranöz ve nükleer boyanma (PD-L1x400) D) Tümör hücrelerinde negatif boyanma (PD-L1x400)



İHK'sal olarak PD-L1 boyanması izlenen hastalar, histolojik alt tipleri açısından değerlendirildiğinde, bu hastalardan 1'i berrak hücreli alt tipte, 1'i kromofob alt tipte ve 1'i papiller alt tiptedir. Bunlardan üçünde de kantitatif gerçek zamanlı PCR ile PD-L1 gen ekspresyonu gösterilmiştir. PCR ile PD-L1 gen ekspresyonu izlenen 13 vakada ise İHK'sal boyanma gösterilememiştir. Çalışmamızdaki İHK'sal boyanma sonuçları PCR ile gösterilen gen ekspresyonu varlığı ile korele değildir.

İHK'sal PD-L1'in tanı koyma gücü yani özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. İHK'sal PD-L1'in PCR ile belirlenen PD-L1 gen ekspresyonu negatif olan hastaları bulma gücü yani duyarlılığı ise zayıf (%18) olarak bulunmuştur (Tablo 14).

**Tablo 14. PD-L1 için PCR ve İHK sonuçlarının karşılaştırılması**

|              |         | PD-L1 PCR |         | Toplam |
|--------------|---------|-----------|---------|--------|
|              |         | negatif   | pozitif |        |
| PD-L1<br>İHK | negatif | 65        | 13      | 78     |
|              | pozitif | 0         | 3       | 3      |
| Toplam       |         | 65        | 16      | 81     |

#### 4.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile PD-L1 Gen Ekspresyonu İnceleme Sonuçları

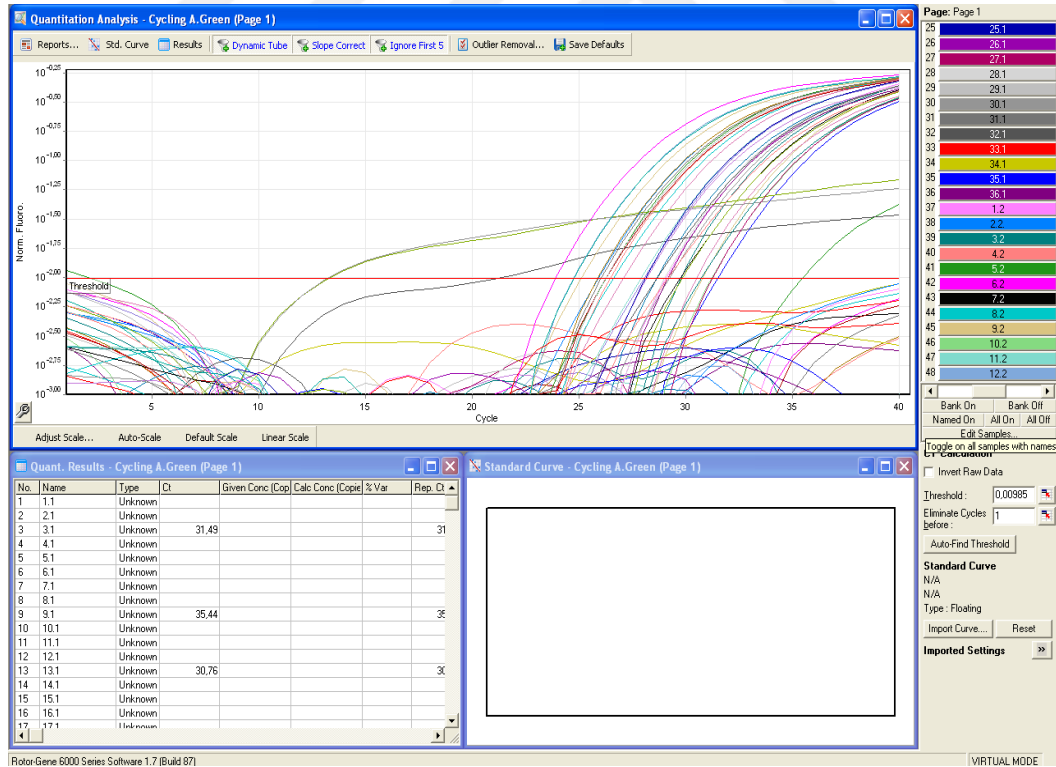
Çalışmamıza alınan ve PCR ile PD-L1 gen ekspresyonu araştırılan hastaların 19'unda formalinle fikse olmuş parafine gömülü doku olması nedeniyle takiple ilişkili olduğu düşünülen durumlardan dolayı RNA elde edilememiştir. Geriye kalan 81 hastada, PCR ile PD-L1 gen ekspresyonu pozitif izlenen 16 hasta (%19,75), negatif izlenen 65 hasta (%80,25) tespit edilmiştir.

PD-L1 gen ekspresyonu pozitif hastaların %56,3 (n=9)'ü erkek, %43,7'si (n=7) kadın cinsiyettedir. Histolojik alt tip dağılımları açısından %56,3 (n=9)'ü berrak hücreli alt tipte, %25 (n=4)'i papiller alt tipte, %18,8 (n=3)'i kromofob hücreli alt tipte izlenmiştir. %31,3 (n=11)'ünde böbrek kapsülünde tümör

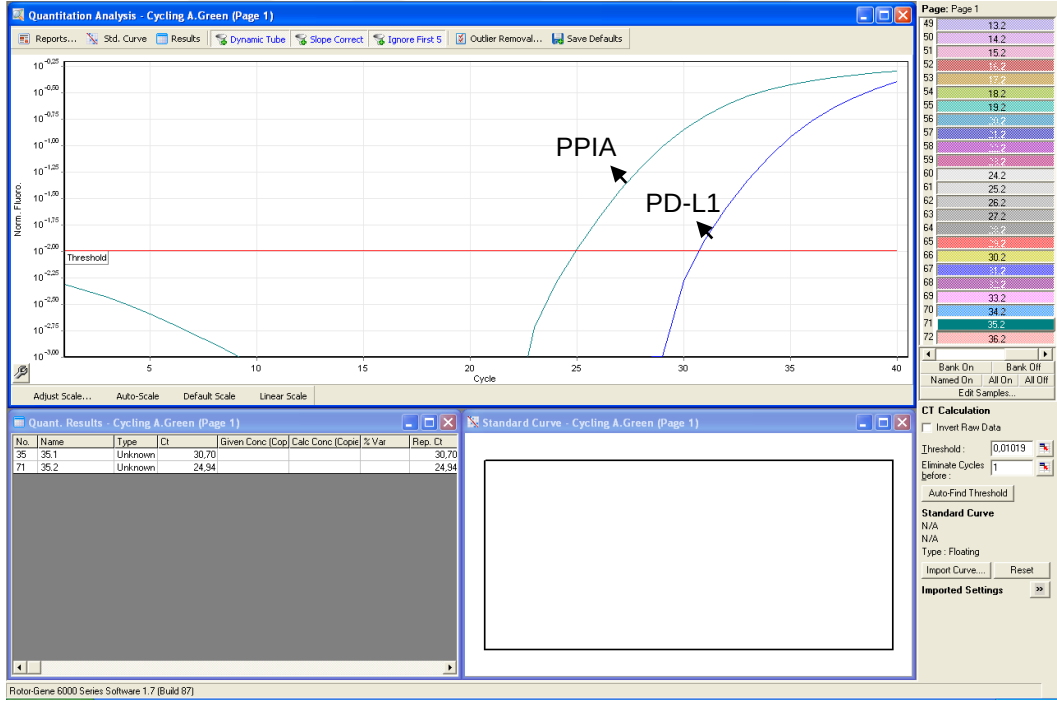
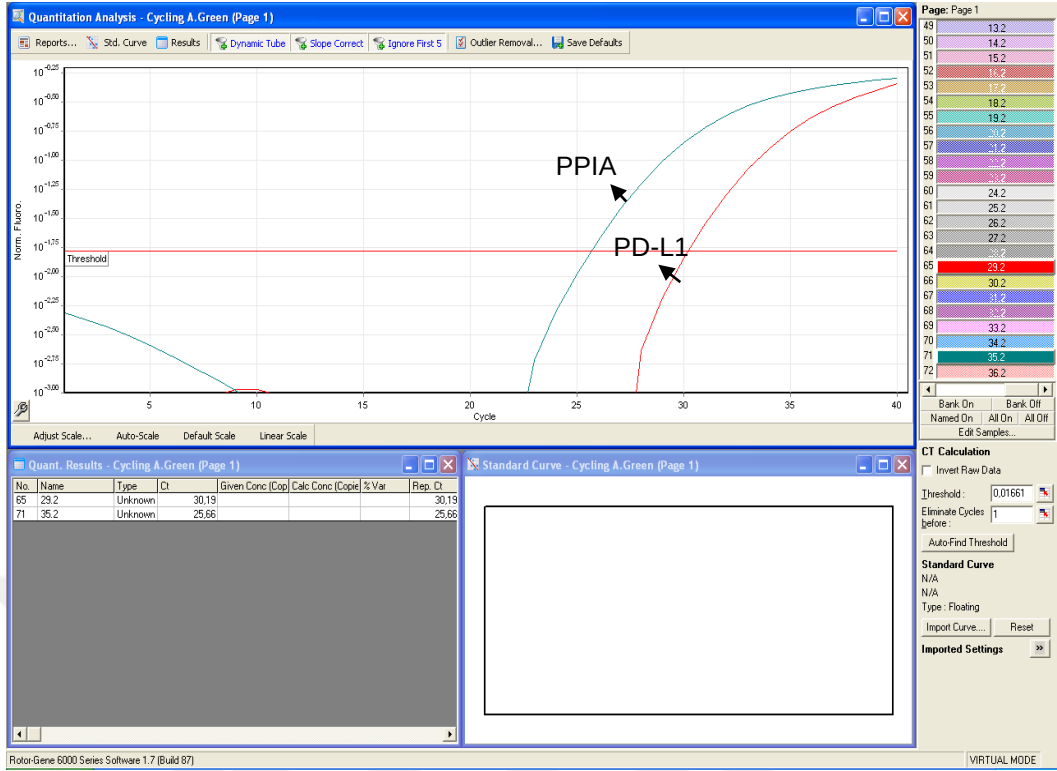
infiltrasyonu görülmüştür. %62,5 (n=10)'inde renal pelvis ve hiler yağ doku invazyonu tespit edilmiştir. Hastaların hiçbirinde sarkomatoid veya rabdoid diferansiyasyon izlenmemiştir. %62,5 (n=10)'inde makroskopik veya mikroskopik olarak nekroz tespit edilmiştir.

PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastaların %18,8 (n=3)'ü evre I, %12,5 (n=2)'ü evre II, %37,5 (n=6)'ü evre III, %31,3 (n=5)'ü evre IV'tür. Hastaların %31,3 (n=5)'ünde tanı anında metastaz tespit edilmiş olup hastaların klinik takipleri sonucunda sonradan gelişen metastaz öyküsü olan hastalarda PD-L1 ekspresyonu görülmemiştir. PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastaların %75 (n=12)'ü nükleer grade 2, %18,8 (n=3)'ü nükleer grade 3, %6,3 (n=1)'ü nükleer grade 4'tür.

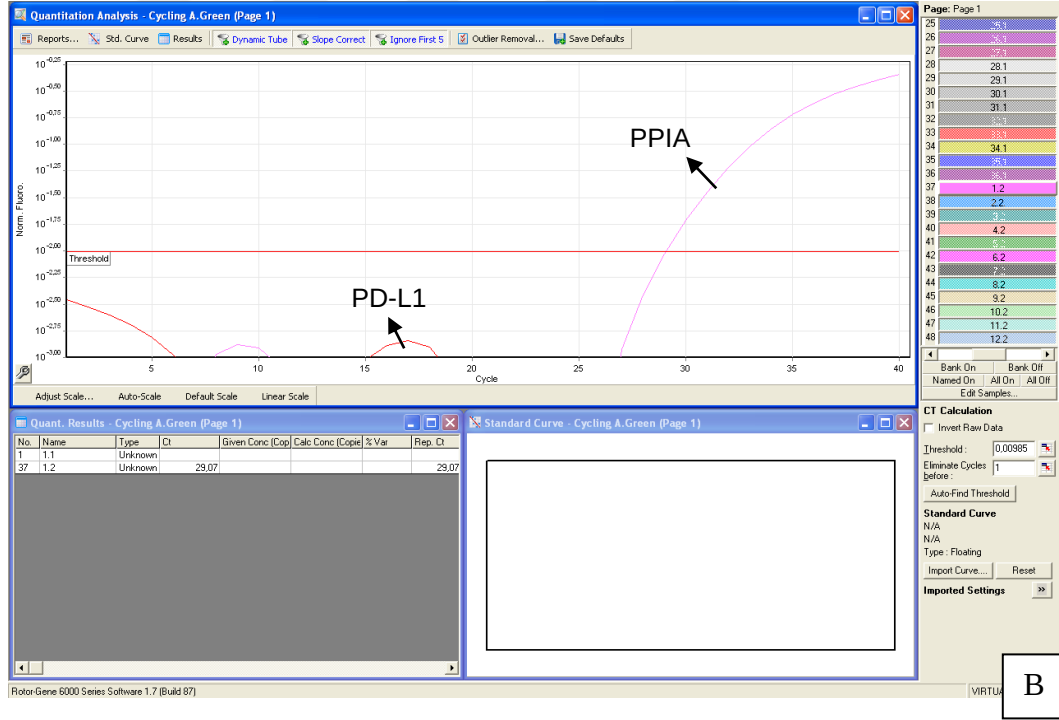
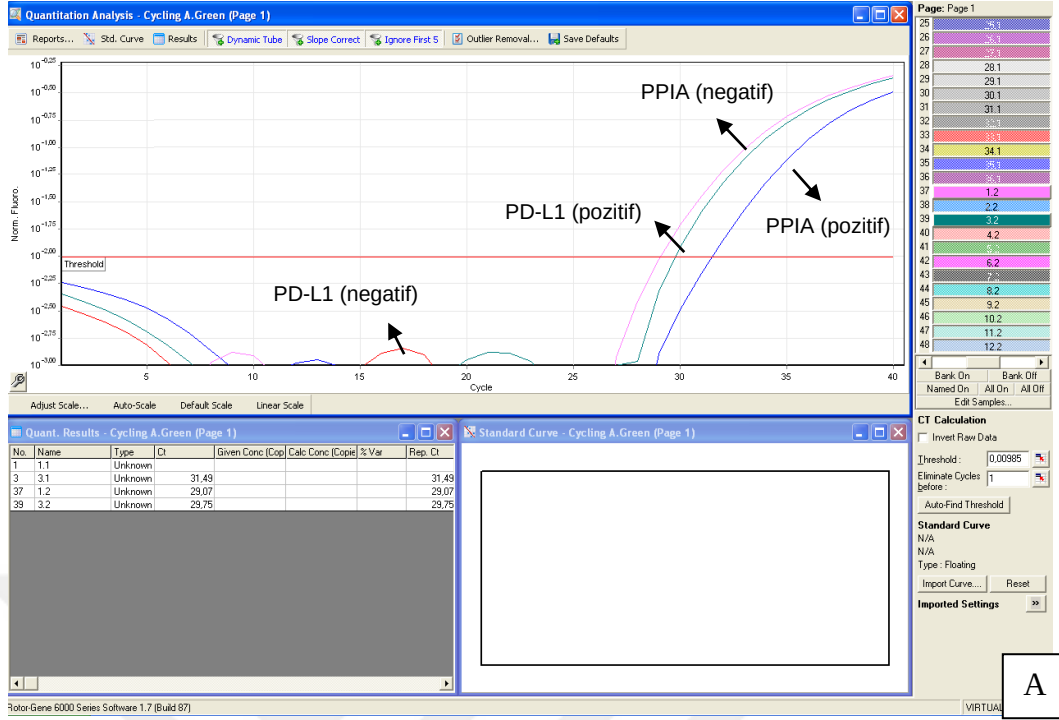
Hastaların PPIA referans geni ile karşılaştırmalı olarak PD-L1 gen ekspresyon durumları şekil 12, şekil 13 ve şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 12 RHK'lı tüm hastaların gerçek zamanlı PCR ile kantitasyon analizleri



Şekil 13 PD-L1 gen ekspresyonu izlenen 2 RHK'lı hastanın cevap eğrileri



Şekil 14 A. PD-L1 gen ekspresyonu pozitif ve negatif olan 2 RHK'lı hastanın kendi PPIA değerleri ile birlikte karşılaştırmalı cevap eğrileri B. PD-L1 gen ekspresyonu negatif RHK'lı hastanın cevap eğrisi

**Tablo 15. Prognostik faktörlerin PD-L1 ekspresyon durumu**

|                                             |             | PD-L1 ekspresyonu |      |             |      | p değeri |
|---------------------------------------------|-------------|-------------------|------|-------------|------|----------|
|                                             |             | yok               |      | var         |      |          |
|                                             |             | sayı              | %    | sayı        | %    |          |
| Cinsiyet                                    | Kadın       | 22                | 75,9 | 7           | 24,1 | 0,459    |
|                                             | Erkek       | 43                | 82,7 | 9           | 17,3 |          |
| Tanı yaşı (ortalama±standart sapma)         |             | 59,06±12,09       |      | 57,43±13,29 |      | 0,638    |
| Tümör boyutu (cm) (ortalama±standart sapma) |             | 6,4±2,6           |      | 6,8±2,6     |      | 0,668    |
| Histolojik alt tip                          | Berrak h.   | 47                | 83,9 | 9           | 16,1 | 0,386    |
|                                             | Papiller    | 10                | 71,4 | 4           | 28,6 |          |
|                                             | Kromofob h. | 8                 | 72,7 | 3           | 27,3 |          |
| Evre                                        | 1           | 11                | 78,6 | 3           | 21,4 | 0,196    |
|                                             | 2           | 6                 | 75   | 2           | 25   |          |
|                                             | 3           | 40                | 87   | 6           | 13   |          |
|                                             | 4           | 8                 | 61,5 | 5           | 38,5 |          |
| Tanı anında metastaz                        | yok         | 58                | 84,1 | 11          | 15,9 | 0,054    |
|                                             | var         | 7                 | 58,3 | 5           | 41,7 |          |
| Klinik takip sonrasında toplam metastaz     | yok         | 48                | 81,4 | 11          | 18,6 | 0,756    |
|                                             | var         | 17                | 77,3 | 5           | 22,7 |          |
| Nükleer grade                               | 1           | -                 | -    | -           | -    | 0,558    |
|                                             | 2           | 39                | 76,5 | 12          | 23,5 |          |
|                                             | 3           | 16                | 84,2 | 3           | 15,8 |          |
|                                             | 4           | 10                | 90,9 | 1           | 9,1  |          |
| Sarkomatoid/rabdoid diferansiyasyon         | yok         | 61                | 79,2 | 16          | 20,8 | 0,943    |
|                                             | var         | 4                 | 100  | -           | -    |          |
| Nekroz                                      | yok         | 25                | 80,6 | 6           | 19,4 | 0,511    |
|                                             | var         | 40                | 80   | 10          | 20   |          |
| Böbrek kapsül infiltrasyonu                 | yok         | 51                | 82,3 | 11          | 17,7 | 0,693    |
|                                             | var         | 14                | 73,7 | 5           | 26,3 |          |
| Renal pelvis/hiler yağ doku invazyonu       | yok         | 21                | 77,8 | 6           | 22,2 | 0,693    |
|                                             | var         | 44                | 81,5 | 10          | 18,5 |          |

## 5. TARTIŞMA

Neoplazi oluşum süreci ve devamlılığında tümör hücrelerince kazanılan 6 belirleyici özellik ortaya konulmuş olup bunlar; proliferasyon sinyallerinde devamlılık, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, anjiyogenezi uyarmak, invazyonu aktive etmek ve metastaz gelişimidir. Bu özelliklerin kazanımına sebep olan en önemli faktörler genomik instabilite ve sonucunda oluşan mutasyonlar sonucu genetik istikrarsızlık oluşumu olup inflamasyon da bu süreci desteklemektedir. Kanser hücrelerinin özelliklerine ek olarak, normal destek hücreleri, tümör mikroçevresi yaratarak tüm neoplazi sürecine katkıda bulunur (95).

Bu özelliklere son çalışmalarla, neoplastik çoğalmayı en etkili şekilde desteklemek için hücresel metabolizmayı değiştirme veya yeniden programlama yeteneği (hücre enerji metabolizmasının yeniden programlanması) ile kanser hücrelerinin, özellikle T ve B lenfositler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından sağlanan immünolojik yıkımdan kaçma yeteneği (immun yanıtı kaçınmak) eklenmiştir (90).

Tümöre karşı gelişen immün yanıt mekanizmaları, Boon ve ark.'larının çalışmasında tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan kanser spesifik peptid-MHCI komplekslerinin CD8 pozitif T hücrelerince tanınmasının gösterilmesinden beri araştırılmaya başlanmıştır (96). Bu mekanizmanın daha ayrıntılı olarak araştırılması sonucu kanser tedavisinde immünoterapi gündeme gelmiştir.

Naiv CD8 T hücrelerinin aktive olarak çoğalması ve efektör fonksiyonlarını kazanmasındaki ilk basamak olan bu sürecin tanımlanmasının ardından sinyal 2 olarak adlandırılan basamakta antijen sunan hücreler ve T lenfositler arasındaki inhibitör veya stimülatör karakterdeki kostimülasyon adı verilen etkileşimlerin varlığı belirlenmiştir. Bu durum, tümör yatağındaki immün sistem hücreleri ile tümör hücresi yüzeyinde eksprese edilen antijenlerin etkileşimini etkileyen hedefe yönelik tedaviler fikrini ortaya çıkarmıştır (97).

Kostimülasyon basamağında görülen PD-1/PD-L1 etkileşimi de araştırılan önemli hedeflerden biridir. Tasuku Honjo ve ark. 1992’de PD-1 reseptörünü keşfetmiştir. Aktive T lenfositler üzerinde bulunan PD-1 reseptörü ile bu reseptörün bağlandığı tümör hücre yüzeyinde bulunan PD-L1 ligandı etkileşiminin immünsupresif etkiye yol açtığı, T hücrelerinin apoptozu ve tümör hücrelerinin immün yanıtta kaçışında rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (98).

PD-L1 ekspresyonunun; RHK, malign melanom, over, akciğer ve ürotelyal karsinomlar, baş-boyun yassı hücreli karsinomları, özofagus, serviks, meme, pankreas, mide karsinomları, Wilms tümörü ve glioblastomlarda tümör hücrelerinde izlendiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (99-110).

PD-1/PD-L1 yolağını hedef alan immün kontrol noktası inhibitörleri ilk olarak 2014 yılında standart tedaviye cevap vermeyen metastatik malign melanomda kullanılmıştır. Pembrolizumabın konvansiyonel tedavilere göre sağkalımı belirgin şekilde arttırdığı izlenmiştir (111).

RHK, immünojenik bir tümör olup karakteristik olarak çok sayıda tümör infiltrate lenfosit içermektedir. Webster ve ark.’nın çalışmasında berrak hücreli karsinomlarda mononükleer hücre infiltrasyonunun sağkalımı 2 kat azalttığı gösterilmiştir (7). Çalışmalarda RHK’nın konak antitümör immünitesinin gelişimini engelleyici özellikleri olduğu bildirilmiştir (8).

RHK heterojen tümör biyolojisi olan bir kanserdir. Klinik bulgu vermemesi ve rutin tarama testlerinin mevcut olmaması nedeniyle çoğu zaman tanı anında ileri evre ve metastatik tümörlerin görülmesi söz konusu olmaktadır. Evre IV RHK’da 5 yıllık genel sağkalım oranları literatürde %15 dolaylarında (112) bildirilmiş olup bizim çalışmamızda %7 olarak bulunmuştur. Bu düşük sağkalım oranları, metastatik RHK’da yüksek toksisite ve zayıf tedavi cevapları ile seyreden konvansiyonel tedavi dışında alternatif yaklaşımların ele alınmasını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle hedefe yönelik tedavilerin yanında immün kontrol noktası inhibitörleri kullanıma sunulmuştur. Bu amaçla geliştirilen PD-1 inhibitörü nivolumabın faz III çalışmaları gösterilmiş olup metastatik RHK ikinci sıra tedavide tek başına veya tirozin kinaz inhibitörleri ile kombine kullanımı

tedavi kılavuzlarına eklenmiştir (86, 87). PD-L1 inhibitörleri olan atezolizumabın faz II çalışmaları (88) ve durvalumabın faz I çalışmaları devam etmektedir (89).

Geliştirilen bu yeni tedavi yöntemlerine daha iyi cevap verebilecek ve ilaç toksisitesinden daha az etkilenecek hasta popülasyonunu seçmek için geçerli belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu belirteçlerle hastaların prognozu, tedaviye cevabı, tedavi toksisitesi ve hastalık rekürrensi öngörülebilecektir.

Yapmış olduğumuz retrospektif çalışmamızda RHK tanılı olgularda PD-L1 ekspresyon durumları, İHK'sal PD-L1 incelemesi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR ile PD-L1 gen ekspresyonu araştırması yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Bu çalışmayla PD-L1 ekspresyonunun belirlenmesinde uygun yöntem seçimini değerlendirmek ve bu ekspresyonun tümör karakteristikleri, prognostik faktörler ile sağkalım üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu etkiler değerlendirilirken PCR ile belirlenen pozitif PD-L1 gen ekspresyonu sonuçları kullanılmıştır.

Çalışmamızda tüm RHK hastalarında PD-L1 ekspresyon oranı %19,75 (n=16) olarak bulunmuştur. Bu oran literatürde %13,6-56,5 olarak bildirilmiştir. PD-L1 ekspresyon oranındaki bu değişkenlik, ekspresyonun değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerdeki farklılık ve İHK'sal olarak pozitif kabul edilme şekilleri ve yüzdelerinin belirgin farklılık göstermesi nedeniyle olabilir. Ayrıca hasta popülasyonunda ırksal vb. heterojenite izlenmekte ve çalışmalar farklı alt tiplere sahip hastalarda yapıldığından bu alt tiplerin PD-L1 ekspresyon oranları farklılık gösteriyor olabilir. Literatürde renal hücreli karsinomlarda PD-L1 ekspresyonunu gösteren çalışmalar tablo 16'da özetlenmiştir.

Literatürde renal hücreli karsinomlar ile ilgili çalışmalar incelendiğinde Abbas ve ark.'nın berrak hücreli RHK'ları değerlendirdiği çalışmada PD-L1 ekspresyonu kadın cinsiyet ile ilişkili bulunmuştur (15). Diğer çalışmalarda ise bizim çalışmamızda olduğu gibi cinsiyetin PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisi gösterilememiştir.

Çalışmamızda PD-L1 ekspresyonu izlenen hastaların yaş ortalaması  $57,43 \pm 13,29$  olup yaş aralığı 37-74'tür. Bu sonuçların literatürle uyumlu olarak PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir.



**Tablo 16. RHK’da PD-L1 ekspresyonunu gösteren çalışmalar**

|                                   | Yıl  | Olgu sayısı | Alt tip                      | Kullanılan yöntem | PD-L1 ekspresyon oranı (%) - Kesme değeri (cut off) (%) |
|-----------------------------------|------|-------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Thompson<sup>100</sup></b>     | 2004 | 196         | RHK                          | İHK-doku          | 37,2 (>10)                                              |
| <b>Thompson<sup>113</sup></b>     | 2006 | 306         | Berrak h.                    | İHK-doku          | 23,9 (>5)                                               |
| <b>Krambeck<sup>114</sup></b>     | 2007 | 298         | Berrak h.                    | İHK-doku          | 23,5 (>5)                                               |
| <b>Frigola<sup>115</sup></b>      | 2011 | 172         | Berrak h.                    | ELISA-kan         | Medyan %57,1                                            |
| <b>Choueiri<sup>119</sup></b>     | 2014 | 101         | Berrak h. dışı               | İHK-doku          | 10,9 (>5)                                               |
| <b>Callea<sup>116</sup></b>       | 2015 | 52          | Berrak h.                    | İHK-doku          | 32 (>1)                                                 |
| <b>Leite<sup>117</sup></b>        | 2015 | 115         | Metastatik olmayan berrak h. | İHK-doku          | 56,5 (>1)                                               |
| <b>Erlmeier<sup>121</sup></b>     | 2016 | 81          | Kromofob h.                  | İHK-doku          | 13,6 (>1)                                               |
| <b>Abbas<sup>15</sup></b>         | 2016 | 177         | Berrak h.                    | İHK-doku          | 20,9 (>1)                                               |
| <b>Motoshima<sup>122</sup></b>    | 2017 | 102         | Papiller                     | İHK-doku          | 28,4 (>2)                                               |
| <b>Chang<sup>123</sup></b>        | 2017 | 36          | Xp11.2 translokasyon         | İHK-doku          | 25 (>1)                                                 |
| <b>Alaghebandan<sup>124</sup></b> | 2017 | 13          | Fumarat eks. İzlenen RHK     | İHK ve PCR -doku  | 53,8                                                    |

PD-L1 ekspresyon durumları ile histolojik alt tiplerin ilişkisi incelendiğinde literatürde PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili bulunan prognostik faktörler büyük oranda berrak hücreli alt tipte yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (15, 100, 113-117). Iacovelli ve ark.’larının 2016 tarihli metaanalizinde PD-L1 ekspresyonu berrak hücreli tümörlerin %24,2’sinde, berrak hücreli dışı tümörlerin %10,9’unda izlenmiştir (118). Bizim çalışmamızda ise PD-L1 ekspresyonu, berrak hücreli alt tipe sahip hastaların %16,1’inde, papiller alt tipe sahip hastaların %28,6’sında, kromofob hücreli alt tipe sahip hastaların %27,3’ünde izlenmiştir.

Literatürde berrak hücreli dışı alt tiplerdeki PD-L1 ekspresyonunun beraber araştırıldığı bir çalışmada PD-L1 ekspresyonu evre, nükleer grade ve sağkalım ile ilişkili bulunmuş olup agresif klinikopatolojik özellikler ve kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmiştir (119). Daha yakın tarihli başka bir çalışmada ise PD-L1 ekspresyonu prognostik faktörler ve sağkalımla ilişkili bulunmamıştır (120).

Berrak hücreli RHK'lara göre daha iyi prognozlu olduğu bilinen kromofob hücreli RHK'larda PD-L1 ekspresyonunun prognostik faktörlerle ilişkisi Erlmeier ve ark.'larının çalışmasında incelenmiş, prognostik faktörler ve sağkalımla ilişkili bulunmamıştır (121). Berrak hücreli RHK'lardan daha kötü prognozlu olduğu bilinen papiller RHK'lardaki PD-L1 ekspresyonunun prognostik faktörlerle ilişkisi ise Motoshima ve ark.'larının yaptığı çalışmada araştırılmış ve prognostik faktörler ile sağkalımla ilişkili bulunmamıştır (122).

Chang ve ark.'larının 2017 yılında Xp11.2 translokasyon RHK'da İHK'sal olarak PD-L1 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada PD-L1 ekspresyonu evre, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve sağkalım ile ilişkili bulunmuş olup kötü prognostik belirteç olarak kabul edilmiştir (123). Bu grubun ait olduğu alt tip, Mit ailesi translokasyonu olan RHK'lar, PD-L1 ekspresyonundan bağımsız olarak sağkalım açısından da berrak hücreli alt tipte benzer özellikler göstermektedir.

Aleghebandan ve ark.'nın 2017 tarihli fumarat-hidrataz eksikliği izlenen RHK'da İHK'sal ve PCR yöntemleri ile PD-L1 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada da prognostik faktörler ile sağkalımla ilişkili bulunmamıştır (124).

Literatürdeki veriler berrak hücreli alt tipte PD-L1 ekspresyonunu kötü prognostik bir belirteç olarak kabul etmekteyken, berrak hücreli dışı alt tiplerle ilgili çalışma sonuçları çelişkilidir. Bizim çalışmamızda prognostik faktörler ile PD-L1 ekspresyonu ilişkisi tüm alt tipler için beraber yapılmış olup ayrı ayrı uygulanmamıştır. PD-L1 ekspresyonunun çalışmadaki 3 alt tip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığı ise saptanmamıştır.

Çalışmamızda PD-L1 ekspresyonu en çok evre IV hastalarda izlenmiş olsa da istatistiksel olarak diğer evrelerle anlamlı farklılık yoktur. Literatürde ise bazı çalışmalarda PD-L1 ekspresyonu evre ile ilişkili olarak bulunmuştur (115,117,119).

Abbas ve ark.'larının çalışmasında berrak hücreli RHK'lar ile Chang ve ark.'larının çalışmasında Xp11.2 translokasyon RHK'lardaki PD-L1 ekspresyonu uzak metastaz ile ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak en sık uzak metastaz akciğerde saptanmış olup istatistiksel olarak tanı anında metastatik olan hastalardaki PD-L1 ekspresyonu pozitifliği ilişkisi sınırda olarak görülmüştür ( $p=0,054$ ). Bu durumun çalışmamızın örneklem sayısının

sınırlı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Örneklem sayısının artırılmasıyla metastaz ile ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı saptanabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca literatürde Jilaveanu ve ark.'larının immünfloresans yöntemle (125) ve Callea ve arkadaşlarının ise İHK'sal yöntemle (116) uzak metastaz izlenen berrak hücreli alt tipteki hastalarda primer nefrektomi materyalleri ile uzak metastatik alanlardaki PD-L1 ekspresyonunu karşılaştırdığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda iki alanda ekspresyon farklılıkları belirgin olarak izlenmiştir. Bu durum RHK'larda sıklıkla izlenen intratümöral ve intertümöral heterojeniteden kaynaklanmış olabilir. PD1/PD-L1 yolağı ile ilişkili tedavi alacak metastatik hastaların seçiminde sadece primer nefrektomi materyalinden değil metastaz alanından da çok sayıda örnek alınması gerektiği düşünülmüştür.

Literatürde bazı çalışmalarda nükleer grade ile PD-L1 ekspresyonunun ilişkisi gösterilmiş olup (115,117,119) bizim çalışmamızda PD-L1 ekspresyonu ile nükleer grade arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Frigola ve ark.'larının çalışmasında nekroz PD-L1 ekspresyonu ilişkisi anlamlı bulunmuş olup (115) bizim çalışmamızda istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

2015 tarihli bir metaanalizde PD-L1 ekspresyonu ile tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmış olup (14) bizim çalışmamızda ekspresyon izlenen hastalarda ortalama 6,8 cm olarak bulunmuştur. İstatistiksel açıdan ise anlamlı izlenmemiştir.

Joseph ve ark.'larının çalışmasında sarkomatoid diferansiyasyon gösteren RHK'larda PD-L1 ekspresyonunun daha fazla olduğu ortaya konulmuştur (126). Kawakami ve ark.'larının 2017 yılına ait bir çalışmasında ise, sarkomatoid diferansiyasyon gösteren RHK'lar ile göstermeyen grade 4 berrak hücreli RHK'lar karşılaştırılmış ve diferansiyasyon gösterenlerde PD-L1 ekspresyonu anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (127). Bu çalışmalarla immün kontrol noktası inhibitörleri ile tedavi için hasta seçiminde sarkomatoid diferansiyasyonun önemli bir parametre olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda ise sarkomatoid diferansiyasyon gösteren RHK'ların hiçbirinde PD-L1 ekspresyonu saptanmamıştır.

Çalışmamıza dahil edilen PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastaların ortalama sağkalım süresi 75,04 ay olup genel sağkalım süresinden düşük olarak izlenmiştir. Hastaların 1 yıllık sağkalım oranları %81 iken 5 yıllık sağkalımda bu oran %67'ye düşmektedir. Yapılan tek değişkenli Cox regresyon analizlerinde ise PD-L1 ekspresyonu izlenen hastalarda, izlenmeyenlere göre ölüm riskinin 1,3 kat arttığı görülmüştür. Bu verilere rağmen çalışmamızda sağkalım ile PD-L1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki gözlenememiştir. Abbas ve ark.'larının çalışmasında ise PD-L1 ekspresyonu izlenen berrak hücreli karsinomlarda 5 yıllık sağkalım oranı %46,7 olarak belirtilmiştir (15). Berrak hücreli alt tipe sahip RHK'larda PD-L1 ekspresyonunun sağkalımı azaltıcı etkisi olduğu çeşitli çalışmalar ve metaanalizlerde gösterilmiştir (14, 15, 113, 114, 115, 118). Berrak hücreli dışı alt tipler için ise sadece iki çalışmada sağkalımı azaltıcı etki izlenmiştir (119, 123). Çalışmamızda tanı anındaki uzak metastaz durumu ile PD-L1 ekspresyonu istatistiksel olarak sınırda izlendiğinden metastatik RHK'ye sahip hastalarda PD-L1 ekspresyonu izlenen ve PD-L1 ekspresyonu izlenmeyen alt gruplar arasında yeniden sağkalım kıyaslaması yapılmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuç görülmemiştir.

Çalışmamızdaki bu sonuçların, örneklem sayısının arttırılması yanında çalışmanın literatürle uyumlu olarak sadece berrak hücreli alt tip ile sınırlandırılması ile değişebileceği ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

Literatürdeki PD-L1 İHK'sal incelemesinin değerlendirilmesi ve skorlanması konusunda ciddi farklılıklar gözlenmiştir. Bazı çalışmalarda membranöz ve sitoplazmik boyanma pozitif kabul edilirken bazılarında nükleer ve membranöz boyanma pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda ortalama H-skor, bazılarında boyanma yüzdesinin medyan değeri, bir bölümünde ise %1'den %10'a kadar değişen oranlarda herhangi bir boyanma, kesme değeri (cut off değeri) olarak kabul edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise literatür verileri birleştirilerek zeminden ayırım yapılabilir şekilde, tam veya parsiyel olarak, lineer membranöz boyanma ve nükleer boyanma pozitif kabul edilirken, sadece sitoplazmik granüler boyanma veya hiç boyanmama durumu negatif kabul

edilmiştir. Kesme değeri olarak anti PD-L1 faz çalışmalarında kullanılan %5 değeri kullanılmıştır.

Ayrıca çalışmalarda PD-L1 İHK'sal değerlendirmesinde farklı antikor klonları kullanılması da önemli bir problemdir. Tümörlerde farklı klonların boyanma yoğunluk ve yüzdeleri farklı sonuçlar verebilmektedir (128).

Bizim çalışmamızda İHK'sal incelemede Anti PD-L1 antikor 28-8 klonu kullanılmıştır. Bu klon nonskuamöz küçük hücreli dışı akciğer karsinomları ve melanomlar için tamamlayıcı yardımcı diyagnostik bir belirteç olarak FDA onayı almıştır. Cogswell ve ark.'larının çalışmasında bu klonun Nivolumab tedavisinin değerlendirmesinde diğer klonlara göre daha spesifik olduğu gösterilmiştir (129). Ayrıca metastatik RHK'de 2. sıra tedavi olarak tedavi protokollerine eklenen faz III çalışmaları gösterilmiş terapötik ajan olan Nivolumabın faz çalışmaları sırasında bu klon kullanılmıştır (86,87).

Çalışmamızda kantitatif gerçek zamanlı PCR ile PD-L1 gen ekspresyonu izlenen 16 vakanın 3'ünde İHK'sal yöntem ile boyanma gösterilebilmiştir, bu nedenle İHK'sal sonuçlar ile PCR sonuçları korele olmamıştır. PCR sonuçlarına göre İHK'sal incelememizin negatif olan hastaları bulma gücü yani duyarlılığı zayıf olarak bulunmuştur. İHK'sal test sürecinde postanalitik dönem kadar analitik ve preanalitik dönem de önemlidir (Şekil 15).



Şekil 15. İHK'sal test sürecinde analitik, preanalitik ve postanalitik dönem

Çalışmamızda PD-L1 İHK'sal boyanmasında izlenen korelasyon eksikliğinin, test sürecinde materyal yaşının 3 seneyi geçmemesi durumu sağlanamadığından ve formalinle fikse olmuş parafine gömülü dokuda oluşabilecek fiksasyon sürecinden kaynaklanan preanalitik ve analitik süreçle ilişkili problemlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Literatürde PD-L1 ekspresyonunun belirlenmesi için çoğu çalışmada doku örneklerinde İHK'sal yöntem kullanılmış olup Frigola ve ark.'larının çalışmasında hastaların kan örneklerinde ELISA testi uygulanmıştır (115). Jilaveanu ve ark.'larının çalışmasında ise doku örneklerinde immüno Floresans yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu belirlenmiştir (125). Alaghehbandan ve ark.'larının fumarat-hidrataz eksikliği izlenen RHK'da PD-L1 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada ise bizim çalışmamızda olduğu gibi doku örneklerinde İHK'sal yöntem ile kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi bir arada kullanılmıştır. Bu çalışmada RHK'ların bir bölümü İHK'sal yöntemle güçlü boyanma gösterirken bir kısmı ise zayıf boyanma göstermiştir. PCR ile değerlendirildiğinde hem güçlü boyanan hem de zayıf boyanan RHK'larda PD-L1 gen ekspresyonu gösterilmiştir. (124).

Çalışmamızda İHK'sal PD-L1 ekspresyonunu doğrulamak ve duyarlılık-özgüllük değerlerini belirleyebilmek için kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Literatürde az sayıda izlenen bu iki yöntemin birlikte kullanımının çalışmalardaki İHK'sal boyanma ve skorlama farklılıklarını ortadan kaldırıp kantitatif verilerle standardizasyonu sağlayacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızın bir amacı RHK'larda PD-L1 ekspresyonunun hastaların metastaz durumları, evre ve sağkalım gibi klinik ve prognostik parametreleri ile korelasyon ilişkisinin saptanması ile literatüre katkıda bulunmaktır. Diğer amacımız ise metastatik RHK'larda tedavi protokollerine eklenen PD-1 ve faz I-II çalışmaları yürütülen PD-L1 inhibitörlerinin uygulanabileceği hastaların seçiminde bu belirteçlerin karar verdirici (prediktif) ya da yardımcı diagnostik testler olarak kullanılması konusunda yol göstermektir. Literatür verileri ve çalışmamıza ait verilere göre PD-L1 ekspresyonu, karar verdirici (prediktif) bir belirteç olmaktan çok, PD1/PD-L1 inhibitörlerinin daha etkili olabileceği

hastaların seçiminde yardımcı olabilecek bir belirteç (komplementer/tamamlayıcı diyagnostik) olarak yorumlanmıştır.

PD1/PD-L1 inhibitörleri ile tedavi edilen hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda İHK'sal olarak PD-L1 ekspresyonu izlenen tüm hastalarda tedavi yanıtının izlenmediği görülmüştür. Ascierto ve ark.'larının çalışmasında, İHK'sal olarak PD-L1 pozitifliği belirlenmiş fakat anti PD1/PD-L1 tedavisine yanıt vermemiş 13 hastadan RNA izolasyonu yapılmış ve multipleks kantitatif PCR incelemesiyle gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Metabolik yollar ve immün fonksiyonlarla ilişkili proteinler değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda hastalarda PD-L1 ekspresyonu pozitif olsa dahi tümör hücreindeki intrinsik metabolik faktörlerin PD1/PD-L1 tedavisine direnç gelişiminde etkili olduğu ve bu hedeflere ait yeni belirteçlerin tespit edilmesinin immün kontrol noktası inhibitörleri ile kombine kullanılarak etkili tedavi yanıtı oluşturacak yeni tedavi hedefleri belirleyebileceği belirtilmiştir (130).

Ayrıca 2 çalışmada sarkomatoid diferansiyasyon gösteren hastalarda belirgin PD-L1 ekspresyonu görülmesinden dolayı bu durumun izlendiği hastaların tedaviden fayda sağlayabileceği belirtilmiştir.

Uzak metastaz izlenen hastalarda primer nefrektomi materyalleri ile uzak metastatik alanlardaki PD-L1 ekspresyonunu karşılaştırdığı iki çalışmada ise bu iki alanda ekspresyon farklılıkları belirgin olarak izlenmiştir. RHK'larda belirgin olarak izlenen intertümöral ve intratümöral heterojeniteden dolayı PD1/PD-L1 yolağı ile ilişkili tedavi alacak metastatik hastaların seçiminde sadece primer nefrektomi materyalinden değil metastaz alanından da çok sayıda örnek alınması gerektiği düşünülmüştür (116,125). Bu parametrelere dikkat edilerek PD-L1 ekspresyonunun PD1/PD-L1 tedavisine aday metastatik hastalarda yardımcı test olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatür incelendiğinde özellikle berrak hücreli alt tipe sahip RHK'larda çok sayıda çalışmada PD-L1 ekspresyonu çeşitli prognostik faktörlerle ilişkili bulunmuş ve ekspresyon görülmesinin kötü prognoz göstergesi olduğu bildirilmiştir. Berrak hücreli dışı alt tiplerde ise bazı çalışmalarda prognostik faktörlerle ilişkili olduğu ifade edilirken, çoğu çalışmada bu ilişki gösterilememiştir. Bizim çalışmamızda ise PD-L1 ekspresyonu berrak hücreli, kromofob hücreli ve papiller alt tiplerini içeren hasta grubunda %19,75 oranında izlenmiş olup, prognostik parametrelerden sadece tanı anında uzak metastaz görülme durumu ile istatistiksel olarak sınırda bulunmuştur. ( $p=0,054$ ).

Çalışmamızda incelenen diğer prognostik parametreler olan cinsiyet, yaş, mortalite oranı, tümörün histolojik alt tipi, hastanın klinik evresi, nükleer grade, sarkomatoid/rabdoid diferansiyasyon, nekroz, böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu, renal pelvis ve hiler yağ doku invazyonu, tümör çapı parametreleri ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmemiştir.

PD-L1 ekspresyonu izlenen hastalarda ortalama sağkalım süresi 16,07 ay daha düşük izlenmiş; fakat genel sağkalım ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmemiştir. Regresyon analizlerinde ise PD-L1 ekspresyonu izlenen hastalarda, izlenmeyenlere göre ölüm riskinin 1,3 kat arttığı görülmüştür; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca metastatik RHK'ye sahip hastalarda PD-L1 ekspresyonu izlenen ve izlenmeyen alt gruplar arasında sağkalım karşılaştırması yapılmıştır. İstatistiksel olarak incelendiğinde bu iki alt grup arasında da anlamlı fark izlenmemiştir.

PD-L1 ekspresyon durumunun belirlenmesi PD1/PD-L1 tedavisi alacak hastalarda karar verdirici (prediktif) değer taşımasa da tedaviye aday metastatik hastalar için yardımcı test olarak kullanılabilir.

PD-L1 ekspresyon durumunun belirlenmesinde İHK'sal uygulama en yaygın kullanılan inceleme yöntemi olmakla birlikte bizim çalışmamızda altın standart olarak uygulanan kantitatif gerçek zamanlı PCR incelemesi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı zayıf bulunmuştur. Literatürdeki farklı İHK'sal değerlendirme ve skorelama şekilleri standardize edilip değerlendirme objektif kriterlere dayalı olarak yapılmalıdır. Bu standardizasyon sağlanana kadar PCR ve İHK'sal incelemenin birlikte kullanılması PD-L1 ekspresyonunun ve buna bağlı olarak PD1/PD-L1 inhibitörleri tedavisi alacak hastaların daha doğru belirlenmesine yardımcı olabilir.



## 7. ÖZET

### **Renal Hücreli Karsinomlarda PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve İmmünohistokimyasal Yöntem ile PD-L1 Ekspresyonunun Araştırılması**

Renal hücreli karsinom karakteristik olarak çok sayıda tümör infiltrate lenfosit içeren immünojenik bir tümör olup çalışmalarda konak antitümör immünitelerinin gelişimini engelleyici özelliklerinin gösterilmesi konvansiyonel tedaviye cevap alınamayan metastatik renal hücreli karsinomları PD1/PD-L1 inhibitörleri tedavisi için olası bir hedef haline getirmiştir.

Çalışmamızda 2008-2013 yılları arasında renal hücreli karsinom tanısıyla radikal nefrektomi uygulanmış 81 hastaya ait spesimenin PD-L1 ekspresyon durumları immünohistokimyasal (Anti PD-L1 antibody [28-8, ab205921], RabMAb, abcam) ve kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemleri ile belirlenmiş olup PD-L1 ekspresyonunun hastaların metastaz durumları, evre ve sağkalım gibi prognostik parametreleriyle korelasyon ilişkisinin saptanması ile literatüre katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Ayrıca PD-L1 ekspresyonunun belirlenmesinde uygun yöntem seçimini değerlendirerek PD1/ PD-L1 inhibitörü tedavisine aday hastaların seçiminde yol göstermek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda PD-L1 ekspresyonu berrak hücreli, kromofob hücreli ve papiller alt tiplerini içeren hasta grubunda %19,75 oranında izlenmiş olup, prognostik parametrelerden sadece tanı anında uzak metastaz görülme durumu ile istatistiksel olarak sınırda ilişki bulunmuştur. ( $p=0,054$ ). Diğer klinik ve prognostik parametreler olan cinsiyet, yaş, mortalite oranı, tümörün histolojik alt tipi, hastanın klinik evresi, nükleer grade, sarkomatoid/rabdoid diferansiyasyon, nekroz, böbrek kapsülünde tümör infiltrasyonu, renal pelvis ve hiler yağ doku invazyonu, tümör çapı parametreleri ve sağkalım ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmemiştir.

PD-L1 ekspresyon durumunun belirlenmesinde immünohistokimyasal inceleme kantitatif gerçek zamanlı PCR incelemesi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı zayıf bulunmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlarda PD-L1 ekspresyonunun prognostik faktörlerle ilişkisi tespit edilemese de PD1/PD-L1 inhibitörü tedavisine aday metastatik hastaların seçiminde yardımcı diyagnostik test olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca literatürdeki immünohistokimyasal boyanma ve skorlama farklılıklarını ortadan kaldırılıp kantitatif verilerle standardizasyonun sağlanması amacıyla PD-L1 ekspresyonunu belirlemede immünohistokimyasal ve PCR yönteminin birlikte kullanımını önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Renal hücreli karsinom, PD-L1, immünohistokimya, PCR

## 8. ABSTRACT

### **Determination of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma Using Immunohistochemical and PCR (Polymerase Chain Reaction) methods.**

Renal cell carcinoma is an immunogenic tumor which characteristically involves many tumor infiltrating lymphocytes. In the studies, renal cell carcinoma is revealed to have many features that suppress the host antitumor immunity. This made metastatic renal cell carcinomas which are unresponsive to conventional therapies, probable targets to the treatment with PD1/PD-L1 inhibitors.

In our study, we determined PD-L1 expressions of 81 patients who underwent radical nephrectomy between 2008-2013 by using immunohistochemical (Anti PD-L1 antibody [28-8, ab205921], RabMAb, abcam) and quantitative real time PCR methods. We aimed to investigate the correlation between PD-L1 expression and prognostic features such as metastasis, stage and survival to contribute to the literature. Also, we aimed to evaluate convenient methods to guide patient selection for PD1/PD-L1 inhibitors treatment.

Our patient group consists of clear cell, chromophobe cell and papillary subtypes and PD-L1 expression rate is %19,75. We found a borderline statistic correlation between PD-L1 expression and metastasis ( $p=0,054$ ). There was no significant relationship between PD-L1 and other clinical and prognostic parameters such as gender, age, mortality rates, histologic subtype, clinical stage, nuclear grade, sarcomatoid/rhabdoid differentiation, necrosis, tumor infiltration in kidney capsule, invasion into renal pelvis and hilar fat tissue, tumor size and survival.

When we compared immunohistochemical testing with quantitative real time PCR method in determining the expression of PD-L1, we found that the sensitivity of immunohistochemistry is weak.

In our results, we found no statistically significant relationship between PD-L1 and prognostic parameters but we think PD-L1 expression can be used as a complementary diagnostic test in selecting patients for PD1/PD-L1 inhibitor treatment. Also in determining PD-L1 expression, we recommend using immunohistochemical and PCR methods together to eliminate the variations in the literature about staining and scoring interpretations for standardization.

**Key Words:** Renal cell carcinoma, PD-L1, immunohistochemistry, PCR

## 9. KAYNAKLAR

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Erişim adresi: <http://gco.iarc.fr/today/home>, Erişim Tarihi: 24/12/2017.
- 2 Ljungberg, B., Campbell, S.C., Cho, H.Y., Jacqmin, D., Lee, J.E., Weikert, S., Kiemeney, L.A., *The epidemiology of renal cell carcinoma*. European urology, 2011, 60(4), 615-621..
- 3 Moch, H., Cubilla, A.L., Humphrey, P.A., Reuter, V.E., Ulbright, T. M., *The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours*. European urology, 2016, 70(1), 93-105.
- 4 Ljungberg, B., Bensalah, K., Bex, A., Canfield, S., Dabestani, S., Giles et al, *EAU Guidelines on Renal cell carcinoma*, European Association of Urology, 2016.
- 5 Delahunt, B., Cheville, J. C., Martignoni, G., Humphrey, P. A., Magi-Galluzzi, C., McKenney et al., *The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters*. The American journal of surgical pathology, 2013, 37(10), 1490-1504.
- 6 Rini B.I., McKiernan J.M., Chang S.S., Choueiri T.K., Kenney P.A. et al., Kidney. In Amin, M.B., Edge, S.B., Greene, F.L. et al, eds. *AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed*. New York, NY: Springer, 2017, 739-748.
- 7 Webster, W.S., Lohse, C.M., Thompson, R.H., Dong, H., Frigola, X., Dicks, D. L. et al., *Mononuclear cell infiltration in clear cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival*. Cancer, 2006, 107(1), 46-53.

- 8 Rayman, P., Wesa, A.K., Richmond, A.L., Das, T., Biswas, K., Raval, G. et al, *Effect of renal cell carcinomas on the development of type 1 T-cell responses*. Clinical cancer research, 2004, 10(18), 6360S-6366S.
- 9 Uzzo, R.G., Rayman, P., Kolenko, V., Clark, P.E., Bloom, T., Ward, A. M. et al, *Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma*. Clinical cancer research, 1999, 5(5), 1219-1229.
- 10 Chen, L., Flies, D.B., *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(4), 227-242.
- 11 Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007, 27(1), 111-122.
- 12 Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B et al, *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nature medicine, 2002, 8(8), 793-800.
- 13 Ceeraz, S., Nowak, E.C., & Noelle, R.J., *B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease*. Trends in immunology, 2013, 34(11), 556-563.
- 14 Xu, F., Xu, L., Wang, Q., An, G., Feng, G., & Liu, F., *Clinicopathological and prognostic value of programmed death ligand-1 (PD-L1) in renal cell carcinoma: a meta-analysis*. International journal of clinical and experimental medicine, 2015, 8(9), 14595.
- 15 Abbas, M., Steffens, S., Bellut, M., Eggers, H., Großhennig, A., Becker, J. U. et al., *Intratumoral expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)*. Medical Oncology, 2016, 33(7), 1-7.
- 16 Kumar, K.A., Sadashivudu, G., Krishnamani, K.V., Linga, V. G., Maddali, L. S., Digumarti, R.R., *Managing metastatic renal cell carcinoma-challenges, pitfalls, and outcomes in the real world*. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology, 2016, 37(4), 260.

- 17 Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V. et al, *Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 2016, 27(suppl 5), v58-v68.
- 18 Clapp W.L., Croker B.P. Kidney. In: Mills ES (ed.) *Histology For Pathologists*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2007, 891-970.
- 19 Sadler T.W., Urogenital System. *Langman's Medical Embryology*. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2012, 232-259.
- 20 Miller-Hodges, E., Hohenstein, P., *WT1 in disease: shifting the epithelial–mesenchymal balance*. The Journal of pathology, 2012, 226(2), 229-240.
- 21 Mescher A.L., Urogenital System. *Junqueira's Basic Histology Text And Atlas*. 14th ed. McGraw-Hill, 2016, 393-413.
- 22 Jeansson M, Haraldsson B. *Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier*. Am J Physiology Renal Physiology, 2006, 290:F111–F116.
- 23 Ballerman B.J., *Glomerular endothelial cell differentiation*. Kidney Int, 2005, 67:1668–1671.
- 24 Abrahamson D.R., Wang R. *Development of the glomerular capillary and its basement membrane*. In: Vize P.D., Woolf A.S., Bard J.B.L., eds. *The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease*. San Diego: Academic Press, 2003, 221–249.
- 25 Murphy W.M., Grignon D.J., Perlman E.J.: Kidney Tumors in Adults. In Silverberg SG, Sobin LH (eds). *Tumors of the Kidney, Bladder and Related Urinary Structures. AFIP Atlas of Tumor Pathology. 4th series, Fascicle 1*. Washington DC, American Registry of Pathology, 2004, 101-240.
- 26 Bonsib S.M., Renal Anatomy and Histology. In: Jennette J.C., Olson J.L., Schwartz, M.M., Silva F.G. (Eds.). *Hepinstall's Pathology of the Kidney, Vol.1, 6th edition*., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 1-71.

- 27 Chow W.H., Linehan W.M., Devesa S.S. Re: *Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect*. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(18):1331-4.
- 28 Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. *Cancer statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017, 67:7-30.
- 29 Şencan İ., Kesinkılıç B., Hacıkamiloğlu E., Gültekin M. et al, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara, 2017. Erişim adresi: [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2014-RAPOR\\_uzun.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR_uzun.pdf). Erişim Tarihi: 25/12/2017.
- 30 *Türkiye İstatistik Kurumu Ölüm Nedeni İstatistikleri (2009 ve sonrası)*. Erişim Adresi: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1083](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1083). Erişim tarihi: 25/12/2017.
- 31 Bray F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Zanetti R., Ferlay J., *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. XI* (electronic version). Lyon: International Agency for Research on Cancer., 2017. Erişim Adresi: <http://ci5.iarc.fr>, accessed [date]. Erişim tarihi: 25/12/2017.
- 32 Ridge C.A., Pua B.B., Madoff D.C. *Epidemiology and staging of renal cell carcinoma*. Seminars in interventional radiology, 2014, 31:3-8.
- 33 Pascual D., Borque A. *Epidemiology of kidney cancer*. Adv Urol 2008,782381.
- 34 Graves, A., Hessamodini H., Wong G., Lim W.H. *Metastatic renal cell carcinoma: update on epidemiology, genetics, and therapeutic modalities*. ImmunoTargets and therapy, 2013, 2, 73.
- 35 Renehan A.G., Soerjomataram I., Tyson M., Egger M., Zwahlen M., Coebergh J.W., Buchan I. *Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries*. International journal of cancer, 2010, 126(3), 692-702.
- 36 Renehan A.G., Tyson M., Egger M., Heller R.F., Zwahlen M. *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008, 371(9612):569-78

- 37 Mano R., Hakimi A.A., Zabor E., Bury M.A., Donati O.F., Karlo C.A., Bazzi W.M., Furberg H., Russo P. *Association between visceral and subcutaneous adiposity and clinicopathological outcomes in non-metastatic clear cell renal cell carcinoma*. Can Urol Assoc J.,2014, (9-10):E675-80.
- 38 Asma G., Soumaya K., Raya M., Amel E.G., Nadia K., Amine D. et al. *Role of adipokines in the tumor-immune system conflict*. Oncoimmunology. 2014, 3: e27810.
- 39 Osório-Costa F., Rocha G.Z., Dias M.M. et al. *Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2009, 53:213-226.
- 40 Hunt J.D., Van der Hel O.L., McMillan G.P., Boffetta P., Brennan P. *Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies*. International Journal of Cancer, 2005, 114(1), 101-108.
- 41 Cumberbatch M.G., Rota M., Catto J.W., La Vecchia C. *The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: a comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks*. European urology, 2016, 70(3), 458-466
- 42 Hidayat K., Du X., Zou S.Y., Shi, B.M. *Blood pressure and kidney cancer risk: meta-analysis of prospective studies*. Journal of Hypertension, 2017, 35(7), 1333-1344.
- 43 Weikert S., Boeing H., Pischon T., Weikert C., Olsen A., Tjønneland A., Mountokalakis T. *Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition*. American journal of epidemiology, 2007, 167(4), 438-446
- 44 Denton M.D., Magee C.C., Ovuworie C., Mauiyyedi S., Pascual M., Colvin R.B., Tolkoff-Rubin N. *Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis*. Kidney international, 2002, 61(6), 2201-2209.
- 45 Scott, C.S., Jinot J. *Trichloroethylene and Cancer: Systematic and Quantitative Review of Epidemiologic Evidence for Identifying*

- Hazards*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011, 8(11), 4238–4272.
- 46 Reuter V.E., Tickoo S.K. Adult Renal Tumors. In : Mills S.E., Carter D., Greenson J.K., Reuter V.E., Stoler M.H., editor. *Sternberg Surgical Pathology 4 th ed*. LWW, 2004, 1757-1793.
  - 47 Oberling C., Riviere M., Haguenan F. *Ultrastructure of clear cell epitheliomas of the kidney (hypernephroma of Grawitz tumor) and its implications for the histogenesis of the tumors*. Bull Cancer Assoc Franc 1959, 46:356–358.
  - 48 Lopez-Beltran A., Scarpelli M., Montironi R., Kirkali, Z. *2004 WHO classification of the renal tumors of the adults*. European urology, 2006, 49(5), 798-805.
  - 49 Srigley J. R., Delahunt B., Eble J. N., Egevad L., Epstein J. I., Grignon D., Zhou, M. *The International Society of Urological Pathology (ISUP) vancouver classification of renal neoplasia*. The American journal of surgical pathology, 2013, 37(10), 1469-1489.
  - 50 Cancer Genome Atlas Research Network. *Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma*. Nature, 2013, 499(7456), 43-49.
  - 51 Semenza G. L. *HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing*. Current opinion in cell biology, 2001, 13(2), 167-171.
  - 52 Alshenawy H. A. *Immunohistochemical panel for differentiating renal cell carcinoma with clear and papillary features*. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2015, 3(2), 68-74.
  - 53 Montironi R., Lopez-Beltran A., Cheng L., Scarpelli M. *Re: Multilocular cystic renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects*. European urology, 2013, 63(2), 400-401.
  - 54 Halat S., Eble J. N., Grignon D. J., Lopez-Beltran A., Montironi R., Tan P. H., Cheng L. *Multilocular cystic renal cell carcinoma is a subtype of clear cell renal cell carcinoma*. Modern Pathology, 2010, 23(7), 931-936.



- 55 Cancer Genome Atlas Research Network. *Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2016, 2016(374), 135-145.
- 56 Sweeney P., El-Naggar A.K., Lin S.H., Pisters, L.L. 2002 *Biological significance of c-met over expression in papillary renal cell carcinoma*. The Journal of urology, 2002, 168(1), 51-55.
- 57 Sanz-Ortega J., Vocke C., Stratton P., Linehan W.M., Merino M.J. *Morphologic and molecular characteristics of uterine leiomyomas in hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome*. The American journal of surgical pathology, 2013, 37(1), 74.
- 58 Tomlinson I.P., Alam N.A., Rowan A.J., Barclay E., Jaeger E.E., Kelsell D., Roylance R.R. *Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer*. Nature genetics, 2002, 30(4), 406.
- 59 Grubb R.L., Franks M.E., Toro J., Middleton L., Choyke L., Fowler S., Zbar, B. *Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer*. The Journal of urology, 2007, 177(6), 2074-2080.
- 60 Brunelli M., Eble J.N., Zhang S., Martignoni G., Delahunt B., Cheng L. *Eosinophilic and classic chromophobe renal cell carcinomas have similar frequent losses of multiple chromosomes from among chromosomes 1, 2, 6, 10, and 17, and this pattern of genetic abnormality is not present in renal oncocytoma*. Modern pathology, 2005, 18(2), 161-169.
- 61 Schmidt L.S., Warren M.B., Nickerson M.L., Weirich G., Matrosova V., Toro J.R., Pavlovich C.P. *Birt-Hogg-Dube syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2*. The American Journal of Human Genetics, 2001, 69(4), 876-882.
- 62 Skinnider B.F., Folpe A.L., Hennigar R.A., Lim S.D., Cohen C., Tamboli P., Amin, M.B. *Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin*

- antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors.* The American journal of surgical pathology, 2005, 29(6), 747-754.
- 63 Wright J L., Risk M C., Hotaling, J., Lin, D.W. *Effect of collecting duct histology on renal cell cancer outcome.* The Journal of urology, 2009, 182(6), 2595-2600.
- 64 Gupta R., Billis A., Shah R.B., Moch H., Osunkoya A.O., Jochum W., Zhou, M. *Carcinoma of the collecting ducts of Bellini and renal medullary carcinoma: clinicopathologic analysis of 52 cases of rare aggressive subtypes of renal cell carcinoma with a focus on their interrelationship.* The American journal of surgical pathology, 2012, 36(9), 1265-1278.
- 65 Argani P., Antonescu C.R., Couturier J., Fournet J.C., Sciot R., Debiec-Rychter M., Hafez N. *PRCC-TFE3 renal carcinomas: morphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular analysis of an entity associated with the t (X; 1)(p11. 2; q21).* The American journal of surgical pathology, 2002, 26(12), 1553-1566.
- 66 Argani P., Hicks J., De Marzo A.M., Albadine R., Illei P.B., Ladanyi M., Netto G.J. *Xp11 translocation renal cell carcinoma (RCC): extended immunohistochemical profile emphasizing novel RCC markers.* The American journal of surgical pathology, 2010, 34(9), 1295.
- 67 Ellis C.L., Eble J.N., Subhawong A.P., Martignoni G., Zhong M., Ladanyi M., Argani P. *Clinical heterogeneity of Xp11 translocation renal cell carcinoma: impact of fusion subtype, age, and stage.* Modern Pathology, 2014, 27(6), 875-886.
- 68 Vanharanta S., Buchta M., McWhinney S.R., Virta S.K., Peçzkowska M., Morrison C.D. et al. *Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma.* Am J Hum Genet, 2004, 74(1):153-9
- 69 Paner G.P., Srigley J.R., Radhakrishnan A., Cohen C., Skinnider B.F., Tickoo S. K., Amin, M. B. *Immunohistochemical analysis of mucinous tubular and spindle cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma of*

- the kidney: significant immunophenotypic overlap warrants diagnostic caution.* The American journal of surgical pathology, 2006, 30(1), 13-19.
- 70 Chen N., Nie L., Gong J., Chen X., Xu M., Chen M., Zhou Q. *Gains of chromosomes 7 and 17 in tubulocystic carcinoma of kidney: two cases with fluorescence in situ hybridisation analysis.* Journal of clinical pathology, 2014, jclinpath-2014-202363.
- 71 Kuroda N., Yamashita M., Kakehi Y., Hes O., Michal M., Lee G.H. *Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma: an immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study.* Medical molecular morphology, 2011, 44(4), 228-232.
- 72 Williamson S.R., Eble J.N., Cheng L., Grignon D.J. *Clear cell papillary renal cell carcinoma: differential diagnosis and extended immunohistochemical profile.* Modern Pathology, 2013, 26(5), 697-708.
- 73 Tan P.H., Cheng L., Rioux-Leclercq N., Merino M.J., Netto G., Reuter V.E., Srigley J.R. *Renal tumors: diagnostic and prognostic biomarkers.* The American journal of surgical pathology, 2013, 37(10), 1518.
- 74 Fuhrman S.A., Lasky L.C., Limas C. *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma.* Am J Surg Pathol, 1982, 6(7):655-63.
- 75 Srigley J.R., Zhou M., Allan R., Amin M.B., Campbell S.C., Chang, A., Reuter V.E. *CAP June 2017 Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of renal tubular origin.* Erişim adresi:  
<http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/cp-kidney-17protocol-4000.pdf> Erişim tarihi: 30.12.2017
- 76 Cheville J.C., Lohse C.M., Zincke H., Weaver A.L., Blute M.L. *Comparison of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma.* Am J Surg Pathol., 2003, 27:612-624.
- 77 Kaelin Jr W.G. *Von hippel-lindau disease.* Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2007, 2145-173.

- 78 Finke J., Rini B., Ireland J. et al. *Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal carcinoma patients.* Cancer Res, 2008, 14: 6674-6682
- 79 Cho D., Signoretti S., Regan M., Mier J.W., Atkins M.B. *The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer.* Clin Cancer Res, 2007, 13: S758-S763.
- 80 Le Tourneau C., Faivre S., Raymond E. *mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work?* Br J Cancer, 2008, 99: 1197- 203.
- 81 An J., Rettig M.B. *Mechanism of von HippelLindau Protein-Mediated Suppression of Nuclear Factor kappa B Activity.* Mol Cell Biol, 2005, 25: 7546-56.
- 82 Block K., Gorin Y., Hoover P. et al. *NAD(P)H oxidases regulate HIF-2 alpha protein expression.* J Biol Chem, 2007, 282: 8019-26
- 83 Gustafsson A., Boström A.K., Ljungberg B., Axelson H., Dahlbäck B. *Gas6 and the receptor tyrosine kinase Axl in clear cell renal cell carcinoma.* PLoS One, 2009, ; 4:e7575.
- 84 Chang L., Karin M. *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature, 2001, 410: 37-40.
- 85 Wu P.S., Chang Y.H., Pan C.C. *High expression of heat shock proteins and heat shock factor-1 distinguishes an aggressive subset of clear cell renal cell carcinoma.* Histopathology, 2017, 71(5):711-718
- 86 Motzer R.J., Rini B.I., McDermott D.F., Redman B.G., Kuzel T.M., Harrison M.R., Margolin K.A. *Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial.* Journal of clinical oncology, 2015, 33(13), 1430-1437.
- 87 Escudier B., Sharma P., McDermott D.F., George S., Hammers H.J., Srinivas S., Castellano, D. *CheckMate 025 randomized phase 3 study: outcomes by key baseline factors and prior therapy for nivolumab versus everolimus in advanced renal cell carcinoma.* European Urology, 2017, 72(6):962-971.

- 88 *A Study of Atezolizumab as Adjuvant Therapy in Participants With Renal Cell Carcinoma (RCC) at High Risk of Developing Metastasis Following Nephrectomy* (IMmotion010), 2017, Erişim Adresi: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03024996>. Erişim Tarihi: 31/12/2017
- 89 *A Phase Ib Trial of Neoadjuvant Durvalumab (MEDI4736) +/- Tremelimumab in Locally Advanced Renal Cell Carcinoma*, 2017, Erişim Adresi: <http://adisinsight.springer.com/trials/700270875> Erişim Tarihi: 31/12/2017
- 90 Hanahan D., Weinberg R.A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011, 144(5), 646-674.
- 91 Chen D.S., Mellman I. *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013, 39(1), 1-10.
- 92 Curtsinger J.M., Lins D.C., Mescher M.F. *Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells*. Journal of experimental medicine, 2003, 197(9), 1141-1151.
- 93 Yu C., Sonnen A.F.P., George R., Dessailly B.H., Stagg L.J., Evans E.J., Gilbert R.J. *Rigid-body ligand recognition drives cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) receptor triggering*. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(8), 6685-6696.
- 94 Boomer J.S., Green J.M. *An enigmatic tail of CD28 signaling*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2010, 2(8), a002436.
- 95 Hanahan D, Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000, 100(1):57-70.
- 96 Boon T., Cerottini J.C., Van den Eynde B., van der Bruggen P., Van Pel A. *Tumor antigens recognized by T lymphocytes*. Annu. Rev. Immunol., 1994, 12 , 337–365.
- 97 Mellman I., Coukos G., Dranoff G. *Cancer immunotherapy comes of age*, 2011, Nature, 480(7378), 480-489.
- 98 Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu. Rev. Immunol., 2008, 26, 677-704.

- 99 Hino R., Kabashima K., Kato Y., Yagi H., Nakamura M., Honjo T., Tokura, Y. *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. Cancer, 2010, 116(7), 1757-1766.
- 100 Thompson R.H., Gillett M.D., Cheville J.C., Lohse C.M., Dong H., Webster W.S., Zincke H. *Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(49), 17174-17179.7
- 101 Hamanishi J., Mandai M., Iwasaki M., Okazaki T., Tanaka Y., Yamaguchi K., Honjo, T. *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(9), 3360-3365
- 102 Konishi J., Yamazaki K., Azuma M., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Nishimura, M. *B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression*. Clinical cancer research, 2004, 10(15), 5094-5100
- 103 Nakanishi J., Wada Y., Matsumoto K., Azuma M., Kikuchi K., Ueda, S. *Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2007, 56(8), 1173-1182.
- 104 Lyford-Pike S., Peng S., Young G.D., Taube J.M., Westra W.H., Akpeng B., Chen L. *Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer research, 2013, 73(6), 1733-1741
- 105 Ohigashi Y., Sho M., Yamada Y., Tsurui Y., Hamada K., Ikeda N., Tsushima, F. *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer*. Clinical cancer research, 2005, 11(8), 2947-2953

- 106 Karim R., Jordanova E.S., Piersma S.J., Kenter G.G., Chen L., Boer J.M., van der Burg, S.H. *Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma.* Clinical Cancer Research, 2009, 15(20), 6341-6347
- 107 Wu C., Zhu Y., Jiang J., Zhao J., Zhang X.G., Xu, N.. *Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance.* Acta histochemica, 2006, 108(1), 19-24.
- 108 Nomi T., Sho M., Akahori T., Hamada K., Kubo A., Kanehiro H., Nakajima, Y. *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer.* Clinical cancer research, 2007, 13(7), 2151-2157.
- 109 Routh J.C., Ashley R.A., Sebo T.J., Lohse C.M., Husmann D.A., Kramer S.A., Kwon E. D. *B7-H1 expression in Wilms tumor: correlation with tumor biology and disease recurrence.* The Journal of urology, 2008, 179(5), 1954-1960.
- 110 Berghoff A.S., Kiesel B., Widhalm G., Rajky O., Ricken G. et al. *Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma.* Neuro Oncol, 2015, 17: 1064-75.
- 111 Deeks E.D. *Pembrolizumab: A review in advanced melanoma.* Drugs, 2016, 76(3), 375-386.
- 112 Sunela K.L., Kataja M.J., Lehtinen E.T., Salminen T.K., Kujala P.M., Virman J.P., Kellokumpu-Lehtinen P.L.I. *Prognostic factors and long-term survival in renal cell cancer patients.* Scandinavian journal of urology and nephrology, 2009, 43(6), 454-460.
- 113 Thompson R.H., Kuntz S.M., Leibovich B.C., Dong H., Lohse C.M., Webster W.S., Blute, M.L. *Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up.* Cancer research, 2006, 66(7), 3381-3385.
- 114 Krambeck A.E., Dong H., Thompson R.H., Kuntz S.M., Lohse C.M., Leibovich B.C., Kwon E.D. *Survivin and b7-h1 are collaborative*

- predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clinical Cancer Research, 2007, 13(6), 1749-1756*
- 115 Frigola X., Inman B.A., Lohse C.M., Krco C.J., Cheville J.C., Thompson R.H., Kwon E.D. *Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. Clinical Cancer Research, 2011, 17(7), 1915-1923.*
  - 116 Callea M., Albiges L., Gupta M., Cheng S.C., Genega E.M., Fay A.P., Hodi, F.S. *Differential expression of PD-L1 between primary and metastatic sites in clear-cell renal cell carcinoma. Cancer immunology research, 2015, 3(10), 1158-1164.*
  - 117 Leite K.R., Reis S.T., Junior J.P., Zerati M., de Oliveira Gomes D., Camara-Lopes L.H., Srougi M. *PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. Diagnostic pathology, 2015, 10(1), 189*
  - 118 Iacovelli R., Nolè F., Verri E., Renne G., Paglino C., Santoni M., Cascinu S. *Prognostic role of PD-L1 expression in renal cell carcinoma. A systematic review and meta-analysis. Targeted oncology, 2016, 11(2), 143-148*
  - 119 Choueiri T.K., Fay A.P., Gray K.P., Callea M., Ho T.H., Albiges L., Stanton M.L. *PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma. Annals of oncology, 2014, 25(11), 2178-2184*
  - 120 Abbas M., Steffens S., Bellut M., Becker J.U., Großhennig A., Eggers H., Schrader A.J. *Do programmed death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) play a role in patients with non-clear cell renal cell carcinoma?. Medical Oncology, 2016, 33(6), 59*
  - 121 Erlmeier F., Hartmann A., Autenrieth M., Wiedemann M., Ivanyi P., Steffens S., Weichert W. *PD-1/PD-L1 expression in chromophobe renal cell carcinoma: An immunological exception?. Medical Oncology, 2016, 33(11), 120*



- 122 Motoshima T., Komohara Y., Ma C., Dewi A.K., Noguchi H., Yamada S., Sugimoto M. *PD-L1 expression in papillary renal cell carcinoma*. BMC urology, 2017, 17(1), 8
- 123 Chang K., Qu Y., Dai B., Zhao J.Y., Gan H., Shi G., Ye D. *PD-L1 expression in Xp11. 2 translocation renal cell carcinoma: Indicator of tumor aggressiveness*. Scientific Reports, 2017, 7.
- 124 Alaghebandan R., Stehlik J., Trpkov K., Magi-Galluzzi C., Mundo E.C., Foix M.P., Montiel D.P. *Programmed death-1 (PD-1) receptor/PD-1 ligand (PD-L1) expression in fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma*. Annals of Diagnostic Pathology, 2017, 29, 17-22
- 125 Jilaveanu L.B., Shuch B., Zito C.R., Parisi F., Barr M., Kluger Y., Kluger, H.M. *PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma: an analysis of nephrectomy and sites of metastases*. Journal of Cancer, 2014, 5(3), 166
- 126 Joseph R.W., Millis S.Z., Carballido E.M., Bryant D., Gatalica Z., Reddy S., Ho T.H. *PD-1 and PD-L1 expression in renal cell carcinoma with sarcomatoid differentiation*. Cancer immunology research, 2015.
- 127 Kawakami F., Sircar K., Rodriguez-Canales J., Fellman B.M., Urbauer D.L., Tamboli P., Karam J.A. *Programmed cell death ligand 1 and tumor-infiltrating lymphocyte status in patients with renal cell carcinoma and sarcomatoid dedifferentiation*. Cancer, 2017, 123(24), 4823-4831.
- 128 Kluger H.M., Zito C.R., Turcu G., Baine M., Zhang H., Adeniran A., Cohen J.V. *PD-L1 Studies Across Tumor Types, its Differential Expression and Predictive Value in Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors*. Clinical Cancer Research, 2017, clincanres-3146
- 129 Cogswell J., Inzunza H.D., Wu Q., Feder J.N., Mintier G., Novotny J., Cardona D.M. *An Analytical Comparison of Dako 28-8 PharmDx Assay and an E1L3N Laboratory-Developed Test in the Immunohistochemical Detection of Programmed Death-Ligand 1*. Molecular Diagnosis & Therapy, 2017, 21(1), 85–93. <http://doi.org/10.1007/s40291-016-0237-9>

- 130 Ascierto M.L., McMiller T.L., Berger A.E., Danilova L., Anders R.A., Netto G.J., Cope L. The Intratumoral Balance between Metabolic and Immunologic Gene Expression Is Associated with Anti-PD-1 Response in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Cancer immunology research*, 2016, 4(9), 726-733.

