



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

**MALİGN MELANOM HASTALARINDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK CD80, CD86VE PDL-1 EKSPRESYONLARININ
KLİNİKOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Esra ÇOBANKENT AYTEKİN

UZMANLIK TEZİ

2017-ANTALYA



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

**MALİGN MELANOM HASTALARINDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK CD80, CD86VE PDL-1 EKSPRESYONLARININ
KLİNİKOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Esra ÇOBANKENT AYTEKİN

DANIŞMAN
Doç. Dr. Cumhuri İbrahim BAŞSORGUN

UZMANLIK TEZİ

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2017-954 Proje No ile desteklenmiştir.**

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Teşekkür

Bu çalışmanın yürütülmesi ve sonuçların yorumlanması aşamalarında bilimsel görüşlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta danışmanım Doç.Dr. Cumhur İbrahim BAŞSORGUN'a, bütün çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve manevi desteğini hiç esirgemeyen eşim Uzm. Dr. Sami AYTEKİN'ne, bu süreçte en büyük özveriyi gösteren oğlum Uras AYTEKİN'e, aileme ve bu süreçte desteklerinden dolayı değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Anabilim Dalımızın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

İçindekiler Tablosu

ŞEKİLLER DİZİNİ	İV
TABLolar DİZİNİ	V
KISALTMALAR DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Cilt histolojisi ve embriyolojisi.....	2
2.2. Malign melanom.....	4
2.2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2.2. Etiyoloji ve patogeneze	5
2.2.3. Malign Melanom Sınıflaması	15
2.2.4. Klinik tanı	19
2.2.5. Melanomda tedavi.....	22
2.2.6. Prognostik özellikler	28
2.3. Tümör immünitesi ve immünoterapi	32
3. MATERYAL VE METOD	41
4. BULGULAR	47
4.1. Demografik veriler	47
4.2. Histolojik subtipler	49
4.3. Tümör boyutu.....	52
4.4. Clark evresi ve Breslow kalınlığı	53
4.5. Ülserasyon.....	56
4.6. Büyüme fazı	57
4.7. Lenfositik infiltrasyon.....	58
4.8. Nörotropizm.....	60
4.9. Regresyon.....	61
4.10. Lenf düğümü metastazı	62
4.11. Klinik evre	64
4.12. Sağkalım.....	65
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇLAR	76
7. ÖZET.....	78
8. ABSTRACT	79
9. KAYNAKÇA	80

Şekiller Dizini

Şekil 1 Gelişimin farklı evrelerinde cilt yapısı A: 5. Hafta B: 7. Hafta C: 4. Ay ve D: Doğum Sırasında (2)	2
Şekil 2 Melanom tanısında ABCDE kriterleri	20
Şekil 3 Melanom tanısında akış şeması (122).....	22
Şekil 4 T hücresi ve APC arasındaki immünolojik sinaps (183)	34
Şekil 5 TCR aktivasyonu (183).....	35
Şekil 6 A)İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD80 ile güçlü membranöz boyanma (CD80x200), B) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD80 ile zayıf membranöz boyanma (CD80x200), C)İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD86 ile güçlü membranöz boyanma, (CD86x400) D) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD86 ile zayıf membranöz boyanma (CD86x400)	45
Şekil 7 A) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PDL-1 ile güçlü membranöz ve nükleer boyanma (PDL-1x400), B) İmmünohistokimyasal olarak lenfositlerde PDL-1 ile güçlü boyanma, iğsi tümör hücrelerinde negatif boyanma (x200), C) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PDL-1 ile membranöz ve nükleer boyanma, lenfositlerde negatif boyanma (PDL-1x400), D) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PDL-1 ile zayıf nükleer boyanma, lenfositlerde güçlü pozitif boyanma (PDL-1x400).....	46
Şekil 8 CD80 boyanma pozitifliğine göre sağkalım grafiği.....	65
Şekil 9 CD80 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği	66
Şekil 10 CD86 boyanma pozitifliğine göre sağkalım grafiği.....	66
Şekil 11 CD86 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği	67
Şekil 12 Tümörde PDL-1 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği	67
Şekil 13 Lenfositte PDL-1 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği.....	68
Şekil 14 CD80 ve CD86 ekspresyon grafikleri.....	68
Şekil 15 Kanserin karakteristik özellikleri	71

Tablolar Dizini

Tablo 1 Malign Melanom DSÖ sınıflaması	16
Tablo 2 Melanom tanısında majör ve minör kriterler	20
Tablo 3 Melanomda Clark evrelemesi	29
Tablo 4 Melanomda Breslow evrelemesi.....	29
Tablo 5 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (T).....	30
Tablo 6American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (N)	30
Tablo 7 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (M)	31
Tablo 8 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (Patolojik evreleme).....	31
Tablo 9 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (Klinik evreleme)	31
Tablo 10 CD80 ve CD86 ekspresyonlarının hasta sayıları ile gösterimi	68
Tablo 11 CD80 ekspresyonu ve boyanma skorlarına göre risk faktörleri	69
Tablo 12 CD86 ekspresyonu ve boyanma skorlarına göre risk faktörleri	69
Tablo 13 Tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorlarına göre risk faktörleri	70

Kısaltmalar Dizini

ALM	:	Akral lentiginöz melanom
APC	:	Antijen sunan hücre
BATF	:	Bazik lösin transkripsiyon faktörü
CTLA-4	:	Sitotoksik T Hücre Antijeni-4
CVD	:	Sisplatin, Vindeksin ve Dakarbazin
DAG	:	Diaçil gliserol
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
EMT	:	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FSA	:	Frozen section analiz
IDO	:	İndolamin 2-3 dioksijenaz
IFN- α	:	İnterferon alfa
IL-2	:	İnterlökin-2
IP3	:	İnoзитол trifosfat
ITIM	:	İmmünoseptör tirozin-temelli inhibitör motif
LAK	:	Lenfokin ile aktive olan Killer hücreleri
LMM	:	Lentigo malign melanom
MC1R	:	Melanokortin-1 Reseptörü
MM	:	Malign melanom
NM	:	Nodüler melanom
PIP3	:	Fosfoinozitol trifosfat
Pi3K	:	Fosfatidil inositol 4-5 bifosfat 3 kinaz
RBF	:	Radyal büyüme fazı
SLN	:	Sentinel lenf nodu
SRBF	:	Sınıflanmamış radyal büyüme fazı
TCR	:	T hücre reseptörleri
TİL	:	Tümörü infiltre eden lenfositler
Treg	:	Regülatuar T hücresi
UV	:	Ultraviyole
VBF	:	Vertikal büyüme fazı
VE-kaderin	:	Vasküler-Endotelyal Kaderin
YYM	:	Yüzeyel yayımlı melanom

1. GİRİŞ

Malign melanom melanositlerden gelişen ve yüksek immünojenite gösteren malign bir tümördür. Her ne kadar primer yerleşim yeri cilt olsa da, kulak yolunda, gastrointestinal sistemde, gözlerde, oral, genital mukozada veya leptomeninkslerde de görülebilmektedir(1).

Rezeke edilen melanom örneklerinde tümörü infiltre eden lenfositlerin varlığı ve spontan regresyon alanlarının gözlenmesi, melanomu immünoterapi için olası bir hedef haline getirmiştir. Günümüzde tümör immünitesi ve immünoterapi oldukça yeni kavramlar olup, bu fenomenler gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada, 2005-2015 yılları arasında malign melanom ön tanısı ile biyopsi örneği alınan veya cerrahi rezeksiyon yapılan hastalardan alınan spesimenlerin immünohistokimyasal değerlendirmesi neticesinde CD80, CD86 ve PD-L1 ekspresyon oranlarını belirlemeyi ve bu belirteçlerin evre ve sağkalım gibi klinik özellikler ile korelasyon ilişkisini araştırmayı amaçladık.

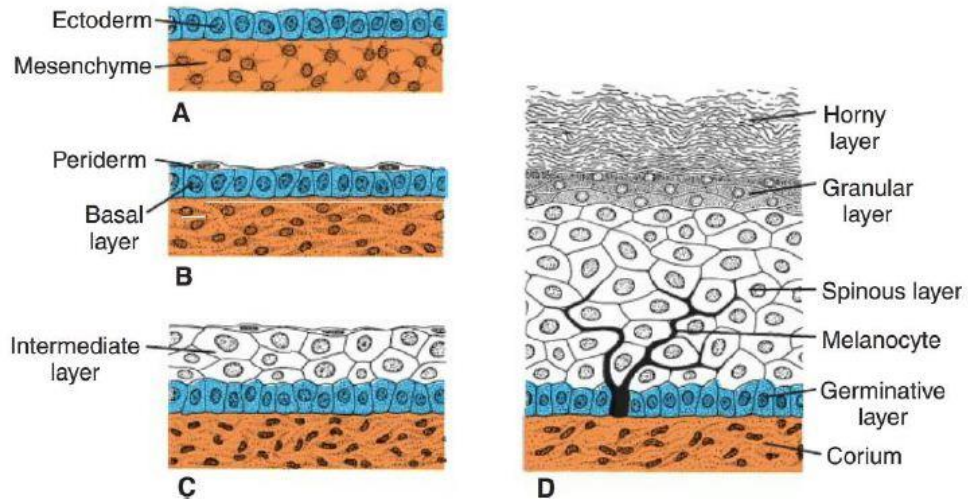
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cilt histolojisi ve embriyolojisi

Embriyolojik olarak üst katmanı oluşturan epidermis, yüzey ektodeminden köken alırken, daha derinde yer alan dermis ise mezenkimal orjinlidir.

2.1.1.Epidermis

İntrauterin dönemin başlarında embriyo tek katlı bir ektodermal hücre katmanı ile çevrili durumdadır. İkinci haftada bu katman bölünerek yassı hücrelerden oluşan periderm veya epitrichium katmanı yüzeyi örtecek şekilde yerleşir. Bazal tabakada devam eden proliferasyon neticesinde ilerleyen dönemde üçüncü bir tabaka olan intermediate bölge de oluşur. Nihayetinde dördüncü haftanın sonunda ise epidermis 4 tabakalı karakteristik görünümüne kavuşur.



Şekil 1 Gelişimin farklı evrelerinde cilt yapısı A: 5. Hafta B: 7. Hafta C: 4. Ay ve D: Doğum Sırasında (2)

Bazal veya diğer ismi ile **germinatif tabaka**; ciltte yeni hücrelerin üretiminden sorumlu olan bölümdür. Bu katman tarafından oluşturulan girinti ve çıkıntıların cilt yüzeyinde meydana getirdiği görünüm parmak izi gibi karakteristik yapıları oluşturmaktadır.

Spinöz tabaka; ince tonofibriller içeren büyük polihedral hücreler içermektedir.

Granüler tabaka; hücrelerin içlerinde küçük keratohyalin granülleri bulunmakta olup, tabakanın adı bu granüllerden gelmektedir.

Boynuzsu tabaka; oldukça sıkı biçimde yerleşmiş keratin ile dolu ölü hücrelerden meydana gelen bu tabak, cilt yüzeyinin pullu görünümünü sağlamaktadır.

Periderm hücreleri genellikle intrauterin hayatın ikinci döneminde atılmakla beraber, bu hücreler amniyon sıvısında görülebilmektedirler. Gelişimin ilk üç aylık döneminde, nöral krestten köken alan bir takım hücreler epidermis içerisine doğru invazyon gösterirler. Bu hücreler melanozomlarda melanin pigmenti sentezlemektedirler. Melanozomlar biriktikçe, melanositlerin dentritik uzantılarından interselüler olarak ciltteki keratinositlere veya kıl köklerine taşınırlar. İntrauterin dönemde deri ve saç pigmentasyonu bu şekilde sağlanmaktadır (2).

2.1.2.Dermis

Dermis üç farklı mezenkimal kaynaktan türemiştir. Ekstremiteler ve gövde duvarlarını örten dermis, lateral mezoderm tabakasından, sırtı örten dermis paraksiyel mezoderminden, baş ve boyunu örten dermis ise nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. İntrauterin üç ve dördüncü aylarda, koryum dokusu tarafından dermal papilla olarak da adlandırılan düzensiz parmaklı çıkıntılar oluşturulur. Bu papillaların çok büyük bölümünde küçük kapiller yapılar ve sensörinöral uç organlar yerleşim gösterir. Subkoryum olarak isimlendirilen daha altta yerleşik tabaka ise, yüksek oranda yağ dokusu ihtiva etmektedir.

Doğum sırasında cilt, sebase glandların salgıları, dejenere epidermal hücreler ve kıllardan meydana gelen beyazımsı bir tabaka (verniks kazeoza) ile kaplı haldedir. Bu tabaka sayesinde cilt amniyon sıvısının massere edici etkisinden korunmaktadır.

2.2. Malign melanom

Malign melanom (MM) melanositlerden köken alan, primer olarak ciltte yerleşim gösteren bir malignitedir. Bunun yanı sıra, kulak yolunda, gastrointestinal sistemde, gözlerde, oral, genital mukozada veya leptomeninkslerde de görülebilmektedir. MM, cilt kanserleri içerisinde düşük görülme oranına sahip olsa da, mortalitesi oldukça yüksek bir kanserdir (3).

Malign melanomaların çoğu epidermiste ortaya çıkabilmekte ve bunlar *in-situ* (tamamen epidermisin içerisinde) veya invaziv (dermise doğru ilerlemiş) olabilmektedirler. Bazı durumlarda invaziv MM'ler tamamen dermal yerleşim de gösterebilmektedirler. İnvaziv melanomlar tümörojenik (vertikal büyüme) veya non tümörojenik (radyal büyüme) olabilmektedirler. *In-situ* melanomlar ve non tümörojenik melanomlar “lentigo malign”, “yüzeyel yayımlı”, “akral lentiginöz” ve “mukozal lentiginöz” tiplerine ayrılabilir. Tümörojenik melanomlar daha önceden var olan herhangi bir non tümörojenik komponentten gelişebilmekte ve buna uygun şekilde isimlendirilmektedirler. Ancak, tümörojenik melanomlar, tanı anında *in-situ* komşuluk ya da mikroinvazyon olmaksızın *de-novo* olarak da gelişebilmekte ve bu tablo, “nodüler melanom” olarak isimlendirilmektedir. Tümörojenik melanomların “desmoplastik melanom” ve “nörotropik melanom” tipleri bulunmaktadır

Tüm majör melanom tipleri, dermal-epidermal bileşkedeki melanositlerden köken almaktadır. Lezyonların bir kısmı daha önceden var olan bir nevüs ile ilişkili olup, yarısından fazlasında ya *de-novo* gelişim ya da öncül nevüsün yerini alma durumu vardır. Kutanöz melanomlar çoğunlukla güneş ışığı maruziyeti ile ilişkili olup, yüzeyel yayımlı tiplerinde intermitan güneş yanıkları, lentigo malign tiplerinde ise kronik maruziyet sorumlu tutulmaktadır. Akral ve mukozal melanomların sebepleri ise henüz bilinmemektedir (1).

2.2.1.Epidemiyoloji

Melanom insidansı, 1930'lu yıllardan günümüze dek yaklaşık 15 katlık bir artış göstermekle beraber, melanom nedeni ile meydana gelen ölüm insidansındaki artış ise %2 düzeylerindedir. Buna karşılık son 50 yılda melanom

nedeniyle ölüm insidansı anlamlı derecede azalma göstermektedir. Benzer şekilde son yıllarda 5 yıllık sağkalım anlamlı derecede artmıştır. Sağlık Bakanlığı Kanser Verileri'ne göre, hastalığının ülkemizdeki görülme sıklığı ise, erkeklerde 10.000'de 1,9, kadınlarda 10.000'de 1,3 olarak bildirilmiştir (4). Hastalık insidansındaki artışın, metastaz potansiyeli olmayan çok erken olguların tanısı nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (5, 6)

Melanom gelişme riski yaşla artmaktadır. Ortalama görülme yaşı 45 ile 55 yaşları arasında olmakla beraber her yaş grubu risk altındadır. Melanom genellikle toplumun üretken yaştaki kişilerini etkiler. Amerika Birleşik Devletleri'nde tanı konulan melanom olgularının %25'i 40 yaşın altındadır. 20-35 yaş arası kadınlarda serviks kanserinden sonra en sık görülen kanserdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde melanom daha çok yüksek sosyoekonomik sınıflarda görülmekle beraber, düşük sosyoekonomik sınıflarda daha fatal seyretmektedir.

Hastalık ırklar arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Beyaz ırkı belirgin olarak daha fazla etkilemektedir. Beyaz Amerikalılarda, Afrika kökenli Amerikalılardan 20 kat daha fazla görülmektedir. Zencilerde beyazlardan farklı olarak pigmente bölgelerden çok akral bölgelerde ortaya çıkar. Irklar arasındaki insidans farklılıklarına rağmen melanom insidansı global olarak artmaktadır. Tüm dünyada ırk en önde giden risk faktörüdür ve beyaz ırkta, siyah ve sarı ırktan daha fazla görülmektedir (7).

2.2.2.Etiyoloji ve patogenezi

2.2.2.1. Ultraviyole radyasyon

Malign melanom patogenezinin aydınlatılmasında epidemiyolojik çalışmalar çok büyük rol oynamıştır. Yapılan bu çalışmalarda ultraviyole (UV) radyasyon maruziyetinin, hastalığın patogenezinde önemli bir risk faktörü olduğu, aynı zamanda çocukluk ya da ergenlik döneminde ciddi güneş yanığı yaşayanlarda, hayatın ileri dönemlerinde melanom gelişme riskinin iki katından daha fazla arttığı gösterilmiştir (8). Farklı sürelerde ve tiplerde UV radyasyon

maruziyetinin değerlendirildiği çalışmalarda, rekreasyonel aktiviteler veya tatiller gibi sürekli olmayan UV alımının melanom gelişimi için anlamlı bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (9, 10). Buna karşın mesleksel maruziyet gibi sürekli UV alımının olduğu durumlarda ise belirgin olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bazı otoriteler mesleksel maruziyeti, sürekli UV alımı şeklinde yorumlayarak melanom gelişimi üzerinde etkisini reddetmiş (11), bazıları ise spesifik aralıklı bir maruziyet olarak tanımlayarak artan melanom insidansı ile ilişki gördüklerini rapor etmişlerdir (12).

Melanom gelişiminde doğal UV radyasyonun yanı sıra suni UV ışınımı üreten bronzlaşma ünitelerinin de rolü olduğunu bildiren otoriteler bulunmaktadır (13). Güneş ışığının bir bileşeni olan UV radyasyon, dalga boyuna göre UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) ve UV-C (100-218 nm) olarak üç kategoriye ayrılmakta olup, sadece UV-A ve UV-B atmosferden geçerek cilt ile etkileşebilmektedir (14). UV radyasyon, pirimidin dimerlerinin oluşması veya sitozinin, timidine deaminasyonu gibi mekanizmalar ile DNA'da mutasyonlara neden olmaktadır (15, 16). Kutanöz melanom tanılı örneklerde, UV'nin potens mutajenik etkilerini destekler şekilde, diğer tüm solid tümörlerden daha yüksek oranda baz mutasyonu gözlenmektedir (17-19). Tüm melanom vakalarının %8-12'sini oluşturan, ailesel melanom öyküsü olan kişiler, UV ışınlarına karşı yüksek hassasiyet göstermektedir (20-23). Bu kişilerde, erken yaşta melanom gelişimi ve multipl melanom lezyonları gelişim riskinin de daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Gerek doğal gerekse suni UV radyasyon maruziyetinin melanom gelişiminde önemli bir risk faktörü olması görüşüne yönelik olarak, güneş kremi kullanımı ile melanom insidansının etkili şekilde azaltılabileceği öne sürülmektedir (24).

2.2.2.2. Melanositik Nevüsler

Malign melanom için bilinen bir diğer risk faktörü melanositik nevüslerdir. Melanositik nevüsler epidermis, kıl folikülü veya uveanın pigment üreten hücreleri olan melanositlerin, benign klonal proliferasyonu ile oluşmaktadır (25). Cilt yapısındaki melanositler, keratinositler arasında serpiştirilmiş şekilde bazal

membranının üzerinde dinlenim durumunda bulunurlar. Melanositik nevüslerde ise tek başlarına veya kümelenmiş halde çok yüksek miktarda melanosit yerleşimi izlenebilmektedir (26). Melanositik nevüsler, içerdiği yüksek miktarda melaninden dolayı, ciltte koyu pigmente lezyonlar halinde görülmektedirler. Nevüsler, halk dilinde et beni veya doğum lekesi olarak da belirtilmektedirler.

Melanositik nevüsler konjenital veya akkiz olabilmektedir. Konjenital nevüsler, yenidoğanların %1-3'ünde, doğumda veya doğumdan hemen sonra görülmektedir (27). Konjenital nevüsler boyutlarına göre, "küçük boyutlu (<1,5 cm), "orta boyutlu" (1,5-20 cm)," büyük boyutlu" (20-40 cm), "çok büyük boyutlu" (>40 cm) olarak 4 kategoriye ayrılmaktadır (28). Yapısal olarak konjenital nevüsler globüler özellikte olup, terminal kıl foliküllerinin üzerinde yerleşim gösterirler. Histolojik olarak ise, kutanöz ekler, damarlar veya sinirler boyunca kollajen lifler arasında kümelenmiş, fuziform, epiteloid, balon ya da nöroid şekilli büyük melanositler yuvaları ile karakterizedir.(25). Bu yapılar derin retiküler dermis ve subkutan dokuya kadar ilerleyebilmektedir. Bu nevüslerin, embriyogenez sırasında melanoblastların klonal proliferasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. Akkiz nevüsler ise doğumdan sonraki bir yıl içerisinde veya erken çocukluk döneminde ortaya çıkabilmekte, sayıları yaş ile orantılı olarak artarak, yaşamın 3-4. dekatlarında en yüksek miktara ulaşmaktadırlar. Genetik yapı ve çevresel faktörler (UV radyasyon), akkiz nevüsler için predispozandır. Klinik olarak akkiz nevüsler, düz, yüzeysel, horizontal yayılımlı lezyonlar olup, genellikle konjenital nevüslerden daha küçüktür (<6mm), Dermatoskopik olarak akkiz nevüsler, retiküler, globüler, homojen veya bunların kombinasyonu görünümünde olabilmektedir. Bu görünüm, birbirine yapışan ve yuvalanan melanositlerin farklı dağılımından kaynaklanmaktadır. Akkiz nevüsleri oluşturan melanositler, histolojik olarak retiküler dermis veya subkutan dokuya inmezler. Hücresel yapı olarak monomorfik, küçük ve oval yapıdadırlar.

Melanositik nevüslerin çok büyük bir bölümü yaşamın ilerleyen dönemlerinde kaybolur veya yaşam boyunca değişikliğe uğramaz. Fakat %5'den daha az bir kısmı, farkedilebilir değişiklik gösterir ve yakın takibe alınır (29-31). Bununla beraber, kutanöz melanom vakalarının %35-50'si prekürsör bir melanositik nevüsten gelişmektedir (32, 33). Konjenital melanositik nevüsün

malign transformasyon gösterme riskinin, nevüs boyutu ile orantılı olarak arttığı (34), kutanöz melanom gelişme riskinin ise toplam ve klinik olarak displastik nevüs sayıları ile ilişkili olduğu literatürde yer alan çalışmalarda ortaya koyulmuştur (35, 36). Yaşamın ileri dönemlerinde aşırı miktarlarda ortaya çıkan veya atipik yapılı olan melanositik nevüsler, melanom gelişimi için potansiyel bir risk faktörü ya da tanısız açıdan anlamlı bir belirteç olarak kabul edilmektedir (37). Var olan benign karakterli nevüste gözlenen şekil, renk veya doku değişiklikleri de melanom tanısında kabul gören diğer güçlü belirteçlerdir. Yapılan bir çalışmada malign melanom hastalarının %81'inde, malign lezyon bölgesinde renk, şekil veya doku değişimi gösteren nevüs varlığı gösterilmiştir. Ancak, nevüslerde görülen değişimlerin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamadığından dolayı, değişim gösteren her nevüsün de melanom lehine yorumlanamayacağı unutulmamalıdır. Değişim gösteren nevüslerin tespiti ve erken dönemde cerrahi eksizyonu sayesinde kansersiz sağkalım açısından oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (38).

2.2.2.3. Moleküler değişimler

Malign melanom'da, orijinden, diğer kutanöz veya subkutanöz bölgelere doğru yayılım ya da metastaz meydana gelmesi halinde, tedavi araçlarına yanıt oranları yaklaşık %5-20, 10 yıllık sağkalım düzeyleri ise sadece %10 civarlarında olmaktadır (39, 40). Metastatik melanom tablosunda ise tedavinin zorluğunun yanı sıra, sağkalım ve kür oranları oldukça düşüktür.

Sellüler seviyede incelendiğinde kanser hücrelerinin, apoptozdan kaçış, büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaksızın sınırsız büyüme potansiyeli, angiogenez ve metastaz gibi ayırıcı özellikler kazandığı görülmektedir. Melanom hücrelerinin, büyüme ve hayatta kalma adına diğer hücrelere karşı sağladığı bu üstünlüğün altında oldukça spesifik moleküler değişimler yatmaktadır. Hücrelerin ortaya koyduğu moleküler değişimlerin tanımlanması ile hedefe yönelik yeni tedavi ajanlarının da kullanıma girmesi mümkün olacaktır.

BRAF:

Yapılan çalışmalarda melanom hücrelerinin %40-60'ında aktive BRAF mutasyonu bulunduğu gösterilmiştir (41). BRAF geni, RAS-RAF-MEK-ERK kinaz yolağının, serin/treonin protein kinaz bölümünü kodlayarak hücre büyümesini ve proliferasyonunu kontrol eden bir proto-onkogendir (42, 43). Normalde BRAF geni büyüme sinyallerinin hücresel cevabında diğer RAF kinazlar ile homo/heterodimerizasyon halinde bulunmaktadır. Ancak aktive edici bir mutasyon sonucunda, BRAF kendisine yetebilen, sürekli aktif monomer haline dönüşür (44). Sonuçta ortaya çıkan kontrolsüz hücre proliferasyonu, tümör gelişimi ve büyümesinde rol oynayabilmektedir. BRAF'ın aktive olduğu mutasyonların %90'ı valin yerine glutamik asidin geçtiği V600E missense mutasyonu olup, tüm melanom vakalarının %50'sinden fazlasında görülmektedir (41, 45, 46). İkinci sıklıkla ise valin yerine lizinin geçtiği V600K mutasyonu görülmektedir. Aynı zamanda, BRAF mutasyonları benign nevüslerin de %68'inde görülebildiğinden dolayı, melanom patogenezinde rol oynamıyor olabileceği de düşünülmüştür (47). Nevüslerin, oluştuktan sonra genellikle stabil kalmalarından dolayı, bazı otoriteler BRAF mutasyonlarının melanositik neoplazi formasyonunda rol oynayabileceği üzerinde durmaktadır. Yapılan ileri çalışmalarda melanomun erken dönemi olarak bilinen radyal büyüme fazındaki tümörlerde bu mutasyonun görülme oranı, melanom başlangıcında BRAF mutasyonlarının rolü olmadığı hipotezini destekler nitelikte, %10 olarak bildirilmiştir (48). Bununla beraber, vertikal büyüme gösteren veya metastaz yapmış lezyonlarda ise, BRAF mutasyonlarının progresyonunda rolü olduğunu destekler şekilde, %60-70 oranında mutasyon pozitifliği gösterilmiştir (47-50). Melanom metastazlarında gözlenen aktive BRAF varlığı, bu mutasyonun hücre büyümesini stimüle ettiği önerisi ile açıklanmaktadır. Bu hastalarda gözlenen yüksek BRAF^{V600E} prevalansı, anti-melanom tedavilerde hedef olarak düşünülebileceği hipotezini güçlendirmektedir.

NRAS:

Melanom başlangıcı veya gelişiminde suçlanan bir diğer faktör, NRAS GTPaz veya Nöroblastoma RAS onkogenindeki moleküler değişimlerdir. NRAS GTPaz mutasyonu, melanom olgularının %15-20'sinde görülmekle birlikte, sıklıkla G60/61 ve G12/13 kodonlarında ortaya çıkmaktadır (51-53). NRAS,

RAS-RAF-mitojen aktive edici kinaz yolağının bir bileşeni olup, özellikle Raf protein aktivitesini kontrol eden Ras protein ailesinin bir parçasıdır (42, 45).

NRAS ve BRAF aynı yolak üzerinde yer almaktadır ancak yapılan çalışmalar, NRAS ve BRAF mutasyonlarının nadiren beraber bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda BRAF mutasyonu olan ve BRAF inhibitörü tedaviye yanıt vermeyen ilerlemiş melanom hastalarında eşlik eden NRAS mutasyonunun da olduğu rapor edilmiştir (54). Elde edilen bulgular, melanom gelişiminin altında yatan mekanizmalarda, BRAF ve NRAS'dan fazlasının rol oynadığı hipotezini ön plana çıkartmaktadır. NRAS mutasyonu olan hastalarda, kalın, vertikal büyüme gösteren tümörler görülmesi, bu mutasyonun aşırı hücre çoğalmasını indüklediğini düşündürmektedir.

Melanom olgularında görülen NRAS mutasyonlarındaki karakteristikler BRAF mutasyonları ile benzerlik göstermektedir. BRAF mutasyonları gibi NRAS mutasyonları da benign karakterli nevüslerde yüksek oranlarda görülmekte ve bu durum melanom başlangıcındaki rolünün kısıtlı olabileceğini ortaya koymaktadır (47, 52, 55). Primer ve metastatik tümörlerde yapılan mutasyon analizleri, BRAF ve NRAS mutasyonlarının, metastatik tümörlerde çok daha yüksek oranda görüldüğünü göstermiştir. Ayrıca metastatik tümörlerdeki BRAF ve NRAS mutasyonlarının daha düşük sağkalım oranları ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (42). Sonuç olarak MAPK yolağında gözlenen her iki mutasyon da, primer melanomun metastatik varyantına dönüşümünde rol oynamaktadır. Kontrolsüz proliferasyonda oynadığı önemli rolden dolayı NRAS mutasyonlarının melanom tedavisinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (38).

PI3K-ATK/PTEN:

PI3K-AKT yolağı, hücre proliferasyonu ve sağkalımında önemli rol oynayan bir diğer faktördür. RAS-RAF-MEK-ERK yolağı gibi, PI3K-AKT'nin de yapısal aktivasyonu tümöre, proliferasyon ve metastaz açısından kompetitif büyüme üstünlükleri sağlamaktadır. Meydana gelen nokta mutasyonları veya yolak üzerinde kilit noktalarda yer alan PIK3CA, AKT1 gibi proteinlerin kromozomal kopya sayılarının değişmesi ile PI3K-AKT yolağı tümör gelişimi için oldukça avantajlı hale gelmektedir (52). Melanom örnekleri üzerinde yapılan analizlerde, PI3K missense mutasyon görülme oranı %3 olarak bildirilmiştir (52,

56, 57). Görülen düşük mutasyon oranları bu yolağın melanom gelişiminde ve progresyonunda rolü olmadığını düşündürmektedir.

Bununla beraber, NRAS mutasyonu veya PTEN inhibisyonunun ortadan kalkması gibi, PI3K-AKT hiperaktivasyonun meydana geldiği diğer yollar da bulunmaktadır (52). NRAS sürücülüğündeki bir aktivasyon sadece PI3K-AKT yolağını değil, RAS-RAF-MEK-ERK yolağını da aktive etmektedir. NRAS inhibisyonunun ortamda olmamasından dolayı yolların her birisi için ayrı inhibisyona gereksinim olmaktadır.

Bir tümör süpressör gen olan PTEN, PI3K'yı defosforile ederek inhibisyonunu sağlamaktadır (58). PI3K-AKT yolağı, hücre viabilitesinin sağlanması ve apoptozun inhibisyonunda görev almaktadır. Bu yolağın hiperaktivasyonu veya baskılayıcı mekanizmalarının inhibisyonu ile, kemoterapi ve radyoterapi gibi modalitelerin hücre ölümü üzerindeki potens etkilerinde kayıp meydana gelmektedir (59).

P53:

P53, meme, kolorektal, akciğer ve prostat kanserlerinde rolü tanımlanmış bir tümör süpressör gendir (60-70). Hücrel stres veya DNA hasarı ile aktive olan p53 proteini, hücre ölümünü indüklemektedir (71). Melanomda ise p53'ün rolü tartışmalıdır. İmmünohizyokimyasal tetkikler ile melanom vakalarında bozulmuş p53 ekspresyonu oranlarını %11-85 arasında oldukça geniş bir yelpazede rapor edilmiştir (70, 72). Bununla beraber, P53 gen lokusuna yönelik yapılan sekans analizlerinde, mutasyon izlenmediği ve normal formda P53 geninin görüldüğünü bildiren otoriteler de vardır (70). P53 geninde mutasyon gözlenmemiş olmasına rağmen melanom olgularında gama radyasyonu veya kemotoksik ilaçlar ile apoptoz yanıtının alınamıyor olması, bu hücrelerde genin uygun fonksiyon yürütemediği hipotezini desteklemektedir. Bununla beraber, P53 genini inaktive eden bir takım protein ya da proteinler sebebi ile tümör süpressör fonksiyonlarını tam olarak yerine getiremediği de öne sürülmektedir (38).

CDK4/CDKN2A:

Melanom hastalarının %5-10'unun ailesinde de aynı hastalık görülmektedir (73, 74). Bu yatkınlık durumu için önerilen kalıtım biçimi olan

otozomal dominant geçişte, hastalık 8 dekatlık süreçte %53 penetrans ile kalıtılmaktadır (74, 75).

Onkojen karakterdeki CDK4 ve tümör süpressör karakterdeki CDKN2A genleri, ortaya çıkışında genetik yatkınlığın rolü bilinen, ailesel melanom gelişimi ile ilişkili olan p16INK4a proteinini kodlamaktadırlar (74, 76).

Diğer D-tip siklinler ile birlikte, CDK6 ile pRb ve CDK4 ile p16INK4a, hücre bölünmesinin G1-S fazı geçişini kontrol etmektedirler (77-82). Siklin D1 aktivasyonu ile CDK4 protoonkogen gibi davranarak G1-S fazı geçişini hızlandırmakta ancak p16INK4a, CDK4 aktivitesini engelleyerek hücre bölünmesini durdurucu yönde etki göstermektedir (20, 82). Yapılan çalışmalarda, aile öyküsü pozitif olan melanom hastalarının %25-60'ında, 9p21 bölgesinde P16INKA inaktivasyonuna yol açan bir mutasyon bulunduğu gösterilmiştir (74, 76, 83-90). Benzer yöndeki diğer çalışmalarda ise CDK4 geni mutasyonlarının çok daha düşük oranlarda olduğu bildirilmiştir (91).

c-KIT:

Tüm melanom vakalarının %2-5'i akral lentiginöz melanom subtipi tarafından oluşturmaktadır (92, 93). C-Kit geninde mutasyon veya kromozomal dublikasyon, akral melanomların %23'ünde kutanöz melanomların ise %2'sinden daha azında gözlenmektedir (94). C-Kit geni tirozin kinaz transmembran reseptörünü kodlamakla beraber, melanogenez ve melanosit hücre bölünmesinin kontrolünde rol oynamaktadır (95). Nokta mutasyonları veya gen dublikasyonları sıklıkla Kit proteininin artmış ekspresyonuna neden olmakta, bu durum melanosit proliferasyonunda, hücre ölümünde, kemotaksiste ve adezyonda değişimler yaratarak tümörögeneze katkıda bulunmaktadır (95-97).

MC1R:

Melanokortin-1 reseptörü (MC1R), melanosit duvarında G-proteini bağlı bir reseptör gibi görev yapmakta olup, cilt pigmentasyonunun belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır (98, 99). UV radyasyon maruziyeti ile alfa-melanosit stimulan hormon üretiminde artış meydana gelmekte ve bu hormon MC1R aktivasyonu ile melanogenez başlatarak melanin üretimini sağlamaktadır. Melanin, okside bir tirozin derivativesi olup, UV radyasyona cevap olarak üretilmekte; insan cildinin koyuluk ve pigmentasyonunun belirlemektedir.

Melanin, koyu kahverengi-siyah ömelanin ve kırmızı-yeşil feomelanin olmak üzere iki formda üretilmekte ve bu formların her ikisi de insan cildinde bulunmaktadır (100). Yapılan çalışmalarda, yüksek feomelanin-ömelanin oranına ile beraber toplam melanin seviyesi düşük olan kişilerde, açık ten rengi ve kızıl saç görüldüğü, aynı zamanda bu kişilerde bronzlaşma izlenmediği rapor edilmiştir (101).

Melaninin fonksiyonları halen aydınlatılmaya çalışılıyor olmakla beraber, genel olarak bilinen UV radyasyon kaynaklı DNA hasarına karşı bir kalkan olarak görev yaptığıdır. Bununla beraber termoregülasyonda, serbest radikallerin tutulmasında, katyon şelasyonunda ve antioksidan sistemde de rol oynadığı gösterilmiştir (102, 103). Açık ten rengine sahip kişilerde, melanosit içeren epidermis yerleşimli granüllerin (melanozom) miktarının daha düşük olmasından dolayı, UV radyasyon penetrasyonunun ve melanositlerde “güneş ışığı ilişkili DNA hasarının” daha yüksek oranda görüldüğü buna bağlı olarak malign neoplazi riskinin de yükseldiği düşünülmektedir (101, 104). UV radyasyon direkt olarak DNA hasarına neden olabileceği gibi, reaktif oksijen türleri de oluşturabilmektedir. Normal şartlar altında, glutatyon yolağı ile birlikte melanin de antioksidan gibi davranarak reaktif oksijen türlerinin nötralizasyonunda rol oynamaktadır. MC1R varyant kişilerde ise azalmış melanin üretimi neticesinde DNA hasarı yaratan oksidatif stresin düzeyinde artma meydana gelmekte ve bu hasar melanom başlangıcını tetikleyebilmektedir (102).

Yapılan çalışmalarda özellikle beyaz ırka mensup bazı popülasyonlarda, MC1R varyant bireylerin melanom gelişimi açısından daha yüksek yatkınlığa sahip oldukları gösterilmiştir (98). Yapılan bir diğer vaka kontrol çalışmasında ise melanom vakalarının %72’sinde kontrol grubunun %56’sında MC1R gen polimorfizmi gözlemlendiği bildirilmiştir. Kızıl saç rengi fenotipi ile ilişkilendirilmiş 60’den fazla MC1R gen polimorfizmi saptanmış olup, bunların her birisinde melanom gelişimi riskinin yaklaşık olarak iki katına çıkmış olduğu gösterilmiştir (105). Bununla beraber MC1R polimorfizmlerinin kendi başına melanom başlangıcını sağladığına dair kanıt ortaya konulamamıştır. MC1R sinyal kapasitesinde azalma veya tamamen kayıp neticesinde ortaya çıkan diğer genetik mutasyonların, melanom gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (98). MC1R

varyant kişilerde, BRAF, NRAS ve CDK2NA gibi gen bölgelerinde UV radyasyon hasarı daha kolay oluşabilmektedir (98, 106, 107).

Kaderin:

Fizyolojik koşullarda melanositler ile farklanmamış bazal keratinositler arasındaki bağlantı E-kaderin transmembran glikoproteini gibi hücreler arası bağlantı molekülleri ile sağlanmaktadır. Bu bağlantı melanositin ve keratinositin homeostazına bağlı olduğu gibi hücreSEL ve dentritik matürasyonuna veya hücre yüzey reseptörlerini eksprese etmesine olanak vermektedir(108).

Primer tümörler ile karşılaştırıldığında, metastatik tümörlerin kendilerine yayılma açısından avantaj sağlamak adına çok daha fazla kromozomal aberasyon ve mutasyon sergilediği bilinmektedir(109). Melanomlarda da primer tümörden metastatik varyanta geçiş olurken, epitelyal mezenkimal geçiş gözlenmektedir. (Epithelial to Mesenchymal Transition- EMT) (110). EMT’de, sitoskelet ve adezyon moleküllerinde değişim ile beraber metastatik kabiliyette de artış olmaktadır (108, 110). Melanom hücrelerinde EMT’nin karakteristik bileşenlerinden birisi, E-kaderin N-kaderin dönüşümüdür. Ortaya çıkan bu mutasyonlar ile, melanom hücresinde apoptozu indükleyen yollar ve büyüme kısıtlamaları inhibe edilmekte, tümör büyümesi için avantaj sağlanmaktadır. E-kaderinin kaybı, melanosit üzerindeki keratinosit regülasyonunu da engellemektedir. Ortaya çıkan N-kaderin ise, melanom hücrelerinin dermis göçünü ve aynı tip kaderini taşıyan fibroblastlar veya vasküler endotel hücreleri ile etkileşimini kolaylaştırıcı yönde etki göstermektedir. Melanomun bu olay örgüsü sayesinde epidermal orjininden yayılım gösterdiği düşünülmektedir (111). Hücrede meydana gelen N-kaderin ekspresyonu aynı zamanda Bad tarafından oluşturulan pro-apoptotik etkilerin P13K-AKT yolağı aktivasyonu ile önlenmesi ve B-katenin’in anti-apoptotik etkinliğinin güçlendirilmesini de sağlamaktadır. N-kaderin pozitif melanom hücreleri aynı zamanda kan damarlarına da kolaylıkla erişebilmekte ve uzak metastaz yapma kabiliyetine sahip olmaktadır (111).

Melanom hücresinde metastatik potansiyeli arttıran bir diğer değişim de VE-kaderin ekspresyonunun up-regülasyonudur. Primer tümörler ile karşılaştırıldığında, metastatik melanomlarda vaskülojenik taklit fenomeni ile korele şekilde yüksek VE-kaderin ekspresyonu izlenmektedir (112). Melanom

hücre yüzeyinde eksprese edilen VE-kaderin ile tümör hücresi-vasküler endotel hücresi bağlantısı sağlanmakta ve tümörün vasküler penetrasyonu meydana gelmektedir.

2.2.3.Malign Melanom Sınıflaması

Melanomun aşamalı olarak evrelerini yada “fazlarını” temsil eden iki ana formu vardır. Non-tümörojenik, radyal veya horizontal büyüme fazında, neoplastik melanositler dermis içine proliferasyon veya tümöral kitle formasyonu olmaksızın epidermiste (in-situ melanom) ya da epidermis ile beraber papiller dermiste lokalize olmakta, bu durum mikroinvaziv melanom olarak isimlendirilmektedir. Bu dönem değişken olabilen bir zaman aralığında vertikal büyüme fazı tarafından takip edilmekte, bu fazda dermis invazyonuna ilave olarak artmış proliferasyonun getirdiği tümöral kitle oluşumu da gözlenmektedir. Melanom sınıflandırmasında her bir majör kompartmanın alt varyantları Tablo-1’de gösterilmiştir (113, 114). Malign melanom, histopatolojik tip, vertikal büyüme, yakın lenf nodlarına veya diğer organlara yayılım gibi pek çok faktör göz önüne alınarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir(1) .

Histopatolojik tipe göre sınıflandırıldığında melanomlar, yüksek morfolojik çeşitlilik ile karakterizedir. Her ne kadar histolojik subtip ile klinik davranış arasında ilişki bulunmuyor olsa da, subtiplerin ayrımının yapılması, histopatolojik tanı ve farkındalık açısından önem taşımaktadır. Melanomlarda tanımlanan dört önemli histolojik patern, görülme sıklığı açısından en yüksekten düşüğe doğru, yüzeyel yayımlı melanom (YYM), nodüler melanom (NM), lentigo malign melanom (LMM) ve akral lentiginöz melanom şeklindedir (113, 115).

2.2.3.1. Yüzeyel yayımlı melanom

Yüzeyel yayımlı melanom, tüm malign melanom vakalarının yaklaşık olarak %75’ini oluşturan en yaygın subtipidir (116). Bu gruptaki tümörlerin dörtte

biri, *de-novo* olarak önceden var olan bir nevüs zemininde gelişim göstermektedir. Yüzeyel yayımlı melanomlar, isimlerini vertikal büyüme fazları başlamadan önceki periyod içerisinde ortaya koydukları radyal büyüme paternlerinden almaktadır (117). Yerleşim yeri olarak erkeklerde çoğunlukla gövde, kadınlarda ise alt ekstremiteler ön plana çıkmaktadır (118). Klinik olarak YYM'ler boyutları birkaç milimetreden, birkaç santimetreye kadar değişiklik gösterebilen düzensiz sınırlı pigmente plaklar şeklinde prezente olmaktadır. Pigmentasyonda varyasyon, sınır ve yüzey düzensizliği YYM için karakteristik olup, çoğunlukla melanoma ait klasik özellikler sergilemektedir (118). Histolojik olarak YYM, radyal büyüme fazının (RBF) difüz pagetoid paternini göstermektedir. Radyal büyüme fazında epiteloid hücreler dominant olmakla beraber, RBF sınırındaki dermis, normalden hiperplastığe kadar değişken özelliktedir. Vertikal büyüme fazında da epiteloid hücre dominansı olmakla beraber, parsiyel regresyon sıklıkla görülmekte ancak desmoplazi ve nörotrofizm ile oldukça nadir karşılaşılmaktadır (114). Olgularda transformasyon oldukça yavaş meydana gelmekte ve lezyon vertikal büyüme fazına geçmeden önce 10-50 yıl sürece kalabilmektedir. LMM çoğunlukla 50 yaşın üzerindeki kişilerde ve kronik güneş ışığı maruziyeti olan baş ve boyun bölgesinde ortaya çıkmaktadır (119).

Tablo 1 Malign Melanom DSÖ sınıflaması

2006 DSÖ'ye göre malign melanom sınıflaması
Radyal büyüme fazı (RBF) • Non-tümörojenik melanom • <i>İn-situ</i> ya da mikroinvaziv ○ Yüzeyel yayımlı melanom (YYM) ○ Lentigomalign melanom (LMM) ○ Akral-lentiginöz melanom ○ Sınıflanmamış radyal büyüme fazı (SRBF)
Vertikal büyüme fazı (VBF) • Tümörojenik melanom • RBF kompartmanı olmayan tip ○ Nodüler melanom (NM) • RBF kompartmanı olan tip ○ Klasik VBF ○ Desmoplastik tip (Çoğunlukla aynı zamanda nörotrofik) ○ Nörotropik (Desmoplastik olmayan) • Diğer varyantlar: nevoid, balon hücreli, amelanotik, iğsi hücreli, malign mavi nevüs, konjenital nevüsten gelişen melanom, berrak hücreli sarkom, malign melanositik schwannom vb.

2.2.3.2. Lentigo malign melanom

Lentigo malign melanom (LMM), melanoma olgularının %4-15'ini oluşturmakta ve yaşlı bireylerde (ortalama 65 yaşında, pik insidans hayatın yedinci dekatında) cildin güneş yanığı hasarına maruz kalan bölgelerinde çil benzeri, bronz-kahverengi görünüm ile ortaya çıkmaktadır. İn situ melanom prezentasyonu olan Lentigo Maligna (LM) olgularının %3-8'inde de tablo invaziv lentigo malign melanoma ilerleyebilmektedir. Pek çok otorite tarafından LM, epidermis ile sınırlanmış, LMM ise dermisin de tutulduğu tablo olarak tanımlanmaktadır (119, 120). Tablo, histolojik olarak RBF paterninde olup, dominant hücre tipi olarak epiteloid, iğsi veya daha nadir olarak da dendritik hücreler izlenmektedir. Radyal büyüme fazında epidermis genellikle atrofik görünümündedir. Vertikal büyüme fazında ise iğsi ve epiteloid hücreler dominant olup, desmoplazi nörotrofizm ve regresyon oldukça sıktır (121, 122).

2.2.3.3. Nodüler melanom

Nodüler melanom (NM), tüm melanom olgularının %15-30'unu oluşturmaktadır ve histolojik olarak VBF bölgesinin periferinde RBF olmaması ile karakterizedir (119). Bundan dolayı tüm NM'ler tanı anında vertikal büyüme fazında yer almaktadır. İnvaziv progresyon, diğer melanom tiplerine göre çok daha hızlı meydana gelmektedir. Tümörün agresif karakterine rağmen, hasta prognozu, aynı evredeki diğer melanom tipleri ile benzerdir (119, 123). Tümörall lezyon koyu renkli ve deri seviyesinden yüksektir (kubbe biçimli). Klinik olarak ise pigmente, pedinküllü, nodüler bir polip görünümünde olup bazen malign melanomun klasik özelliklerinin dışında düzenli sınırlı, 6 mm'den küçük ve uniform renkte de izlenebilmektedir. Histolojik olarak RBF paterni bulunmamakta, VBF'de ise epiteloid hücre dominansı görülmektedir. Nodüler melanomda desmoplazi, nörotropizm ve regresyon nadirdir.

2.2.3.4. Akral lentiginöz melanom

Akral lentiginöz melanom (ALM), en nadir görülen melanom tipi olmakla beraber, beyaz ırkta görülme oranı %2-8'dir ve tümör çapı çoğunlukla 3 cm'nin üzerindedir (123). ALM çoğunlukla palmar ya da plantar bölgelerde lokalizedir ancak nadiren subungal yüzeylerde de izlenebilmektedir. Subungal melanom, tırnak matriksinden köken almaktadır. Proksimal veya lateral tırnak katlantısından yeni ortaya çıkan hiperpigmentasyon (Hutchinson bulgusu), subungal melanom için tanısaldır (117, 124). ALM'nin, dörtte üçü el veya ayak baş parmaklarından gelişir ve bu koyu ten rengine sahip bireyler ve Asya popülasyonundaki en yaygın formudur. Histolojik olarak LMM'ye oldukça benzer şekilde RBF paterninde lentiginöz, iğsi, epiteloïd veya dendritik hücreler VBF paterninde ise epiteloïd veya dendritik hücreler içermektedir. Desmoplazi ve nörotropizm oldukça sıktır. LMM'den farklı olarak RBF'de epidermis hiperplastik durumda ve regresyon sıklığı değişkendir (124, 125).

2.2.3.5. Diğer melanom tipleri

Melanomun daha nadir görülen diğer subtipleri, desmoplastik melanom, epiteloïd hücreli melanom, iğsi hücreli melanom, balon hücreli melanom, malign mavi nevüs melanom ve dev pigmente nevüsten gelişen melanomdur.

Nörotrofik melanom, perinöral invazyon sonucunda periferel sinir boyunca yayılım göstermektedir. Mikroskopik olarak schwann hücreleri ve iğsi hücreler arasında oldukça zayıf seçilen marjinler ile karakterize olup, bu patern, sarkomatöz lezyonlar ile karışabildiğinden dolayı tanısı oldukça zordur.

Desmoplastik melanom, iğsi hücreli melanom ve nörotrofik melanom aynı hücre tipinden gelişen benzer klinik özellikler sergileyen tümörlerdir (123). Klinik olarak baş ve boyunda lokalize, iri fibröz kitle veya endurans veren plak şeklinde olup amelanotik lezyonlardır (126).

Melanomlar invaze oldukları cilt derinliğine göre de evrelenebilmektedir. Clark ve Breslow evrelemeleri ile beraber evre ilişkili 5 yıllık sağ kalımları Tablo-2, Tablo-3'de, American Joint Committee of Cancer (AJCC) tarafından melanom

için yapılan TNM evreleme sistemi ise Tablo-4, 5,6 ve 7’de belirtilmiştir (114, 127, 128).

2.2.4.Klinik tanı

Kutanöz melanom transforme melanositlerden köken alarak, embriyogenez sırasında melanositlerin göç ettiği her hangi bir bölgede gelişebilmektedir. Primer olarak göz (129), merkezi sinir sistemi (130), gastrointestinal kanal (131, 132)ve safra kesesinden (133) gelişen melanom olguları bildirilmiştir. Olguların %90’ından fazlasında yerleşim yeri cilt olmakla beraber, yaklaşık olarak %4’ünde ise primer bölge tanımlanamadan metastazlar tespit edilmektedir (123) Özellikle gelişimin erken fazındaki olguların bir bölümünde, histolojik inceleme ile regresyon alanları izlenebilmektedir. Bu regresyon alanları klinik muayenede pigmente lezyon içerisinde renk kaybı olan bölgeler şeklinde görülmekte olup, konağın immün yanıtı neticesinde ortaya çıkmaktadır. Melanomlar karakteristik olarak gövde üst yarısında veya üst ekstremitelerde yerleşik, 6 mm’den daha büyük, asimetrik, düzensiz sınırlı, cilt seviyesinden hafif kabarık görünümde ve çeşitli pigmentasyon düzeylerinde görülebilmekle beraber takip sürecinde genişleme ve değişim de sergileyebilmektedir.

Tanısal amaçla yapılan tüm yaklaşımlarda, yüksek hassasiyet ve özgünlük ile benign malign ayrımı net şekilde yapılarak melanomun erken dönemde tespiti amaçlanmaktadır. Tanısal yaklaşım olarak 1985 yılında ortaya konan ABCD (Asimetry [Asimetri], Border irregularity [sınır düzensizliği], Color variation [renk farklılıkları] ve Diameter [çap]) akronimi, 2004 yılında “Evolving” (Değişim)’in de eklenmesi ile genişletilerek ABCDE halini almıştır. Her ne kadar bazı olgularda bu özelliklerin bir bölümü bazılarında ise hepsi prezente edilse de, bu yaklaşım ile pigmente lezyonların, hem hekimler hem de bireyler tarafından sistematik değerlendirmesi sayesinde melanomların erken dönemde yakalanabilmesi amaçlanmaktadır. Ancak pek çok otorite tarafından sadece ABCDE kriterlerine dayanarak yapılan bir değerlendirmede, çapı 6 mm’den

küçük veya kriterlerin tamamını karşılamayan melanom olgularının gözden kaçırılabilmesine de dikkat çekilmektedir (134, 135).



Şekil 2 Melanom tanısında ABCDE kriterleri

1980’lerde Glaskow’da dermatoloji uzmanı olmayan kişilerin de melanom olgularını yakalaması amacı ile geliştirilen 7 maddelik tanısal listede, her bulgu bir puan olarak ağırlıklandırılmış ve muayene sonucunda elde edilen puanın ≥ 3 olması durumunda hastanın, uzmana yönlendirilmesi önerilmiştir (136). Tanısal liste 1989 yılında majör ve minör kriterler olarak güncellenmiş ve tanısal ağırlıklandırma 2 majör - 1 minör kriter veya toplam puan ≥ 3 olması durumu şeklinde düzenlenmiştir (Tablo-8). 2005 yılında English National Institute for Health and Clinical Excellence tarafından yayınlanan kılavuzda bu 7 maddelik revize edilmiş listenin, şüpheli kanser olgularının tanımlanması amacı ile tüm sağlık çalışanları tarafından kullanılması ve tanısal skoru ≥ 3 olan tüm hastaların vakit kaybetmeden üst merkezlere yönlendirilmesi önerilmiştir (137).

Tablo 2 Melanom tanısında majör ve minör kriterler

Majör kriterler	Minör kriterler
• Boyut değişimi • Şekil değişimi • Renk değişimi	• Çap ≥ 7 mm • İnflamasyon varlığı • Kabuklanma/kanama • Hafif kaşıntı veya artmış hassasiyet

Grob ve arkadaşları, 1998 yılında melanom tanısında “çirkin ördek yavrusu bulgusu” adını verdikleri yaklaşımı ortaya koymuştur (138). Bu yaklaşıma göre aynı birey üzerindeki tüm nevüsler birbirine benzer yapısal ve morfolojik özellikteyken, melanomların bu paterni bozacak karakterde görüleceği öne sürülmüştür. Aynı zamanda klinik muayene esnasında lezyonları sadece morfolojilerinin değil, dış çevresinin, zemininin ve çevre lezyonların da araştırılmasının önemi ortaya koyulmuştur. Dermoskopinin klinik kullanımda yer bulması ile, kutanöz melanomun morfolojik özellikleri üzerinden erken tanısını sağlayacak oldukça önemli gelişmeler sağlanmıştır. Dermoskopi temel alınarak yapılan çalışmalar üzerinden yürütülen bir meta analiz çalışmasında, dermoskopi ile yapılan muayenelerde hassaslığın ve özgünlüğün, çıplak gözle yapılanlara göre çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (hassaslık, sırası ile %90 ve %71, özgünlük, sırası ile %90 ve %81) (139).

Klinik muayene ile fark edilen şüpheli pigment lezyonlarda tanısal olarak bir sonraki basamakta doku biyopsisi alınarak malignite tanısının doğrulanması veya ekarte edilmesi gerekmektedir. Hastalarda eğer mümkünse 1-3 mm marjini de kapsayan eksizyonel doku biyopsisi yapılmalıdır (140). Alınan biyopsi örneğinin histopatolojik incelemesinde, mikrosatellitöz, lokasyon, regresyon, tümörü infiltre eden lenfositler (TİL), vertikal büyüme fazı, anjiyolenfatik invazyon, nörotropizm, pür veya miks desmoplazi varlığı araştırılmalıdır (141). Tümör regresyonu, tümör hücrelerinin yerini fibrotik doku, dejenere melanom hücreleri, lenfositik proliferasyon ve telenjektazi formasyonu alması olarak tanımlanmaktadır (142). TİL, melanom hücrelerine karşı konak immün cevabının bir göstergesidir ve bu cevabın derecesi, faal, faal değil ve yok olarak 3 kategoride değerlendirilmektedir. Vertikal büyüme fazındaki melanom olgularındaki 5 yıllık sağkalım oranları, faal TİL gözlenenlerde %77, faal olmayan TİL gözlenenlerde %53 ve TİL gözlenmeyenlerde ise %37 olarak rapor edilmiştir (143).

Primer melanom tanısında ve mikro-evrelemede frozen section analizlerinin (FSA) rolü yoktur (144-146). FSA hassasiyet değerlerinin düşük olması, sentinel lenf nodu (SLN) biyopsilerinin sadece %12'sinde metastaz varlığının gösterilebilmesinden dolayı kutanöz melanom tanısında FSA'nın yeri bulunmamaktadır (147, 148).



Şekil 3 Melanom tanısında akış şeması (123)

2.2.5. Melanomda tedavi

2.2.5.1. Geleneksel tedaviler

Primer melanomlar tipik olarak cerrahi eksizyon ile tedavi edilmektedir. Metastaz yapmamış olgularda bu yaklaşım ile oldukça yüksek sağkalım oranları elde edilebilirken, metastaz ile prezente olan tümörlerde ise cerrahi eksizyon sonrası 5 yıllık sağkalım oranları sadece %10 seviyelerinde sağlanabilmektedir (40). Bununla beraber, metastatik melanom olgularının tedavisinde radyoterapinin de başarılı sonuçlar sağlayamadığı bildirilmektedir (40). Cerrahi tedavi seçenekleri ve radyoterapinin kullanışsız olmasından dolayı, metastatik melanom tedavisinde dakarbazin gibi kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Alkilleyici bir ajan olan Dakarbazin, dimetiltriazeno-imidazol karboksamid (DTIC), melanom tedavisinde FDA tarafından onaylanmış tek monokemoterapötiktir.(40, 149, 150). Karaciğerde aktive olduktan sonra DITC, sitotoksik etkilerini ortaya çıkartan MITC metabolitini oluşturmaktadır (151). MITC, DNA bazlarını alkilleyerek mutasyonlara neden olmakta ve DNA replikasyonunu engellemektedir (152). Dakarbazine direnç gelişene kadar geçen ortalama 3 aylık süreçte tedaviden ortalama %15-20 tedavi cevabı elde

edilebildiğini bildiren raporlar mevcuttur (150, 152). İzlenen bu başarı oranları oldukça düşük görünmekle beraber, metastatik melanom tedavisinde halen en iyi seçenek dakarbazindir (153). Buna ilave olarak, antimikrotübül ajanlardan olan taxan ve vindesin, platin analogu olan sisplatin ve nitrozüreler de monoterapide kullanılabilecek diğer ajanlardır. Bu alternatiflerin her birisi tek başına kullanıldığında tedavinin başarı oranı %20 düzeylerinin altındadır (40, 150, 153). Bununla beraber, sisplatin, vindesin ve dakarbazinden oluşan kombinasyon (CVD) tedavisinde de başarı oranlarının yüksek olmadığını bildiren yayınlar vardır (150, 154).

Melanom tedavisinde konağın kendi immün sisteminin aktive olarak tümör hücrelerini hedef almasını sağlamak için interlökin-2 (IL-2) ve interferon-alfa (IFN- α) kullanılmasının yarar sağlayabileceği rapor edilmiştir (150, 155). Bu amaçla verilen IL-2'nin, natürel killer (NK) lenfositlerin, lenfokin ile aktive olan killer hücrelerine (LAK) dönüşümünü indüklediği ve LAK hücrelerinin de MHC-I eksprese etmeyen tümör hücrelerine saldırarak bu hücrelerin lizise uğramalarına neden olduğu gösterilmiştir (150, 156, 157). IL-2 verilerek uygulanan tedavi protokolü ile %16-17 gibi bir cevap oranı elde edilebilmiş olmakla beraber, bu tedavi aynı zamanda kapiller kaçak sendromu gibi oldukça ciddi komplikasyonlar, morbiditeler ve toksisite tabloları ortaya çıkartabilmektedir (158).

IFN- α ise FDA tarafından melanom hastalarında özellikle operasyon sonrası kalan rezidü tümör hücrelerinin proliferasyonlarının önlenmesi amacı ile adjuvan tedavi olarak kullanılması onaylanmış bir ajandır (159). Hastalara verilen IFN- α , CD4⁺ T_{helper} hücrelerinde sürekli bir aktivasyon oluşturup, bu hücrelerden salınan IFN- α ve IL-2 ile de makrofaj ve NK hücre aktivasyonu yaparak uzun süren bir immün yanıt meydana getirmektedir (150, 160). Literatürde yer alan raporlarda, IL-2 ve IFN- α ile kombine olarak verilen CVD protokolünün tedavi yanıt oranlarının %31 oranlarına kadar yükseltilebildiği belirtilmektedir (154).

2.2.5.2. Yeni tedavi yaklaşımları

Vemurafenib:

Melanom hastalarının büyük bir bölümünde hücre proliferasyonunu indükleyen BRAF geni mutasyonu ve aktivasyonu görülmesinden dolayı, terapötik anlamda bu genin hedef alınması düşünülmüş ve bu amaçla bir BRAF kinaz inhibitörü olan vemurafenib geliştirilmiştir. Mutant form BRAF'ı inhibe ederek etki göstermesinden dolayı, vemurafenibin BRAF mutasyonlu melanom olguları için belirli derecede bir özgüllüğü bulunmaktadır. Uluslararası ve çok merkezli şekilde dizayn edilen bir faz-III çalışması olan BRIM-3'de, BRAF^{V600E} mutasyonlu Evre-III ve Evre-IV anrezektabl melanom tanılı, önceden tedavi almamış 675 hastada, vemurafenib ve dakarbazin'in etkinliği karşılaştırılmıştır. Çalışmanın primer sonlanım noktaları olarak progresyon olmaksızın sağkalım ve toplam sağkalım parametreleri, sekonder sonlanım noktaları olarak ise, en iyi toplam cevap oranı, cevap zamanı, güvenlik ve ilaçların tolere edilebilirlikleri belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre vemurafenib'in, toplam sağkalım, progresyon olmaksızın sağkalım ve en iyi toplam cevap zamanı açısından dakarbazine göre anlamlı derecede daha üstün olduğu gösterilmiştir (46, 161). Vemurafenib'in etkinliğine dair yapılan bir diğer çok merkezli faz-II çalışmasında, BRAF^{V600E} veya BRAF^{V600K} mutasyonu bulunan ve daha önceden bir veya daha fazla kez tedavi almış 132 melanom hastasında ilacın etkinliği değerlendirilmiş, çalışmada ele alınan hastaların %53'ünde (%47 parsiyel, %6 tam) tedaviye cevap geliştiği izlenmiştir (162).

Yapılan klinik çalışmalarda, vemurafenibin oldukça efektif ve hastalar tarafından iyi tolere edilebilen bir ilaç olduğu gösterilmiş ve buna istinaden 2011 yılında FDA tarafından, BRAF^{V600} mutasyonlu Evre-III ve IV anrezektabl melanom hastalarında kullanım onayı verilmiştir. Vemurafenib tedavisi, hastada melanom progresyonu veya ilaca ait yan etkiler gelişene kadar 960 mg BID şablonunda uygulanmaktadır. İlacın yan etkileri artalji, halsizlik, fotosensitivite, alopesi, bulantı ve diyare olarak belirtilmiş olmakla beraber, tedavi sırasında kutanöz yassı hücreli karsinom veya keratoakantom gibi durumlar da ortaya çıkabilmektedir ayrıca tedavi ile ilişkili olarak da primer kutanöz melanom tablosu görülebilmektedir. Vemurafenib, QT uzamasına neden olduğu için tedavi

sırasında ventriküler aritmi riskini arttırmaktadır. İlacın kullanımı, doğal tip BRAF geni taşıyan kişilerde, sıvı elektrolit bozukluğu olanlarda, uzun QT sendromlu kişilerde ve QT uzaması yapan ilaçlardan birisini alanlarda kontrendikedir (38).

Dabrafenib:

Dabrafenib, vemurafenib ile benzer etki mekanizmasına sahip yeni jenerasyon bir ilaçtır. BRAF^{V600E} mutasyonu pozitif, Evre-III ve Evre-IV anrezektabl 250 melanom hastası üzerinde yapılan bir faz-III çalışması olan BREAK-3'de dabrafenib ile dakarbazinin etkinlikleri karşılaştırılmış ve çalışma sonuçlarına göre dabrafenibin daha güvenli bir ilaç olduğu, aynı zamanda progresyon olmaksızın sağkalım açısından dakarbazinden daha üstün olduğu gösterilmiştir (163). İlaç, BRAF^{V600E} mutasyonu pozitif anrezektabl melanom hastalarında kullanılmak üzere 2013 yılında FDA tarafından onaylanmış olmakla beraber, doğal tip BRAF taşıyan kişilerde kullanımı kontrendikedir. Dabrafenib'in en sık görülen yan etkileri, hiperkeratozis, baş ağrısı, pireksi, artralji, papillom, alopesi ve palmar-plantar eritrodizestezi sendromudur. Bu yan etkilerinin yanında görülebilen ciddi yan etkileri ise tedaviye bağlı primer yassı hücreli karsinom, melanom ve keratoakantom gelişimi, febril ilaç reaksiyonları, hiperglisemi, üveit ve iridit olarak belirtilmiştir (163, 164).

Trametinib:

FDA tarafından BRAF^{V600E} ve BRAF^{V600K} pozitif anrezektabl melanom olgularının tedavisi için 2013 yılında onaylanan bir diğer ilaç olan trametinib, etki mekanizması olarak vemurafenib ve dabrafenibden farklılık göstermektedir. İlacın etki mekanizması, MEK gibi ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinazların inhibisyonu ile BRAF'ın baskılanması temeline dayanmaktadır (38). Trametinib için önerilen doz, oral olarak günde bir defa 2 mg olup, hastalıkta progresyon görülene veya ilaç yan etkileri ortaya çıkana kadar tedavi devam ettirilmektedir. Doğal tip BRAF geni taşıyan ve daha önce herhangi bir BRAF inhibitörü ile tedavi gören hastalarda trametinib tedavisi kontrendikedir.

Trametinib tedavisinin yan etkileri, kardiyomiyopati, retina pigment epitelinde ayrılma, retinal ven oklüzyonu, intersitisyel akciğer hastalığı, döküntü, dermatit, akneiform döküntü, lenfödem, akneiform dermatit gibi ciddi cilt

toksisiteleri, hipertansiyon, abdominal ağrı, hemoraji, cilt kuruluğu, pruritus ve paronişidir. İlaç aynı zamanda kadın hastalarda infertiliteye de neden olabilmektedir.

Melanom tedavisinde BRAF inhibitörleri umut verici gelişmeler sağlamış olsalar da, MAPK yolağının aktivasyonuna bağlı olduğu düşünülen bir mekanizma neticesinde bu ilaçlara karşı direnç gelişebilmektedir (165). Aynı zamanda, MAPK yolağında oluşturulan paradoksal aktivasyondan dolayı bu ilaçlar, BRAF mutasyonu olmayan sağlam hücreleri de etkileyerek diğer kutanöz malignitelerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır(165).

Yolakta BRAF'dan daha alt basamakta yer almasından dolayı MEK inhibitörlerinin BRAF inhibitörleri ile beraber kullanılması durumunda terapötik olarak daha yüksek etkinlik elde edilebilmektedir. Bu bilgilerin ortaya çıkmasını takiben 2014 yılında FDA, BRAF^{V600E} ve BRAF^{V600K} mutasyonu pozitif olan anrezektabl melanom hastalarında dafrafenib ile trametinibin kombine kullanımına yönelik izin vermiştir. Güncel olarak yapılan bir faz-III çalışmasında, dafrafenib ve trametinib kombinasyonu ve tek başına vemurafenibin etkinlikleri karşılaştırılmış ve BRAF^{V600} mutant metastatik melanom hastalarında kombinasyon tedavisinin toplam sağkalım üzerinde çok daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Şaşırtıcı şekilde kombinasyon tedavisi alan hastaların sadece %1'inde kutanöz yassı hücreli karsinom veya keratoakantom gelişimi izlenirken, tek başına vemurafenib tedavisi alan hastaların ise %18'inde bu komplikasyonların ortaya çıktığı rapor edilmiştir (165).

Yapılan bir diğer faz-III çalışmasında, tıpkı trametinib gibi bir MEK inhibitörü olan cobimetinib ile kombine vemurafenib tedavisi alan hastalar ile vemurafenib tedavisine ilave olarak plasebo alan hastalar karşılaştırılmış, BRAF^{V600} mutasyonu pozitif olan metastatik melanom hastalarında kombine cobimetinib ve vemurafenib tedavisinin, progresyon olmaksızın sağkalım açısından daha başarılı olduğu gösterilmiştir (166).

Ipilimumab:

Ipilimumab, sitotoksik T hücre antijeni-4 (CTLA-4) inhibisyonu ile T hücrelerinin aktive olmasını önleyen bir hümanize monoklonal antikor olup, geç

dönem metastatik melanom tedavisi için 2011 yılında FDA onayı almıştır (167-170).

Normal immün modülasyonda, T hücre reseptörlerinin (TCR), MHC ile sunulan kendine özel antijenlere bağlanması neticesinde, T hücresinde CTLA-4 ko-reseptörleri eksprese edilmeye başlanır (171, 172). CTLA-4 ve CD28 ko-reseptörleri birbirlerine yapısal olarak benzetmekle beraber her ikisi de, antijen sunan hücrelerin yüzeylerinde bulunan CD 80 ve CD86'ya bağlanmaktadır (171). CD28-CD80/86 interaksiyonu ile T hücre proliferasyonu, farklanması ve sitokin üretimi stimüle olurken, yüksek afiniteli CTLA4-CD80/86 bağlanmasında ise T hücre aktivasyonunu inhibe olarak, immün cevap sınırlanmaktadır (171-174).

Ipilimumab, CTLA4 reseptörü ile CD80/86 etkileşimini inhibe ederek, T hücresinin hem inaktive olmasını önlemekte hem de aktivasyonunu güçlendirmektedir (168). Bu olayın sonunda ipilimumabın etkisi ile anti-tümör immünitesinde de artış ve güçlenme meydana gelmektedir. Daha önceden tedavi almış, Evre-III anrezektabl ve Evre-IV metastatik melanomu olan hastalarda yapılan bir çalışmada, 10 mg/kg dozundan Ipilimumab verilen hastalarda tedavi cevabı %11,1 düzeyinde olmakla beraber, daha düşük dozlarda daha zayıf cevap görülmesi ile doz bağımlı etkinin var olduğu bildirilmiştir (175). İlacın, 10 mg/kg düzeyinden daha yüksek dozlarda uygulamalarında ise, hastaların %15'inde otoimmün yan etkiler gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu yan etkiler halsizlik, diyare, cilt döküntüleri, endokrin yetmezlikler ve intestinal inflamasyon olarak rapor edilmiştir.

Pembrolizumab:

Pembrolizumab, hümanize monoklonal IgG4 antikoru olup, insan hücrelerinin yüzeyinde bulunan PD-1 ve PD-1 ligand bağlanmasına müdahale etmektedir. Bu müdahale neticesinde, tümöre karşı T hücresi aracılı bir cevap oluşmaktadır (176). FDA, ilerlemiş veya diğer ilaç tedavilerine refrakter anrezektabl melanom olgularında kullanılmak üzere pembrolizumaba onay vermiştir (177). İlacın sık görülen yan etkileri, halsizlik, öksürük, bulantı, pruritus, döküntü, iştah kaybı, konstipasyon, artralji ve diyaredir.

Nivolumab:

Nivolumab da PD-1'i hedef alan insan monoklonal antikoru olup fonksiyonel olarak pemprolizumab ile benzerdir. Diğer tedavilere yanıtız

metastatik melanom olgularında kullanılmak üzere 2014 yılında FDA onayı alınmıştır (178). İlacın sık görülen yan etkileri, cilt döküntüsü, kaşıntı, öksürük, üst solunum yolu enfeksiyonları ve ödemdir. Bu yan etkilerin yanında ilaç immün sisteme kenetlenerek majör organlarda da hasar oluşturabilmektedir(179).

2.2.6. Prognostik özellikler

Malign melanomlu hastaların sağ kalımlarını tahmin edebilecek ve geliştirilecek hedef tedaviyi yönlendirecek çeşitli klinik ve histolojik özellikler vardır. Fakat bu parametreler her zaman tedaviye yanıtı tahmin etmede yeterli değildir. Evrelemede temel amaç tümörün klinik yayılımını tanımlamaktır. Bu fiziksel inceleme; klinik araştırma ve makroskopik ve mikroskopik patolojik inceleme ile yapılabilir. Patolojik prognostik özellikler “mikroevreleme” olarak isimlendirilebilir. Bu özelliklerden bazıları Clark seviyesi, Breslow kalınlığı, ülserasyon, mitoz sayısı, tümörde lenfositik infiltrasyon, lenfovasküler invazyon, in-transit metastaz, satellitozis, sentinel lenf nodu, patolojik evre, regresyon ve mikroskopik satellit varlığıdır.

2.2.6.1. Clark Evresi

Melanom invazyonunun anatomik derinliği olarak da belirtilebilen Clark evrelemesi ilk olarak 1967 yılında tanımlanmıştır (114). Breslow kalınlığının kullanıma girmesinden önce prognoz ile ilişkili en iyi bilinen parametre Clark evresi olarak kabul edilmiştir.

1992 yılında AJCC tarafından düzenlenen evreleme sistemi prognostik değerlendirmeyi tümörün penetre olduğu cilt katmanları esasına göre düzenlenmiş Clark sisteminden vazgeçip, tümörün milimetrik penetrasyon esasına dayanan Breslow sistemine göre düzenlenmiştir. Breslow kalınlığının, Clark seviyesine göre özellikle küçük tümörlerde çok daha doğru prognostik değer verdiği ortaya çıkarılmış ve Breslow kalınlığı prognozu belirleyen en önemli faktör olarak benimsenmiştir. Böylelikle bu yeni evreleme sisteminde Evre I ve Evre II

melanomun prognostik değerlendirmesinde Breslow kalınlığı ve ülserasyon esas alınmıştır. Breslow kalınlığı 1mm'den az olduğunda primer lezyonun Clark seviyesi analizlerde ancak sekonder bir özellik olarak yer almaktadır. T1 lezyonu olan ve Clark Evre IV ya da daha fazla olan hastalarda nodal yayılım olasılığı %10 iken, T1 lezyonlu ve Clark evresi IV'ten az olan hastalarda nodal yayılım ihtimali sadece %2'dir. İnce tümörlerde Clark evrelemesinin önemi nedeniyle 1 mm'den az Breslow kalınlığı olan tümörlerde Clark evre IV ve V T1b olarak belirlenmiştir (6).

Tablo 3 Melanomda Clark evrelemesi

Clark Evresi	İnvazyon Derinliği	5 Yıllık Sağ Kalım
Evre-I	Tümör epidermise lokalize	%99
Evre-II	Papiller dermiste tekli veya küçük yuvalar halinde malign melanosit infiltrasyonu var	%95
Evre-III	Malign melanositler, papiller dermişi doldurmuş ve tümör, papiller-retiküler dermis sınırına ulaşmış (Genellikle vertikal büyüme fazını işaret etmektedir)	%82
Evre-IV	Retiküler dermiste malign melanosit infiltrasyonu var	%71
Evre-V	Subkutan yağ dokusunda malign melanosit infiltrasyonu var	%49

2.2.6.2. Breslow kalınlığı

Evre I ve II melanomda primer lezyonun Breslow kalınlığı en önemli prognostik faktördür. Hastalığın tekrarlaması ve melanoma bağlı ölüm riski primer melanomda her 1 mm'lik Breslow kalınlığının artmasıyla ciddi olarak artmaktadır. 1 ile 6 mm arasında kalınlığa sahip primer tümörlerde yineleme olasılığı lineer olarak artmaktadır. 6mm'den daha fazla Breslow kalınlığına sahip tümörlerde, her 1mm'lik invazyonla meydana gelen yineleme ve ölüm oranları daha az kalınlığına sahip tümörlere göre azalmaktadır.

Tablo 4 Melanomda Breslow evrelemesi

Breslow Evresi	Tümörün İnvazyon Seviyesi	
	Pratik	Klasik
Evre-I	<1mm	≤0,75 mm
Evre-II	1-2 mm	0,76-1,50 mm
Evre-III	2-4 mm	1,51-4 mm
Evre-IV	>4 mm	≥4 mm

2.2.6.3. Ülserasyon

Lokalize primer melanomlarda ülserasyon %21-60 oranlarında bulunmaktadır. Ülserasyon varlığı 5-10 yıllık hastalıksız sağkalımı 1/3'ten fazla azaltmaktadır. Her derinlikteki lezyonlarda ülserasyon meydana gelmekle birlikte, derin tümörlerde daha sık gözükmemektedir. Ülsere olmayan melanomların ortalama kalınlığı 0.8 mm iken, ülserasyonlu melanomların ortalama kalınlığı 2.6 mm'dir. Ülserasyon diğer prognostik faktörlerden bağımsız olarak lokal yineleme ve rejyonel hastalık riskini artırmakta, sağkalımı azaltmaktadır. Ülserasyon saptanan olgularda rejyonel lenf nodu metastazı, ülsere olmayan olgularla karşılaştırıldığında %10 oranında artmaktadır. American Joint Committee of Cancer (AJCC) tarafından belirlenen melanom evrelemesinde Evre I ve Evre II melanomda ülserasyon, Breslow kalınlığından sonra en önemli bağımsız prognostik faktör olarak belirlenmiş, a harfi ülsere olmayan tümörler için, b harfi ise ülsere tümörler için belirteç haline getirilmiştir. AJCC tarafından melanom için yapılan TNM evreleme sistemi ise Tablo-5,6, 7 ve 8'de belirtilmiştir (114, 127, 128).

Tablo 5 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (T)

Primer Tümör (T)		
Tx	Primer tümör değerlendirilemedi	
T0	Primer tümöre dair bulgu yok	
Tis	Melanoma in-situ	
T1	1 mm veya daha düşük kalınlıkta tümör	
T2	1,01-2 mm kalınlığında tümör	
T3	2,01-4 mm kalınlığında tümör	
T4	4 mm'den daha kalın tümör	
T evresine yapılan a ve b derecelendirmesi ülserasyon varlığı ve mm²'deki mitoz sayısına bağlı uygulanmıştır		
T evresi	Kalınlık (mm)	Ülserasyon durumu-mitoz sayısı
T1	≤1mm	a Ülserasyon yok veya mitoz sayısı<1/mm ²
		b Ülserasyon var veya itoz sayısı >1/mm ²
T2	1,01-2 mm	a Ülserasyon yok
		b Ülserasyon var
T3	2,01-4 mm	a Ülserasyon yok
		b Ülserasyon var
T4	>4 mm	a Ülserasyon yok
		b Ülserasyon var

Tablo 6 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (N)

Lenf nodu yayılımı (N)		
Nx	Bölgesel lenf nodu yayılımı değerlendirilemedi	
N0	Bölgesel metastaz izlenmedi	
N1-3	Metastatik lenf nodları ile birlikte intralenfatik metastazı ile beraber veya intralenfatik metastaz olmaksızın bölgesel yayılım	
N1-3 ve a-c subtiplerinin ayrımı aşağıdaki gibidir.		
N sınıflaması	Metastatik nod sayısı	Nodal metastatik kitle
N1	1 nod	a Mikrometastaz
		b Makrometastaz
N2	2-3 nod	a Mikrometastaz
		b Makrometastaz
		c İntransit metastaz
N3	4 veya daha fazla metastatik nod veya metastatik nod ile beraber intransit metastaz	

Tablo 7 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (M)

Uzak metastaz (M)		
M ₀	Uzak metastaz bulgusu yok	
M _{1a}	Cilt, subkutan doku veya uzak lenf nodu metastazı	
M _{1b}	Akciğer metastazı	
M _{1c}	Yükselmiş serum LDH seviyeleri ile birlikte diğer organlara veya uzak lenf nodlarına metastaz	
Serum LDH değerleri ile birleştirilmiş M sınıflaması aşağıdadır.		
M sınıflaması	Bölge	Serum LDH
M _{1a}	Uzak cilt, subkutan doku veya nodal metastaz	Normal
M _{1b}	Akciğer metastazı	Normal
M _{1c}	Diğer tüm visseral metastazlar	Normal
	Tüm uzak metastazlar	Yükselmiş

Tablo 8 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (Patolojik evreleme)

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a	N0	M0
Evre IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
Evre IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
Evre IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Evre IIC	T4b	N0	M0
Evre IIIA	T(1-4)a	N1a	M0
	T(1-4)a	N2a	M0
Evre IIIB	T(1-4)b	N1a	M0
	T(1-4)b	N2a	M0
	T(1-4)a	N1b	M0
	T(1-4)a	N2b	M0
	T(1-4)a	N2c	M0
Evre IIIC	T(1-4)b	N1b	M0
	T(1-4)b	N2b	M0
	T(1-4)b	N2c	M0
	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 9 American Joint Comitee on Cancer 2010 Melanom için TNM sınıflaması (Klinik evreleme)

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a	N0	M0
Evre IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
Evre IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
Evre IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Evre IIC	T4b	N0	M0
Evre III	Herhangi T	≥ N1	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.6.4. Regresyon

Fibrozis ve santral depigmentasyon ile karakterize lezyon regresyonu literatürde bildirilmiştir. Böyle lezyonlarda eksizyon sonrasında beklenenden daha az Breslow kalınlığıyla karşılaşmak, hastalığın daha düşük evrenlenmesine yol açarak, gerçek prognozun beklenenden daha kötü olmasını sağlayabilir. Primeri bilinmeyen melanomlar, regrese olmuş lezyonlardan kaynaklanabilir. Bu hastalar hafifçe daha iyi prognoza sahip olmakla birlikte, primeri bilinmeyen melanom olgularıyla eş tutulur. Gershenwald ve ark. 1 mm'den küçük ve regresyon gösteren lezyona sahip melanom hastalarının hiçbirinde sentinel lenf nodu pozitifliği saptanmadığını bildirmişlerdir. Tümör regresyonu, etkin, spesifik tümör yanıtının hastalığı sistemik olarak iyi yönde etkileyeceğine dair işaretler vermektedir. Tümör immünologları değişik aşı stratejileri ile bu immün yanıtı artırmak için çalışmaktadırlar (1, 6).

2.3. Tümör immünitesi ve immünoterapi

Tümörlerde var olan karakteristik özellikler, proliferasyon sinyallerinde devamlılık, büyüme baskılayıcılardan kaçış ve hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlüğün kazanılması, anjiogenezin indüklenmesi, invazyon aktivasyonu ve metastaz olarak tanımlanmış olmakla beraber, bu özelliklere yakın zamanda enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün yıkımdan kaçış da eklenmiştir(180).

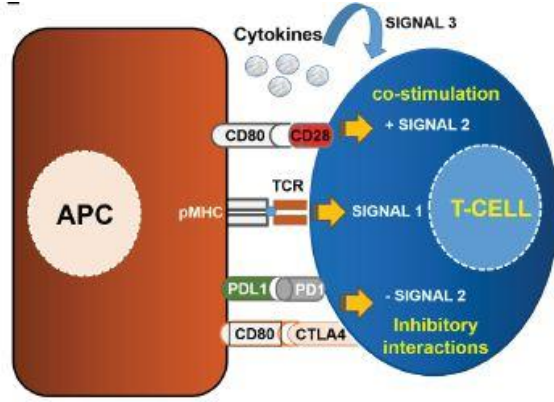
2.3.1. Tümör immünitesinin moleküler temelleri

İnsan immün sistemi, yabancı hücreler veya yüksek derecede immünojenik tümör hücrelerine karşı oldukça kompleks basamakları olan endojen bir cevap oluşturabilmektedir. Kanser hücrelerine ait antijenlerin antijen sunan hücreler (APC) aracılığı ile T hücrelerine sunulması, lenf nodlarında T hücrelerinin hazırlanması ve aktivasyonu, T hücrelerinin tümör yatağına ulaşması ve infiltrasyonu, kanser hücrelerinin lenfositlerce tanınması, antijene spesifik sistemik efektörlerin ve hafıza T hücrelerinin gelişimi ile birlikte tümör yanıtında

rol oynayan diğ er endojen immün sistem hücreleri ve antikorlarının oluşumu sayesinde tümör hücreleri etkisiz hale getirilebilmektedir (181). Özellikle dendritik hücreler olmak üzere MHC Klas-1 APC'ler ile CD8⁺ T hücrelerine antijen sunumu neticesinde, tümör hücresine karşı selüler sitotoksik bir cevap oluşmaktadır. Ancak tüm bu anlatılan sistem, nadiren yeterli düzeyde anti-tümör im nitesini sağlayabilmektedir. Yüksek afiniteli T hücrelerinin daha toleranslı olmaya itiliyor olmalarından dolayı, natürel tümör antijenlerine karşı göreceli olarak zayıf bir T hücre cevabı ortaya çıkmaktadır. Bu durum kanser imm noterapisindeki en önemli kısıtlamalardan birisidir.

T hücrelerine antijen sunumu:

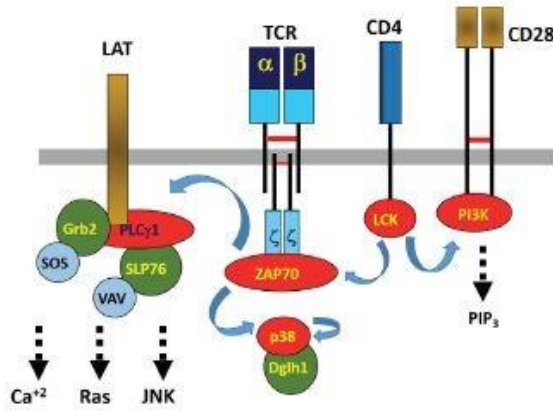
T hücrelerinin ve çoğalması, pek çok sinyal yolağının devreye girdiği karmaşık bir süreç sonucunda meydana gelmektedir. Spesifik T hücre reseptörleri (TCR) ile antijenik peptidlerin karşılaşması sonrasında başlayan aktivasyon sürecinde, çoğalma ve yanıt düzeylerinde üstel bir artış olmaktadır. Antijenik peptidler, özellikle dendritik hücreler gibi APC'ler tarafından işlenerek oldukça sıkı bir denetim içerisinde T hücrelerinin tanıyabileceği bir biçimde prezente edilmektedir. APC'ler tarafından yakalanan ve intraselüler işlemlerden geçirilen patojenlere veya tümör hücrelerine ait antijenler, MHC moleküllerine yüklenmiş kısa antijenik peptid parçaları (peptid-MHC kompleksi veya pMHC) halinde y zeyeye eksprese edilirler. Eksprese edilen pMHC'ler, immünolojik sinapslar aracılığı ile TCR'ler tarafından tanınabilmektedir. Burada bahsedilen süreç, TCR sinyalizasyon kaskadının sinyal-1 olarak da adlandırılan başlangıç basamağını oluşturmaktadır. Ancak T hücrelerinin enerji veya apoptozdan kaçınmaları için başka bir takım sinyal yolaklarına daha ihtiyaçları vardır (182). Bu bağlamda T hücresindeki aktivasyonun derecesini belirlemek adına APC'ler ile T hücreleri arasında meydana gelen inhibitör veya stimülatör karakterdeki pek çok etkileşim de “sinyal-2” olarak adlandırmaktadır. Bununla beraber “sinyal-3 olarak adlandırılan süreçte ise, sitokinler aracılığı ile T hücrelerindeki farklılaşma ve efektör kapasite düzenlenmektedir (183).



Şekil 4 T hücresi ve APC arasındaki immünolojik sinaps (184)

2.3.2. T hücre aktivasyonunda moleküler mekanizmalar

Moleküler temelde değerlendirildiğinde, sinyal-1, TCR-CD3 molekülü ile pMHC kompleksinin bağlanması neticesinde aktive olan kinaz bağımlı bir yolak üzerinden yürümektedir. TCR-CD3 ve koreseptör (CD4 veya CD8) etkileşimi sonucunda, TCR-CD-3'ün intraselüler bölümünde LCK ve FYN kinazların rol oynadığı tirozin fosforilasyonu meydana gelmektedir. LCK aynı zamanda CD3 zincirinde bulunan ZAP70'i de fosforile etmektedir (185). ZAP70, GRB2 ve PLC γ 1 ile de ilişkili olan LAT fosforilasyonundan başlayan ve nihayetinde MAPs ERK ve JNK aktivasyonu ile son bulan, hücrede proliferasyon, motilite, stres cevabı, apoptoz veya sağkalım gibi pek çok yolakta rol oynayan bir dizi sinyalizasyon olayını da başlatmaktadır (186). PLC γ 1 tarafından üretilen diasil gliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5 trifosfat (IP $_3$), endoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonu salınımına neden olmakta ve salınan kalsiyum, IL2 transkripsiyonunda rol alan NFAT ve CREB translokasyonunu indüklemektedir. Ayrıca ZAP70 tarafından p38, daha sonra "alternatif p38 aktivasyon yolu" olarak adlandırılan prosedür ile otofosforilasyon sağlayarak aktivasyon döngüsü oluşturmaktadır. Bu yolağın hücresel proliferasyon ve sitokin üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (187, 188).



Şekil 5 TCR aktivasyonu (184)

Sinyal-2'nin (T hücresi ko-stimülasyonu) en önemli bileşenlerinden bir tanesi, APC ve T hücresi arasında gerçekleşen CD80-CD28 etkileşimidir. Bu senaryoda, CD28'in intraselüler bölümü LCK tarafından fosforillenmekte ve PI3K kompleksine bir bağlanma alanı oluşturulmaktadır. PI3K tarafından oluşturulan fosfatidil inozitol 3,4,5 trifostat (PIP₃) da yolağın devamında yer alan, proliferasyon ve mTOR yolağından kaçınma gibi fonksiyonlar sağlayan AKT, NF-κB aktivasyonunu sağlayan PKCθ ve IL2 üretimini için gerekli olan MKK7 gibi kinazları aktive etmektedir (189). T hücrelerinin tam manası ile efektör aktivite kazanması ve proliferere olması için AKT ve PKCθ aktivasyonu gerekmektedir.

Tümöre karşı meydana gelen immün cevabın, MHC/T hücre reseptörü (TCR) etkileşimi ile başlamasından dolayı MHC-peptid-TCR bağlanmasının stabil hale getirilmesi ile yeterli immün cevabın sağlanması ve natürel tümör epitoplarına karşı T hücre olgunlaşmasının arttırılması mümkün olabilmektedir. Ayrıca, MHC-peptid-TCR kompleksini stabilize eden peptidler, spesifik T hücrelerinin uyarılması sayesinde çok daha güçlü immün yanıtların ortaya çıkmasını sağlamaktadır (190).

Tümör hücresi üzerindeki hem güçlü hem de zayıf immünojenik antijenler, pek çok kaçınma stratejisini ortaya koymaktadır. Bu durumun tümör mikroçevresi tarafından hali hazırda var olan anti-tümör T hücre cevabının durdurulması amacı ile düzenlendiği düşünülmektedir. Tümör immünmodülasyonunun sinyal-2 aşamasında görev alan CTLA-4, PDL-1, CD80 ve CD86 aşağıda işlenmiştir.

2.3.2.1. CTLA-4

CTLA-4, intrinsek enzimatik aktiviteden yoksun ve gerçek bir immünoseptör tirozin-temelli inhibitör motifi (ITIM) olmayan 36 aminoasitlik sitoplazmik kuyruğa sahip bir moleküldür (191). Hücrede çoğunlukla homodimer olarak bulunan CTLA-4'e bir ligand bağlandığı zaman konformasyonel değişiklik gözlenmemektedir (192-194).

CTLA-4, CD28'in homoloğu olup, B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) moleküllerine CD28'den yaklaşık 10 kat daha güçlü bağlanma kapasitesine sahiptir (195). CD28, sadece nativ T hücrelerinin yüzeylerinde bulunmakla beraber, CTLA-4 nativ T hücre yüzeyinde bulunmamakta, ancak T hücresi aktive olduğunda ise oldukça güçlü bir şekilde indüklenerek eksprese edilmektedir. Bununla birlikte CD28 yüzey reseptörü karakterinde olmasına karşın, CTLA-4'ün yüksek oranda endositik olması ve zamanın büyük bir bölümünü intraselüler veziküllerin içerisinde geçirmesi de iki molekül arasında gözlenen bir diğer önemli farklılıktır.

Bu molekülün immün sistem üzerindeki negatif regülatör etkinliği, CTLA-4 yetersiz farelerde neonatal letaliteye neden olan poliklonal T hücre aktivasyonu ve lenfoproliferatif bozuklukların görülmesi ile ortaya konulmuştur (195). Bunun yanında, CTLA-4'ün periferik tolerans gelişiminde de kritik rol oynadığını bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır (173). Güncel olarak yapılan bazı çalışmalarda, T hücre supresör fonksiyonlarının, CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinden (Treg) eksprese edilen CTLA-4 ile sağlandığı ve CTLA-4'ün spesifik antagonistik antikorlar ile bloke edilmesi sonucunda bu Treg hücre fonksiyonlarının ortadan kalktığı da rapor edilmiştir (196). Dendritik hücrelerde yer alan B7.1 ve B7.2 ters sinyalizasyonunun etkilenmesi, T hücre proliferasyonunun CTLA-4 aracılı inhibisyonunda yer alan bir diğer mekanizmadır. Bu benzersiz yolak, dendritik hücrelerde triptofan katabolizmasını indükleyerek indolamin 2,3 dioksijenaz (IDO) ekspresyonunu arttırmakta ve bunu takiben T hücre proliferasyonunda inhibisyona neden olmaktadır (197, 198).

Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA-4), immün reaksiyona cevap olarak eksprese edilen ve kontrol edilemeyen immün cevabın baskılanmasını amaçlayan bir negatif regülatördür (199). CTLA-4, dendritik hücreler veya diğer

APC'lerde yer alan B7 moleküllerine bağlanarak ileri stimülasyonu ve immün cevabın ekspansiyonunu inhibe ederek, kronik otoimmün inflamasyon oluşumunun önüne geçmektedir. Bununla beraber anti-tümör immünite için düşünüldüğünde ise, CTLA-4 endojen immün cevap gelişiminde inhibitör etkinlik göstermektedir.

CTLA-4, T hücre aracılı immün cevabı düzenleme fonksiyonundan dolayı, anti-tümör tedaviler açısından majör hedeflerden birisi haline gelmiştir. CTLA-4'ün immün homeostaz üzerindeki tartışmasız etkisi net şekilde kabul görmekle beraber bu etkinin ne şekilde ortaya çıktığının çözümlenmesi oldukça zordur. Hem CTLA-4 hem de CD80 ve CD86'nın homolog reseptör (CD28) kullanımının olması bu zorluğun sadece küçük bir bölümünü teşkil etmektedir.

2.3.2.2. PD-1 ve PDL-1

PD-1 ve ligandı PDL-1, kanser tedavisinde PD-1 veya PDL-1'i hedef alan çeşitli antikorların onaylanması ile son yıllarda büyük önem kazanmıştır. PD-1, T hücreleri, B hücreleri ve bazı miyeloid hücreler üzerinde eksprese edilmektedir, ancak rolü en iyi T hücrelerinde karakterize edilmiştir. T hücreleri üzerindeki PD-1 ekspresyonu, antijen uyarımı ile indüklenmektedir (200). Erken T-hücresi aktivasyonunu sınırlayan CTLA-4'ün aksine, PD-1 ve PDL-1 periferdeki T hücreleri üzerinde inhibitör etki göstermektedir (201). Bugüne kadar PD-1'in, tümör hücreleri, monosit deriveli miyeloid dendritik hücreler, epitelyal hücreler, T hücreleri ve B hücreleri gibi geniş bir hücre yelpazesi tarafından eksprese edilen 2 ligandı: PDL-1 ve PDL-2 belirlenmiştir (202, 203). Kanserde, tümör hücrelerinin ve miyeloid hücrelerin, PD-1 ligasyonu yoluyla T hücre baskılanmasına aracılık ettikleri düşünülmektedir (204). Ayrıca, pankreas duktal adenokarsinomunda PDL-1 eksprese eden γδ T hücrelerinin, anti-tümör sitotoksik T lenfosit ve Th1 hücrelerini baskıladığı ve bu etkinin PD-1'in bloklanmasıyla tersine çevrildiği gösterilmiştir (205). Ancak, PDL-1 ve PDL-2'nin, PD-1 sinyal kaskadındaki etkilerinin, ligandı eksprese eden hücre türüne bağlı olup olmadığı halen netlik kazanmamıştır. Yakın tarihli bir araştırmada, PDL-1 eksprese eden murin NK hücrelerinin, D-hücresi aktivasyonu üzerinde doğrudan etki göstermeksizin

dendritik hücre matürasyonunu ve aktivasyonunu baskılayabileceği ileri sürülmüştür (206). Bu, tüm PDL-1 eksprese eden hücre tiplerinin PD-1 ligasyonu yoluyla T hücrelerini direkt olarak inhibe edebildiğini öne süren ilk rapordur. Ancak, PDL-1 ile PDL-2'nin neden olduğu etkileri arasında tamamen açıklığa kavuşturulamamış farklılıklar bulunmaktadır. Liang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PDL-1 - / - farelerinin *Leishmania mexicana* enfeksiyonuna dirençli olduğu, fakat PDL-2 - / - farelerinde hastalığın daha kötü bir hal aldığı gösterilmiştir (207). Bununla beraber, yakın tarihli bir araştırmada, sıtmadan etkilenen farelerde immün hücreler üzerindeki PDL-2 ekspresyonunun PD-1'e bağlanmak için PDL-1'in üzerine çıktığı, dolayısıyla T-hücresi tükenmesini sınırladığı ve patojenin temizlenmesi ile PDL-2 ekspresyonlarının korele olduğu ortaya konmuştur (208).

PD-1 aracılı T-hücre supresyonuna yönelik çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Chemnitz ve arkadaşları, PD-1 ligasyonunun sadece TCR bağlanması üzerine T hücre aktivasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir (209). Literatürde PD-1 ligasyonunun, T hücre proliferasyonu, sitokin sekresyonu ve metabolizması için önemli olan fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz (Pi3K) ve Ras gibi sinyal molekülleri ile etkileşime girdiği önerilmiştir (200, 210). İnsan immün yetmezlik virüsüne (HIV) spesifik T hücrelerinin analizi ayrıca T-hücresi fonksiyonunu inhibe eden PD-1'e bağımlı bazik lösin transkripsiyon faktörü (BATF) upregülasyonunu göstermiştir (211). Bunun yanında, Li ve arkadaşları, baş-boyun kanserli hastaların TIL'lerinde, Th1 tipi yanıtları kısıtlayacak şekilde SHP-2 ve PD-1 ekspresyonu arasında bir korelasyon bildirmiştir (212). PD-1 ligasyonunun T hücrelerinde metabolik değişikliklere de neden olduğu gösterilmiştir. İntratümoral T hücrelerindeki mitokondriyal disfonksiyon, inhibitör reseptörlerin ekspresyonundaki artış ile ilişkilendirilmiştir (213). Patsoukis ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada PD-1 aracılı olarak, T hücrelerinin fonksiyon bozukluğuna yol açacak şekilde metabolik yeniden programlanması gösterilmiştir (214). Bengsch ve arkadaşlarının raporunda da mitokondriyal solunum ve glikolizde PD-1 ile indüklenen defektler gösterilmiştir (215). Tanımlanmış PD-1 aracılı T-hücresi supresyonu mekanizmalarının çoğu in vitro ya da ex vivo

deneylere dayandığından, T-hücresi tükeniminden aynı mekanizmaların sorumlu olduğunun in vivo olarak gösterilmesi gerekmektedir (216).

Efektör T hücresi yanıtlarını inhibe etmenin yanı sıra, PD-1: PDL-1 aksının, Treg hücrelerinin indüksiyonunun ilerletilmesinde rol oynadığı da öne sürülmüştür. Bu hipotez, PDL-1 eksprese eden dendritik hücrelerin veya PDL-1 kaplı boncukların varlığında geliştirilmiş Treg konversiyonunu gösteren in vitro çalışmalarla desteklenmiştir (217, 218).

2.3.2.3. CD28-CD80/CD86

İlk olarak ortaya konulduğu 1980'lerden itibaren CD28, T hücrelerinin klonal ekspansiyonu, farklanması ve efektör fonksiyonlarının ortaya çıkmasında başı çeken faktörlerden birisi olarak kabul görmüştür. CD28, insan CD4⁺ hücrelerinin %80'inin, CD8⁺ hücrelerinin %50'sinin (219), mürinlerde ise hem CD4⁺ hem de CD8⁺ hücrelerinin %100'ünün yüzeylerinde eksprese edilen (220) 44 kDa ağırlığında, glikozile, disülfid bağı ile bağlı homodimerik yapıda bir tip-1 transmembran proteindir. CD80, 44/54 kDa ağırlığında, CD86 ise 70/75 kDa ağırlığında glikoprotein yapıli moleküller olup her ikisi de B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerden eksprese edilebilmektedir. Antijen sunan hücrelerin yanı sıra, CD80'in bazı malignitelerde de tümör hücreleri üzerinde eksprese edildiğine dair raporlar mevcuttur (221). APC'lerin yüzeylerinde eksprese edilen B7.1/CD80 ve B7.2/CD86 molekülleri ile, CD28 arasındaki bağlanma, molekülün immünglobülin (Ig) V-benzeri bölgesindeki MYPPPY motifi sayesinde meydana gelmektedir (222, 223). CD28 ligasyonunun en belirgin etkisi, TCR stimülasyonu ile beraber değerlendirildiğine gözlemlenmiştir. Hem kalitatif hem de kantitatif anlamda TCR'yi komplemente eden sinyaller gönderildiğinde, CD28'in etkisi ile uyarılmış ve artmış hücre döngüsü, yüksek sitokin seviyeleri, T hücrelerinin sağ kalımında ve farklanmalarında artma gözlemlendiği rapor edilmiştir (224-226). Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalarda elde edilen kanıtlar, CD28'in TCR'den bağımsız olarak benzersiz sinyaller oluşturduğunu da göstermiştir (227-231). CD28'in gösterdiği tüm sinyalizasyon özellikleri; kısa sitoplazmik kuyruğunda yer alan farklı ve spesifik motiflerce

oluşturulan protein-protein etkileşimlerinin, kostimülatör fonksiyon için gerekli olan sinyal kaskadlarını aktive etmesine dayanmaktadır.

CD80/CD86-CD28 yolağında yer alan her iki B7 ailesi üyesi de CTLA-4 ve CD28 reseptörleri ile etkileşime girebilmekte olup (174, 232, 233), bu reseptörlerin her birisinin CD80 ve CD86'ya karşı affiniteleri ve ekspresyon kinetikleri farklı özellikler göstermektedir (234). CD28 sürekli olarak yüzeyde eksprese edilirken, CTLA-4 T hücre aktivasyonundan hemen sonra hızla up-regülasyona uğramaktadır. Bununla beraber, CTLA-4, CD28'e göre hem CD80, hem de CD86'ya daha yüksek afinite göstermektedir. CTLA-4 ve CD28 arasında görülen ekspresyon kinetiği farklılığının bir benzeri CD80 ve CD86 arasında da gözlenmektedir. CD86 hücrede temel düzeylerde bulunup, aktivasyonu takiben hızla up-regüle olurken, CD80 ise, CD86 ekspresyonu ile indüklenmektedir. Yapılan güncel çalışmalar, CD80 ve CD86'nın, hem immünolojik (235-238), hem de non-immünolojik (239, 240) fonksiyonları olduğunu, ayrıca CD80 ve CD86'dan bağımsız olarak CTLA-4'ün inhibitör fonksiyon gösterebildiğini de açığa çıkartmıştır (241).

CD80 ve CD86 anti-tümör immünesinde de oldukça önemli rol oynamaktadır (242-246). Yapılan çalışmalarda, CD80 geni transfenkte edilmiş mürinlerde, doğal tip tümörlere göre daha güçlü immün yanıtlar gözleendiği, protektif hatta bazı raporlarda küratif sonuçlar alındığı bildirilmiştir (242-245, 247). CD80 transfenkte mürin melanom ve mastositom hücreleri üzerinde yapılan *in-vivo* çalışmalarda, non-transfenkte hücrelere göre CD8⁺ hücreler aracılı ile güçlü bir rejeksiyon yanıtının indüklendiği gözlenmiş, aynı şekilde CD80 transfenkte sarkoma hücrelerinde de CD4⁺ hücrelerce indüklenen spesifik bir immün yanıt geliştiği rapor edilmiştir (244, 245, 248). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, anti-tümör immünesinde CD80 ve CD86'nın önemini ortaya koymaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda 2005-2015 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde malign melanom ön tanısı ile punch biyopsi, operasyonel biyopsi veya rezeksiyon yapılan 109 hasta değerlendirildi. Hastalara ait yaş, cinsiyet gibi demografik veriler, tümör lokalizasyonu, klinik evre, klinik muayene bulguları ve operatif veriler Mia-Med Hastane Bilgi Sistemi ve Medi-PIS Hastane Bilgi Sistemleri üzerinden tarandı. Hastaların biyopsi materyalleri ve parafin blokları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkartılarak incelendi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri olarak; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılan incelemede malign melanom tanısı almış olmak, hastanın tüm biyopsi materyalleri ve parafin bloklarının tam ve incelemeye uygun halde olması belirlenirken, çalışmadan dışlanma kriteri olarak malign melanom tanısı konulmamış olması, parafin blokların arşivde mevcut olmaması, parafin bloklarda uygun tümör dokusu bulunmaması belirlendi. Çalışma için incelenen toplam 109 hastadan çalışma kriterlerini karşılamayan 29 tanesi dışlanarak çalışma, 80 hasta üzerinden yürütüldü.

Çalışmaya dahil edilen hastaların Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi'nde bulunan parafin bloklarının 4 mikronluk kesitleri hemotaksilen eozin ile boyanarak, Patoloji Anabilim Dalının mikroskopları ile (Olimpus) iki Patolog tarafından incelenerek çalışma parametreleri açısından değerlendirildi ve en uygun tümör alanları cama yazar suya dayanıklı kalem ile işaretlendi. Aşağıda, maddeler halinde basamakları belirtildiği şekilde immünohistokimya prosedürü uygulandı;

- İşaretlenen preparatların ait oldukları bloklardan immünohistokimyasal değerlendirme için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na ait mikrotom cihazları kullanılarak, pozitif şarızlı lama 5 mikron kalınlığında kesitler alındı.
- Alınan kesitler 50°C'de bir gece boyunca bekletildi.

- Kesitlere, iki seri halinde 10'ar dakika ksilol, 5 dakika %100'lük alkol, 5 dakika %85'lik alkol, 5 dakika da %75'lik alkol ile muamele edildi ve deparafinizasyon işlemi yapıldı.
- Deparafinize edilen kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitler, 90 °C' ye kadar ısıtılmış uygun antijen retrieval solüsyonda önce 20 dakika süre ile sonra iki defa 5'er dakika süre ile kaynatıldı.
- Kaynatma işleminden sonra, kesitler 30 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.
- Soğuma işlemi bittikten sonra kesitler tekrar distile su ve PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Kesitler endojen peroksit blokajının yapılması için hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonunda 1 dakika bekletildi.
- Peroksit ile muamele sonunda tekrar distile su ve PBS solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Boyama için kullanılacak olan primer antikor (Anti-CD80 antibody [2A2], Anti-CD86 antibody [EP1158Y], Anti-PD-L1 antibody [ABM4E54], İNGİLTERE), PDL-1 için 1/1000, CD80 için 1/800 ve CD86 için 1/800 oranlarında dilüe edildi.
- Uygun şekilde dilüe edilen PD-L1, CD80 ve CD86 primer antikorları kesitlerin üzerine damlatıldı ve kesitler nemli ortamda 1 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda kesitler üzerine sekonder antikor 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 (Diamino Benzidine Solüsyonu) solüsyonu damlatılarak 2 dakika daha beklendi.

- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler şale içine alınarak Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletildi.
- Süre sonunda çeşme suyunda yıkama yapıldı.
- Kesitler, %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri halinde ksilolde 5'er dakika daha bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı.
- Dehidratasyonun tamamlanmasının ardından kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi ve her bir antikör için aşağıda belirtildiği şekilde skorelama yapıldı.

BOYANMA KRİTERİ ve SKORLAMA:

CD80 ve CD86 için:

Sitoplazmik ve membranöz boyanma varlığı, parafin kesitteki tümör alanının yüzde olarak boyanma oranı ve boyanma yoğunluğu değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu 0 (yok), 1+ (zayıf boyanma), 2+ (orta yoğunlukta boyanma) ve 3+ (güçlü boyanma) ayrımına göre, 0 için 0 puan, 1+ için 1 puan, 2+ için 2 puan ve 3+ için 3 puan olarak ağırlıklandırıldı. Tümörde pozitif boyanma gösteren hücrelerin, tüm tümör hücrelerine oranı bakılarak, %0-10 arasında 1 puan, %10-50 arasında 2 puan, %50-100 arasında 3 puan olacak şekilde ağırlıklandırıldı.

PDL-1 için:

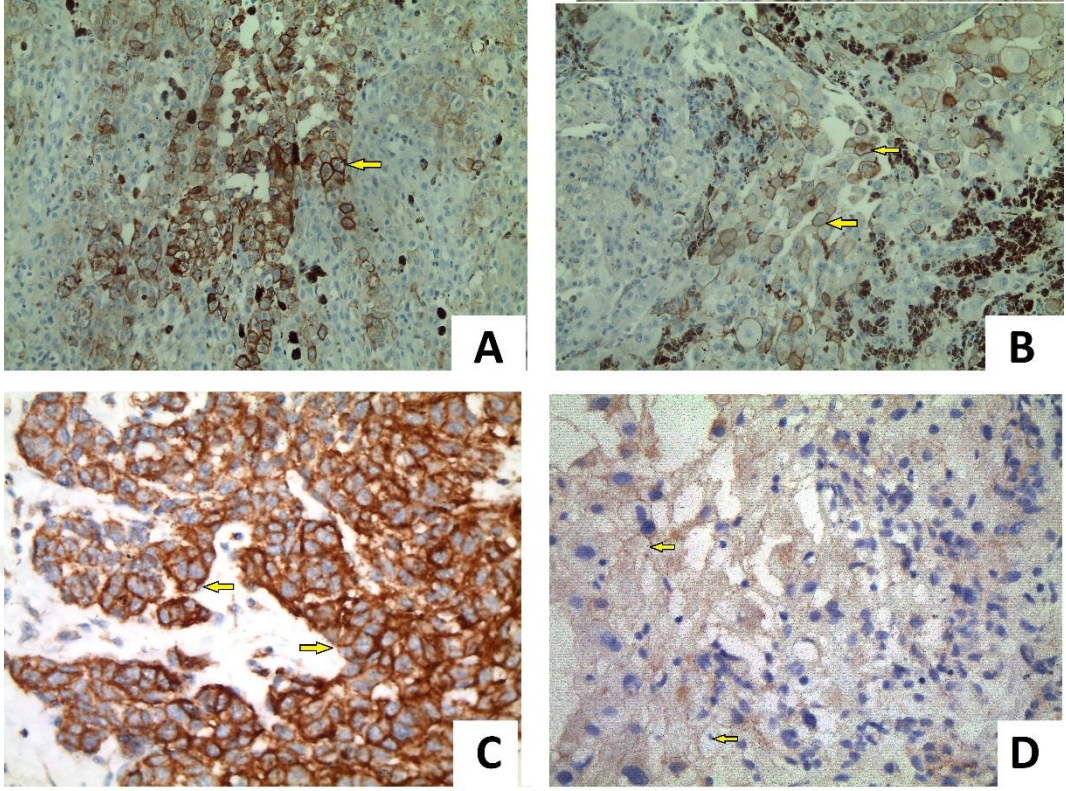
PDL-1 boyaması hem tümör hücrelerinde, hem de tümör infiltratlenfositlerde değerlendirildi. Pozitif PDL-1 boyanması, zeminden ayırım yapılabilir şekilde; tam veya parsiyel olarak, lineer membranöz boyanma ve nükleer boyanma olarak tanımlandı. PDL-1 için sitoplazmik granüler boyanma negatif kabul edildi. Boyanma yoğunluğu 0 (yok), 1+ (zayıf boyanma), 2+ (orta yoğunlukta boyanma) ve 3+ (güçlü boyanma) ayrımına göre, 0 için 0 puan, 1+ için 1 puan, 2+ için 2 puan ve 3+ için 3 puan olarak ağırlıklandırıldı. Tümörde pozitif boyanma gösteren hücrelerin, tüm tümör hücrelerine oranı bakılarak, %0-10 arasında 1 puan, %10-50 arasında 2 puan, %50-100 arasında 3 puan olacak şekilde ağırlıklandırıldı. Hem PDL-1 hem de CD80 ve CD86

immünohistokimyasal boyamalarında kontrol grubu olarak tonsil dokusu kesitleri kullanıldı.

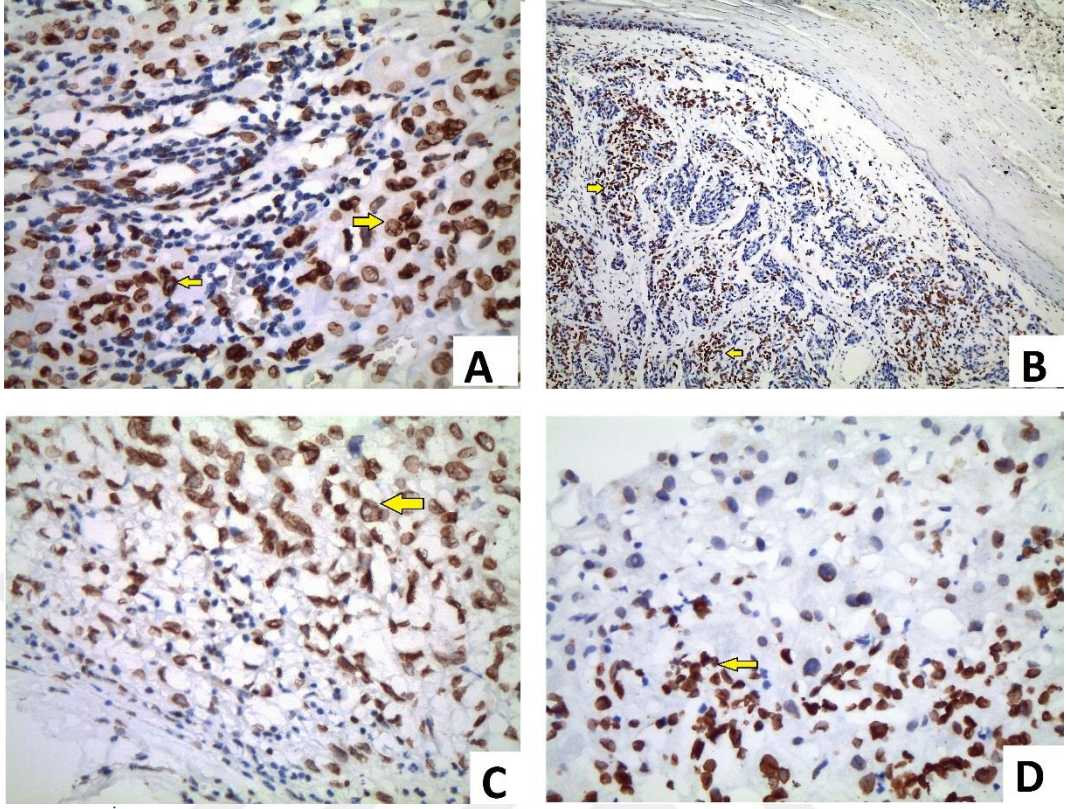
Skorlama ve Gruplama: Boyanma yüzdesinin ağırlık değeri ile boyanma yoğunluğu ağırlık değeri toplanarak boyanma skorları elde edildi. Boyanma skorlarına göre hastalar 0-4 arasında ve 5-6 düzeyinde puana sahip olanlar olarak iki gruba ayrılarak incelendi. Çalışmaya dahil edilen hastalar ayrıca, CD80 ve CD86 için boyanma var ve boyanma yok şeklinde de gruplandı.

Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındı.

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi İstatistik Danışma Merkezi tarafından SPSS Paket Programı v20 (IBM, ABD) ile yapıldı. Çalışmada elde edilen veriler, ortalama±standart sapma ve yüzde olarak verildi. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, iki eş arası ortalama fark testi, Mann Whitney U testi, Ki-kare testi ve Log-rank testi ve Kaplan-Meier analizleri kullanıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda 0,05'den daha düşük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 6 A) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD80 ile güçlü membranöz boyanma (CD80x200), B) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD80 ile zayıf membranöz boyanma (CD80x200), C) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD86 ile güçlü membranöz boyanma, (CD86x400) D) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde CD86 ile zayıf membranöz boyanma (CD86x400)



Şekil 7 A) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PDL-1 ile güçlü membranöz ve nükleer boyanma (PDL-1x400), B) İmmünohistokimyasal olarak lenfositlerde PDL-1 ile güçlü boyanma, işsi tümör hücrelerinde negatif boyanma (x200), C) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PDL-1 ile membranöz ve nükleer boyanma, lenfositlerde negatif boyanma (PDL-1x400), D) İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PDL-1 ile zayıf nükleer boyanma, lenfositlerde güçlü pozitif boyanma (PDL-1x400)

4. BULGULAR

4.1. Demografik veriler

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması $57,48 \pm 16,01$ olup, hastaların %41,3'ü (n=33) kadın, %58,7'si (n=47) erkek cinsiyetteydi. Mortalite oranları erkeklerde %46,8 (n=22), kadınlarda %33,3 (n=11) düzeylerinde görülmüş olup, iki cinsiyet arasında mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,256).

Kadın hastaların %48,5'inde (n=16) CD80 ekspresyonu pozitif görülürken, erkek hastalarda ise bu oranın %42,6 düzeylerinde (n=20) olduğu izlendi. Cinsiyetler arasında CD80 ekspresyonu açısından fark izlenmedi (p=0,600).

CD80 boyanma skorları, kadın hastaların %78,5'inde (n=25) 0-4 arasında, %24,2'sinde (n=8) 5-6 puan düzeyinde, erkek hastaların %80,9'unda (n=38), 0-4 arasında, %19,1'inde (n=9) 5-6 puan düzeylerinde olup, cinsiyetler arasında CD80 boyanma skoru açısından fark izlenmedi (p=0,584).

Kadın hastaların %45,5'inde (n=15) CD86 ekspresyonu pozitif görülürken, erkek hastalarda bu oran %46,8 (n=22) düzeyindeydi. Cinsiyetler arasında CD86 ekspresyonu açısından fark izlenmedi (p=0,905).

Değerlendirme, CD86 boyanma skorları için yapıldığında ise kadın hastaların %78,8'i (n=26) 0-4 puan arası, %21,2'si (n=7) 5-6 puan düzeyinde, erkek hastaların %80,9'u (n=38) 0-4 puan arası, %19,1'i ise (n=9) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru gösterdiği izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, cinsiyetler arasında CD86 boyanma skoru açısından anlamlı farklılık gözlenmedi (p=0,820).

Kadın hastaların %33,3'ünde (n=11) tümörde PDL-1 boyanma skoru 0-4 puan arasındayken, %66,7'sinde (n=22) 5-6 puan düzeyinde olduğu görüldü. Erkek hastaların %36,2'sinin (n=17) 0-4 puan arası, %63,8'inin de (n=30) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru sergilediği gözlemlendi. Cinsiyetler arasında tümörde

PDL-1 boyanma skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p=0,793$).

Kadın hastaların %45,5'inde ($n=15$) lenfosit PDL-1 boyanma skoru 0-4 puan arası gösterirken, %54,5'inin ($n=18$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru gösterdiği izlendi. Bununla beraber, erkek hastaların %40,4'ünün ($n=19$) 0-4 puan arası, %59,6'sının ($n=28$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru sergilediği gözlemlendi. Cinsiyetler arasında lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,654$).

Yaş ve CD80 ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik yapılan istatistiksel değerlendirmede, CD80 ekspresyonu pozitif olan hastalarda yaş ortalaması $58,55\pm17,03$, negatif olan hastalarda ise $56,59\pm15,26$ olarak görüldü ve CD80 ekspresyonu ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmedi ($p=0,588$).

CD80 boyanma puanı 0-4 arasında olan hastaların yaş ortalaması $57,39\pm15,18$ ve 5-6 düzeyinde olan hastaların yaş ortalaması $57,76\pm19,29$ olup, iki grubun arasında yaşları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p=0,934$).

CD86 ekspresyonu pozitif olan hastalarda yaş ortalaması $58,67\pm17,63$, negatif olan hastalarda yaş ortalaması $56,44\pm14,60$ olup iki grup arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,537$).

CD86 boyanma puanı 0-4 arasında olan hastaların yaş ortalaması $55,81\pm15,64$ ve 5-6 düzeyinde olan hastaların yaş ortalaması $64,12\pm16,22$ olup, iki grubun arasında yaşları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p=0,063$).

Tümörde PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasında olan hastaların yaş ortalaması $56,71\pm18,94$, 5-6 arasında olan hastaların yaş ortalaması $57,88\pm14,73$ olup iki grup arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,445$).

Lenfositte PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasında olan hastaların yaş ortalaması $56,26\pm17,55$, 5-6 arasında olan hastaların yaş ortalaması $58,36\pm14,90$ olup iki grup arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,709$).

4.2. Histolojik subtipler

Hastalar Dünya Sağlık Örgütü 2006 Malign Melanom sınıflamasına göre, non-tümörojenik (akral lentiginöz melanom, yüzeysel yayımlı melanom+lentigo malign melanom+sınıflanmamış radyal büyüme fazı) ve tümörojenik (nodüler melanom, desmaplastik melanom, malign mavi nevüs, balon hücreli melanom) olarak gruplara ayrılarak değerlendirdiğinde, %55'inin (n=44) non-tümörojenik grupta, %45'inin (n=36) tümörojenik grupta yer aldığı izlendi. Non-tümörojenik grupta yer alan hastalarda mortalitenin %29,5 (n=13), tümörojenik grupta yer alan hastalarda ise %55,6 (n=20) düzeyinde olduğu görülüp, non-tümörojenik grupta mortalitenin, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu izlendi (p=0,019).

CD80 ekspresyonunun, non-tümörojenik grupta yer alan hastalarda %52,3 (n=23) , tümörojenik grupta yer alan hastalarda ise %36,1 (n=13) düzeyinde olduğu izlenmiş olup, ekspresyon oranları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (p=0,148).

CD80 boyanma skorlarının, non-tümörojenik subtipteki hastaların %77,3'ünde (n=34) 0-4 puan arasında, %22,7'sinde (n=10) 5-6 puan düzeyinde olduğu izlenmiş olup, tümörde CD80 boyanma puanları açısından tümörojenik ve non-tümörojenik subtipteki hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı izlendi (p=0,721).

CD86 ekspresyonlarının, non-tümörojenik grupta olan hastalarda %52,3 (n=23), tümörjenik grupta yer alan hastalarda ise %38,9 (n=14) düzeylerinde olduğu izlendi ve yapılan istatistiksel analizde iki grup arasında CD86 ekspresyon oranları açısından anlamlı farklılık gözlenmedi (p=0,232).

CD86 boyanma skorlarının, non-tümörojenik subtipteki hastaların %86,1'inde (n=31) 0-4 puan arasında, %13,9'unda (n=5) 5-6 puan düzeyinde olduğu izlenmiş olup, tümörde CD80 boyanma puanları açısından tümörojenik ve non-tümörojenik subtipteki hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı izlendi (p=0,216).

Non-tümörojenik subtipteki hastaların %36,4'ünün (n=16) tümörde PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasındayken, %63,6'ünün (n=28) boyanma skorunun 5-6 olduğu görüldü. Tümörojenik histolojik subtipteki hastaların ise %33,3'ünde

(n=12) 0-4 arası, %66,7'sinde (n=24) ise 5-6 boyanma puanı olduğu izlenmiş olup, iki grup arasında PDL-1 boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı görüldü ($p=0,777$).

Aynı değerlendirme lenfositlerdeki PDL-1 boyanma skorları için yapıldığında ise non-tümörojenik histolojik subtipteki hastaların %38,6'sının (n=17) PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasındayken, %61,4'ünün (n=27) boyanma skorunun 5-6 olduğu görüldü. Tümörojenik histolojik subtipteki hastaların ise %42,7'sinde (n=17) 0-4 arası, %52,8'inde (n=19) 5-6 boyanma puanı olduğu izlenmiş olup, iki grup arasında PDL-1 boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı görüldü ($p=0,440$).

Hastaların %28,8'inin (n=23) yüzeysel yayılan tip veya lentigo maligna histolojik subtipinde, %26,2'sinin (n=21) akral lentiginöz melanom, desmoplastik veya balon hücreli melanom subtipinde olduğu görüldü. Nodüler melanom olguların ise tüm hastaların %45'lik (n=36) bölümünü teşkil ettiği izlendi.

Yüzeysel yayılan tip veya lentigo maligna subtipindeki hastalarda mortalite oranları %8,7 (n=2), akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom veya balon hücreli melanom subtiplerinde %52,4 (n=11) ve nodüler melanom subtipinde %55,6 (n=20) düzeylerinde görülmüş olup, yapılan istatistiksel değerlendirmede, yüzeysel yayılan tip ve lentigo maligna subtiplerinde mortalitenin anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$).

Histolojik subtiplere göre CD80 ekspresyonları değerlendirildiğinde, yüzeysel yayılan melanom ve lentigo maligna subtiplerinin %78,3'ünde (n=18), akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom veya balon hücreli melanom subtiplerinin %28,6'sında (n=6), nodüler melanom subtipinin ise %33,3'ünde (n=12) pozitif ekspresyon olduğu izlenmiş olup, yüzeysel yayılan melanom ve lentigo maligna subtiplerinde CD80 ekspresyonunun diğer subtiplere göre anlamlı derecede daha fazla olduğu görüldü ($p=0,001$).

CD86 ekspresyonları değerlendirildiğinde ise, yüzeysel yayılan melanom ve lentigo maligna subtiplerinin %73,9'unda (n=17), akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom veya balon hücreli melanom subtiplerinin %33,3'ünde (n=7), nodüler melanom subtipinin ise %36,1'inde (n=13) pozitif ekspresyon olduğu izlenmiş olup, yüzeysel yayılan melanom ve lentigo maligna subtiplerinde

CD86 ekspresyonunun diğer subtiplere göre anlamlı derecede daha fazla olduğu görüldü ($p=,007$).

CD80 boyanma puanları açısından yapılan değerlendirmede, yüzeysel yayılan tip ve lengito maligna subtiplerinin %56,5'inin ($n=13$) 0-4 arasında, %43,5'inin ($n=10$) 5-6 düzeyinde, akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom ve balon hücreli melanom subtiplerinin %95,2'sinin ($n=8$) 0-4 arasında, %4,8'inin ($n=1$) 5-6 düzeyinde, nodüler melanom subtipinde ise %83,3'ünün ($n=30$) 0-4 arasında, %16,7'sinin ($n=25$) 5-6 düzeyinde boyanma puanı olduğu izlenmiş olup, yüzeysel yayılan tip melanom ve lentigomaligna subtiplerinde CD80 boyanma puanlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p=0,005$).

Değerlendirme CD86 boyanma puanları açısından yapıldığında ise yüzeysel yayılan tip ve lengito maligna subtiplerinin %65,2'sinin ($n=15$) 0-4 arasında, %34,8'inin ($n=8$) 5-6 düzeyinde, akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom ve balon hücreli melanom subtiplerinin %85,7'sinin ($n=18$) 0-4 arasında, %14,3'ünün ($n=3$) 5-6 düzeyinde, nodüler melanom subtipinde ise %86,1'inin ($n=31$) 0-4 arasında, %13,9'unun ($n=5$) 5-6 düzeyinde boyanma puanı olduğu izlenmiş olup, iki grup arasında CD86 boyanma puanları açısından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,110$).

Tümörde PDL-1 boyanma skorlarına yönelik yapılan değerlendirmede, yüzeysel yayılan tip ve lengito maligna subtiplerinin %39,1'inin ($n=9$) 0-4 arasında, %60,9'unun ($n=14$) 5-6 düzeyinde, akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom ve balon hücreli melanom subtiplerinin %38,1'inin ($n=8$) 0-4 arasında, %61,9'unun ($n=13$) 5-6 düzeyinde, nodüler melanom subtipinde ise %30,6'sının ($n=11$) 0-4 arasında, %69,4'ünde ($n=25$) 5-6 düzeyinde boyanma puanı olduğu izlenmiş olup, gruplar arasında PDL-1 boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,751$).

Aynı değerlendirme lenfositlerde PDL-1 boyanma skorlarına yönelik olarak yapıldığında ise yüzeysel yayılan tip ve lengito maligna subtiplerinin %34,8'inin ($n=8$) 0-4 arasında, %65,2'sinin ($n=15$) 5-6 düzeyinde, akral lentiginöz melanom, desmoplastik melanom ve balon hücreli melanom subtiplerinin %47,6'sının ($n=10$) 0-4 arasında, %52,4'ünün ($n=11$) 5-6 düzeyinde, nodüler melanom subtipinde ise %44,4'ünün ($n=16$) 0-4 arasında, %55,6'sında ($n=20$) 5-6

düzeyinde boyanma puanı olduğu izlenmiş olup, gruplar arasında PDL-1 boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi($p=0,657$).

4.3. Tümör boyutu

Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama tümör boyutu, $1,78\pm1,12$ cm (min: 0,2 cm max:7,6 cm) olup, %12,5'inde ($n=10$) tümör boyutları $<0,6$ cm ve %87,5'inde ($n=70$) $\geq 0,6$ cm olarak görüldü.

Çalışma sürecinde mortalite gelişen hastalarda tümör boyutu $1,94\pm1,48$ cm, mortalite izlenmeyen hastalarda ise $1,67\pm0,77$ cm olup, tümör boyutu ile mortalite arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi($p=0,817$).

Ortalama tümör boyutu, CD80 pozitif boyanma gösteren grupta $1,64\pm0,80$ cm, CD80 negatif boyanma gösteren grupta $1,90\pm1,32$ cm olarak görülmüş olup iki grup arasında tümör boyutları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,568$). CD80 boyanma puanı 0-4 arasında olan hastalarda ortalama tümör boyutu $1,83\pm1,16$ cm, 5-6 düzeyinde olan hastalarda ise $1,63\pm0,95$ cm olup, iki grup arasında tümör boyutları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,545$).

Ortalama tümör boyutu, CD86 ekspresyonu pozitif olan hastalarda $1,69\pm0,82$ cm, ekspresyon negatif olan hastalarda ise $1,86\pm1,33$ cm düzeylerinde görülmüş olup, iki grup arasında tümör boyutları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,911$). CD86 boyanma puanı 0-4 arasında olan hastalarda ortalama tümör boyutu $1,77\pm1,18$ cm, 5-6 düzeyinde olan hastalarda ise $1,86\pm0,86$ cm olup, iki grup arasında tümör boyutu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenemedi ($p=0,430$).

Tümörde PDL-1 ekspresyon puanı 0-4 arasında olan hastalarda ortalama tümör boyutu $1,77\pm0,86$ cm, boyanma puanı 5-6 düzeyinde olan hastalarda ise $1,79\pm1,24$ cm olup, iki grup arasında tümör boyutu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,622$). Aynı değerlendirme lenfositte PDL-1 boyanma puanlarına göre ayrılan gruplar için yapıldığında ise, boyanma puanı 0-4 arasında olan hastalarda ortalama tümör boyutu $1,82\pm0,85$ cm, 5-6 düzeyinde olan

hastalarda ise $1,76 \pm 1,29$ cm olup, iki grup arasında tümör boyutları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,307$).

4.4. Clark evresi ve Breslow kalınlığı

Çalışmaya dahil edilen hastalar retiküler dermis invazyonu kriter alınarak, Clark-I,II ve Clark III-IV-V olarak iki gruba ayrılarak yapılan değerlendirmede, Clark Evresi I-II olan grubun, tüm hastaların %11,3'ünü ($n=9$), Clark Evresi III-IV-V olan grubun ise tüm hastaların %88,7'sini ($n=71$) oluşturduğu izlendi. Clark Evresi I-II olan hastalarda mortalite %11,1 ($n=1$), III-IV-V olan hastalarda ise %45,1 ($n=32$) olup, iki grup arasında mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,074$).

Clark Evresi I-II olan hastaların %66,7'sinde ($n=6$) CD80 ekspresyonu pozitif görülürken, Clark Evresi III-IV-V olan hastalarda bu oran %42,3 ($n=30$) düzeylerinde görüldü ve iki grup arasında CD80 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenemedi ($p=0,286$).

Clark Evresi I-II olan hastaların %66,7'sinde ($n=6$) CD80 boyanma puanı 0-4 arasındayken, %33,3'ünde bu puanın 5-6 düzeylerinde olduğu, Clark Evresi III-IV-V olan hastaların ise %80,3'ünün 0-4 arasında, %19,7'sinin 5-6 düzeylerinde CD80 boyanma puanlarına sahip oldukları izlendi. Clark Evresi I-II ve III-IV-V olan hastalar arasında CD80 boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,392$).

CD86 boyanması açısından yapılan değerlendirmede, Clark Evresi I-II olan hastaların %55,6'sında ($n=5$) CD86 pozitif boyanma görülürken, %44,4'ünde ($n=4$) negatif boyanma görüldü. Evre III-IV-V için CD86 pozitif boyanma oranı %45,1 ($n=32$) ve negatif boyanma oranı %54,9 ($n=39$) düzeylerinde izlenmiş olup, iki grup arasında CD86 boyanmaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,726$).

CD86 boyanma puanları açısından yapılan değerlendirmede, Clark Evresi I-II olan hastaların %55,6'sı ($n=5$) 0-4 arası boyanma skoruna sahipken, %44,4'ünün ($n=4$) 5-6 düzeyinde boyanma skoruna sahip olduğu, Evre III-IV ve V olan hastaların ise %83,1'inin ($n=59$) 0-4 arasında, %16,9'unun ($n=12$) 5-6

düzeylerinde CD86 boyanma skoruna sahip olduğu görüldü ve iki grup arasında boyanma skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,073$).

Tümörde PDL-1 boyanma puanlarına yönelik yapılan değerlendirmede, Clark Evresi I-II olan hastaların %55,6'sının ($n=5$) 0-4 arası, %44,4'ünün ($n=4$) 5-6 düzeyinde boyanma puanı gösterdiği, Evre III-IV-V olan hastaların ise %32,4'ünün ($n=23$) 0-4 arası, %67,6'sının ($n=48$) 5-6 düzeyinde boyanma puanı gösterdiği izlendi. İki grup arasında tümörde PDL-1 boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,265$).

Lenfositte PDL-1 boyanma puanlarına yönelik yapılan değerlendirmede, Clark Evresi I-II olan hastaların %55,6'sının ($n=5$) 0-4 arası, %44,4'ünün ($n=4$) 5-6 düzeyinde, Clark Evresi III-IV-V olan hastaların ise %40'8'inin ($n=29$) 0-4 arası, %59,2'sinin ise ($n=42$) 5-6 düzeylerinde boyanma puanı gösterdiği izlenip, iki grup arasında boyanma puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,484$).

Tüm hastalarda ortalama Breslow kalınlığı $3,6\pm 3,24$ mm olup Breslow kalınlığı <2 mm olan hastalar tüm çalışma grubunun %37,5'ini ($n=30$), ≥ 2 mm olan hastaların ise %62,5'ini ($n=50$) oluşturduğu izlendi. Mortalite gözlenen hastalarda ortalama Breslow kalınlığı $4,62\pm 3,54$ mm, mortalite gözlenmeyen hastalarda ise $2,89\pm 2,84$ mm olup, mortalite ve Breslow kalınlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu izlendi ($p=0,007$).

Breslow kalınlığı <2 mm olan hastaların %15,2'sinde ($n=5$), ≥ 2 mm olan hastaların ise %84,8'inde mortalite gözlenmiş olup, Breslow kalınlığı ile mortalite arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu izlendi ($p=0,001$).

Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların %66,6'sında ($n=20$) CD80 ekspresyonu pozitif görülürken, 2 mm ve üstünde Breslow kalınlığı olan hastalarda ise bu oranın %32 düzeylerinde ($n=16$) olduğu izlendi. Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastalarda CD80 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu görüldü ($p=0,003$).

CD80 boyanma skorları, Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların %30,2'sinde ($n=19$) 0-4 arasında, %64,7'sinde ($n=11$) 5-6 puan düzeyinde, Breslow kalınlığı 2 mm ve üzerinde olan hastaların %69,8'inde ($n=44$), 0-4

arasında, %35,3'ünde 5-6 puan düzeylerinde izlenip, Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastalarda CD80 boyanma skorlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu izlendi ($p=0,009$).

Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların %63,3'ünde ($n=19$) CD86 ekspresyonu pozitif görülürken, Breslow kalınlığı 2mm ve üzerinde olan hastalarda bu oran %36 ($n=18$) düzeyinde görüldü. Breslow kalınlığı 2mm altında olan hastalarda, CD86 ekspresyonu anlamlı derecede daha fazla izlendi ($p=0,018$). Değerlendirme, CD86 boyanma skorları için yapıldığında ise Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların %66,7'si ($n=20$) 0-4 puan arası, %33,3'ü ($n=10$) 5-6 puan düzeyinde, Breslow kalınlığı 2 mm ve üstünde olan hastaların %88'i ($n=44$) 0-4 puan arası, %12'si ise ($n=6$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru gösterdiği izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların anlamlı derecede daha yüksek CD86 boyanma skoru gösterdiği izlendi. ($p=0,021$).

Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların %40'ı ($n=12$) 0-4 arası tümörde PDL-1 boyanma skoru gösterirken, %60'ının ($n=18$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru gösterdiği görüldü. Breslow kalınlığı 2 mm ve üzerinde olan hastaların %32'sinin ($n=16$) 0-4 puan arası, %68'inin de ($n=34$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru sergilediği gözlemlendi. Breslow kalınlığı 2 mm altı olan hastalar ile 2 mm ve üstü olan hastalar arasında tümörde PDL-1 boyanma skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,468$).

Breslow kalınlığı 2 mm altında olan hastaların %43,3'ü ($n=13$) 0-4 arası lenfosit PDL-1 boyanma skoru gösterirken, %56,7'sinin ($n=17$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru gösterdiği bununla beraber, Breslow kalınlığı 2 mm ve üzerinde olan hastaların %42'sinin ($n=21$) 0-4 puan arası, %58'inin ($n=58$) 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru sergilediği gözlemlendi. Breslow kalınlığı 2 mm altı olan hastalar ile 2 mm ve üstü olan hastalar arasında lenfositte PDL-1 boyanma skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,907$).

4.5. Ülserasyon

Çalışma içerisinde değerlendirilen hastaların %37,5'inde (n=30) ülserasyon varlığı izlendi. Ülserasyon izlenen hastalarda mortalite %60 düzeylerindeyken (n=18), ülserasyon izlenmeyen olgularda bu oranın %30 (n=15) düzeylerinde olduğu görüldü. Ülserasyon gözlenen olgularda mortalitenin de istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu izlendi (p=0,008).

Tümörde ülserasyon gözlenen hastaların %20'sinde (n=6) immünohistokimyasal olarak CD80 ekspresyonu pozitif görülmüş olup, ülserasyon gözlenmeyen hastalarda bu oran %60 (n=30) olarak izlendi ve ülserasyon gözlenmeyen hastalarda CD80 ekspresyonu pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olarak gözlemlendi (p=0,0001). Tümörde ülserasyon gözlenen hastaların %90'ında (n=27) CD80 boyanma skoru 0-4 arasında, %10'unda 5-6 düzeylerinde olup, ülserasyon gözlenmeyen hastaların ise %72'sinde (n=36) boyanma skoru 0-4 arasında, %28'inde ise 5-6 düzeylerinde olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede tümörde ülserasyon görülme durumu ile CD80 boyanma skorları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı izlendi (p=0,089).

Ülserasyon gözlenen tümörlerde CD86 pozitif ekspresyon oranının %26,7 (n=8), ülserasyon gözlenmeyen tümörlerde ise %58 (n=29) düzeyinde olduğu izlendi. İstatistiksel değerlendirmede, ülserasyon gözlenmeyen tümörlerde CD86 ekspresyonunun anlamlı derecede daha fazla olduğu görüldü (p=0,007). CD86 boyanma skorlarının ülserasyon gösteren hastaların %83,3'ünde (n=25) 0-4 puan arasında, %16,7'sinde (n=5) 5-6 puan düzeyinde, ülserasyon gözlenmeyen hastaların %78'sinde (n=39) 0-4 puan arasında ve %22'sinde (n=11) ise 5-6 puan düzeylerinde olduğu gözlemlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede tümörde ülserasyon gözlenmesi durumu ile CD86 boyanma skorları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı izlendi (p=0,564).

Ülserasyon gözlenen olguların %30'unun (n=9) tümörde PDL-1 boyanma skorları 0-4 arasında, %70'inin (n=21) ise 5-6 düzeylerinde olduğu, ülserasyon gözlenmeyen olguların ise %38'inde (n=19) 0-4 arasında, %62'sinde (n=31) ise 5-6 puan düzeylerinde olduğu izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, ülserasyon gözlenme durumu ile tümörde PDL-1 boyanma skorları arasında

istatistiksel olarak bağlantı olmadığı görüldü ($p=0,468$). Ülserasyon gözlenen hastaların %50'sinde ($n=15$) lenfositlerde PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasında, %50'sinde ($n=15$) 5-6 puan düzeylerinde, ülserasyon gözlenmeyen olguların ise %38'inde ($n=19$) 0-4 puan arasında, %62'sinde ise ($n=31$) 5-6 puan düzeylerinde olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, lenfositlerde PDL-1 boyanma skoru ile tümörde ülserasyon görülmesi arasında bir ilişki olmadığı izlendi ($p=0,293$).

4.6. Büyüme fazı

Büyüme fazları açısından hastaların %7,5'inin ($n=6$) sadece radyal büyüme fazını, %92,5'inin ($n=74$) ise vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösterdiği izlendi. Sadece radyal büyüme fazı gösteren olgularda mortalite izlenmezken, vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren hastalarda mortalitenin %44,6 ($n=33$) düzeyinde olduğu izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörlerde mortalitenin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü ($p=0,039$).

Sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörlerin %83,3'ünde ($n=5$) CD80 ekspresyonu pozitif olarak görülürken, vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörlerde ise bu oranın %41,9 ($n=31$) düzeylerinde olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörler ile vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörler arasında CD80 ekspresyonu pozitifliği açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,085$).

Sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörlerin %83,3'ünde ($n=5$) CD80 boyanma skoru 0-4 arasında, %16,7'sinde ($n=1$) 5-6 puan düzeyinde, vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörlerin %78,4'ünde ($n=58$) 0-4 puan arasında, %21,6'sında ($n=16$) 5-6 puan düzeyinde olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörler ile vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren

tümörler arasında CD80 boyanma skorları açısından anlamlı farklılık olmadığı izlendi ($p=1$).

Sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörlerde CD86 ekspresyon oranı %83,3 ($n=5$), vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörlerde %43,2 ($n=32$) düzeyinde görüldü. Yapılan istatistiksel analizde iki grup arasında CD86 ekspresyonu açısından anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=0,058$). CD86 boyanma skorları için yapılan değerlendirmede, radyal büyüme fazı gösteren tümörlerin %83,3'ü ($n=5$) 0-4 puan arasında, %16,7'si 5-6 puan düzeyinde, vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörlerin %79,7'si ($n=59$) 0-4 puan arasında, %20,3'ü ise 5-6 puan düzeyinde boyanma skoru gösterdiği izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, sadece radyal ve vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörler arasında CD86 boyanma puanları açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p=1$).

Sadece radyal büyüme fazı gösteren olguların %16,7'sinde tümörde PDL-1 boyanma skorları 0-4 puan arasında, %83,3'ünde ($n=5$) 5-6 puan arasında olup, vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren olguların %36,5'inde ($n=27$) 0-4 puan arasında, %63,5'inde ($n=47$) 5-6 puan düzeyinde gözlemlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, tümör dokusunda PDL-1 boyanma skorları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,659$).

Sadece radyal büyüme fazı gösteren tümörlerde, lenfositte PDL-1 boyanma skorları, olguların %16,7'sinde ($n=1$) 0-4 puan arasında, %83,3'ünde ($n=5$) 5-6 puan düzeylerinde, vertikal/radyal ve vertikal büyüme fazlarını beraber gösteren tümörlerde ise olguların %44,6'sında ($n=33$) 0-4 puan arasında, %55,4'ünde ($n=41$) 5-6 puan düzeylerinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede iki grup arasında lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,233$).

4.7. Lenfositik infiltrasyon

Hastalara ait incelenen örneklerin %58,8'inde ($n=47$) lenfositik infiltrasyon varlığı izlendi. Lenfositik infiltrasyon izlenen olgularda mortalite %37,3, izlenmeyen olgularda ise %52,4 düzeyinde olup, yapılan istatistiksel

değerlendirmede, lenfositik infiltrasyon izlenen ve izlenmeyen olgular arasında mortalite oranları açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p=0,228$).

CD80 ekspresyon pozitifliği, lenfositik infiltrasyon izlenen olguların %44,1'inde ($n=26$), lenfositik infiltrasyon izlenmeyen olguların ise %47,6'sında ($n=10$) görüldü. CD80 ekspresyonuna dair yapılan istatistiksel incelemede, lenfositik infiltrasyon görülen ve görülmeyen olgular arasında anlamlı farklılık olmadığı izlendi ($p=0,779$).

CD80 boyanma skorları, lenfositik infiltrasyon izlenen olguların %83,1'inde ($n=49$) 0-4 puan arasında, %16,9'unda ($n=10$) 5-6 puan düzeylerinde olup, lenfositik infiltrasyon izlenmeyen olguların ise %66,7'sinde ($n=14$) 0-4 puan arasında ve %33,3'ünde 5-6 puan düzeyinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede lenfositik infiltrasyon gözlenen ve gözlenmeyen olgular arasında, CD80 boyanma skorları açısından anlamlı farklılık olmadığı izlendi ($p=0,130$).

CD86 ekspresyonu oranı, lenfositik infiltrasyon izlenen olgularda %47,5 ve lenfositik infiltrasyon izlenmeyen olgularda ise %42,9 ($n=9$) düzeylerinde olup, lenfositik infiltrasyon izlenen ve izlenmeyen olgular arasında CD86 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,717$).

CD86 boyanma skorları, lenfositik infiltrasyon izlenen olguların %79,7'sinde ($n=47$) 0-4 puan arasında, %20,3'ünde ($n=12$) 5-6 puan düzeylerinde olup, lenfositik infiltrasyon izlenmeyen olguların ise %81'inde ($n=17$) 0-4 puan arasında, %19'unda ($n=4$) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p=1$).

Tümörde PDL-1 boyanma skorları, lenfositik infiltrasyon izlenen olguların %39'unda ($n=23$) 0-4 puan arasında, %61'inde ($n=36$) 5-6 puan düzeylerinde olup, lenfositik infiltrasyon izlenmeyen olguların ise %23,8'inde ($n=5$) 0-4 puan arasında, %76,2'sinde ($n=16$) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,211$).

Lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları, lenfositik infiltrasyon izlenen olguların %44,1'inde ($n=26$) 0-4 puan arasında, %55,9'unda ($n=33$) 5-6 puan

düzeylerinde olup, lenfositik infiltrasyon izlenmeyen olguların ise %38,1'inde (n=8) 0-4 puan arasında, %61,9'unda (n=13) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,634).

4.8. Nörotropizm

Nörotropizm hastaların %23,8'inde (n=19) izlendi. Nörotropizm izlenen olgularda mortalite %52,6, izlenmeyen olgularda ise %37,7 düzeyinde olup, yapılan istatistiksel değerlendirmede, nörotropizm izlenen ve izlenmeyen olgular arasında mortalite oranları açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü (p=0,248).

CD80 ekspresyon pozitifliği, nörotropizm izlenen olguların %36,8'inde (n=7), nörotropizm izlenmeyen olguların ise %47,5'inde (n=29) görüldü. CD80 ekspresyonuna dair yapılan istatistiksel incelemede nörotropizm görülen ve görülmeyen olgular arasında anlamlı farklılık olmadığı izlendi (p=0,413).

CD80 boyanma skorları, nörotropizm izlenen olguların %73,7'sinde (n=49) 0-4 puan arasında, %26,3'ünde (n=5) 5-6 puan düzeylerinde olup, nörotropizm izlenmeyen olguların ise %80,3'ünde (n=49) 0-4 puan arasında ve %19,7'sinde (n=12) 5-6 puan düzeyinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede nörotropizm gözlenen ve gözlenmeyen olgular arasında, CD80 boyanma skorları açısından anlamlı farklılık olmadığı izlendi (p=0,534).

CD86 ekspresyonu oranı, nörotropizm izlenen olgularda %42,1 (n=8) ve nörotropizm izlenmeyen olgularda ise %47,5 (n=29) düzeylerinde olup, nörotropizm izlenen ve izlenmeyen olgular arasında CD86 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (p=0,678).

CD86 boyanma skorları, nörotropizm izlenen olguların %73,7'sinde (n=14) 0-4 puan arasında, %26,3'ünde (n=5) 5-6 puan düzeylerinde olup, nörotropizm izlenmeyen olguların ise %82'sinde (n=50) 0-4 puan arasında, %18'inde (n=11) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,514).

Tümörde PDL-1 boyanma skorları, nörotropizm izlenen olguların %31,6'sında (n=6) 0-4 puan arasında, %68,4'ünde (n=13) 5-6 puan düzeylerinde olup, nörotropizm izlenmeyen olguların ise %36,1'inde (n=22) 0-4 puan arasında, %63,9'unda (n=39) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,720).

Lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları, nörotropizm izlenen olguların %42,1'inde (n=8) 0-4 puan arasında, %57,9'unda (n=11) 5-6 puan düzeylerinde olup, nörotropizm izlenmeyen olguların ise %42,6'sında (n=26) 0-4 puan arasında, %57,4'ünde (n=35) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,968).

4.9. Regresyon

Regresyon hastaların %18,7'sinde (n=15) izlendi. Regresyon izlenen olgularda mortalite %60, izlenmeyen olgularda ise %36,9 düzeyinde olup, yapılan istatistiksel değerlendirmede, nörotropizm izlenen ve izlenmeyen olgular arasında mortalite oranları açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü (p=0,102).

CD80 ekspresyon pozitifliği, regresyon izlenen olguların %20'sinde (n=3), regresyon izlenmeyen olguların ise %50,8'inde (n=33) görüldü. CD80 ekspresyonuna dair yapılan istatistiksel incelemede regresyon görülen olgularda CD80'in daha fazla eksprese edildiği izlendi (p=0,031).

CD80 boyanma skorları, regresyon izlenen olguların %80'inde (n=12) 0-4 puan arasında, %20'sinde (n=3) 5-6 puan düzeylerinde olup, regresyon izlenmeyen olguların ise %78,5'inde (n=51) 0-4 puan arasında ve %21,5'inde (n=14) 5-6 puan düzeyinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede regresyon gözlenen ve gözlenmeyen olgular arasında, CD80 boyanma skorları açısından anlamlı farklılık olmadığı izlendi (p=1).

CD86 ekspresyonu oranı, regresyon izlenen olgularda %26,7 (n=4) ve regresyon izlenmeyen olgularda ise %50,8 (n=33) düzeylerinde olup, regresyon

izlenen ve izlenmeyen olgular arasında CD86 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,150$).

CD86 boyanma skorları, regresyon izlenen olguların %80'inde ($n=12$) 0-4 puan arasında, %20'sinde ($n=3$) 5-6 puan düzeylerinde olup, regresyon izlenmeyen olguların ise %80'inde ($n=52$) 0-4 puan arasında, %20'sinde ($n=13$) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p=1$).

Tümörde PDL-1 boyanma skorları, regresyon izlenen olguların %40'ında ($n=6$) 0-4 puan arasında, %60'ında ($n=9$) 5-6 puan düzeylerinde olup, regresyon izlenmeyen olguların ise %33,8'inde ($n=22$) 0-4 puan arasında, %66,2'sinde ($n=43$) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,652$).

Lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları, regresyon izlenen olguların %53,3'ünde ($n=8$) 0-4 puan arasında, %46,7'sinde ($n=7$) 5-6 puan düzeylerinde olup, regresyon izlenmeyen olguların ise %40'ında ($n=26$) 0-4 puan arasında, %60'ında ($n=39$) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,346$).

4.10. Lenf düğümü metastazı

Lenf düğümü metastazı, hastaların %20'sinde ($n=16$) görüldü. Lenf düğümü metastazı izlenen olgularda mortalite %56,2, izlenmeyen olgularda ise %37,5 düzeyinde olup, yapılan istatistiksel değerlendirmede, lenf düğümü metastazı izlenen ve izlenmeyen olgular arasında mortalite oranları açısından anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p=0,173$).

CD80 ekspresyon pozitifliği, lenf düğümü metastazı izlenen olguların %18,8'inde ($n=3$), lenf düğümü metastazı izlenmeyen olguların ise %51,6'sında ($n=33$) görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, lenf düğümü metastazı olmayan olgularda CD80 ekspresyonunun anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,024$).

CD80 boyanma skorları, lenf düğümü metastazı izlenen olguların tamamında 0-4 arasında, lenf düğümü metastazı izlenmeyen olguların ise %73,4'ünde (n=49) 0-4 puan arasında ve %26,6'sında (n=17) 5-6 puan düzeyinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, lenf düğümü metastazı olmayan olgularda CD80 boyanma skorlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,018).

CD86 ekspresyonu oranı, lenf düğümü metastazı izlenen olgularda %18,8 (n=3) ve lenf düğümü metastazı izlenmeyen olgularda ise %53,1 (n=34) düzeylerinde olup, lenf düğümü metastazı izlenmeyen olgularda CD86 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görüldü. (p=0,014).

CD86 boyanma skorları, lenf düğümü metastazı izlenen olguların tamamında 0-4 puan arasında olup, lenf düğümü metastazı izlenmeyen olguların ise %75'inde (n=50) 0-4 puan arasında, %25'inde (n=16) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, lenf düğümü metastazı olmayan olgularda CD86 boyanma skorlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,032).

Tümörde PDL-1 boyanma skorları, lenf düğümü metastazı izlenen olguların %37,5'inde (n=6) 0-4 puan arasında, %62,5'inde (n=10) 5-6 puan düzeylerinde olup, lenf düğümü metastazı izlenmeyen olguların ise %34,4'ünde (n=22) 0-4 puan arasında, %65,6'sında (n=42) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,815).

Lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları, lenf düğümü metastazı izlenen olguların %50'sinde (n=8) 0-4 puan arasında, %50'sinde (n=8) 5-6 puan düzeylerinde olup, lenf düğümü metastazı izlenmeyen olguların ise %40,6'sında (n=26) 0-4 puan arasında, %59,4'ünde (n=38) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,497).

4.11. Klinik evre

Çalışmada değerlendirilen hastaların %51,2'si (n=41) Evre-1-2, %48,8'i (n=39) Evre 3-4'dür. Evre1-2 hastalarda mortalite oranı %12,2 (n=5), Evre 3-4 hastalarda mortalite oranı %71,8 (n=28) olup, yapılan istatistiksel değerlendirmede Evre 3-4 hastalarda mortalite anlamlı derecede daha yüksek görüldü (p=0,0001).

CD80 ekspresyon pozitifliği, Evre 1-2 olguların %73,2 (n=30), Evre 3-4 olguların ise %15,4'ünde (n=6) görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, Evre 1-2 olgularda CD80 ekspresyonunun anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,0001).

CD80 boyanma skorları, Evre 1-2 olguların %63,8'inde (n=28) 0-4 arasında, %31,7'sinde (n=13) 5-6 puan düzeyinde, Evre 3-4 olguların ise %89,7'sinde (n=35) 0-4 puan arasında ve %10,3'ünde (n=4) 5-6 puan düzeyinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, Evre 1-2 olgularda CD80 boyanma skorlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,028).

CD86 ekspresyonu oranı, Evre 1-2 olgularda %70,7 (n=29) ve Evre 3-4 olgularda ise %20,5 (n=8) düzeylerinde olup, Evre 1-2 olgularda CD86 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görüldü. (p=0,0001).

CD86 boyanma skorları, Evre 1-2 olguların %70,7'sinde (n=29) 0-4 puan arasında, %29,3'ünde (n=12) 5-6 puan düzeyinde olup, Evre 3-4 olguların ise %89,7'sinde (n=35) 0-4 puan arasında, %10,3'ünde (n=4) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, Evre 1-2 olgularda CD86 boyanma skorlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,034).

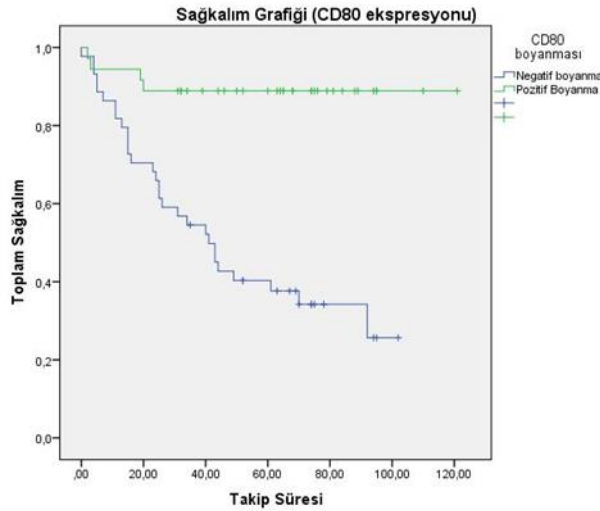
Tümörde PDL-1 boyanma skorları, Evre 1-2 olguların %51,2'sinde (n=21) 0-4 puan arasında, %48,8'inde (n=20) 5-6 puan düzeylerinde olup, Evre 3-4 olguların ise %17,9'unda (n=7) 0-4 puan arasında, %82,1'inde (n=32) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Yapılan istatistiksel analizde Evre 3-4 olguların anlamlı derecede daha yüksek tümörde PDL-1 boyanma skoru olduğu görüldü. (p=0,002).

Lenfositlerde PDL-1 boyanma skorları, Evre 1-2 olguların %51,2'sinde (n=21) 0-4 puan arasında, %48,8'inde (n=20) 5-6 puan düzeylerinde olup, Evre 3-4 olguların ise %33,3'ünde (n=13) 0-4 puan arasında, %66,7'sinde (n=26) ise 5-6 puan düzeylerinde izlendi. Lenfositte PDL-1 boyanma skorlarına yönelik yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,106).

4.12. Sağkalım

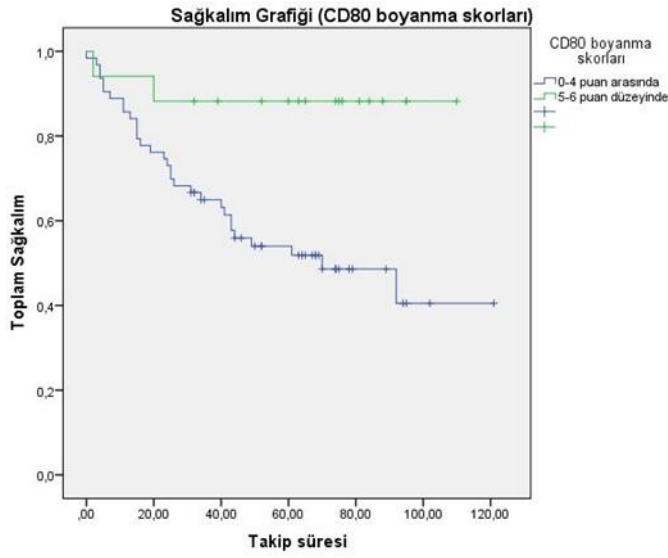
Hastaların ortalama takip süresi $57,72 \pm 30,32$ ay (min:0; max: 121 ay) olarak görülürken, takip sürecinde mortalite oranı %41,3 (n=33) düzeyindeydi.

CD80 ekspresyonu pozitif olan olgularda 1-3 ve 5 yıllık sağkalım düzeyleri %89 düzeylerindeyken, CD80 ekspresyonu göstermeyen olgularda 1, 3 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %68, %43 ve %34 düzeylerinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede CD80 ekspresyonu pozitif olan olgularda 5 yıllık sağkalımın anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,0001).



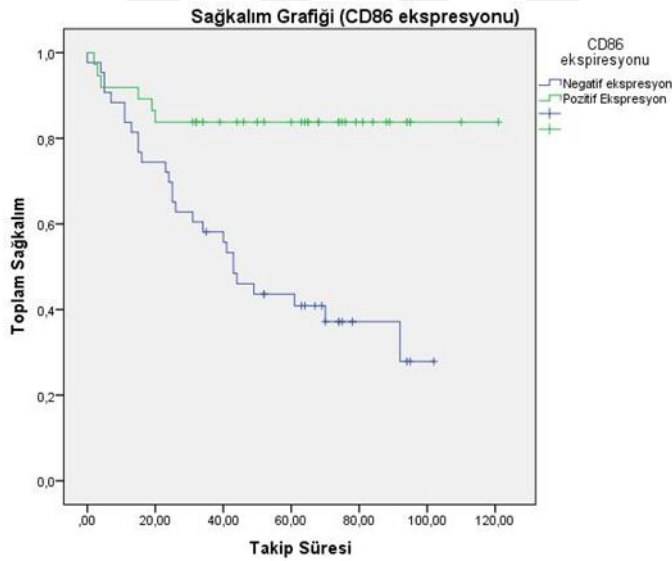
Şekil 8 CD80 boyanma pozitifliğine göre sağkalım grafiği

CD80 boyanma skoru 0-4 arasında olan olgularda 1-3 ve 5 yıllık sağkalım düzeyleri sırasıyla %75, %55 ve %48 düzeylerindeyken, CD80 boyanma skoru 5-6 düzeyinde olan olgularda 1, 3 ve 5 yıllık sağkalım oranları her üç dönemde de %88 düzeylerinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede CD80 boyanma skoru 5-6 düzeylerinde olan olgularda 5 yıllık sağkalımın anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,012).



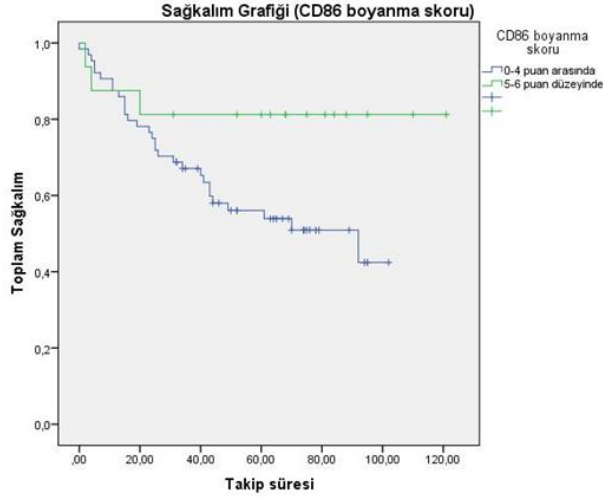
Şekil 9 CD80 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği

CD86 ekspresyonu pozitif olan olgularda 1-3 ve 5 yıllık sağkalım düzeyleri %84 düzeylerindiyken, CD86 ekspresyonu göstermeyen olgularda 1, 3 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %72, %46 ve %37 düzeylerinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede CD86 ekspresyonu pozitif olan olgularda 5 yıllık sağkalımın anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,0001$).



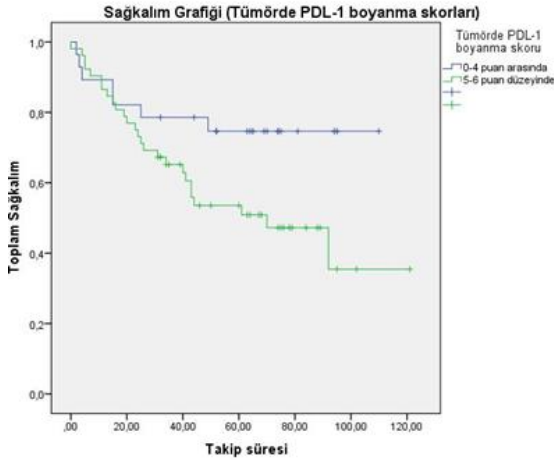
Şekil 10 CD86 boyanma pozitifliğine göre sağkalım grafiği

CD86 boyanma skoru 0-4 arasında olan olgularda 1-3 ve 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %77, %58 ve %46 düzeylerindiyken, CD86 boyanma skoru 5-6 düzeyinde olan olgularda 1, 3 ve 5 yıllık sağkalım oranları her üç dönemde de %81 düzeylerinde görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede CD86 boyanma skoru 0-4 arasında ve 5-6 düzeylerinde olan hastalar arasında 5 yıllık sağkalım açısından anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=0,067$).



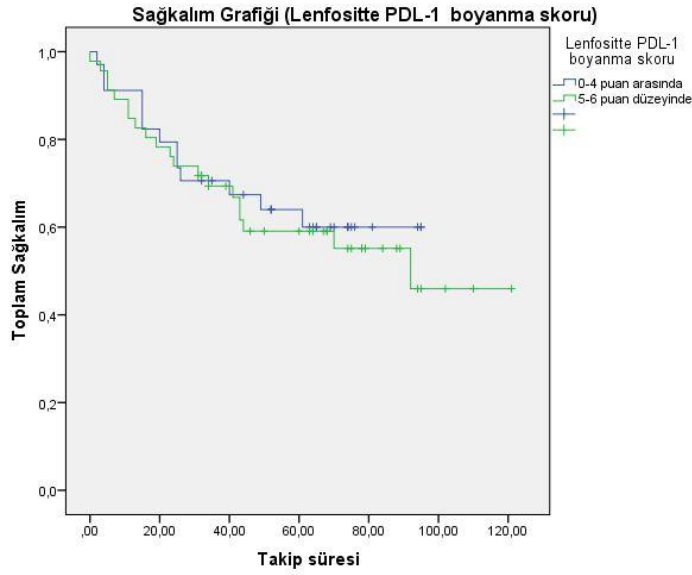
Şekil 11 CD86 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği

Tümörde PDL-1 boyanma skoru 0-4 puan arasında olan olgularda 1,3 ve 5 yıllık sağkalım değerleri sırasıyla %82, %78 ve %74 seviyelerinde olmakla beraber, boyanma skoru 5-6 düzeyindeki olgularda ise sağkalım değerleri sırasıyla %75, %53 ve %40 seviyelerinde görüldü. Yapılan istatistiksel analizde, tümörde PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasında olan hastalarda 5 yıllık sağkalımın anlamlı derecede daha yüksek görüldü ($p=0,039$).



Şekil 12 Tümörde PDL-1 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği

Lenfositte PDL-1 boyanma skoru 0-4 puan arasında olan olgularda 1,3 ve 5 yıllık sağkalım değerleri sırasıyla %79, %67 ve %56 seviyelerinde olmakla beraber, boyanma skoru 5-6 düzeyindeki olgularda ise sağkalım değerleri sırasıyla %76, %59 ve %49 seviyelerinde görüldü. Yapılan istatistiksel analizde, tümörde PDL-1 boyanma skoru 0-4 arasında ve 5-6 düzeyinde olan olgular arasında 5 yıllık sağkalım açısından anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,658$).



Şekil 13 Lenfositte PDL-1 boyanma skorlarına göre sağkalım grafiği

Çalışmaya dahil edilen hastaların %45'inde (n=36) immünohistokimyasal olarak CD80 boyanması pozitif görülürken, bu oran CD86 için, %46,3 düzeylerinde izlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, CD80 ve CD86 ekspresyonlarının beraber pozitif ve beraber negatif görülmesi durumunun, ayrı ayrı ekspresyonlarına göre anlamlı derecede daha yüksek oranda olduğu gözlemlendi (p=0,0001). CD80 ve CD86'nın görülme sayıları tabloda ve grafikte verilmiştir.

Tablo 10 CD80 ve CD86 ekspresyonlarının hasta sayıları ile gösterimi

		CD86		
		Pozitif (n)	Negatif (n)	TOPLAM (n)
CD80	Pozitif (n)	35	1	36
	Negatif (n)	2	42	44
	TOPLAM (n)	37	43	80



Şekil 14 CD80 ve CD86 ekspresyon grafikleri

Tablo 11 CD80 ekspresyonu ve boyanma skorlarına göre risk faktörleri

		CD80 ekspresyonu				p değeri	CD80 boyanma skoru				
		Yok		Var			0-4 puan arası		5-6 puan düzeyi		p değeri
		Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet	Kadın	17	51,5%	16	48,5%	0,600	25	75,8%	8	24,2%	0,584
	Erkek	27	57,4%	20	42,6%		38	80,9%	9	19,1%	
Yaş (ortalama±standart sapma)		56,69±15,26		58,55±17,03		0,588	57,39±15,18		57,76±19,29		0,934
Tümör boyutu (ortalama±standart sapma)		1,90±1,32		1,65±0,80		0,568	1,83±1,16		1,63±0,95		0,545
DSÖ histolojik subtip	Non-tömörojenik	21	47,7%	23	52,3%	0,148	34	77,3%	10	22,7%	0,721
	Tömörojenik	23	63,9%	13	36,1%		29	80,6%	7	19,4%	
Clark Evresi	Clark Evresi 1 ve 2	3	33,3%	6	66,7%	0,286	6	66,7%	3	33,3%	0,392
	Clark Evresi 3,4 ve 5	41	57,7%	30	42,3%		57	80,3%	14	19,7%	
Breslow kalınlığı	2 mm altı	10	33,3%	20	66,7%	**0,003	19	63,3%	11	36,7%	**0,009
	2 mm üstü	34	68,0%	16	32,0%		44	88,0%	6	12,0%	
Ülserasyon	Yok	20	40,0%	30	60,0%	**0,0001	36	72,0%	14	28,0%	0,089
	Var	24	80,0%	6	20,0%		27	90,0%	3	10,0%	
Büyüme fazı	Radyal	1	16,7%	5	83,3%	0,085	5	83,3%	1	16,7%	1
	Vertikal veya Radyal+vertikal	43	58,1%	31	41,9%		58	78,4%	16	21,6%	
Lenfositik infiltrasyon	Yok	11	52,4%	10	47,6%	0,779	14	66,7%	7	33,3%	0,130
	Var	33	55,9%	26	44,1%		49	83,1%	10	16,9%	
Evre (Klinik)	Evre 1-2	11	26,8%	30	73,2%	**0,0001	28	68,3%	13	31,7%	**0,028
	Evre 3-4	33	84,6%	6	15,4%		35	89,7%	4	10,3%	
Lenf nodu metastazı	Yok	31	48,4%	33	51,6%	**0,024	47	73,4%	17	26,6%	**0,018
	Var	13	81,2%	3	18,8%		16	100,0%	-	-	
Nörotropizm	Yok	32	52,5%	29	47,5%	0,413	49	80,3%	12	19,7%	0,534
	Var	12	63,2%	7	36,8%		14	73,7%	5	26,3%	
Regresyon	Yok	32	49,2%	33	50,8%	**0,030	51	78,5%	14	21,5%	1
	Var	12	80,0%	3	20,0%		12	80,0%	3	20,0%	

Tablo 12 CD86 ekspresyonu ve boyanma skorlarına göre risk faktörleri

		CD86 ekspresyonu				p değeri	CD86 boyanma skoru					
		Yok		Var			0-4 puan arası		5-6 puan düzeyi		p değeri	
		Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%		
Cinsiyet	Kadın	18	54,5%	15	45,5%	0,985	26	78,8%	7	21,2%	0,820	
	Erkek	25	53,2%	22	46,8%		38	80,9%	9	19,1%		
Yaş (ortalama±standart sapma)		56,44±14,60		58,67±17,63		0,537	55,81±15,64		64,12±16,22		0,063	
Tümör boyutu (ortalama±standart sapma)		1,86±1,33		1,69±0,82		0,911	1,77±1,18		1,86±0,86		0,430	
DSÖ histolojik subtip	Non-tömörojenik	21	47,7%	23	52,3%	0,232	33	75,0%	11	25,0%	0,216	
	Tömörojenik	22	61,1%	14	38,9%		31	86,1%	5	13,9%		
Clark Evresi	Clark Evresi 1 ve 2	4	44,4%	5	55,6%	0,726	5	55,6%	4	44,4%	0,073	
	Clark Evresi 3,4 ve 5	39	54,9%	32	45,1%		59	83,1%	12	16,9%		
Breslow kalınlığı	2 mm altı	11	36,7%	19	63,3%	**0,018	20	66,7%	10	33,3%	**0,021	
	2 mm üstü	32	64,0%	18	36,0%		44	88,0%	6	12,0%		
Ülserasyon	Yok	21	42,0%	29	58,0%	**0,007	39	78,0%	11	22,0%	0,564	
	Var	22	73,3%	8	26,7%		25	83,3%	5	16,7%		
Büyüme fazı	Radyal	1	16,7%	5	83,3%	0,058	5	83,3%	1	16,7%	1	
	Vertikal veya Radyal+vertikal	42	56,8%	32	43,2%		59	79,7%	15	20,3%		
Lenfositik İnfiltrasyon	Yok	12	57,1%	9	42,9%	0,717	17	81,0%	4	19,0%	1	
	Var	31	52,5%	28	47,5%		47	79,7%	12	20,3%		
Evre Klinik	Evre 1-2	12	29,3%	29	70,7%	**0,0001	29	70,7%	12	29,3%	**0,034	
	Evre 3-4	31	79,5%	8	20,5%		35	89,7%	4	10,3%		
Lenf nodu metastazı	Yok	30	46,9%	34	53,1%	**0,014	48	75,0%	16	25,0%	**0,032	
	Var	13	81,2%	3	18,8%		16	100,0%	-	-		
Nörotropizm	Yok	32	52,5%	29	47,5%	0,678	50	82,0%	11	18,0%	0,514	
	Var	11	57,9%	8	42,1%		14	73,7%	5	26,3%		
Regresyon	Yok	18	54,5%	15	45,5%	0,150	26	78,8%	7	21,2%	1	
	Var	25	53,2%	22	46,8%		38	80,9%	9	19,1%		

Tablo 13 Tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorlarına göre risk faktörleri

		Tümörde PDL-1 boyanma skoru				p değeri	Lenfositte PDL-1 boyanma skoru				
		0-4 puan arası		5-6 puan düzeyi			0-4 puan arası		5-6 puan düzeyi		p değeri
		Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet	Kadın	11	33,3%	22	66,7%	0,793	15	45,5%	18	54,5%	0,654
	Erkek	17	36,2%	30	63,8%		19	40,4%	28	59,6%	
Yaş (ortalama±standart sapma)		56,71±18,94		57,88±14,37		0,445	56,26±17,55		58,36±14,90		0,709
Tümör boyutu (ortalama±standart sapma)		1,77±0,86		1,79±1,24		0,622	1,82±0,85		1,76±1,29		0,307
DSÖ histolojik subtip	Non-tümöröjenik	16	36,4%	28	63,6%	0,777	17	38,6%	27	61,4%	0,440
	Tümöröjenik	12	33,3%	24	66,7%		17	47,2%	19	52,8%	
Clark Evresi	Clark Evresi 1 ve 2	5	55,6%	4	44,4%	0,265	5	55,6%	4	44,4%	0,484
	Clark Evresi 3,4 ve 5	23	32,4%	48	67,6%		29	40,8%	42	59,2%	
Breslow kalınlığı	2 mm altı	12	40,0%	18	60,0%	0,486	13	43,3%	17	56,7%	0,907
	2 mm üstü	16	32,0%	34	68,0%		21	42,0%	29	58,0%	
Ülserasyon	Yok	19	38,0%	31	62,0%	0,468	19	38,0%	31	62,0%	0,293
	Var	9	30,0%	21	70,0%		15	50,0%	15	50,0%	
Büyüme fazı	Radyal	1	16,7%	5	83,3%	0,659	1	16,7%	5	83,3%	0,233
	Vertikal veya Radyal+vertikal	27	36,5%	47	63,5%		33	44,6%	41	55,4%	
Lenfositik İnfiltrasyon	Yok	5	23,8%	16	76,2%	0,211	8	38,1%	13	61,9%	0,634
	Var	23	39,0%	36	61,0%		26	44,1%	33	55,9%	
Evre Klinik	Evre 1-2	21	51,2%	20	48,8%	**0,002	21	51,2%	20	48,8%	0,106
	Evre 3-4	7	17,9%	32	82,1%		13	33,3%	26	66,7%	
Lenf nodu metastazı	Yok	22	34,4%	42	65,6%	0,815	26	40,6%	38	59,4%	0,497
	Var	6	37,5%	10	62,5%		8	50,0%	8	50,0%	
Nörotropizm	Yok	22	36,1%	39	63,9%	0,720	26	42,6%	35	57,4%	0,968
	Var	6	31,6%	13	68,4%		8	42,1%	11	57,9%	
Regresyon	Yok	22	33,8%	43	66,2%	0,652	26	40,0%	39	60,0%	0,346
	Var	6	40,0%	9	60,0%		8	53,3%	7	46,7%	

5. TARTIŞMA

Tümörlerde var olan karakteristik özellikler, proliferasyon sinyallerinde devamlılık, büyüme baskılayıcılarından kaçış ve hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlüğün kazanılması, anjiogenezin indüklenmesi, invazyon aktivasyonu ve metastaz olarak tanımlanmış olmakla beraber, bu özelliklere yakın zamanda enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün yıkımdan kaçış da eklenmiştir (180).



Şekil 15 Kanser karakteristk özellikleri

Malign melanom oldukça immünojenik bir tümör olmakla beraber, regresyonu, tedavisi ve prognostik değerlendirmesi bu özelliği ile doğrudan bağlantılıdır (249). Özellikle metastatik melanom olgularında 5 yıllık sağkalım düzeyleri %16 gibi korkutucu şekilde karşımıza çıkabilmektedir. Melanom olgularında mortalite, güncel olarak kullanılan dakarbazin veya karmustin gibi kemoterapötik ajanlara karşı ortaya koyduğu duyarsızlık sebebi ile gittikçe artış göstermektedir. “Konvansiyonel” kemoterapötik ajanlar ile karşılaşılın bu

sonuçlar, yüksek doz IL-2 tedavisi yada TCR temelli immünoterapiler gibi alternatif yaklaşımların ele alınmasını zorunlu kılmıştır. Bu amaçla, immün kontrol noktası blokajı için CTLA-4'e ve PD-1'e karşı antagonistik monoklonal antikorlar kullanıma sunulmuştur. Bu ajanların anti-tümör etkinlikleri, Faz I, II ve III alışmaları ile gösterilmiş olup, immünoterapi modalitelerinin hedef aldıkları temel moleküller olarak; CTLA-4 ve PDL-1 ne çıkmaktadır. İmmün cevabın oluşumunda, sinyal-2'nin inhibitör veya stimülatör etkilerinden faydalanılması adına yapılan çalışmalar her ne kadar çoğunlukla yukarıdaki iki molekül üzerinden yürütülse de, CD80/CD86-CD28 etkileşiminin de immünmodülasyon üzerindeki etkileri bilinmektedir.

Yapmış olduğumuz retrospektif klinik çalışmamızda, kutanöz malign melanom olgularında CD80, CD86 ve PDL-1 ekspresyonlarının tümör immün profilinin çıkarılması ile birlikte, tümör karakteristikleri, prognostik faktörler ve sağkalım üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda ele aldığımız hastalarda tümör boyutu ve Clark evresi ile CD80, CD86 ekspresyonları ve PDL-1 ekspresyon dereceleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Bununla beraber, Breslow kalınlığı 2 mm ve üstü olan hastalarda mortalitenin yüksek olması ve CD80, CD86 ekspresyonlarının anlamlı derecede düşük olmasından dolayı tümöre karşı verilen immün yanıtın radyal büyüme fazından ziyade vertikal büyüme fazını etkilediği düşünülmüştür. PDL-1'in güçlü veya zayıf şekilde boyanması ile Breslow kalınlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Hino ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, Breslow kalınlığının güçlü PDL-1 ekspresyonu gösteren olgularda, zayıf ekspresyon gösterenlere göre anlamlı derecede daha fazla olduğu bildirilmiştir (250). Aynı alışmada, PDL-1 ekspresyonunun, vertikal büyüme paterni, Clark Evresi ≥ 3 olma durumu ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olup, yaş, cinsiyet ve histolojik subtip ile ilişkisiz olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca Oba ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, PDL-1'in sadece pozitif veya negatif boyanması değerlendirilmiş ve pozitif PDL-1 boyanması gözlenen olgularda, Breslow kalınlığının anlamlı derecede daha yüksek olduğu bildirilmiştir (251). Massi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da, Breslow kalınlığının, sağkalım açısından bağımsız bir prognostik belirteç olduğu

belirtilmiştir (252). Mahoney ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada PDL-1 ekspresyonu ile vertikal büyüme paterninin anlamlı düzeyde ilişkili olduğu gösterilmiş olup, PDL-1 pozitif tümörlerin prognostik açıdan oldukça kötü oldukları belirtilmiştir (253). Ancak, Gadiot ve arkadaşlarının çalışmasında da, hem tek başına Breslow kalınlığının sağkalım ile ilişkisinin olmadığı, hem de Breslow kalınlığı ile PDL-1 ekspresyonu arasında bir bağlantı olmadığı rapor edilmiştir (254).

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada Abbas ve arkadaşları, renal hücreli kanserlerde PDL-1 ekspresyonunun prognostik önemini değerlendirmişler ve PDL-1 pozitifliği ile kadın cinsiyet, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve klinik evre arasında anlamlı ilişki olduğu ve PDL-1 ekspresyonunun sağkalımı olumsuz etkilediğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, bizim bulgularımızı destekler nitelikte, tümör çapı ile PDL-1 ekspresyonu arasındaki ilişki olmadığı belirtilmiştir (255).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, ülserasyon görülmesi ile tümörde PDL-1 boyanma skoru arasında bir ilişki görülmemiş olmasına rağmen, CD80 ve CD86 ekspresyonu olan hastalarda ülserasyonun anlamlı derecede daha az olduğu, ancak ülserasyon gözlenmeyen hastalarda mortalitenin anlamlı derecede daha düşük olduğu izlenmiştir. Hino ve arkadaşları, ülserasyon ile PDL-1 ekspresyonu arasında ilişki bulunmadığını, Massi ve arkadaşları ise, ülserasyonun sağ kalım için bir prognostik belirteç olmadığı bildirilmiştir (252).

Çalışmamızda lenfositik infiltrasyon ile mortalite arasında bir bağlantı görülmemiş olmakla beraber, CD80, CD86 ve PDL-1 ekspresyonları ile lenfositik infiltrasyon arasında da bir bağlantı olmadığını tespit ettik. Bizim bulgularımız ile uyumlu şekilde, Massi ve arkadaşlarının raporunda, lenfositik infiltrasyon ile PDL-1 ekspresyonu arasında bir ilişki bulunmadığı, ayrıca Gadiot ve arkadaşlarının raporlarında da lenfositik infiltrasyon ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını belirtilmiştir (252, 254).

PDL-1'in, melanom, over kanserleri, akciğer kanserleri, renal hücreli kanserler, ürotelyal kanserler, baş ve boyunun yassı hücreli karsinomlarında, özofagus kanserlerinde, servikal kanserlerde, meme kanserlerinde, pankreatik kanserlerde, mide kanserlerinde, Willms tümörlerinde ve glioblastomalarda

tümörde ve tümöre infiltre olan lenfositlerde ekspresyonu bilinmekle beraber (250, 256-269), membranöz ekspresyonu ile sağkalım arasındaki ilişkiye dair literatürde net bir görüş birliği bulunmamaktadır. Literatürde yer alan pek çok çalışmada, tümörde PDL-1 ekspresyonunun sağkalım ve kötü prognoz ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde ilişki içerisinde olduğu bildirilmiş olup (252, 255, 258, 266, 270-278), bunun tam tersini bildiren çalışmalar da mevcuttur (254, 261, 267, 279-281).

Literatürde yer alan raporlar, PDL-1'in boyanma var ya da yok durumuna istinaden kötü prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini belirtmekten ziyade, bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda kullandığımız boyanma skorları ile, tümör dokusunda PDL-1'in güçlü boyanmasının kötü prognozu ve düşük sağkalımı işaret ettiğini gösterdik. Ancak, lenfositte PDL-1'in zayıf veya güçlü boyanması arasında sağkalım açısından bir farklılık görülememiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak;

- Tümör dokusunda eksprese edilen PDL-1'in, malign melanom olgularında prognostik belirteç olarak kullanılması,
- Tümörde yüksek PDL-1 boyanma skoru görülmesi durumunda, kötü prognoz kriteri olarak ele alınması,
- Hastanın klinik yönetiminin ve immünoterapi endikasyonlarının belirlenmesinde bu kriterin de göz önünde bulundurulmasını önermekteyiz.

Literatürde CD80 ve CD86'nın parafin dokuda immünohistokimyasal olarak çalışıldığı, tümör immünitesi ve prognoz tayini açısından kullanımına dair sonuç belirten kısıtlı miktarda veri bulunmaktadır. CD80 ve CD86'nın çoğu kemirgen tümörlerinde tümöral ekspresyonunun olmadığına dair raporlar bulunurken (282), bazı insan tümör hücrelerinde yapılan moleküler, immünohistokimyasal ve flow sitometri çalışmaları ile tümör hücrelerinde CD80 ve CD86 varlığının gösterildiği raporlar da mevcuttur (283, 284). Martinez ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada, melanom olgularında periferik kanda dolaşan lenfositlerde CD80 ekspresyonunun arttığı ve bu artış paterni ile sağkalımın istatistiksel olarak anlamlı şekilde ilişkili olduğu rapor edilmiştir (285). Aynı çalışmada, Breslow kalınlığı ile periferik kanda dolaşan lenfositlerde

eksprese edilen CD80 arasında bir ilişki olmadığı da bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, nazofaringeal kanserlerde CD80 ve CD86 ekspresyonunun, sağkalımı arttırdığı bildirilmiştir (286).

Literatürde CD80, CD86, ve PDL-1'in renal hücreli kanser olgularında hem tümör hem de lenfositlerdeki ekspresyonunun değendirildiği bir çalışmada, tümör hücreleri ve lenfositler üzerindeki PDL-1 ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilirken, CD80 ve CD86 ekspresyonlarının prognoz ile açık bir korelasyonu gösterilememiştir (287). Bu raporları destekler nitelikte, melanom olgularındaki CD80 ve CD86 ekspresyonunun prognoz üzerinde herhangi bir etkinlik oluşturmadığını bildiren yayınlar da vardır (221, 288).

Yapmış olduğumuz çalışmada, hücre yüzeyinde CD80 ve CD86 ekspresyonu, Breslow kalınlığı 2mm'nin altında olan/tümör yüzeyinde ülserasyon gözlenmeyen/klinik evre I-II olan veya lenf nodu metastazı gözlenmeyen olgularda anlamlı şekilde pozitif bulundu. Ayrıca CD80 ve CD86 pozitifliğinin iyi prognoz göstergesi olduğu izlendi.

Tümörde regresyona yönelik yapılan değerlendirmede sadece CD80 pozitifliği ile regresyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki görülürken, CD86 pozitifliğinde bu ilişkinin gözlenememiş olmasının nedeni olarak çalışma grubunun yeteri kadar büyük olmaması düşünüldü.

Histolojik suptiplere yönelik yapılan analizde, CD80 ve CD86 ekspresyonlarının, yüzeyel yayılan ve lentigo maligna tiplerinde anlamlı derecede daha yüksek olması bu tümörlerin, daha selim karakteri ve iyi prognozları ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Çalışmamızın sağkalım analizlerinde, CD80 ve CD86 ekspresyonlarının ve yüksek boyanma skorlarının, iyi prognoz göstergesi olduğunu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bundan dolayı CD80 ve CD86'nın malign melanom prognoz tayininde iyi bir immünohistokimyasal belirteç olarak rutin kullanıma girebileceğini düşünmekteyiz. Ancak, malign melanomda, histolojik subtip, lenfositik infiltrasyon varlığı, büyüme fazı, mitotik indeks gibi diğer prognostik faktörler ile olan ilişkilerinin sağlıklı şekilde incelenebileceği daha büyük hasta popülasyonlarında çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

- Mortalite açısından cinsiyetler arasında anlamlı farklılık gözlenmedi
- CD80,CD86 boyanmaları ve PDL-1 boyanma skorlarında cinsiyet ve yaş açısından anlamlı farklılık görülmedi.
- Tümörojenik ve non-tümörojenik gruplar arasında CD80, CD86 boyanmaları, CD80 boyanma skoru, CD86 boyanma skoru ve PDL-1'in tümörde ve lenfositlerdeki boyanma skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.
- Yüzeyel yayılan tip ve lentigo maligna subtiplerinde, mortalitenin anlamlı derecede daha düşük, CD80, CD86 boyanma pozitiflikleri ve CD80 boyanma skorlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ancak CD86 boyanma skoru, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorları açısından histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.
- Tümör boyutu ile CD80,CD86 ekspresyonları ve CD80, CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorları ve mortalite arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.
- Clark Evresi I-II ve III-IV-V hastalar arasında CD80,CD86 ekspresyonları ve CD80, CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorları arasında anlamlı ilişki görülmedi.
- Breslow kalınlığı <2 mm olan hastalarda mortalite anlamlı şekilde daha düşük görüldü.
- Breslow kalınlığının <2mm olması ile CD80,CD86 ekspresyon ve boyanma skorlarının yüksek olması arasında anlamlı ilişki görüldü. Ancak tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorları ile Breslow kalınlığı arasında ilişki gözlenmedi.
- Tümörde ülserasyon görülmesinin mortalite ile ilişkili olduğu izlendi.
- Ülserasyon durumu ile, CD80 ve CD86 pozitif ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki varken, CD80,CD86 boyanma skorları, tümörde PDL-1 ve lenfositte PDL-1 boyanma skorları açısından anlamlı ilişki görülmedi.
- Büyüme fazları ile CD80 ve CD86 ekspresyonları, CD80, CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi.
- Tümörde lenfositik infiltrasyon varlığı ile mortalite arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

- Tümörde lenfositik infiltrasyon ile, CD80 ve CD86 ekspresyonları, CD80, CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi.
- Nörotropizm ile, CD80 ve CD86 ekspresyonları, CD80, CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi.
- Regresyon ile CD80 pozitif ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenirken, CD86 ekspresyonu, CD80, CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skoru arasında bir ilişki görülmedi.
- Lenf düğümü metastazı ile CD80 ve CD86 pozitif ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülürken, CD80,CD86 boyanma skorları, tümörde ve lenfositte PDL-1 boyanma skorları arasında bir bağlantı izlenmedi.
- Klinik evresi I-II olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla CD80 ve CD86 pozitif ekspresyonu varken, CD80, CD86 boyanma skorları ve tümörde PDL-1 boyanma skorlarının da anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi. Lenfositte PDL-1 boyanma skorları ile Klinik evre arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi.
- CD80 ve CD86 ekspresyonu pozitif olan hastalarda 5 yıllık sağkalımın anlamlı şekilde daha yüksek olduğu izlendi.
- CD80 boyanma skoru 5-6 düzeyinde olan hastalarda 5 yıllık sağkalımın anlamlı şekilde daha yüksek olduğu izlendi.
- CD86 boyanma skorları ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi.
- Tümörde PDL-1 boyanma skoru 5-6 düzeylerinde olan hastalarda sağkalımın anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi.
- Lenfositte PDL-1 boyanma skoru ile sağkalım arasında bir ilişki görülmedi.
- CD80 ve CD86'nın ikisinin de pozitif veya ikisinin de negatif olma durumunun anlamlı şekilde yüksek oranda olduğu izlendi.

7.ÖZET

Malign melanom hastalarında immünohistokimyasal olarak CD80, CD86 ve PDL-1 ekspresyonlarının klinikopatolojik değerlendirilmesi

Malign melanom melanositlerden gelişen ve yüksek immünojenite gösteren malign bir tümördür. Rezeke edilen melanom örneklerinde tümörü infiltre eden lenfositlerin varlığı ve spontan regresyon alanlarının gözlenmesi, melanomu immünoterapi için olası bir hedef haline getirmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, 2005-2015 yılları arasında malign melanom ön tanısı ile biyopsi örneği alınan veya cerrahi rezeksiyon yapılan hastalardan alınan spesimenlerin immünohistokimyasal değerlendirmesi neticesinde CD80, CD86 ve PD-L1 ekspresyon oranlarını belirlemeyi ve bu belirteçlerin evre ve sağkalım gibi klinik özellikler ile korelasyon ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 2005-2015 yılları arasında malign melanom ön tanısı ile punch biyopsi, operasyonel biyopsi veya rezeksiyon yapılan 80 hastanın parafin blokları immünohistokimyasal olarak CD80, CD86 ve PDL-1 boyanmaları açısından değerlendirildi.

CD80 pozitif olan hastalarda ve CD86 pozitif olan hastalarda 5 yıllık sağkalımın istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu izlendi. CD80 boyanma skoru yüksek olan hastalarda sağkalım anlamlı derecede daha yüksek görüldü. Ancak CD86 boyanma skoru ile sağkalım arasında anlamlı ilişki gözlenmedi. Tümörde PDL-1 boyanma skoru düşük olan hastalarda sağkalım anlamlı derecede daha yüksek olarak görülürken, lenfositlerdeki PDL-1 boyanma skoru ile sağkalım arasında ilişki gözlenmedi.

Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, tümörde PDL-1 boyanma skoru, CD80 pozitifliği, CD86 pozitifliği, CD80 boyanma skoru ve CD86 boyanma skorlarının prognostik belirteç olarak kabul edilmesini ve hastaların klinik yönetimlerinde bu kriterlerin de dikkate alınmasını önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: CD80, CD86, PDL-1, immunohistokimya, malign melanom, sağkalım

8. ABSTRACT

Clinicopathologic evaluation of CD80, CD86 and PDL-1 expressions with immunohistochemical methods in malignant melanoma patients.

Malignant melanoma is a highly immunogenic tumor that develops from melanocytes. The presence of tumor-infiltrating lymphocytes and the observation of spontaneously regressed areas in resected melanoma specimens have made melanoma a possible target for immunotherapy.

We aimed to determine the expression ratios of CD80, CD86 and PD-L1 as a result of immunohistochemical evaluation of specimens collected by biopsy or surgical resection between 2005 and 2015 and to investigate the correlation between these markers and clinical features such as stage and survival.

5 years survival rates was significantly higher in CD80 positive patients and CD86 positive patients. In patients with higher CD80 staining score, survival was significantly higher. However, there were no relationship between CD86 staining scores and survival. In patients with low tumoral PDL-1 staining scores, survival was significantly higher, whereas no correlation was found between lymphocytic PDL-1 staining scores and survival.

Based on our results, we suggest that tumoral PDL-1 staining scores, CD80 positivity, CD86 positivity, CD80 staining scores and CD86 staining scores in tumors should be considered as prognostic markers and that these criteria should be taken into consideration in the clinical management of patients.

Keywords: CD80, CD86, PDL-1, immunohistochemistry, malignant melanom, survival

9. KAYNAKÇA

1. Lever, W.F., D.E. Elder, Ovid Technologies Inc., *Lever's histopathology of the skin*. 2009, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
2. Sadler, T.W., J. Langman, Lippincott Williams & Wilkins., *Langman's medical embryology*. 2014, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 362-364.
3. *Skin cancer incidence statistics*. 2014 [cited 2017 April]; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/skin-cancer/incidence>.
4. Celik, İ., A. Senvinc, S. Buyukberber, U. Coskun, B. Yalcin, M. Mandel, ve ark. *Türkiye Melanom Yol Haritası*. 2012; Available from: <http://kanser.gov.tr/Dosya/Medya/Haberler/Melanomyolharitasi.pdf>.
5. Tucker, M.A., *Melanoma epidemiology*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 383-95, vii.
6. Lotze, M., D. Ramsey, J.M. Kirkwood, *Cutaneous Melanoma*, in *Cancer, principles and practice of oncology*, V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg, Editors. 2008, Lippincott Williams and Wilkins, London.
7. Liu, T. ve S.J. Soong, *Epidemiology of malignant melanoma*. Surg Clin North Am, 1996. **76**(6): p. 1205-22.
8. Weinstock, M.A., G.A. Colditz, W.C. Willett, M.J. Stampfer, B.R. Bronstein, M.C. Mihm, Jr., ve ark., *Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age*. Pediatrics, 1989. **84**(2): p. 199-204.
9. Moan, J., M. Grigalavicius, Z. Baturaite, A. Dahlback, ve A. Juzeniene, *The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2015. **31**(1): p. 26-35.
10. Elwood, J.M. ve J. Jopson, *Melanoma and sun exposure: an overview of published studies*. Int J Cancer, 1997. **73**(2): p. 198-203.
11. Vuong, K., K. McGeechan, B.K. Armstrong, A. Investigators, G.E.M. Investigators, ve A.E. Cust, *Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site*. Int J Cancer, 2014. **134**(11): p. 2735-41.
12. Kutting, B. ve H. Drexler, *UV-induced skin cancer at workplace and evidence-based prevention*. Int Arch Occup Environ Health, 2010. **83**(8): p. 843-54.
13. Dore, J.F. ve M.C. Chignol, *Tanning salons and skin cancer*. Photochem Photobiol Sci, 2012. **11**(1): p. 30-7.
14. Liu, L., W. Zhang, T. Gao, ve C. Li, *Is UV an etiological factor of acral melanoma?* J Expo Sci Environ Epidemiol, 2016. **26**(6): p. 539-545.
15. Agar, N. ve A.R. Young, *Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?* Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 121-32.

16. Ikehata, H.veT. Ono, *The mechanisms of UV mutagenesis*. J Radiat Res, 2011. **52**(2): p. 115-25.
17. Hodis, E., I.R. Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, ve ark., *A landscape of driver mutations in melanoma*. Cell, 2012. **150**(2): p. 251-63.
18. Pleasance, E.D., R.K. Cheetham, P.J. Stephens, D.J. McBride, S.J. Humphray, C.D. Greenman, ve ark., *A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 191-6.
19. Berger, M.F., E. Hodis, T.P. Heffernan, Y.L. Deribe, M.S. Lawrence, A. Protopopov, ve ark., *Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations*. Nature, 2012. **485**(7399): p. 502-6.
20. Soufir, N., M.F. Avril, A. Chompret, F. Demenais, J. Bombled, A. Spatz, ve ark., *Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(2): p. 209-16.
21. Aitken, J.F., A.C. Green, R. MacLennan, P. YoulveN.G. Martin, *The Queensland Familial Melanoma Project: study design and characteristics of participants*. Melanoma Res, 1996. **6**(2): p. 155-65.
22. Grange, F., A. Chompret, M. Guillaud-Bataille, J.C. Guillaume, A. Margulis, M. Prade, ve ark., *Comparison between familial and nonfamilial melanoma in France*. Arch Dermatol, 1995. **131**(10): p. 1154-9.
23. Greene, M.veJ. Fraumeni, *The hereditary variant of familial melanoma*, in *Human Malignant Melanoma*, W. Clark, L. Goldman, and M. Mastrangelo, Editors. 1979, Grune and Stratton: New York p. 139-166.
24. Mancebo, S.E., J.Y. HuveS.Q. Wang, *Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies*. Dermatol Clin, 2014. **32**(3): p. 427-38, x.
25. Argenziano, G., I. Zalaudek, G. Ferrara, R. Hofmann-WellenhofveH.P. Soyer, *Proposal of a new classification system for melanocytic naevi*. Br J Dermatol, 2007. **157**(2): p. 217-27.
26. Huang, J.M., I. ChikekaveT.J. Hornyak, *Melanocytic Nevi and the Genetic and Epigenetic Control of Oncogene-Induced Senescence*. Dermatol Clin, 2017. **35**(1): p. 85-93.
27. Price, H.N.veJ.V. Schaffer, *Congenital melanocytic nevi-when to worry and how to treat: Facts and controversies*. Clin Dermatol, 2010. **28**(3): p. 293-302.
28. Schaffer, J.V., *Update on melanocytic nevi in children*. Clin Dermatol, 2015. **33**(3): p. 368-86.
29. Robinson, J.K.veB.J. Nickoloff, *Digital epiluminescence microscopy monitoring of high-risk patients*. Arch Dermatol, 2004. **140**(1): p. 49-56.
30. Kittler, H., H. Pehamberger, K. WolffveM. Binder, *Follow-up of melanocytic skin lesions with digital epiluminescence microscopy: patterns of modifications observed in early melanoma, atypical nevi, and common nevi*. J Am Acad Dermatol, 2000. **43**(3): p. 467-76.
31. Haenssle, H.A., U. Krueger, C. Vente, K.M. Thoms, H.P. Bertsch, M. Zutt, ve ark., *Results from an observational trial: digital epiluminescence microscopy follow-up of atypical nevi increases the sensitivity and the*

- chance of success of conventional dermoscopy in detecting melanoma. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(5): p. 980-5.
32. Sagebiel, R.W., *Melanocytic nevi in histologic association with primary cutaneous melanoma of superficial spreading and nodular types: effect of tumor thickness*. *J Invest Dermatol*, 1993. **100**(3): p. 322S-325S.
 33. Bevona, C., W. Goggins, T. Quinn, J. Fullerton, H. Tsao, *Cutaneous melanomas associated with nevi*. *Arch Dermatol*, 2003. **139**(12): p. 1620-4; discussion 1624.
 34. Egan, C.L., S.A. Oliveria, R. Elenitsas, J. Hanson, A.C. Halpern, *Cutaneous melanoma risk and phenotypic changes in large congenital nevi: a follow-up study of 46 patients*. *J Am Acad Dermatol*, 1998. **39**(6): p. 923-32.
 35. Newton-Bishop, J.A., Y.M. Chang, M.M. Iles, J.C. Taylor, B. Bakker, M. Chan, et al., *Melanocytic nevi, nevus genes, and melanoma risk in a large case-control study in the United Kingdom*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(8): p. 2043-54.
 36. Tucker, M.A., A. Halpern, E.A. Holly, P. Hartge, D.E. Elder, R.W. Sagebiel, et al., *Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma*. *JAMA*, 1997. **277**(18): p. 1439-44.
 37. Batistatou, A., A. Zioga, J. Panelos, D. Massi, N.J. Agnantis, K. Charalabopoulos, *A new concept of melanocytic neoplasia pathogenesis based on the phenotype of common acquired nevi*. *Med Hypotheses*, 2007. **69**(6): p. 1334-9.
 38. Liu, Y., M.S. Sheikh, *Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management*. *Mol Cell Pharmacol*, 2014. **6**(3): p. 228.
 39. Balch, C.M., A.C. Buzaid, S.J. Soong, M.B. Atkins, N. Cascinelli, D.G. Coit, et al., *Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(16): p. 3635-48.
 40. Bhatia, S., S.S. Tykody, J.A. Thompson, *Treatment of metastatic melanoma: an overview*. *Oncology (Williston Park)*, 2009. **23**(6): p. 488-96.
 41. Flaherty, K.T., I. Puzanov, K.B. Kim, A. Ribas, G.A. McArthur, J.A. Sosman, et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(9): p. 809-19.
 42. Houben, R., J.C. Becker, A. Kappel, P. Terheyden, E.B. Brocker, R. Goetz, et al., *Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis*. *J Carcinog*, 2004. **3**(1): p. 6.
 43. Kumar, R., S. Angelini, K. Czene, I. Sauroja, M. Hahka-Kemppinen, S. Pyrhonen, et al., *BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(9): p. 3362-8.
 44. Solit, D., C.L. Sawyers, *Drug discovery: How melanomas bypass new therapy*. *Nature*, 2010. **468**(7326): p. 902-3.
 45. McCubrey, J.A., L.S. Steelman, S.L. Abrams, J.T. Lee, F. Chang, F.E. Bertrand, et al., *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance*. *Adv Enzyme Regul*, 2006. **46**: p. 249-79.

46. Chapman, P.B., A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, ve ark., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
47. Pollock, P.M., U.L. Harper, K.S. Hansen, L.M. Yudt, M. Stark, C.M. Robbins, ve ark., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 19-20.
48. Dong, J., R.G. Phelps, R. Qiao, S. Yao, O. Benard, Z. Ronai, ve ark., *BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 3883-5.
49. Brose, M.S., P. Volpe, M. Feldman, M. Kumar, I. Rishi, R. Gerrero, ve ark., *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6997-7000.
50. Davies, H., G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, ve ark., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
51. Woodman, S.E., A.J. Lazar, K.D. Aldape, M.A. Davies, *New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(5): p. 1195-200.
52. Davies, M.A., *The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma*. Cancer J, 2012. **18**(2): p. 142-7.
53. Kelleher, F.C. ve G.A. McArthur, *Targeting NRAS in melanoma*. Cancer J, 2012. **18**(2): p. 132-6.
54. Azvolinsky, A. *NRAS mutation in melanoma: A Challenging Target*. . 2013; Available from: <http://www.cancercommons.org/2013/07/17/targeting-nras-mutations-in-melanoma/>.
55. Poynter, J.N., J.T. Elder, D.R. Fullen, R.P. Nair, M.S. Soengas, T.M. Johnson, ve ark., *BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi*. Melanoma Res, 2006. **16**(4): p. 267-73.
56. Omholt, K., D. Krockel, U. Ringborg, ve J. Hansson, *Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma*. Melanoma Res, 2006. **16**(2): p. 197-200.
57. Curtin, J.A., M.S. Stark, D. Pinkel, N.K. Hayward, ve B.C. Bastian, *PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(7): p. 1660-3.
58. Fresno Vara, J.A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, ve M. Gonzalez-Baron, *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.
59. Krasilnikov, M., V. Adler, S.Y. Fuchs, Z. Dong, A. Haimovitz-Friedman, M. Herlyn, ve ark., *Contribution of phosphatidylinositol 3-kinase to radiation resistance in human melanoma cells*. Mol Carcinog, 1999. **24**(1): p. 64-9.
60. Stacey, S.N., A. Manolescu, P. Sulem, T. Rafnar, J. Gudmundsson, S.A. Gudjonsson, ve ark., *Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 865-9.
61. Hunter, D.J., P. Kraft, K.B. Jacobs, D.G. Cox, M. Yeager, S.E. Hankinson, ve ark., *A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2*

- associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet*, 2007. **39**(7): p. 870-4.
62. Eeles, R.A., Z. Kote-Jarai, G.G. Giles, A.A. Olama, M. Guy, S.K. Jugurnauth, ve ark., *Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility*. *Nat Genet*, 2008. **40**(3): p. 316-21.
 63. Easton, D.F., K.A. Pooley, A.M. Dunning, P.D. Pharoah, D. Thompson, D.G. Ballinger, ve ark., *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1087-93.
 64. Brown, K.M., S. Macgregor, G.W. Montgomery, D.W. Craig, Z.Z. Zhao, K. Iyadurai, ve ark., *Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility*. *Nat Genet*, 2008. **40**(7): p. 838-40.
 65. Whibley, C., P.D. Pharoah, M. Hollstein, *p53 polymorphisms: cancer implications*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(2): p. 95-107.
 66. Baker, S.J., E.R. Fearon, J.M. Nigro, S.R. Hamilton, A.C. Preisinger, J.M. Jessup, ve ark., *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. *Science*, 1989. **244**(4901): p. 217-21.
 67. Iggo, R., K. Gatter, J. Bartek, D. Lane, A.L. Harris, *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer*. *Lancet*, 1990. **335**(8691): p. 675-9.
 68. Prosser, J., A.M. Thompson, G. Cranston, H.J. Evans, *Evidence that p53 behaves as a tumour suppressor gene in sporadic breast tumours*. *Oncogene*, 1990. **5**(10): p. 1573-9.
 69. Nigro, J.M., S.J. Baker, A.C. Preisinger, J.M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, ve ark., *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. *Nature*, 1989. **342**(6250): p. 705-8.
 70. Stretch, J.R., K.C. Gatter, E. Ralfkiaer, D.P. Lane, A.L. Harris, *Expression of mutant p53 in melanoma*. *Cancer Res*, 1991. **51**(21): p. 5976-9.
 71. Smalley, K.S., R. Contractor, N.K. Haass, A.N. Kulp, G.E. Atilla-Gokcumen, D.S. Williams, ve ark., *An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 209-17.
 72. Albino, A.P., M.J. Vidal, N.S. McNutt, C.R. Shea, V.G. Prieto, D.M. Nanus, ve ark., *Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma*. *Melanoma Res*, 1994. **4**(1): p. 35-45.
 73. Tucker, M.A., S.J. Bale, *Clinical aspects of familial cutaneous malignant melanoma*. *Semin Oncol*, 1988. **15**(6): p. 524-8.
 74. FitzGerald, M.G., D.P. Harkin, S. Silva-Arrieta, D.J. MacDonald, L.C. Lucchina, H. Unsal, ve ark., *Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8541-5.
 75. Cannon-Albright, L.A., L.J. Meyer, D.E. Goldgar, C.M. Lewis, W.P. McWhorter, M. Jost, ve ark., *Penetrance and expressivity of the chromosome 9p melanoma susceptibility locus (MLM)*. *Cancer Res*, 1994. **54**(23): p. 6041-4.
 76. Liu, L., D. Dilworth, L. Gao, J. Monzon, A. Summers, N. Lassam, ve ark., *Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma*. *Nat Genet*, 1999. **21**(1): p. 128-32.

77. Hall, M.veG. Peters, *Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer*. Adv Cancer Res, 1996. **68**: p. 67-108.
78. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
79. Strauss, M., J. LukasveJ. Bartek, *Unrestricted cell cycling and cancer*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1245-6.
80. Sherr, C.J.veJ.M. Roberts, *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases*. Genes Dev, 1995. **9**(10): p. 1149-63.
81. Kamb, A., *Cell-cycle regulators and cancer*. Trends Genet, 1995. **11**(4): p. 136-40.
82. Bartkova, J., J. Lukas, P. Guldberg, J. Alsner, A.F. Kirkin, J. Zeuthen, ve ark., *The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5475-83.
83. Liu, L., N.J. Lassam, J.M. Slingerland, D. Bailey, D. Cole, R. Jenkins, ve ark., *Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma*. Oncogene, 1995. **11**(2): p. 405-12.
84. Walker, G.J., C.J. Hussussian, J.F. Flores, J.M. Glendening, F.G. Haluska, N.C. Dracopoli, ve ark., *Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in Australian melanoma kindreds*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(10): p. 1845-52.
85. Holland, E.A., S.C. Beaton, T.M. Becker, O.M. Grulet, B.A. Peters, H. Rizos, ve ark., *Analysis of the p16 gene, CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds*. Oncogene, 1995. **11**(11): p. 2289-94.
86. Gruis, N.A., L.A. Sandkuijl, P.A. van der Velden, W. BergmanveR.R. Frants, *CDKN2 explains part of the clinical phenotype in Dutch familial atypical multiple-mole melanoma (FAMMM) syndrome families*. Melanoma Res, 1995. **5**(3): p. 169-77.
87. Kamb, A., D. Shattuck-Eidens, R. Eeles, Q. Liu, N.A. Gruis, W. Ding, ve ark., *Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 23-6.
88. Hussussian, C.J., J.P. Struewing, A.M. Goldstein, P.A. Higgins, D.S. Ally, M.D. Sheahan, ve ark., *Germline p16 mutations in familial melanoma*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 15-21.
89. Hayward, N.K., *The current situation with regard to human melanoma and genetic inferences*. Curr Opin Oncol, 1996. **8**(2): p. 136-42.
90. Hogg, D., H. Brill, L. Liu, J. Monzon, A. Summers, L. From, ve ark., *Role of the cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN2A in familial melanoma*. J Cutan Med Surg, 1998. **2**(3): p. 172-9.
91. Goldstein, A.M., J.P. Struewing, A. Chidambaram, M.C. FraserveM.A. Tucker, *Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(12): p. 1006-10.
92. Markovic, S.N., L.A. Erickson, R.D. Rao, R.H. Weenig, B.A. Pockaj, A. Bardia, ve ark., *Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(3): p. 364-80.

93. Bradford, P.T., A.M. Goldstein, M.L. McMasterveM.A. Tucker, *Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005*. Arch Dermatol, 2009. **145**(4): p. 427-34.
94. Beadling, C., E. Jacobson-Dunlop, F.S. Hodi, C. Le, A. Warrick, J. Patterson, ve ark., *KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6821-8.
95. Rivera, R.S., H. Nagatsuka, M. Gunduz, B. Cengiz, E. Gunduz, C.H. Siar, ve ark., *C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma*. Virchows Arch, 2008. **452**(1): p. 27-32.
96. Lin, S.C., C.L. Liu, T.I. Wang, W.S. Chang, C.Y. TzenveM.J. Huang, *Clinical implications of C-kit gene mutation in patients with large gastrointestinal stromal tumors*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(10): p. 1604-8.
97. Curtin, J.A., K. Busam, D. PinkelveB.C. Bastian, *Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(26): p. 4340-6.
98. Landi, M.T., J. Bauer, R.M. Pfeiffer, D.E. Elder, B. Hulley, P. Minghetti, ve ark., *MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma*. Science, 2006. **313**(5786): p. 521-2.
99. Reed, R.J., *New concepts in surgical pathology of the skin*. Wiley series in surgical pathology. 1976, New York: Wiley. viii, 159 p.
100. Thody, A.J., E.M. Higgins, K. Wakamatsu, S. Ito, S.A. BurchillveJ.M. Marks, *Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(2): p. 340-4.
101. Scott, M.C., K. Wakamatsu, S. Ito, A.L. Kadekaro, N. Kobayashi, J. Groden, ve ark., *Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 11): p. 2349-55.
102. Meyskens, F.L., Jr., P. FarmerveJ.P. Fruehauf, *Redox regulation in human melanocytes and melanoma*. Pigment Cell Res, 2001. **14**(3): p. 148-54.
103. Riley, P.A., *Melanin*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(11): p. 1235-9.
104. Menon, I.A., S. Persad, N.S. RanadiveveH.F. Haberman, *Effects of ultraviolet-visible irradiation in the presence of melanin isolated from human black or red hair upon Ehrlich ascites carcinoma cells*. Cancer Res, 1983. **43**(7): p. 3165-9.
105. Hacker, E.veN.K. Hayward, *Germline MC1R variants and BRAF mutant melanoma*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(10): p. 2354-6.
106. Duffy, D.L., N.F. Box, W. Chen, J.S. Palmer, G.W. Montgomery, M.R. James, ve ark., *Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(4): p. 447-61.
107. Naysmith, L., K. Waterston, T. Ha, N. Flanagan, Y. Bisset, A. Ray, ve ark., *Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(2): p. 423-8.
108. Hsu, M.Y., F.E. Meier, M. Nesbit, J.Y. Hsu, P. Van Belle, D.E. Elder, ve ark., *E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1515-25.

109. Yokota, J., *Tumor progression and metastasis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 497-503.
110. Hao, L., J.R. Ha, P. Kuzel, E. GarciaveS. Persad, *Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail*. Br J Dermatol, 2012. **166**(6): p. 1184-97.
111. Li, G., K. SatyamoorthyveM. Herlyn, *N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3819-25.
112. Hendrix, M.J., E.A. Seftor, P.S. Meltzer, L.M. Gardner, A.R. Hess, D.A. Kirschmann, ve ark., *Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 8018-23.
113. McGovern, V.J., A.J. Cochran, E.P. Van der Esch, J.H. LittleveR. MacLennan, *The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification*. Pathology, 1986. **18**(1): p. 12-21.
114. Clark, W.H., Jr., L. From, E.A. BernardinoveM.C. Mihm, *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res, 1969. **29**(3): p. 705-27.
115. Jelfs, P.L., G. Giles, D. Shugg, M. Coates, G. Durling, P. Fitzgerald, ve ark., *Cutaneous malignant melanoma in Australia*, 1989. Med J Aust, 1994. **161**(3): p. 182-7.
116. Langley, R., F. Sober, C. Balch, A. HoughtonveA. Sober, *Clinical characteristics in Cutaneous Melanoma*. 1998: AJ Quality Medical Publishing.
117. Price, N.M., A.M. RywlinveA.B. Ackerman, *Histologic criteria for the diagnosis of superficial spreading malignant melanoma: formulated on the basis of proven metastatic lesions*. Cancer, 1976. **38**(6): p. 2434-41.
118. Liu, V.veM.C. Mihm, *Pathology of malignant melanoma*. Surg Clin North Am, 2003. **83**(1): p. 31-60, v.
119. Clark, W.H., Jr., D.E. ElderveM. Van Horn, *The biologic forms of malignant melanoma*. Hum Pathol, 1986. **17**(5): p. 443-50.
120. Weinstock, M.A.veA.J. Sober, *The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma*. . Br J Dermatol., 1987. **116**(3): p. 303-10.
121. Tannous, Z.S., L.H. Lerner, L.M. Duncan, M.C. Mihm, Jr.veT.J. Flotte, *Progression to invasive melanoma from malignant melanoma in situ, lentigo maligna type*. Hum Pathol, 2000. **31**(6): p. 705-8.
122. Cohen, L., *Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma*. J Am Acad Dermatol, 1995. **33**(6): p. 923-36.
123. Arrangoiz, R., J. Dorantes, F. Cordera, M.M. Juarez, M.E. PaquentinveE.F. Leon, *Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging*. Journal of Cancer Treatment and Research, 2016. **4**(1): p. 1-15.
124. Plotnick, H., N. RachmaninoffveH. Vandenberg, Jr, *Polypoid melanoma: a virulent variant of nodular melanoma. Report of three cases and literature review*. J Am Acad Dermatol, 1990. **23**(5): p. 880-4.

125. W.P., C., *Acral lentiginous melanoma*. Arch Dermatol, 1980. **116**(7): p. 773-6.
126. Cheng, L., *Desmoplastic Melanoma, Advances in Malignant Melanoma - Clinical and Research Perspectives*. 2011.
127. Breslow, A., *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*. Ann Surg, 1970. **172**(5): p. 902-8.
128. Gachon, J., P. Beaulieu, J.F. Sei, J. Gouvernet, J.P. Claudel, M. Lemaitre, ve ark., *First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice*. Arch Dermatol, 2005. **141**(4): p. 434-8.
129. Martorano, L.M., R.R. Winkelman, C.M. Cebulla, M.H. Abdel-RahmanveS.M. Campbell, *Ocular melanoma and the BAP1 hereditary cancer syndrome: implications for the dermatologist*. Int J Dermatol, 2014. **53**(6): p. 657-63.
130. Said, S., H. Alkhateeb, C.J. Cooper, J.M. Galvis, H. Fang, G.T. Hernandez, ve ark., *Primary central nervous system amelanotic melanoma in a Hispanic male: Case report*. Pol J Radiol, 2014. **79**: p. 199-202.
131. Schoneveld, M., *Intussusception of the small intestine caused by a primary melanoma? Case Rep Gastroenterol.*, 2012. **6**(1): p. 15-9.
132. Khalid, U., T. Saleem, A.M. ImamveM.R. Khan, *Pathogenesis, diagnosis and management of primary melanoma of the colon*. World J Surg Oncol, 2011. **9**: p. 14.
133. MF., H., *Primary malignant melanoma of the gallbladder: a case report and review of the literature*. Case Rep Surg., 2012. **6**: p. 35-47.
134. Grin, C.M., A.W. Kopf, B. Welkovich, R.S. BartveM.J. Levenstein, *Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma*. Arch Dermatol, 1990. **126**(6): p. 763-6.
135. Abbasi, N.R., H.M. Shaw, D.S. Rigel, R.J. Friedman, W.H. McCarthy, I. Osman, ve ark., *Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria*. JAMA, 2004. **292**(22): p. 2771-6.
136. MacKie, R.M., J. English, T.C. Aitchison, C.P. FitzsimonsveP. Wilson, *The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic naevi) in a healthy British population*. Br J Dermatol, 1985. **113**(2): p. 167-74.
137. NICE- *Suspected cancer: recognition and referral*. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng12>.
138. Grob, J.J.veJ.J. Bonerandi, *The 'ugly duckling' sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening*. Arch Dermatol, 1998. **134**(1): p. 103-4.
139. Vestergaard, M.E., P. Macaskill, P.E. HoltveS.W. Menzies, *Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting*. Br J Dermatol, 2008. **159**(3): p. 669-76.
140. *National Comprehensive Cancer Network- Melanoma*. NCCN Guidelines.
141. Bichakjian, C.K., A.C. Halpern, T.M. Johnson, A. Foote Hood, J.M. Grichnik, S.M. Swetter, ve ark., *Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma*. American Academy of Dermatology. J Am Acad Dermatol, 2011. **65**(5): p. 1032-47.

142. Zettersten, E., L. Shaikh, R. RamirezveM. Kashani-Sabet, *Prognostic factors in primary cutaneous melanoma*. Surg Clin North Am, 2003. **83**(1): p. 61-75.
143. Mihm, M.C., Jr., C. ClementeveN. Cascinelli, *Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response*. Lab Invest., 1996. **74**(1): p. 43-7.
144. Koopal, S.A., A.T. Tiebosch, D. Albertus Piers, J.T. Plukker, H. Schraffordt KoopsveH.J. Hoekstra, *Frozen section analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients*. Cancer, 2000. **89**(8): p. 1720-5.
145. Stojadinovic, A., P.J. Allen, B.M. Clary, K.J. BusamveD.G. Coit, *Value of frozen-section analysis of sentinel lymph nodes for primary cutaneous malignant melanoma*. Ann Surg, 2002. **235**(1): p. 92-8.
146. Slater, D., *Standards and Datasets for Reporting Cancers Dataset for Histological Reporting of Primary Cutaneous Malignant Melanoma and Regional Lymph Nodes*,. 2014, London: Carlton House Terrace.
147. Scolyer, R.A., R. Murali, S.W. McCarthyveJ.F. Thompson, *Pathologic examination of sentinel lymph nodes from melanoma patients*. Semin Diagn Pathol, 2008. **25**(2): p. 100-11.
148. Tanis, P.J., R.P. Boom, H.S. Koops, I.F. Faneyte, J.L. Peterse, O.E. Nieweg, ve ark., *Frozen section investigation of the sentinel node in malignant melanoma and breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2001. **8**(3): p. 222-6.
149. Institute, N.C. *Dacarbazine*; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/dacarbazine>.
150. Bajetta, E., M. Del Vecchio, C. Bernard-Marty, M. Vitali, R. Buzzoni, O. Rixe, ve ark., *Metastatic melanoma: chemotherapy*. Semin Oncol, 2002. **29**(5): p. 427-45.
151. Tsang, L.L., C.P. Quarterman, A. GescherveJ.A. Slack, *Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide*. Cancer Chemother Pharmacol, 1991. **27**(5): p. 342-6.
152. Sanada, M., Y. Takagi, R. ItoveM. Sekiguchi, *Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(4): p. 413-20.
153. Gogas, H., D. BafaloukosveA.Y. Bedikian, *The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma*. Melanoma Res, 2004. **14**(5): p. 415-20.
154. Bajetta, E., M. Del Vecchio, P. Nova, A. Fusi, A. Daponte, M.R. Sertoli, ve ark., *Multicenter phase III randomized trial of polychemotherapy (CVD regimen) versus the same chemotherapy (CT) plus subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha2b in metastatic melanoma*. Ann Oncol, 2006. **17**(4): p. 571-7.
155. Parmiani, G., C. Castelli, L. Rivoltini, C. Casati, G.A. Tully, L. Novellino, ve ark., *Immunotherapy of melanoma*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(6): p. 391-400.
156. *National Cancer Institute-Drugs Approved for Melanoma*. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/melanoma>.

157. Mule, J.J., S. Shu, S.L. SchwarzveS.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2*. Science, 1984. **225**(4669): p. 1487-9.
158. Schwartz, R.N., L. StoverveJ. Dutcher, *Managing toxicities of high-dose interleukin-2*. Oncology (Williston Park), 2002. **16**(11 Suppl 13): p. 11-20.
159. American Cancer Society-Immunotherapy for melanoma skin cancer. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/immunotherapy.html>.
160. Tompkins, W.A., *Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(8): p. 817-28.
161. Zelboraf (vemurafenib) Phase II trial Design. Zelboraf.; Available from: <http://www.zelboraf.com/oncology/treatment/phase-ii-trial-design/>.
162. Sosman, J.A., K.B. Kim, L. Schuchter, R. Gonzalez, A.C. Pavlick, J.S. Weber, ve ark., *Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib*. N Engl J Med, 2012. **366**(8): p. 707-14.
163. Hauschild, A., J.J. Grob, L.V. Demidov, T. Jouary, R. Gutzmer, M. Millward, ve ark., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.
164. Pazdur, R. National Cancer Institute; FDA Approval for Dabrafenib.; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-dabrafenib>.
165. Robert, C., B. Karaszewska, J. Schachter, P. Rutkowski, A. Mackiewicz, D. Stroiakovski, ve ark., *Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib*. N Engl J Med, 2015. **372**(1): p. 30-9.
166. Larkin, J., P.A. Ascierto, B. Dreno, V. Atkinson, G. Liskay, M. Maio, ve ark., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1867-76.
167. Peggs, K.S., S.A. Quezada, A.J. KormanveJ.P. Allison, *Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(2): p. 206-13.
168. O'Day, S.J., O. HamidveW.J. Urba, *Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies*. Cancer, 2007. **110**(12): p. 2614-27.
169. Melero, I., S. Hervas-Stubbs, M. Glennie, D.M. PardollveL. Chen, *Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 95-106.
170. O'Day, S.J., M. Maio, V. Chiarion-Sileni, T.F. Gajewski, H. Pehamberger, I.N. Bondarenko, ve ark., *Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study*. Ann Oncol, 2010. **21**(8): p. 1712-7.
171. Alegre, M.L., K.A. FrauwirthveC.B. Thompson, *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 220-8.
172. Rudd, C.E., A. TaylorveH. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
173. Greenwald, R.J., G.J. FreemanveA.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.

174. Chikuma, S.veJ.A. Bluestone, *CTLA-4 and tolerance: the biochemical point of view*. Immunol Res, 2003. **28**(3): p. 241-53.
175. Wolchok, J.D., B. Neyns, G. Linette, S. Negrier, J. Lutzky, L. Thomas, ve ark., *Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 155-64.
176. *Pembrolizumab*. National Cancer Institute. Available from: www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789.
177. *FDA; FDA approves Keytruda for advanced melanoma.*; Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm412802.htm>.
178. *FDA; FDA approves Opdivo for advanced melanoma.* . Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm427716.htm>.
179. *Nivolumab*. National Cancer Institute. Available from: <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=539733>.
180. Hanahan, D.veR.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
181. Chen, D.S.veI. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
182. Curtsinger, J.M., C.M. JohnsonveM.F. Mescher, *CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5165-71.
183. Curtsinger, J.M., D.C. LinsveM.F. Mescher, *Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1141-51.
184. Arasanz, H., M. Gato-Canas, M. Zuazo, M. Ibanez-Vea, K. Breckpot, G. Kochan, ve ark., *PD1 signal transduction pathways in T cells*. Oncotarget, 2017.
185. Chan, A.C., M. Iwashima, C.W. TurckveA. Weiss, *ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain*. Cell, 1992. **71**(4): p. 649-62.
186. Sieh, M., A. Batzer, J. SchlessingerveA. Weiss, *GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4435-42.
187. Salvador, J.M., P.R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T.D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, ve ark., *Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 390-5.
188. Round, J.L., L.A. Humphries, T. Tomassian, P. Mittelstadt, M. ZhangveM.C. Miceli, *Scaffold protein Dlg1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 154-61.
189. Boise, L.H., A.J. Minn, P.J. Noel, C.H. June, M.A. Accavitti, T. Lindsten, ve ark., *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 87-98.

190. Slansky, J.E., F.M. Rattis, L.F. Boyd, T. Fahmy, E.M. Jaffee, J.P. Schneck, ve ark., *Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 529-38.
191. Teft, W.A., M.G. KirchhofveJ. Madrenas, *A molecular perspective of CTLA-4 function*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 65-97.
192. Yu, C., A.F. Sonnen, R. George, B.H. Dessailly, L.J. Stagg, E.J. Evans, ve ark., *Rigid-body ligand recognition drives cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) receptor triggering*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6685-96.
193. Stamper, C.C., Y. Zhang, J.F. Tobin, D.V. Erbe, S. Ikemizu, S.J. Davis, ve ark., *Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 608-11.
194. Darlington, P.J., M.G. Kirchhof, G. Criado, J. SondhiveJ. Madrenas, *Hierarchical regulation of CTLA-4 dimer-based lattice formation and its biological relevance for T cell inactivation*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 996-1004.
195. Chambers, C.A.veJ.P. Allison, *Costimulatory regulation of T cell function*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 203-10.
196. Read, S., R. Greenwald, A. Izcue, N. Robinson, D. Mandelbrot, L. Francisco, ve ark., *Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4376-83.
197. Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, ve ark., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
198. Mellor, A.L.veD.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
199. Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. BluestoneveA.H. Sharpe, *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 541-7.
200. Pauken, K.E.veE.J. Wherry, *Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 265-76.
201. Topalian, S.L., C.G. DrakeveD.M. Pardoll, *Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 207-12.
202. Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, ve ark., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000(192): p. 1027-1034.
203. Latchman, Y., C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, ve ark., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol 2001. **2**: p. 261-68.
204. Curiel, T.J., S. Wei, H. Dong, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, ve ark., *Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity*. Nat Med, 2003. **9**: p. 562-567.

205. Daley, D., C.P. Zambirinis, L. Seifert, N. Akkad, N. Mohan, G. Werba, ve ark., *gammadelta T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining alphabeta T Cell Activation*. *Cell*, 2016. **166**(6): p. 1485-1499 e15.
206. Iraolagoitia, X.L., R.G. Spallanzani, N.I. Torres, R.E. Araya, A. Ziblat, C.I. Domaica, ve ark., *NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells*. *J Immunol*, 2016. **197**(3): p. 953-61.
207. Liang, S.C., R.J. Greenwald, Y.E. Latchman, L. Rosas, A. Satoskar, G.J. Freeman, ve ark., *PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**: p. 58-64.
208. Karunarathne, D.S., J.M. Horne-Debets, J.X. Huang, R. Faleiro, C.Y. Leow, F. Amante, ve ark., *Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4(+) T Cell Immunity*. *Immunity*, 2016. **45**(2): p. 333-45.
209. Chemnitz, J.M., R.V. Parry, K.E. Nichols, C.H. JuneveJ.L. Riley, *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 945-54.
210. Patsoukis, N., J. Brown, V. Petkova, F. Liu, L. LiveV.A. Boussiotis, *Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation*. *Sci Signal*, 2012. **5**(230): p. ra46.
211. Quigley, M., F. Pereyra, B. Nilsson, F. Porichis, C. Fonseca, Q. Eichbaum, ve ark., *Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF*. *Nat Med*, 2010. **16**(10): p. 1147-51.
212. Li, J., H.B. Jie, Y. Lei, N. Gildener-Leapman, S. Trivedi, T. Green, ve ark., *PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 2015. **75**: p. 508-518.
213. Scharping, N.E., A.V. Menk, R.S. Moreci, R.D. Whetstone, R.E. Dadey, S.C. Watkins, ve ark., *The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction*. *Immunity*, 2016. **45**(2): p. 374-88.
214. Patsoukis, N., K. Bardhan, P. Chatterjee, D. Sari, B. Liu, L.N. Bell, ve ark., *PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6692.
215. Bengsch, B., A.L. Johnson, M. Kurachi, P.M. Odorizzi, K.E. Pauken, J. Attanasio, ve ark., *Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion*. *Immunity*, 2016. **45**(2): p. 358-73.
216. Wherry, E.J.veM. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(8): p. 486-99.
217. Wang, L., K. Pino-Lagos, V.C. de Vries, I. Guleria, M.H. SayeghveR.J. Noelle, *Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of*

- adaptive Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9331-6.
218. Francisco, L.M., V.H. Salinas, K.E. Brown, V.K. Vanguri, G.J. Freeman, V.K. Kuchroo, ve ark., *PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3015-29.
 219. Aruffo, A.veB. Seed, *Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8573-7.
 220. Gross, J.A., T. St JohnveJ.P. Allison, *The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression*. J Immunol, 1990. **144**(8): p. 3201-10.
 221. Hersey, P., Z. Si, M.J. SmithveW.D. Thomas, *Expression of the co-stimulatory molecule B7 on melanoma cells*. Int J Cancer, 1994. **58**(4): p. 527-32.
 222. Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. LedbetterveR. Peach, *Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors*. Immunity, 1994. **1**(9): p. 793-801.
 223. Freeman, G.J., J.G. Gribben, V.A. Boussiotis, J.W. Ng, V.A. Restivo, Jr., L.A. Lombard, ve ark., *Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation*. Science, 1993. **262**(5135): p. 909-11.
 224. Boomer, J.S.veJ.M. Green, *An enigmatic tail of CD28 signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(8): p. a002436.
 225. Manickasingham, S.P., S.M. Anderton, C. BurkhartveD.C. Wraith, *Qualitative and quantitative effects of CD28/B7-mediated costimulation on naive T cells in vitro*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3827-35.
 226. Acuto, O.veF. Michel, *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 939-51.
 227. Riley, J.L., M. Mao, S. Kobayashi, M. Biery, J. Burchard, G. Cavet, ve ark., *Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11790-5.
 228. Raab, M., S. PfisterveC.E. Rudd, *CD28 signaling via VAV/SLP-76 adaptors: regulation of cytokine transcription independent of TCR ligation*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 921-33.
 229. Marinari, B., A. Costanzo, V. Marzano, E. PiccolellaveL. Tuosto, *CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6098-103.
 230. Diehn, M., A.A. Alizadeh, O.J. Rando, C.L. Liu, K. Stankunas, D. Botstein, ve ark., *Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11796-801.
 231. Camperio, C., M. Muscolini, E. Volpe, D. Di Mitri, R. Mechelli, M.C. Buscarinu, ve ark., *CD28 ligation in the absence of TCR stimulation up-regulates IL-17A and pro-inflammatory cytokines in relapsing-remitting*

- multiple sclerosis T lymphocytes. *Immunol Lett*, 2014. **158**(1-2): p. 134-42.
232. Coyle, A.J.veJ.C. Gutierrez-Ramos, *The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(3): p. 203-9.
 233. Sharpe, A.H.veG.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(2): p. 116-26.
 234. van der Merwe, P.A.veS.J. Davis, *Molecular interactions mediating T cell antigen recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 659-84.
 235. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, ve ark., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
 236. Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, ve ark., *Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(7): p. 3348-52.
 237. Paust, S., L. Lu, N. McCartyveH. Cantor, *Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(28): p. 10398-403.
 238. Taylor, P.A., C.J. Lees, S. Fournier, J.P. Allison, A.H. SharpeveB.R. Blazar, *B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]*. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 34-9.
 239. Reiser, J., G. von Gersdorff, M. Loos, J. Oh, K. Asanuma, L. Giardino, ve ark., *Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1390-7.
 240. Short, J.J., A.V. Pereboev, Y. Kawakami, C. Vasu, M.J. HoltermanveD.T. Curiel, *Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors*. *Virology*, 2004. **322**(2): p. 349-59.
 241. Vijayakrishnan, L., J.M. Slavik, Z. Illes, R.J. Greenwald, D. Rainbow, B. Greve, ve ark., *An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells*. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 563-75.
 242. Li, Y., P. McGowan, I. Hellstrom, K.E. HellstromveL. Chen, *Costimulation of tumor-reactive CD4+ and CD8+ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28, can be used to treat established mouse melanoma*. *J Immunol*, 1994. **153**(1): p. 421-8.
 243. Ramarathinam, L., M. Castle, Y. WuveY. Liu, *T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1205-14.
 244. Baskar, S., S. Ostrand-Rosenberg, N. Nabavi, L.M. Nadler, G.J. FreemanveL.H. Glimcher, *Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(12): p. 5687-90.
 245. Townsend, S.E.veJ.P. Allison, *Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells*. *Science*, 1993. **259**(5093): p. 368-70.

246. Chen, L., P.S. LinsleyveK.E. Hellstrom, *Costimulation of T cells for tumor immunity*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 483-6.
247. Chen, L., S. Ashe, W.A. Brady, I. Hellstrom, K.E. Hellstrom, J.A. Ledbetter, ve ark., *Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1093-102.
248. Yang, G., K.E. Hellstrom, I. HellstromveL. Chen, *Antitumor immunity elicited by tumor cells transfected with B7-2, a second ligand for CD28/CTLA-4 costimulatory molecules*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2794-800.
249. Ladanyi, A., *[Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in melanoma]*. Magy Onkol, 2013. **57**(2): p. 85-95.
250. Hino, R., K. Kabashima, Y. Kato, H. Yagi, M. Nakamura, T. Honjo, ve ark., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. Cancer, 2010. **116**(7): p. 1757-66.
251. Oba, J., T. Nakahara, T. Abe, A. Hagihara, Y. MoroiveM. Furue, *Expression of programmed death receptor ligand 1 in melanoma may indicate tumor progression and poor patient survival*. J Am Acad Dermatol, 2014. **70**(5): p. 954-6.
252. Massi, D., D. Brusa, B. Merelli, M. Ciano, V. Audrito, S. Serra, ve ark., *PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics*. Ann Oncol, 2014. **25**(12): p. 2433-42.
253. Mahoney, K.M., G.J. FreemanveD.F. McDermott, *The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma*. Clin Ther, 2015. **37**(4): p. 764-82.
254. Gadiot, J., A.I. Hooijkaas, A.D. Kaiser, H. van Tinteren, H. van BovenveC. Blank, *Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma*. Cancer, 2011. **117**(10): p. 2192-201.
255. Abbas, M., S. Steffens, M. Bellut, H. Eggers, A. Grosshennig, J.U. Becker, ve ark., *Intratumoral expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)*. Med Oncol, 2016. **33**(7): p. 80.
256. Wintterle, S., B. Schreiner, M. Mitsdoerffer, D. Schneider, L. Chen, R. Meyermann, ve ark., *Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7462-7.
257. Routh, J.C., R.A. Ashley, T.J. Sebo, C.M. Lohse, D.A. Husmann, S.A. Kramer, ve ark., *B7-H1 expression in Wilms tumor: correlation with tumor biology and disease recurrence*. J Urol, 2008. **179**(5): p. 1954-9; discussion 1959-60.
258. Wu, C., Y. Zhu, J. Jiang, J. Zhao, X.G. ZhangveN. Xu, *Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance*. Acta Histochem, 2006. **108**(1): p. 19-24.
259. Nomi, T., M. Sho, T. Akahori, K. Hamada, A. Kubo, H. Kanehiro, ve ark., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1*

- ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
260. Ghebeh, H., S. Mohammed, A. Al-Omair, A. Qattan, C. Lehe, G. Al-Qudaihi, ve ark., *The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors*. Neoplasia, 2006. **8**(3): p. 190-8.
 261. Karim, R., E.S. Jordanova, S.J. Piersma, G.G. Kenter, L. Chen, J.M. Boer, ve ark., *Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(20): p. 6341-7.
 262. Ohigashi, Y., M. Sho, Y. Yamada, Y. Tsurui, K. Hamada, N. Ikeda, ve ark., *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2947-53.
 263. Lyford-Pike, S., S. Peng, G.D. Young, J.M. Taube, W.H. Westra, B. Akpeng, ve ark., *Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 1733-41.
 264. Strome, S.E., H. Dong, H. Tamura, S.G. Voss, D.B. Flies, K. Tamada, ve ark., *B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6501-5.
 265. Nakanishi, J., Y. Wada, K. Matsumoto, M. Azuma, K. Kikuchi, S. Ueda, *Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(8): p. 1173-82.
 266. Thompson, R.H., M.D. Gillett, J.C. Cheville, C.M. Lohse, H. Dong, W.S. Webster, ve ark., *Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17174-9.
 267. Konishi, J., K. Yamazaki, M. Azuma, I. Kinoshita, H. Dosaka-AkitaveM. Nishimura, *B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 5094-100.
 268. Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, ve ark., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
 269. Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, ve ark., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
 270. Thompson, R.H., H. Dong, C.M. Lohse, B.C. Leibovich, M.L. Blute, J.C. Cheville, ve ark., *PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1757-61.
 271. Schalper, K.A., V. Velcheti, D. Carvajal, H. Wimberly, J. Brown, L. Pusztai, ve ark., *In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with*

- increased TILs and better outcome in breast carcinomas. Clin Cancer Res, 2014. **20**(10): p. 2773-82.
272. Muenst, S., A.R. Schaerli, F. Gao, S. Daster, E. Trella, R.A. Drieser, ve ark., *Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **146**(1): p. 15-24.
 273. Kim, J.R., Y.J. Moon, K.S. Kwon, J.S. Bae, S. Wagle, K.M. Kim, ve ark., *Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82870.
 274. Kang, M.J., K.M. Kim, J.S. Bae, H.S. Park, H. Lee, M.J. Chung, ve ark., *Tumor-infiltrating PD1-Positive Lymphocytes and FoxP3-Positive Regulatory T Cells Predict Distant Metastatic Relapse and Survival of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Transl Oncol, 2013. **6**(3): p. 282-9.
 275. Abbas, M., S. Steffens, M. Bellut, J.U. Becker, A. Grosshennig, H. Eggers, ve ark., *Do programmed death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) play a role in patients with non-clear cell renal cell carcinoma?* Med Oncol, 2016. **33**(6): p. 59.
 276. Choueiri, T.K., A.P. Fay, K.P. Gray, M. Callea, T.H. Ho, L. Albiges, ve ark., *PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma*. Ann Oncol, 2014. **25**(11): p. 2178-84.
 277. Maine, C.J., N.H. Aziz, J. Chatterjee, C. Hayford, N. Brewig, L. Whilding, ve ark., *Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(3): p. 215-24.
 278. Iacovelli, R., F. Nole, E. Verri, G. Renne, C. Paglino, M. Santoni, ve ark., *Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis*. Target Oncol, 2016. **11**(2): p. 143-8.
 279. Muenst, S., S. Hoeller, S. DirnhoferveA. Tzankov, *Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival*. Hum Pathol, 2009. **40**(12): p. 1715-22.
 280. Hsu, M.C., J.R. Hsiao, K.C. Chang, Y.H. Wu, I.J. Su, Y.T. Jin, ve ark., *Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma*. Mod Pathol, 2010. **23**(10): p. 1393-403.
 281. Cho, Y.A., H.J. Yoon, J.I. Lee, S.P. HongveS.D. Hong, *Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2011. **47**(12): p. 1148-53.
 282. Chen, L., P. McGowan, S. Ashe, J. Johnston, Y. Li, I. Hellstrom, ve ark., *Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 523-32.
 283. Antonia, S.J., T. Munoz-Antonia, G. Soldevila, J. MillerveR.A. Flavell, *B7-1 expression by a non-antigen presenting cell-derived tumor*. Cancer Res, 1995. **55**(11): p. 2253-6.
 284. Denfeld, R.W., A. Dietrich, C. Wuttig, E. Tanczos, J.M. Weiss, W. Vanscheidt, ve ark., *In situ expression of B7 and CD28 receptor families*

- in human malignant melanoma: relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity.* Int J Cancer, 1995. **62**(3): p. 259-65.
285. Martinez-Escribano, J.A., T. Hernandez-Caselles, J.A. Campillo, M. Campos, J.F. Frias, A. Garcia-Alonso, ve ark., *Changes in the number of CD80(+), CD86(+), and CD28(+) peripheral blood lymphocytes have prognostic value in melanoma patients.* Hum Immunol, 2003. **64**(8): p. 796-801.
 286. Chang, C.S., J.H. Chang, N.C. Hsu, H.Y. LinveC.Y. Chung, *Expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules are potential markers for better survival in nasopharyngeal carcinoma.* BMC Cancer, 2007. **7**: p. 88.
 287. Flörcken, A., M. Johannsen, T. Nguyen-Hoai, A. Gerhardt, K. Mller, B. Dörken, ve ark., *Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.* Int J Clin Exp Pathol, 2017. **10**(2): p. 1443-1454.
 288. Bernsen, M.R., L. Hakansson, B. Gustafsson, L. Krysander, B. Rettrup, D. Ruiter, ve ark., *On the biological relevance of MHC class II and B7 expression by tumour cells in melanoma metastases.* Br J Cancer, 2003. **88**(3): p. 424-31.