

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MALİGN MELANOMDA TÜMÖR İNFİLTRE  
EDİCİ LENFOSİTLERİN (TIL)  
İMMUNOHİSTOLOJİK KARAKTERİZASYONU  
VE REGÜLATÖR T HÜCRESİ'NİN TÜMÖR  
DOKUSU VE DOLAŞIMDA DEĞERLENDİRİLİP  
PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI**

**Uzm.Dr. Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU**

**TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2009**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MALİGN MELANOMDA TÜMÖR İNFİLTRE  
EDİCİ LENFOSİTLERİN (TIL)  
İMMUNOHİSTOLOJİK KARAKTERİZASYONU  
VE REGÜLATÖR T HÜCRESİ'NİN TÜMÖR  
DOKUSU VE DOLAŞIMDA DEĞERLENDİRİLİP  
PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI**

**TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**Uzm.Dr. Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU**

Danışman Öğretim Üyesi: **Prof. Dr. Münir Kınay**

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel / İleri Araştırma Projeleri Ödeneğinden  
2008.KB.SAG.033 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
RESİM LİSTESİ .....	vi
KISALTMALAR .....	vii
TEŞEKKÜR .....	ix
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	5
1. Giriş .....	5
2. Amaç.....	6
3. Konunun Önemi, Getireceği Yenilikler ve Sonuçlar, Bunların Uygulanabilirliği.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	8
1. Malign Melanom .....	8
1.1. Patogenez.....	9
1.2. Epidemiyoloji .....	10
1.3. Risk Faktörleri .....	11
1.4. Tanı.....	12
1.5. Evreleme.....	14
1.6. Prognoz.....	19
1.7. Biyolojik ve Serolojik Belirteçler.....	20
1.8. Tedavi .....	20
1.9. Takip.....	25
2. TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLER.....	26
2.1. TIL kavramının gelişimi.....	26
2.2. TIL hedefleri ve tanınma mekanizmaları .....	26
2.3. Melanom TIL'lerinin T hücre reseptör (TCR) repertuarı.....	27
2.4. TIL'lerin immünofenotipleri .....	27
3. T REGÜLATÖR HÜCRELERİ (Treg).....	31

4. S100B proteini.....	32
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	33
1. Çalışma Materyali.....	33
2. Örnek toplanması.....	34
2.1. Serum.....	34
2.2. Tam kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu .....	34
2.3. Mononükleer Hücrelerin Dondurulması (Cryopreservation).....	35
2.4. Sıvı Azotta Dondurulan Hücrelerin Çözündürülmesi .....	36
2.5. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Testi.....	36
3. Flow Sitometrik Analiz .....	36
4. ELİSA Analizi .....	40
5. İmmünohistokimya.....	42
6. İstatistiksel Analizler .....	44
6.1. Verilerin Kaydedilmesi .....	44
6.2. Veri Alanları Tanımı ve Verilerin Kantitatif Hale Dönüştürülmesi.....	44
6.3. Verilerin Analizi , Tablo ve Grafiklerle Gösterilmesi.....	44
4. BULGULAR .....	45
1. ELISA analizi Yöntemi ile elde edilen S100B sonuçları .....	49
2. Flow Sitometrik Analiz Sonuçları .....	51
3. İmmünohistokimyasal Bulgular .....	72
4. Korelasyon analiz sonuçları.....	77
5. TARTIŞMA.....	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	87
7. KAYNAKLAR.....	89
EK.1: ETİK KURUL ONAYI.....	98
EK.2: GÖNÜLLÜBİLGİLENDİRME FORMU.....	99
EK.3: SAĞLIKLI KONTROLLER İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU .....	101

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1 : Melanom gelişimde bilinen risk faktörleri.....	11
Tablo 2: <i>American Joint Committee on Cancer (AJCC)</i> 'in 2002'de revize edilmiş Malign Melanom Evrelemesi.....	18
Tablo 3 :Kutanöz malign melanomda prognostik faktörler.....	19
Tablo 4: TIL immünofenotiplemesinde önerilen markerlar .....	29
Tablo 5: Flow sitometride kullanılan gereçler.....	37
Tablo 6: İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar.....	42
Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen malign melanom olgularının demografik verileri.....	46
Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen sağlıklı kontrol olgularının demografik verileri.....	47
Tablo 9: Grupların cinsiyete göre dağılımı.....	48
Tablo 10: Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı.....	48
Tablo 11: Hastaların S100B Analizi Sonuçları .....	49
Tablo 12: Sağlıklı kontrollerin S100B Analizi Sonuçları .....	49
Tablo 13: S100B analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırması .....	50
Tablo 14: Hasta grubuna ait CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarının analiz sonuçları .....	60
Tablo 15: Hasta grubuna ait CD4 <sup>+</sup> ve FOXP3 <sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonlarının analiz sonuçları .....	60
Tablo 16 :Kontrol grubuna ait CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarının analiz sonuçları .....	61
Tablo 17: Kontrol grubuna ait CD4 <sup>+</sup> ve FOXP3 <sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonlarının analiz sonuçları.....	62
Tablo 18: CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarının analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması.....	63
Tablo 19 :CD4 <sup>+</sup> ve FOXP3 <sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonlarının analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması .....	64
Tablo 20: Çalışmada yer alan hastalara ait demografik, klinik, patolojik ve tedavi uygulamalarına ait veriler (1-16 hasta).....	66

Tablo 21: Çalışmada yer alana hastalara ait demografik, klinik, patolojik ve tedavi uygulamalarına ait veriler (17-32 hasta).....	67
Tablo 22 : Tümör lokalizasyonuna göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları .....	68
Tablo 23: Tümör lokalizasyonuna göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları .....	69
Tablo 24: Uzak metastaz varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları .....	70
Tablo 25: Uzak metastaz varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları .....	70
Tablo 26 :Ülserasyon varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları ..	71
Tablo 27: Ülserasyon varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları ..	72
Tablo 28: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3'ün ekspresyon sonuçları .....	73
Tablo 29 : Korelasyon analizleri .....	78

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: Kanser immünoterapisinin tarihçesi	9
Şekil 2: Lenfoid hücrelerin alt grupları	29
Şekil 3: Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması	33
Şekil 4: Santrifüjden sonra tüpte görülen dört tabaka	35
Şekil 5: Hasta ve kontrol grubunda S100B düzeylerinin kutu grafiği ile gösterilmesi	50
Şekil 6-a-f: Örnek hastadaki dot plot ve histogram görüntüleri	51
Şekil 7-a-f: Örnek sağlıklı kontrol için dot plot ve histogram görüntüleri	54
Şekil 8 : Hasta ve kontrol grubuna ait flow sitometride analiz edilen hücrelere ait ortalamaların bar grafiği ile gösterilmesi	64

## RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD20 için skor 1.....	74
Resim 2: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD20 için skor 2.....	74
Resim 3: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD20 için skor 3.....	74
Resim 4: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD3 için skor 3.....	74
Resim 5: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD3 için skor 4.....	75
Resim 6 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 1.....	75
Resim 7 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 2.....	75
Resim 8 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 3.....	75
Resim 9: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 4.....	75
Resim 10: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 1.....	75
Resim 11 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 2.....	76
Resim 12 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 3.....	76
Resim 13: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 4.....	76
Resim 14: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD25 için skor 1.....	76
Resim 15: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD25 için skor 2.....	76
Resim 16 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD25 için skor 4.....	76
Resim 17: Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %6.....	77
Resim 18: Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %12.....	77
Resim 19 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %20.....	77
Resim 20 :Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %27.....	77



## KISALTMALAR

Ag:	Antijen
AJCC:	American Joint Committee of Cancer
APC:	Antijen sunan hücreler
BT:	Beyin Tomografisi
cAMP:	Siklik adenzin monofosfat
CDKN2A:	p14Arf = p16: Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A
CTL:	Sitotoksik T lenfositler
CTLA-4:	Sitotoksik T lenfosit antijeni-4
DAB:	Diaminobenzidin
DC:	Dendritik Hücreler
DMSO:	Dimetil sülfoksit
ELISA:	'sandwich' enzim immunoassay
ELND:	Elektif Lenf Nodu Diseksiyonu
FBS:	Fetal sığır serumu
FDA:	Food and Drug Administration
FOXP3:	Forkhead box P3 transcription factor
FL1:	Fluoresans 1
FL2:	Fluoresans 2
FL3:	Fluoresans 3
FL4:	Fluoresans 4
FSC:	Dar açılı ışık saçılımı
GFAP:	Glial fibriler asidik protein
H&E:	Hematoksilen eozin

H2O2:	Hidrojen peroksit
HRP:	Horseradish peroksidaz
HLA:	İnsan lökosit antijeni
IFN $\gamma$ :	Interferon gama
IL-2:	Interlökin-2
IL-10:	Interlökin 10
ILP:	İzole ekstremitte perfüzyon
LDH:	Laktat dehidrogenaz
MHC:	Major histocompatibility complex
MNC:	Mononükleer hücre
MIA:	MIA melanom inhibitör aktivitesi
MR:	Magnetik Rezonans
NK:	Natural Killer
PBS:	Fosfat tampon solusyonu
p53:	Tümör protein p53
RT-PCR:	Ters yazılımlı-polimeraz zincir reaksiyonu
SLN:	Sentinel lenf nodu
SSC:	90° açıyla ışık saçılımı
TCR:	T hücre reseptörü
TGF $\beta$ :	Tümör büyüme faktörü $\beta$
TIL:	Tümör infiltre edici lenfosit
TMB:	Tetra metil benzidin
Treg:	Regülatör T hücresi
TRIS:	Tris (hidroksimetil) amino metan

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütölmesi ve sonuçların yorumlanması aőamalarında bilimsel görüőlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta danıőmanım Prof. Dr. Múnir KINAY'a, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD başkanı ve projemin yöneticisi Prof. Dr. Can KARACA'ya,

Hastaların seçimi ve tezin yazım aőamasında gösterdiği titiz çalıőmasından dolayı Yrd.Doç.Dr.Cenk DEMİRDÖVER'e

Laboratuvarındaki çalıőmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen değerli mesai arkadaşlarım Öğr.Gör.Uzm.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, Dr. Halil ATEŐ ve Araş. Gör. Zeynep ZADEOĞLULARI'na;

Patoloji örneklerinin seğilmesi ve değerlendirilmesini titizlikle yürüten Doç. Dr. Banu LEBE'ye;

İstatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkıları için Doç. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,

Bütün çalıőmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve manevi desteğini hiç esirgemeyen aileme teőekkürlerimi bir borç biliyorum.

Öğr.Gör.Uzm.Dr.Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU

## ÖZET

### MALİGN MELANOMDA TÜMÖR İNFİLTRE EDİCİ LENFOSİTLERİN (TIL) İMMUNOHİSTOLOJİK KARAKTERİZASYONU VE REGÜLATÖR T HÜCRESİ'NİN TÜMÖR DOKUSU VE DOLAŞIMDA DEĞERLENDİRİLİP PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN SAPTANMASI

Uzm.Dr. Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, 35340 İnciraltı-İzmir

Malign melanomun diğer solid tümörlerden farklı olarak spesifik bir immün cevap sayesinde spontan regresyonun görülmesi immünoterapistlerin ilgisini bu hastalığa çekmiştir. Günümüzde de immünoterapinin başarıya ulaşan hedeflerinden biri haline gelmiştir. İmmün sistemdeki görevleri incelenen regülatör T hücrelerinin (Treg) melanomdaki rolünün anlaşılması için ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Bu araştırmanın temel amacı, malign melanom hastalarında tümör infiltre edici lenfositlerin immünohistolojik karakterizasyonu ve dolaşımdaki Treg hücrelerinin serum S100B ile karşılaştırarak prognozu saptamadaki gücünün araştırılmasıdır. Bunun için hem melanom hastalarında (n=30) hem de sağlıklı kontrollerde (n=24), günümüzde en uygun Treg markeri olan FOXP3 transkripsiyon faktörünü kullanarak, Treg'lerin miktar ve fenotip analizi yapıldı. Ayrıca immünohistokimyasal TIL tayini yapıldı.

Çalışmamızda serum S100B ve dolaşımdaki  $CD4^+CD25^+$ ,  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  ve  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücrelerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulundu. Serum S100B ile hastaların periferik kanlarında ölçülen  $CD4^+$  hücreleri ve de tümörü infiltre eden B lenfositleri arasında ters yönde korelasyon bulundu. Tümörü infiltre eden T lenfositlerinin tümörün Breslow kalınlığı arttıkça azaldığı gösterildi. Clark seviyesi yükseldikçe de tümörü infiltre eden  $CD4^+$  T lenfositlerin azaldığı görüldü.

Sonuçlarımıza göre tümör progresyonu, hastalığın klinik seyri ile serum S100B ve dolaşımdaki Treg hücre ölçümü paralellik göstermektedir. Ayrıca, hastalık prognozu ile TIL varlığı arasında ters yönde bir ilişki olduğunu ve tümörü süprese edecek olan lenfositlerin azlığının bu tümörün gelişmesine neden olduğunu söylemek mümkündür.

Bu alışma sonunda elde ettiğimiz veriler, Treg'lerin anti tümör immünitesinde olası bir rolü olduğunu göstermektedir. Gelecekte Treg'ler için spesifik marker ekspresyonunu araştıran, inhibisyon mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik ve antijen özgünlüğünü dikkate alan çalışmalar dizayn edilmesinin yararlı olacağı öngörülmektedir. Bununla beraber, CD4<sup>+</sup> T hücrelerini artırma ve Treg hücrelerini kısıtlamaya yönelik yeni kanser aşı programları hem CD8<sup>+</sup> T hücreleri hem de antijen spesifik immün cevabı düşünerek değerlendirilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Malign melanom, S100B, Treg, TIL

## **ABSTRACT**

### **IMMUNOHISTOLOGICAL CHARACTERISATION OF TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES (TIL) IN MALIGNANT MELANOMA AND THE EVALUATION OF REGULATORY T CELLS IN TUMOR TISSUE AND CIRCULATION FOR THE ASSESSMENT OF ITS RELATIONSHIP WITH PROGNOSIS**

Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU, MD

Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, 35340 İnciraltı-İzmir/TURKEY

The immunotherapists have begun to focus on malignant melanoma, in which unlike most other solid tumors, spontaneous regression can be seen due to the specific immune response. Thus in nowadays, it has been listed among the successful goals of immunotherapeutic approaches. In order to clarify the role of regulatory T cells (Treg) in melanoma, further detailed studies should be performed. The main objective of this study is the immunohistological characterization of tumor infiltrating lymphocytes and to determine the prognostic efficacy of Treg cells in circulation by comparing serum S100B levels. Therefore, the analysis of phenotype and quantity of Treg's are performed in both melanoma patients (n=30) and healthy controls (n=24) by using the most suitable Treg marker FOXP3 transcription factor. Additionally, TILs are immunohistochemically evaluated.

In this study, higher serum levels of S100B and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells are obtained in the patient group comparing to control group. Negative correlation is found between serum S100B and CD4<sup>+</sup> cells and tumor infiltrating B lymphocytes in peripheral blood circulation. It was shown that tumor infiltrating T lymphocyte numbers were decreased when the Breslow thickness was increased. It was also seen that tumor infiltrating CD4<sup>+</sup> lymphocyte numbers were decreased when the Clark level was increased.

According to our results, there was a correlation between the tumor progression and the clinical status of the patients and the measurement of serum S100B and Treg's in blood circulation. Moreover, it is possible to say that, there is a negative correlation between the prognosis and presence of TIL's. The lower quantity of lymphocytes which should suppress the tumor is responsible for tumor development.

The final data of this study suggest a possible role of Treg's in anti-tumor immunity. For future it can be said that it is useful to design studies to investigate Treg's in terms of specific marker expression, inhibition mechanism, and antigen specificity. Thus, novel cancer vaccine formulations, aiming to favor the expansion of CD4+ T cells, and to limit Treg cell expansion, should be evaluated in conjunction with CD8+ T cells and at the level of antigen specific immune responses.

**Keywords:** Malignant melanoma, S100B, Treg, TIL

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

---

## 1. Giriş

Dünyada görülme sıklığı giderek artan malign melanom, diğer kanser türlerine göre çok farklı bir doğal seyir izlemektedir. Erken tanı için risk altında olan toplumlarda tarama yöntemleri geliştirilmektedir. Tüm bunlara karşın hastalığın sıklığı artmakta ve bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Malign melanom tanısının erken dönemde konulmasının hastanın yaşam süresi ve kalitesine önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. Erken dönem malign melanomun tanısı ve tedavisi küratif cerrahi ile olasıdır. Tümör kalınlığı 4.0 mm'yi geçen ve bölgesel lenf nodu metastazı olan hastaların yarısından fazlasında cerrahi müdahaleye rağmen 2 yıl içinde yineleme veya ölüm riski olduğu bildirilmektedir (1-4).

Malign melanomu, diğer solid tümörlerden ayıran belirgin özellikleri, kemoterapi ajanlarına gösterdiği intrinsek direnç ve hastalık seyrinin değişkenliğidir. Bu özellikler, malign melanomda cerrahi dışı tedavi modellerinin geliştirilmesini ve standart hale getirilmesini engellemektedir. Bu doğrultuda hastaya özel tedavilerin geliştirilmesi söz konusu olmaktadır (5). Diğer solid tümörlerden farklı olarak spesifik bir immün yanıt sayesinde melanom hastalarında spontan regresyonun görülmesi immünoterapistlerin ilgisini bu hastalığa çekmiş ve günümüzde immünoterapinin hedeflerinden biri haline gelmiştir (2,6).

Tümörlü olgularda pek çok immün tedavi modeli, T hücre yanıtının aktivasyonuna odaklanmaktadır. Lenfosit altgruplarının neoplazilerde immüno-regülatör role sahip oldukları bilinmektedir. İyi işlev gören bir immün sistem tümörlere karşı konakçı savunma mekanizmalarının işletilmesinde gereklidir (7-11). Tümör infiltre edici lenfositler antijen spesifik B hücrelerini, Natural Killer (NK) hücrelerini, adaptif immün efektör hücrelerini ve immün supresif hücreleri içerir. Supresif T hücreleri arasında timusta oluşturulan ve sitokine bağımsız olmasıyla karakterize olan CD4+CD25+ doğal T regülatör (Treg) hücreleri bulunmaktadır (3,12,13). Kanserde, özellikle melanomda CD4+CD25+FOXP3+ Treg'leri doku seviyesinde araştıran az sayıda çalışma vardır (14-16). Treglerin doku düzeyinde getirebileceği yenilikler şunlardır:

- Prognostik marker olarak kullanımı
- Terapötik hedef olarak rolünün ortaya konması
- Melanom hastalarının monitörizasyonunda histolojik bir parametre olarak kullanımı



Treg'lerin malign melanomda kanda tespit edilip Treg'lerin doku düzeyi ile ve malign melanomda bir belirteç olarak genel kabul gören S100B proteini (17) ile korele edilmesi sonucunda prognostik bir belirteç olarak kullanımının araştırılması amaçlanmaktadır.

## **2. Amaç**

Bu çalışmadaki amaç malign melanom hastalarında tümör infiltrate edici lenfositlerin immünohistolojik karakterizasyonu ve regülatör T hücrelerinin S100B ile karşılaştırarak prognozu saptamadaki gücünün araştırılmasıdır.

Bunun nedeni:

1. Tümör infiltrate edici lenfositlerinin tayini için; Parafine gömülü doku arşivinden 30 hastada immünohistokimya yöntemiyle CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3 ekspresyonlarının yer ve miktar analizi
2. 12 yeni malign melanom hastasının (24 sağlıklı kontrol) serumundan S100B proteininin ELISA ile ölçümü.
3. Dolaşımdaki T regülatörlerin sıklığının tam kanda Flow Sitometre ile ölçümü.
4. Treg'ler ile S100B arasındaki korelasyonun saptanması ve hastaların klinik verileriyle madde 1-3 ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır

## **3. Konunun Önemi, Getireceği Yenilikler ve Sonuçlar, Bunların Uygulanabilirliği**

Bu çalışmanın sonucunda beklediğimiz sonuçlar:

1. İmmünofenotipleme:
  - a. Tümör infiltrate edici lenfositlerinin (TIL) dokuda tayini sonucunda TIL lokalizasyonlarının malign melanom prognozu ile ilişkisinin ortaya çıkarılması;
  - b. Tümör infiltrate edici lenfositlerinin dokuda hastalık subtiplerine göre tayini, hastayı immünoterapi açısından değerlendirmemizi sağlayacak olan bulgular verecektir;
  - c. Treg'lerin dokuda lokalizasyonu tayini sonucunda aşağıdaki kullanımlar için bulgu elde edilmesi;
    - Prognostik marker

- Terapötik hedef olarak rolü
  - Melanom hastalarının monitörizasyonunda histolojik bir parametre olarak
2. S100B düzeyleri ile TIL lokalizasyonları arasında ilişkinin ortaya konulması
  3. Elde edilmesi kolay ve hızlı olan kan örneğinde Treg'lerin düzey tespiti sonucunda;
    - a. Bu veriyi S100B ile karşılaştırmak suretiyle prognostik bir marker olarak gücünün ortaya konulması.
    - b. Dokudaki Treg düzeyi ve lokalizasyonu ile karşılaştırarak melanom hastalarında izlem ve prognoz markeri olarak yerinin ortaya konulması hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

---

### 1. Malign Melanom

Cilt malign melanomu Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009'da beklenen 68720 yeni olgu ile erkekte beşinci, kadında altıncı en sık kanser türüdür (1). 2008'deki verilerden melanomun 62480 yeni olgu ile erkekte altıncı ve kadında yedinci sırada yer alarak gerek sayı gerekse cinsiyete göre kanser dağılımında artmış olduğu görülmektedir (18).

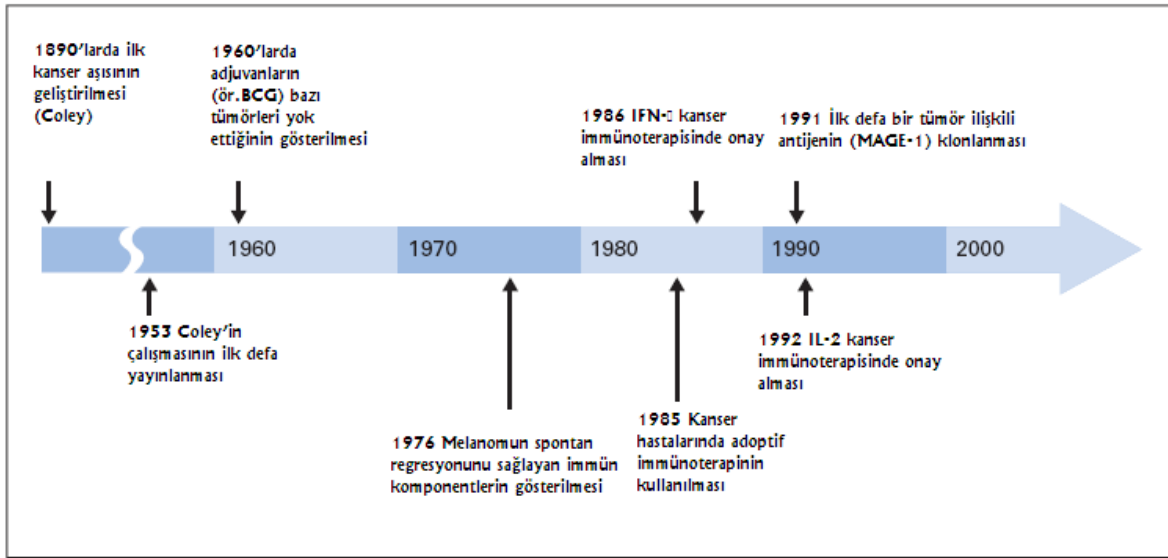
Yeni lezyonların %80'i ciltte lokalizedir ve cerrahi eksizyon sonrası %95 oranında 5 yıllık sağkalım sağlanabilmesine rağmen lokal lezyonu olan kişilerde hastalık yineleyebilmektedir.

Günümüzde yeni biyolojik tedaviler için yapılan yoğun çalışmalara rağmen dissemine olgularda çok az etkili tedavi seçeneği vardır ve hastalığın kötü seyrini değiştirmek için yetersizdir (19). İmmunoterapi uygulanması sadece çok küçük bir yüzde etkili olmaktadır. Metastatik hastalığı olan kişilerde kemoterapi ve biyolojik tedavi genellikle başarısız olmaktadır.

Son yüzyılda melanom insidansında belirgin bir artış görülmüş, 1935 yılında 100.000 de 1 iken günümüzde bu oran 100.000 de 15'e çıkmıştır. Her ne kadar bu artışın kesin nedeni anlaşılamamışsa da, ozon tabakasında meydana gelen hasar, güneş ışınlarına daha fazla maruz kalma, açık tenli kişilerin ekvatora yakın bölgelere göç etmesi melanom insidansında belirgin bir rol oynamaktadır. Erken cerrahi tedavinin çok etkili olması nedeniyle uluslararası kuruluşlar hastalığı önleyici ve erken tanı için tarayıcı yöntemler üzerinde yoğunlaşmışlardır. Çok merkezli büyük prospektif randomize çalışmalar bazı temel soruları yanıtladılmış, melanomun daha iyi tedavi edilmesini ve daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Sentinel lenf nodu biyopsisinin terapötik rolü, izole ekstremitte perfüzyon (ILP), sitotoksik ve biyolojik tedaviler üzerinde çalışılmış ancak tam bir sonuç elde edilmemiştir.

Melanom hastalarının gruplandırılması için lokalizasyona ek olarak dokuz klinikopatolojik prognostik belirteç ortaya konmuştur, ancak bu belirteçler melanomdaki tüm çeşitlilikleri ayırt edebilecek nitelikte değildirler. Gerçekten de, aynı klinik ve histolojik parametrelere sahip olan hastaların, farklı mRNA ekspresyon profilleri ve gen ekspresyonlarına göre gruplandırılmaları sonucu değişik sağkalım oranları ile ilişkide olduğunu görmekteyiz (20-22).

Adjuvan tedavi risk-yarar değerlendirmesindeki olumsuzluğu nedeniyle lokal melanomda tercih edilmemektedir. Bundan dolayı genel sağkalımı artırmak adına tanı sırasında adjuvan tedaviden yararlanabilecek olan hasta alt gruplarının ayırt edilmesi kritik önem taşımaktadır. Diğer solid tümörlerden farklı olarak spesifik bir immün yanıt sayesinde melanom hastalarında spontan regresyonun görülmesi immünoterapistlerin ilgisini bu hastalığa çekmiş ve günümüzde immünoterapinin hedeflerinden biri haline gelmiştir (Şekil 1) (21).



Şekil 1: Kanser immünoterapisinin tarihçesi

## 1.1. Patogenez

Epidemiyolojik çalışmalar açık tenli kişilerde cilt melanomunun en önemli sebebinin güneşe maruz kalma olduğunu göstermiştir bu ilişki cinsiyet ile anatomik lokalizasyon farklılığı, göçmen çalışmaları ve ırksal farklılıklar ile de desteklenmiştir (27).

Genetik çalışmalar ailesel melanomların %50'sinin, sporadik melanomların da %25'inin tümör süpresör gen p16'daki mutasyonlar sonucu ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Linkaj çalışmaları kromozom 9p21'i familyal melanom geni olarak tanımlamıştır. Tüm melanom olgularının %8-12'si ailesel melanomlardır. Kalıtım şekli çoğunlukla poligeniktir. Ailesel melanom öyküsü olan kişilerin kutanöz melanom geliştirme riskleri 50 yaşında %50 olarak tahmin edilebilir. Melanom hastalarının akrabalarında

kromozom 9p21'deki *CDKN2A* geninde mutasyonlar gösterilmiştir. *CDKN2A* geni komplekstir ve ikisi de hücre hücresel büyümenin baskılanmasından sorumlu olan p16 ile p14ARF'ı kodlar. Sağlam p16 siklin bağımlı kinazları inhibe etmektedir. Bu önemli enzim grubunun görevi retinoblastom proteinini inhibe ederek hücresel büyümenin teşvik edilmesidir. Bundan dolayı sağlam bir p16 hücre siklüsünün durdurulması için gereklidir. p14ARF, başka bir tümör süpresörü olan p53'ün etkisinin artırmaktan dolayı önemlidir (23).

Melanom progresyonunda aşağıdaki beş basamak söz konusudur:

1. Benign melanositik nevüs
2. Yapısal ve sitolojik atipili melanositik nevüs (displastik nevüs)
3. Pimer malign melanom, radyal büyüme fazı
4. Pimer malign melanom, vertikal büyüme fazı
5. Metastatik malign melanom

Tümorogenezdeki her basamak çevresel doku üzerinde bir büyüme avantajı sağlayan yeni bir hücre klonu ile karakterizedir.

## 1.2. Epidemiyoloji

Melanom insidansında 1935'ten günümüze 15 kat artış olmuştur. Hastalığın yıllık insidansında %6'lık bir artış görülmesine rağmen melanom nedeniyle meydana gelen ölüm insidansı her yıl %2 artmaktadır. Buna karşılık son 50 yılda melanom nedeniyle ölüm insidansı anlamlı derecede azalma göstermektedir. Benzer şekilde son yıllarda 5 yıllık sağkalım anlamlı derecede artmıştır. Hastalık insidansındaki artışın, metastaz potansiyeli olmayan çok erken olguların tanısı nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (19,24).

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 ¼'ü 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.

Irklar 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 (24,25).

### 1.3. Risk Faktörleri

Son 40 sene içerisinde melanom insidansındaki artış, etkili tarama programlarına ilgiyi artırmıştır. Primer melanom olgularının %93'nün gözle görülebilir olması nedeniyle invaziv olmayan cilt muayenesiyle tarama programları kolaylıkla yapılmaktadır. Mukozal yüzeylerde, gözle görülen ve primer yeri bilinmeyen olgular da geri kalan yüzdeyi oluşturmaktadır. Birçok primer cilt lezyonunun aylar-yıllar süren radyal büyüme fazı vardır ki bu süre hekimlerin, ailenin ya da hastanın kendisinin lezyonu erken fark etmesine ve vertikal büyüme fazına geçmeden etkili cerrahi tedavinin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Tümör kalınlığı 0.76 mm'den daha az olan melanomların 10 yıllık sağkalım oranlarının % 95' ten fazla olması nedeniyle, vertikal büyüme fazına geçmeden yakalanması ve uzun süreli sağkalım elde edilmesi kitlesel taramalardaki en önemli amaçtır. Yapılan çalışmalar ve tarama programları sonucunda bazı risk faktörleri belirlenmiş ve bu faktörleri taşıyan kişiler üzerinde tarama programları yoğunlaştırılmıştır (19, 26).

Karsinogenezle ilişkili bilinen sigara, alkol, östrojenler gibi tipik risk faktörlerinin melanom gelişiminde etkisi saptanmamıştır. Ancak hastanın fenotipi (saç, cilt ve göz rengi), güneş ışınlarına maruz kalma, aile hikayesi ve genetik faktörlerin melanom gelişimi üzerinde rol oynadığı bilinmektedir (Tablo1) (26).

**Tablo 1 :** Melanom gelişimde bilinen risk faktörleri

Birinci derece akrabalarda invaziv kutanöz melanom varlığı
Özgeçmişte invaziv kutanöz melanom öyküsü
Çok sayıda melanositik nevüs (>100) varlığı
>3 atipik (displastik) nevüs varlığı
Erken çocuklukta (<10 yaş) yüksek oranda güneşe maruz kalma
Açık renkli ten (cilt tipi 1 veya 2).
Kızıl veya sarı saç
Çilli cilt
Bir veya birden fazla büllü güneş yanığı hikayesi.

Yüksek sosyoekonomik sınıf
Geçmiş solaryum kullanım öyküsü (özellikle <30 yaş)
Meslek (çiftçi vb.)
Geçmişte tarım ilacı maruz kalma
Solaryum kullanımı
Ekvator bölgesi
Psoralen içerikli güneş kremleri
Xeroderma pigmentosa

Korunma ve tarama programları, son yıllarda insidansı artan bu kanser türü için çok etkili ve anlamlıdır. Erken tanının prognoz üzerinde çok büyük etkisinin olması, tarama programlarının sadece gözlem ve fizik muayeneye dayanması, yüksek maliyetler gerektirmemesi nedeniyle desteklenmesi ve yaygınlaştırılması gerekmektedir.

#### 1.4. Tanı

Tüm şüpheli lezyonlarda biyopsi endikasyonu vardır ve yardımcı teknikler olarak dermatoskopi ve ultrasonografi gibi invaziv olmayan tekniklerden yararlanılmaktadır. Her şüpheli melanom olgusunda mümkünse lezyonun yakın kenarlarını da içeren eksizyonel biyopsi yapılır. Lezyondaki melanom şüphesinin düşük olduğu, lezyonun çok büyük olmadığı ve tam rezeksiyon yapmanın mümkün olmadığı durumlarda insizyonel biyopsi yapılması uygundur.

Biyopsi, melanom evresinin belirlenmesi, uygun tedavinin planlanması ve prognozun saptanması açısından önemlidir (27).

Melanom hastalarının %85'inde tanı anında hastalıkları lokalizedir (evre I ve II), yaklaşık %15'inde bölgesel lenf nodu tutulumu ve sadece %2 sinde uzak metastaz vardır. Evre I ve II için prognoz birçok faktörden etkilenmektedir. Genç yaşta kişilerde, kadınlarda, ekstremitelerde lezyonları ve histolojik olarak lenf nodu negatif hastalarda prognoz iyidir. Tümör kalınlığı ve invazyon kalınlığının arttığı; mitoz oranının arttığı; ülserasyon varlığı; lenfoid yanıtın azaldığı; tümör regresyon bulguları, mikroskopik satelitler, vasküler invazyon varlığı ve iğ hücreli olmayan tip tümörler kötü prognoz ile ilişkili histolojik değişkenlerdir.

Bölgesel lenf nodu metastaz varlığı %37 5 yıllık ve %32 10 yıllık sağkalım oranları göstermektedir. (28). Evre III melanomda prognozu belirleyen en önemli faktör pozitif lenf nodlarının sayısıdır. Uzak metastaz varlığında ortalama sağkalım 6-9 aydır. Metastatik

bölgelerin artması, iç organ metastazı, rezeksiyona uygun olmayan metastaz varlığı, erkek cinsiyet ve remisyon sürelerinin kısa olması Evre IV'te kötü prognozu düşündüren parametrelerdendir (29).

Melanom tanısında, lezyonun tanımlanmasında önemli olan klinik özellikler A B C D E harfleriyle belirtilmiştir.

A: Asimetri

B: "Borders" düzensiz kenarlar,

C: "Color" renk değişikliği,

D: "Diameter" çapın 5 mm'den geniş olması,

E: "Enlargement" lezyondaki çap artışı.

Kanama ve ülserasyon lokalize melanomlarda %10 oranında, gecikmiş olgularda ise %54 oranında gözlenir ve kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (19).

### **1.4.1. Morfotipleri**

Melanom morfotipleri, lezyonun prognozu hakkında bilgi verse de, Breslow kalınlığı, ülserasyon varlığı melanomun biyolojik davranışını belirleyen en önemli verilerdir. Lezyonun morfolojisi bu verilerden bağımsız bir prognostik faktör değildir (19,27,30).

#### **a. Yüzeyel Yayılan Tip**

Asimetrik yassı ya da hafifçe kabarık, siyah kahverengi gölgeli renk değişiklikleri içeren makül olarak karşımıza çıkar. Depigmente alanlar içerebilir. En sık görülen melanom tipidir (%60-70). Bu lezyonlar hızlı büyüme fazından yıllar öncesinde var olabilirler. Radyal büyüme fazında, çap genişlemesiyle birlikte, lezyonun üzerinde düzensizlikler meydana gelebilir. Vücudun herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir; kadınlarda daha çok alt ekstremitelerde, erkeklerde ise sıklıkla gövdede görülürler.

#### **b. Nodüler Tip**

Genellikle uniform, lacivert-siyah ya da mavimsi kırmızı renklere nodüler görünümlü lezyonlardır. %5 oranında amelanotik olabilirler. İkinci en sık görülen melanom tipidir (%15-30). Genellikle hızlı ortaya çıkar. Nodüler melanomların Breslow kalınlıkları fazladır. Hızlı vertikal büyüme gösterirler. Kadınlardan daha çok erkeklerde, gövdede, baş ve boyun bölgesinde görülürler.



### **c. Lentigo Maligna**

Tipik olarak yüzde, büyük, ten renginde, yassı lezyonlardır. Kahverengi renk değişiklikleri görülebilir. Nadiren amelanotik olabilirler. Lentigo maligna lezyonlarının yaklaşık yarısı atipik melanositik proliferasyon ile karakterize, yıllar içinde melanoma dönüşme potansiyeline sahip prekürsör lezyonlardır. Melanom hastalarının %5'inde bu tip lezyonlar görülmektedir.

### **d. Akral Lentiginöz Melanom**

Nadir görülürler. Genellikle avuç içi ve ayak tabanında ve tırnak altında (subungual bölge) görülür. Bu bölgelerde görülen tüm lezyonlar akral lentiginöz melanom değildir. El ve ayaklarda görülen bu melanomlar, tüm melanomlar içinde %5 gibi bir oranda görülmektedir. Genellikle koyu tenli kişilerde ve zencilerde görülür. Afroamerikalarda görülen melanomların %70'i, Asyalılarda ise %46'sı bu tip melanomlardır. Genellikle kahverengisiyah renklerde maküler lezyonlardır, lezyon kenarları düzensizdir. Akral melanomlar total vücut nevüs sayısı ile direkt ilişkilidir. Sıklıkla topukta bulunur. El ve ayaklarda meydana gelen kesici alet yaralanmaları, zirai kimyasal maddeler ile temas, bu lezyonların oluşum riskini artırmaktadır. Bu lezyonlar geç ortaya çıkar ve prognozları kötüdür.

### **e. Desmoplastik Melanom**

Klinik ve mikroskopik olarak zor teşhis edilen, lokal olarak agresif seyreden nadir görülen tiptir. Tüm melanomların %1.7'sini oluşturur. Bu tümörlerin çoğu yaşlı kişilerin baş ve boyun bölgesinde görülür. Yaklaşık yarısı amelanotiktir. S-100 ile kuvvetli olarak boyanırlar.

## **1.5. Evreleme**

Cilt melanomun evrelemesi, lokal, rejyonel ve metastatik hastalığı birbirinden ayırmaktadır. Bu ayırım sağkalım oranlarıyla doğru orantılıdır. Evre I ve II erken (düşük riskli) ve kısmen erken (orta riskli) hastalığı belirtmek için kullanılmaktadır. Hastalığın tekrarlama riskini arttıran bazı özellikler AJCC (American Joint Committee of Cancer) tarafından 1992 yılında gözden geçirilerek evreleme sistemleri oluşturulmuştur. Bu evreleme sistemi 2000 yılında yeniden gözden geçirilmiştir. Her iki sistemde de uzak metastaz (M1) Evre IV, rejyonel lenf nodu metastazı (N1-3) Evre III malign melanomu ifade etmektedir. Birçok hasta uzak ya da rejyonel hastalık bulguları olmaksızın başvururlar. Bu hastalarda

hastalığın lokal özellikleri prognoz hakkında önemli ipuçları vermektedir. AJCC tarafından evreleme ve evreye bağlı olarak sağkalım yüzdeleri 2002'de tekrar düzenlenmiştir (31). Bağımsız parametreler olduğu kanıtlanan mikrometastaz, ülserasyon, lenf nodu tutulum sayısı, uzak metastazın alt grupları evreleme sistemine yerleşmiştir (19).

Mikroevreleme ya da Breslow kalınlığı ve ülserasyonun olup olmaması uzak ya da rejyonel metastaz, olmayan hastalarda en önemli değişkenlerdir. Melanom tanısı alan hastalar arasında, lokalize hastalık büyük bir yer tutmaktadır. Evre I ve Evre II'nin bu noktada birbirinden ayrılması çok önemlidir. Hastalığın düşük riskli mi, orta riskli mi olup olmadığı konusunda bizi aydınlatacaktır. 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 (19).

### **1.5.1. 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. Hastalığın prognozu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda T1/Evre Ia (0,76mm'den küçük), T2/Evre Ib (0,77-1,50 arası), T3/Evre IIa (1,51-4mm arası) ve T4/Evre IIb (4mm'den büyük) şeklinde evreler belirlenmiştir. Bu kategorilerdeki hastalarda risk, çok kesin sınırlar olmamakla birlikte Breslow kalınlığıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. 2000 yılında AJCC tarafında

önerilen yeni evreleme sisteminde daha önce 0.76, 1.50, 4mm olarak belirlenen sınırlar, 1, 2 ve 4 mm olarak değiştirilmiştir (19,31)

### **1.5.2. Ülserasyon**

Lokalize primer melanomlarda ülserasyon %21-60 oranlarında bulunmaktadır. Ülserasyon varlığı 5-10 yıllık hastalısız sağkalımı 1/3'ten fazla azaltmaktadır. Her derinlikteki lezyonlarda ülserasyon meydana gelmekle birlikte, derin tümörlerde daha sık gözükmetedir. 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. AJCC tarafından belirlenen 2000 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 (19).

### **1.5.3. Morfotip**

Eskiden melanom morfotipinin prognostik faktör olduğu düşünülürken, günümüz evreleme sisteminde morfotip yer almamaktadır. Morfotip klinikte hastalığın gidişi ile ilgili hekime fikir vermek açısından önem taşımaktadır. Nodüler tip daha agresif vertikal büyüme göstermekte ve yüzeysel yayılan tipe göre daha kötü prognoz göstermektedir. Aynı şekilde Akral Lentiginöz tip, Lentigo maligna melanoma göre daha kötü prognozludur. Görülüş sıklıkları, yerleştikleri vücut bölgeleri, güneş ışınlarına maruz kalma ile olan ilişkileri bakımından morfotipler birbirlerinden farklılık göstermektedir (19).

### **1.5.4. Tümörü infiltre eden lenfositler ve dentritik hücreler**

Yapılan çalışmalarda, primer melanom bölgesinin lenfositler tarafından infiltre olmasının hastalığın daha iyi bir seyir göstermesiyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. "Boston Collaborates of Melanom Study" adlı çalışma grubu, yoğun lenfosit infiltrasyonuna uğramış melanom olgularının daha iyi prognoza sahip olduklarını göstermiştir. Metastatik hastalıklarda lenfoid yanıtın, primer hastalığa göre daha az sıklıkta gözlenmesi tedavisel anlamda immünolojinin dikkatini bu konuya çekmiştir. Ayrıca diğer immün mediyatörlerin infiltrasyonu ile iyi prognoz arasında ilişki saptanmıştır. Güçlü antijen sunucu hücreler olan dendritik hücreler (DC) de melanom spesimenlerinde saptanmıştır. DC infiltrasyonu tümör

kalınlığı ile ters ilişkidir. DC, anjiyogenezin düzenlenmesi, tümör apoptozisi gibi önemli biyolojik olaylarda medyatör olarak rol oynamaktadır (19).

### **1.5.5. Regresyon**

Fibrozis ve santral depigmentasyon ile karakterize lezyon regresyonu literatürde bildirilmiştir. Böyle lezyonlarda eksizyon sonrasında beklenenden daha az Breslow kalınlığıyla karşılaşmak, hastalığın daha düşük evrenmesine 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 (19).

### **1.5.6. Tümör'ün ortaya çıkış bölgesi**

Akral, subungual bölgede, baş ve boyunda ortaya çıkan malign melanomların prognozları ekstremitelerde ortaya çıkan melanomlara oranla daha kötü prognoza sahiptir. Tümör bölgesi bağımsız ve anlamlı bir prognostik değişkendir. Üst ve alt ekstremitelerde arasında prognoz farkı yoktur. Ancak el ve ayak parmak uçlarındaki lezyonların seyri daha proksimal lezyonlara göre daha kötüdür. Prognostik değişkenler (lokalizasyon, cinsiyet, yaş ve Breslow kalınlığı) sağkalım beklentisini % 50'ye kadar artırmaktadır. Pozitif bölgesel lenf nodu varlığında bu değişkenlerin prognoz üzerinde etkisi yoktur (19,31). Tablo 2'de AJCC'nin 2002'de revize olmuş evreleme sisteminde 1, 5 ve 10 yıllık sağkalımlar verilmiştir.

**Tablo 2:** American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in 2002'de revize edilmiş Malign Melanom Evrelemesi

Histolojik Özellikler	TNM Sınıflaması	Sağkalım		
		1-yıl (%)	5-yıl (%)	10-yıl (%)
<b>Evre 0</b>				
Intraepitelyal veya in situ melanom	T <sub>is</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	100	100
<b>Evre I</b>				
<b>A</b>				
≤1 mm ülserasyonsuz ve Clark seviyesi II/III	T <sub>1a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	95	88
<b>B</b>				
≤1 mm ülserasyonlu veya seviye IV/V	T <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	91	83
1.01-2 mm ülserasyonsuz	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	89	79
<b>Evre II</b>				
<b>A</b>				
1.01-2 mm ülserasyonlu	T <sub>2b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	77	64
2.01-4 mm ülserasyonsuz	T <sub>3a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	79	64
<b>B</b>				
2.01-4 mm ülserasyonlu	T <sub>3b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	63	51
>4 mm ülserasyonsuz	T <sub>4a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	67	54
<b>C</b>				
>4 mm ülserasyonlu	T <sub>4b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	—	45	32
<b>Evre III</b>				
<b>A</b>				
Bölgesel tek nodal mikrometastaz, ülserasyonsuz primer	T <sub>1-4a</sub> N <sub>1a</sub> M <sub>0</sub>	—	69	63
Bölgesel 2-3 nodal mikrometastaz, ülserasyonsuz primer	T <sub>1-4a</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	—	63	57
<b>B</b>				
Bölgesel tek nodal mikrometastaz, ülserasyonlu primer	T <sub>1-4b</sub> N <sub>1a</sub> M <sub>0</sub>	—	53	38
Bölgesel 2-3 nodal mikrometastaz, ülserasyonlu primer	T <sub>1-4b</sub> N <sub>2a</sub> M <sub>0</sub>	—	50	36
Bölgesel tek nodal makrometastaz, ülserasyonsuz primer	T <sub>1-4a</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	—	59	48
Bölgesel 2-3 nodal makrometastaz, ülserasyonsuz primer	T <sub>1-4a</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>0</sub>	—	46	39
In-transit metastaz veya satellit lezyon(lar) metastatik lenf nodu yok	T <sub>1-4a/b</sub> N <sub>2c</sub> M <sub>0</sub>	—	30-50	
<b>C</b>				
Bölgesel tek mikroskopik nod, ülserasyonlu primer	T <sub>1-4b</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	—	29	24
Bölgesel 2-3 makroskopik nod, ülserasyonlu primer	T <sub>1-4b</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>0</sub>	—	24	15
4 veya fazla metastatik nod, sertleşmiş nodlar/büyük ekstrakapsüler yayılım, veya in-transit metastaz veya satellit(ler) ve metastatik nodlar	herhangi T N <sub>3</sub> M <sub>0</sub>	—	27	18
<b>Evre IV</b>				
Uzak cilt, cilt altı veya nodal metastaz ve normal laktat dehidrogenaz (LDH)	herhangi T; herhangi N; M <sub>1a</sub>	59	19	16
Akciğer metastazı ve normal LDH	herhangi T; herhangi N; M <sub>1b</sub>	57	7	3
Diğer tüm visseral metastazlar ve normal LDH veya herhangi bir uzak metastaz ve artmış LDH	herhangi T; herhangi N; M <sub>1c</sub>	41	9	6

## 1.6. Prognoz

Evre I veya II'ye sahip melanomda prognoz ağırlıklı olarak tümör kalınlığına bağlıdır.

1. Melanoma in situ: 5 yıllık sağkalım %100, 10 yıllık sağkalım %100
2. Lezyon  $\leq 1$  mm: 5 yıllık sağkalım %91-95, 10 yıllık sağkalım %83-88,
3. Lezyon 1.01-2 mm: 5 yıllık sağkalım %77-89, 10 yıllık sağkalım %64-79
4. Lezyon 2.01-4 mm: 5 yıllık sağkalım %63-79, 10 yıllık sağkalım %51-64
5. Lezyon  $>4$  mm: 5 yıllık sağkalım %45-67, 10 yıllık sağkalım %32-54

Tablo 3'te iyi prognozu gösteren belirteçler yer almaktadır (32).

**Tablo 3 :**Kutanöz malign melanomda prognostik faktörler

Faktör	Daha iyi prognoz
<b>Klinik:</b>	
Yaş	<65
Cinsiyet	Kadın
Lokalizasyon	Ekstremiteler
Lenf nodu sayısı	Yok
Uzak metastaz	Yok
LDH seviyesi	Normal
<b>Histolojik:</b>	
Kalınlık	<1.0 mm
Ülserasyon	Yok
Clark seviyesi	Seviye 1
Tümör vaskülaritesi	Yok
Vasküler invazyon	Yok
Mikrosatelitler	Yok
Mitotik oran	Düşük
Regresyon	Yok
TIL'ler	Var

## 1.7. Biyolojik ve Serolojik Belirteçler

Malign melanom hastalarında prognozu yansıtacak birçok biyokimyasal, immünolojik ve kantitatif kan testleri incelenmiştir. Bunlardan en eskisi LDH'tır. LDH metastatik hastalık belirteçidir, özellikle de karaciğer metastazlarının belirteçidir. Yüksek LDH değerinin önemi birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmalarda elde edilen ortak sonuç LDH'in önemli bir prognostik faktör olmasıdır. AJCC 2000 düzenlemesinde LDH yüksekliği kötü prognostik belirteç olarak evrelemeye katılmıştır. Ayrıca MIA (melanom inhibitör aktivitesi) ve polipeptit S-100β vardır. MIA yeni bir moleküler belirteçtir. Ancak yapılan son çalışmalar prognostik öneminin sınırlı olduğunu göstermiştir. Yapılan prospektif bir çalışmada S-100β-pozitif olan hastaların hastalısız sağkalım süreleri negatif olanlara göre 2.7 kat daha kısadır. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır. S-100β bağımsız bir prognostik faktördür. Dolaşımda bulunan melanom hücrelerini belirlemek için RT-PCR tekniği uygulanmıştır. Bu teknikte tirozinaz kullanılmış, yüksek sensitivite nedeniyle flebotomi sırasında kana karışan normal melanositleri de saptanmıştır. Sağlıklı kişilerde tirozinaz pozitifliği % 10'dur. Evrenin artmasıyla tirozinaz pozitifliği artmaktadır. Tirozinaz pozitifliği evre, sağkalım, metastaz varlığı ve yüksek LDH ile orantılıdır (19, 33).

## 1.8. Tedavi

Amerikan Dermatoloji Birliği'nin 2001 rehberine göre primer kutanöz melanomun tedavisinde tümör olmayan bölgeyi de içeren eksizyon yapmanın önemi vurgulanmıştır. Buna göre eksize edilmesi gereken kenar miktarları şöyledir:

1. Melanoma in situ: 0.5-cm kenar
2. Breslow kalınlığı <2 mm olan melanom: 1.0-cm kenar
3. Breslow kalınlığı  $\geq$ 2.0 mm olan melanom: 2.0-cm kenar

Melanom şüphesi uyandıracak tüm lezyonlar mutlaka patolojik olarak incelenmelidir. Yüzeyden kabarık, ülser, kanamalı, renk ve boyut değişikliği gösteren lezyonlardan vakit kaybetmeden biyopsi alınmalıdır. İnsizyonel biyopsilerde örnekleme hatası olabileceğinden, tam kat eksizyonel biyopsi tercih edilmelidir. Eksizyonel biyopsinin tam kat olarak yapılması lezyonun kalınlığı hakkında bilgi verecek ve rezeksiyonun genişliğinin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Tıraşlama yöntemleri kontrendikedir. Lezyonun Breslow kalınlığını vermeyeceğinden, patolojik değerlendirmede yetersiz kalacaktır.

### **1.8.1. Preoperatif Hazırlık**

T1 lezyonu olan asemptomatik hastalara BT, MR ya da sintigrafi yapılmasının gereği ya da yararı yoktur. Evre IB ve daha geç evrelerde rutin akciğer grafisi yapılmalıdır. Evre III, IV ya da yakınmaları olan hastalara karaciğer fonksiyon testleri (özellikle LDH) ve radyolojik testlerin yapılması gerekmektedir.

### **1.8.2. Eksizyonel Biyopsi**

Minimal morbidite ile, lokal anestezi altında biyopsi alınmalıdır. 1-2 mm'lik sağlam doku ile lezyon eliptik insizyon ile eksize edilmeli ve primer suture edilmelidir. Bazı cerrahlar aynı seansta frozen sonucuna göre tümör kalınlığını belirleyip cerrahi tedaviyi tamamlamaktadırlar. Ancak bu yöntem genel olarak kabul görmemiştir.

### **1.8.3. İnsizyonel Biyopsi**

İnsizyonel biyopsi sonrası yapılan geniş eksizyonun yineleme oranını arttırdığı yönünde sonuçlar elde edilmiş, ancak bu çalışmalar geçerli bulunmamıştır. İnsizyonel biyopsi ancak çok büyük ya da subungual lezyonlarda tercih edilmelidir. İnsizyonel biyopsinin rutin kullanımı mikroevrelemede yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olacaktır. Yüz lezyonlarında kozmetik kaygı olması nedeniyle, insizyonel biyopsi yapılabilir. Kama (wedge) şeklinde alınan örnek mutlaka normal cilt dokusu, subkutan doku ve lezyonun orta bölümünü içermelidir.

### **1.8.4. Rezeksiyonda cerrahi sınırlar**

Melanomda rezeksiyon derinliği muskuler fasyayı içermeyecek şekilde olmalıdır. Cerrahi sınırlar her zaman tartışma konusu olmuştur. Cerrahi sınırın tanımı lezyonun gözle görünür kenarından radyal uzaklık olarak belirtilmiştir. Patologlar, primer lezyonun etrafında bulunan, bırakıldığı zaman lokal yineleme ya da metastaza neden olan malign hücrelerin lezyona uzaklığını incelemişlerdir. Geniş eksizyonlar bu hücrelerin bölgede bırakılma olasılığını düşürmektedir. Gözle görünen tümör kenarının 1 cm etrafında malign hücre kalıntıları saptanmıştır. Bazı histopatolojik veriler, 5 cm mesafeye kadar malign hücrelerin bulunabileceğini göstermektedir. Eksizyonun genişliği, primer tümörün kalınlığına göre belirlenmelidir. Gereğinden büyük rezeksiyonlar fonksiyonel, kozmetik ve ekonomik olarak dezavantajlar getirmektedir. Bu nedenle minimal rezeksiyon sınırlarının belirlenmesi son derece önemlidir. Lokal yinelemenin tanımı; insizyon yerine ya da cilt greftine 3 ila 5 cm



uzaklıkta tümörün yeniden ortaya çıkmasıdır. Lokal yineleme nadir gözlenmektedir. Lokal yinelemenin en az görüldüğü tümör bölgeleri üst ekstremitelerdir. Üst ekstremiteleri, gövde ve alt ekstremiteler takip etmektedir. Ülserasyon varlığında lokal yineleme rölatif riski 6.3 kez artmaktadır. Baş-boyun tümörlerinde ise diğer bölgelere göre risk 9.4 kez artmaktadır. 1970 yılında Breslow ve Macht 2 mm'den az derinliğe sahip tümörlerin 3-5 cm geniş sınırla rezeke edilmeleri gerektiğini bildirmişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1 mm'nin altındaki tümörlerin 1 cm sınırla rezeke edilmesi önerilmiştir. Geniş randomize çalışmalar sonucunda 1-4 mm arasındaki lezyonların rezeksiyon sınırı 2 cm olarak standardize edilmiştir. İn-situ lezyonlar için yapılmış randomize çalışmalar olmamakla birlikte, yapılan retrospektif çalışmalarda bu lezyonların rezeksiyonu sonrasında lokal yineleme tespit edilmemiştir. İn-situ lezyonların rezeksiyon sınırı 0.5 cm olarak belirlenmiştir (19).

### **1.8.5. Elektif Lenf Nodu Diseksiyonu (ELND)**

ELND üzerinde uzun yıllar tartışılmıştır. Melanomun yayılım şekli ve biyolojisi bu tartışmalar içinde önem kazanmıştır. Melanom hücrelerinin yakın lenf nodlarına drene olduktan sonra mı sistemik dolaşıma katıldıkları, yoksa Fisher'in öne sürdüğü gibi, nodal tutulumun sistemik hastalığın bir göstergesi olup olmadığı tartışmalıdır.

ELND adayları primer tümör kalınlığına göre belirlenmiştir. Primer tümörü 1 mm'den ince olan hastalarda tam kür olasılığı %98'dir. Bu hastalar ELND'den fayda görmemekle birlikte ameliyat sonrası morbiditeye sahip olacaklardır. Primer lezyonu 4 mm'den büyük olan hastaların ise tanı anında yaklaşık %70'inde uzak metastaz bulunmaktadır. Bu hastalar da ELND için iyi adaylar değildirler. ELND den fayda görebilecek grup, orta kalınlıkta lezyona sahip hastalardan oluşmaktadır. Bu konuda birçok çalışma yapılmıştır ancak sonuçlar çelişkilidir. Tutulan lenf nodu sayısının sağkalımı etkileyen en önemli faktör olması nedeniyle, ELND'nin tanısal amaçlı kullanılması savunulmuştur. Gecikmiş lenf nodu diseksiyonu ile karşılaştırıldığında ELND'nin 5 yıllık sağkalımı artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca rejyonel lenf nodu tutulumunun bilinmesi adjuvan interferon tedavisi için uygun hasta grubunun belirlenmesinde önem taşımaktadır. ELND faydalarına rağmen son derece morbiditesi olan bir operasyondur. Patolojik incelemelerde lenf nodunun %80'inin negatif çıkması hastaların büyük bir çoğunluğunun prosedürden fayda görmediklerini, göstermektedir. Bu konuda yapılan çalışmaların birçoğu retrospektif ve elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Cascinelli ve ark. elektif ve gecikmiş lenf adenektomiyi karşılaştırdıkları randomize çalışmalarında lenfadenektomiden sadece lenf nodu pozitif hastaların fayda

gördüğü sonucuna varmışlardır. Sentinel lenf nodu diseksiyonu tekniğinin bulunmasıyla bu veriler önem kazanmıştır. Lenf nodu diseksiyonundan fayda görmeyecek hastalar böylelikle bu operasyonun morbiditesinden kurtulmuşlardır (19).

### **1.8.6. Sentinel lenf nodu biyopsisi**

Sentinel lenf nodu biyopsisi, evreleme ve olası tedavi yöntemidir ve melanom yinelemesi ve sağkalımının en güçlü prediktörüdür. Önce drene eden nodların haritasını çıkarmak için lenfosintigrafi kullanılmaktadır. Sentinel lenf nodu biyopsisi, bir lenfatik bölgeyi drene eden ilk lenf nodunun o bölgedeki melanom varlığı hakkında tahmin yürütülebilmesine dayanır. Eğer melanom hücresi bulunmuyorsa ek bir cerrahi rezeksiyon gerekmemektedir, ancak nodda melanom hücresi varlığı saptanırsa bu bölgedeki artıklar temizlenmelidir (34).

Sentinel lenf nodunun durumunun saptanması birçok açıdan gereklidir. SLN'nin bağımsız bir prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir: Pozitif bir sonuç, tedavi başarısızlığı için yüksek risk oluşturur. Nispeten düşük riskli bir işlemdir ve komple lenfadenektomi veya adjuvan interferon alfa-2b tedavisi gibi ek tedavilerden fayda görebilecek olan yüksek riskli hastaların tanımlanmasında yardımcı olur. Sentinel lenf nodu biyopsisi metastaz göstermeyen hastalar için psikolojik bir avantaj sağlar. Sentinel lenf nodu biyopsisi için pozitif sonuçlar AJCC T1 melanomları için %5'ten az olduğu için, çoğu ince melanomda sentinel lenf nodu biyopsisi düşük verimli bir yöntemdir. Bu tekniğin seçimi için en uygun Breslow kriterleri henüz tanımlanmış değildir (34,35).

### **1.8.7. İnterferon ile adjuvan tedavi**

Adjuvan tedavi verilecek hastaların belirlenmesi için hastaların evreleri ve prognostik durumları göz önüne alınarak hastalar, "az-, orta-, yüksek- ve çok yüksek-riskli" gruplara ayrılmışlardır. Yüksek riskli hastalarda 5 yıllık yineleme ve ölüm riski %50'yi geçmektedir. Melanomda IFN veya diğer ajanlar kullanılarak adjuvan tedavi yapılacak hastalar yineleme riski yüksek olan hastalar (Evre IIB ve III) ve orta derece yineleme riskine sahip hastalar (Evre IIA) olarak belirlenmiştir. AJCC Evre I hastalarda yineleme riski oldukça düşüktür. Hastalısız ve genel sağkalım süreleri bu hastalarda iyidir. Bu nedenle Evre I hastalar adjuvan tedaviden fayda görmezler (19).

### **1.8.8. Kemoterapi**

Sistemik kemoterapi öncelikle ileri Evre III (rezeke edilemeyen bölgesel metastaz) veya Evre IV (uzak metastaz) melanomu olan hastalarda kullanılır. Çoğu kemoterapi ilaçlarının çok fazla etkili olmamasına rağmen, ileri melanomun tedavisinde tek FDA onaylı ilaç olan dacarbazine en aktif ilaç gibi görünmektedir. Yanıt oranı %10-20'dir ve deride, cilt altı dokular veya lenf nodu metastazı olan hastalarda genellikle daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir. Diğer kombine kemoterapi ve biyokemoterapi rejimleriyle daha yüksek yanıt oranları elde edebilir, ancak kalıcı remisyon sağlayabileceklermiş gibi görünmemektedirler (29).

### **1.8.9. Biyolojik Tedavi**

İmmün sistemi melanoma karşı uyarmaya yönelik tedaviler son yıllarda büyük ilgi toplamıştır. Interlökin-2 (IL-2) tekli ajan olarak metastatik melanomda kullanılmıştır. Bir çalışmada, hastaların %7'sinde kalıcı bir tam yanıt saptanmıştır: Hastaların tedavi başladıktan sonra 8 yıla kadar hastalısız sağkalımları görülmüştür (36). Rosenberg ve ark. hastadan alınan tümör infiltre edici lenfositlerin geri verilmesi ve IL-2 ile tedavi sonucunda pozitif sonuçlar göstermiştir. Monoklonal antikor tedavileri hala deneysel aşamadır ve melanom tedavisinde kullanılabilirler.

Benzer şekilde, melanom aşıları belirli melanom antijenlerine karşı yanıtı uyarmak için geliştirilmiştir. Aşı ile ilgili klinik çalışmalar sürmektedir.

### **1.8.10. Perfüzyon Kemoterapisi**

İzole ekstremitte perfüzyonu ekstremitelerdeki melanom için kullanılmaktadır. İzole ekstremitte perfüzyonunda, ekstremitte bir turnike ile sistemik dolaşımdan arteriyel ve venöz kanülasyon kullanılarak izole edilir. Bu yöntemde, kemoterapi ilacı oksijenatör pompa vasıtasıyla infüze edilir, sonrasında ilaç ekstremiteden uzaklaştırılır. Lokal yineleme gösteren veya ekstremitte metastazlarında bu tedavi en etkili yöntem olarak geliştirilmiştir. İlaç infüzyonu için kullanılan ilaçlar, dacarbazine, melphalan, sisplatin, karboplatin, thiotepa ve sitokin tümör nekroz faktörü- $\alpha$  içerir (37).

### **1.8.11. Radyoterapi**

Radyoterapi Evre IV hastalığı olan bazı hastalarda palyatif amaçlı kullanılır. Belirli endikasyonlar arasında beyin metastazı ve kemik ağrısı yer almaktadır.

## 1.9. Takip

Melanom hastalarının düzenli takibinin hedefi yineleme ya da ikinci bir melanom gelişiminin saptanmasıdır. Her ziyaret ayrıntılı bir öykü, fizik muayene içermelidir. Evre I veya II melanomu olan hastaların çoğu için bu takip ilk 2 yıl için her 3 ayda bir, sonraki 3 yıl için 6 ayda bir, ondan sonra yıllık planlanması tavsiye edilir. Eğer hastada displastik nevüs varsa, takip aralığı her 6 ayda bir süresiz olarak devam edebilir. Atipik nevüslerin fotoğrafının çekilmesi klinik olarak takipte yararlı olabilir. Hastalar ayrıca eğitilmeli ve aylık olarak kendi cilt muayenelerini yapmaları için teşvik edilmelidir. Uzmanlar, 1940'larda 5 yıllık sağkalım %40 dolayındayken, bunun günümüzde %86'ya çıkmış olmasının erken tanı yöntemlerinin gelişmesine borçlu olduğumuzu vurgulamakta ve hem hekimlerin hem de halkın melanomun erken belirtilerini tanıyıp en kısa zamanda uygun dermatolojik değerlendirme ve tedaviye başvurmalarını önermektedirler (2).

## 2. TÜMÖRÜ İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLER

Tümör infiltre edici lenfositler (TIL) antijen spesifik B hücrelerini, NK hücrelerini, adaptif immün efektör hücrelerini ve immün supresif hücreleri içerir ve tümör hücrelerinin öldürülmesi ile tümör regresyonundan sorumlu hücrelerdir (38).

### 2.1. TIL kavramının gelişimi

Malign tümörlerde değişik sayılarda lenfositlerin varlığının fark edilmesinin üzerinden 100 seneden fazla geçmiştir. Bu lenfositler daha sonra tümör infiltre edici lenfositler (TIL) olarak tanımlanmıştır. İlk başta bu TIL'lerin kanserde kronik bir inflamasyonu gösterdiği düşünülmüş, daha sonra TIL'lerin kanser büyümesi için iyi bir çevre mi yarattıkları, yoksa kansere karşı bir host cevabı olarak mı ortaya çıktıkları tartışılmıştır (39). Prognoz ile immün hücre infiltrasyonu arasında ilk defa 1949'da meme kanseri olguları üzerinde kurulabilmiştir (40). 1969'da Clark ve ark. ilk defa primer cilt melanomunda lenfosit infiltrasyonunu tanımlamışlardır (41). Daha sonra bu bulgunun prognostik önem taşıdığı gösterilmiştir. Primer melanomlarında orta ile yüksek düzeyde lenfosit infiltrasyonu olan hastaların 5 yıllık sağkalımları üç kat artmıştır. Elder ve ark. lenfositik infiltrasyonunu “canlı”, “canlı olmayan” ve “yok” diye sınıflandırmış ve TIL'lerin sadece vertikal büyüme fazında prognostik önemde olduğunu göstermiştir (42). Buna karşın TIL yayılımının, in situ veya invaziv olup olmamasından bağımsız olarak, radyal büyüme fazındaki melanomlarda prognoza katkısının olmadığı gösterilmiştir. TIL canlılığının T2-T4 primer kutanöz melanomlarda prognostik olduğu ve çok kalın lezyonlarda (T4) prognostik olmadığı gösterilmiştir. Hem 5-10 yıllık sağkalımların hem de lenf nodu metastaz olasılıklarının TIL sayıları ile ters orantıda olduğu gösterilmiştir. Teknik kısıtlıklar nedeniyle o dönemlerde yapılan çalışmalarda TIL'ler için immünofenotipleme yapılmamıştır ve dolayısıyla TIL bileşen ve fonksiyonlarındaki farklar araştırılmamıştır (43).

### 2.2. TIL hedefleri ve tanınma mekanizmaları

T hücrelerinin tanıdığı antijenler (Ag) peptid ve polimorfik hücre yüzey proteinlerinden oluşan ve peptid ile bağlantıya peptid bağlama oluşu ile giren “*major histocompatibility complex*” (MHC) antijenleridir. CD4 helper T hücreleri en az 13 amino asit uzunluğundaki ve MHC II (HLA DR, DP, DQ) tarafından sunulan peptidleri tanırken CD8 sitotoksik lenfositler (CTL'ler) 8-10 amino asit uzunluğundaki ve MHC I (HLA A, B,C)

antijenleri tarafından sunulan peptidleri tanır (44). MHC I antijenleri tüm çekirdekli hücrelerde eksprese olmaktadır ve bundan dolayı tümör hücrelerini de içeren geniş bir dağılım gösterir. Tümör hücrelerindeki ekspresyon tümör progresyonu sırasında kaybolabilmektedir. MHC II antijenlerin ekspresyonu profesyonel antijen sunan hücrelere (APC) (makrofaj, dentritik hücre ve B hücreler) sınırlıdır, ancak tümör hücrelerinde de bazen değişik bir şekilde eksprese olmaları peritümöral infiltrasyon veya direkt neoplastik transformasyonun bir sonucu olarak görülebilir. Gerçekten de çok sayıda melanom MHC II moleküllerini eksprese eder ve interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ile tedavi, çoğu melanomda MHC II ekspresyonunu indükleyebilir (44).

Normalde çekirdekli hücrelerin MHC I eksprese etmeleri ve inflamatuvar bir çevrede MHC II Ag'lerinin upregüle edebilmelerinin yanında, aslında APC'ler hem MHC II hem de T hücre ko-stimülatör molekül ekspresyonları sayesinde en iyi T hücre yanıtı oluşturabilen hücrelerdir. Bundan dolayı çok sayıda çalışma APC'lerin, özellikle de DC'lerin, fonksiyonlarını artırmayı hedeflemektedir.

Melanom peptid Ag'lerin idantifiye edilmesi: cDNA ekspresyon kütüphanelerinin melanom-reaktif T hücreleri için taranması, pürifiye HLA moleküllerinden elüe edildikten sonra kütle spektrometri ve genomik sekanstan ön görülmesidir. Bu tekniklerin kullanımı sonucu melanomda çeşitli Ag sınıfları gözlenmiştir. Bunlar otolog tümör-spesifik (ör.  $\beta$ -katenin geninde özel nokta mutasyonlarını içerir), doku-spesifik (ör. MART-1) ve ortak kanser-spesifik (ör. MAGE ailesi) Ag'lerini içerir. Ancak immün sistemin bu çeşitli Ag'lere nasıl değişik yanıtlar verdiği henüz kesin ortaya konulmamıştır (45).

### **2.3. Melanom TIL'lerinin T hücre reseptör (TCR) repertuarı**

Birçok çalışmada T hücreleri tarafından melanom tümör Ag'lerinin tanınmasında TCR variable (V) genlerinin rollerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Ancak sonuçlar çelişkilidir, bu belki de tümör immünitelerinin karmaşıklığını ortaya koymaktadır. Artık değişik T hücre alt gruplarının nasıl etkin bir anti-tümör cevabına katıldığı ve bu hücrelerin fonksiyonel karakteristiklerinin araştırılması, TIL'lerin TCR repertuar analizinin önemini gölgede bırakmıştır (46).

### **2.4. TIL'lerin immünofenotipleri**

TIL'lerin kompozisyonu ağırlıklı olarak T hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Kanserler arası farklılıktan çok hastalar arasındaki farklılıktan kaynaklanan geniş bir aralıkta

eksprese olmaktadır. Bazı hastalarda CD4+ T hücreleri %90 oranında temsil edilirken diğer hastalarda %90 oranında CD8+ T hücreleri görülmektedir (43).

Periferik kan lökositlerinin % 20-30 kadarını lenfositler, periferik kandaki lenfositlerin de %70-80'ini de T lenfositleri oluştururlar. T lenfositleri, timusta geliştikleri ve timus bağımlı hücreler oldukları için "T hücreleri" adını alırlar. İmmün cevabı başlatan antijene spesifik efektör yanıtı oluştururlar. Çeşitli çözünür maddeler üreterek diğer lökosit aktivitelerini de regüle ederler. Lenfositlerin efektör ve regülatör olmak üzere iki ayrı fonksiyonu vardır:

1. Efektör fonksiyonları;

Hücrel sitotoksinite,

Hücrel immünite (geç tip aşırı duyarlılık).

2. Regülatör fonksiyonları;

B ve T hücrelerin, monosit ve makrofajların aktivitesini artırmak,

İmmün yanıtı baskılamak,

Sitokin salgılamak

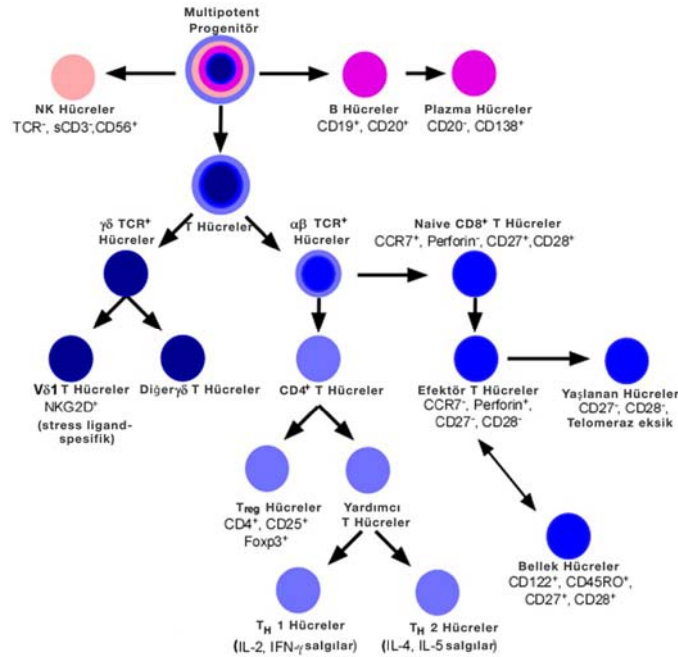
İmmünglobulinlerle yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik göstermesine karşın, hiçbir zaman salgılanmazlar. Etkilerini direkt temas veya diğer immün hücrelerin aktivitelerini etkileyerek gösterirler. İmmün sistem, tümör rejeksiyonunda kritik bir role sahiptir ve T lenfositleri, etkili bir tümör immün yanıtın gelişmesinde en önemli hücrelerdir. Bu nedenle, tümörlü olgularda pek çok immün tedavi modeli, T hücre yanıtının aktivasyonuna odaklanmaktadır (7-11). Lenfosit altgruplarının neoplazilerde immünoregülatör role sahip oldukları bilinmektedir. İyi işlev gören bir immün sistem tümörlere karşı konakçı savunma mekanizmalarının işletilmesinde gereklidir. Yine iyi görev yapan bir immün sistem sadece terapötik anlamda değil prognostik anlamda da (lenfosit aberrasyonlarının kötü bir prognoz kriteri olabileceği gibi) bir kriter kabul edilebilir.

Melanomda daha ince, regrese olan lezyonlarda CD4+ TIL'ler  $T_{H1}$  CD4+ hücreleri için tipik olan sitokinleri (IFN- $\gamma$ , lenfotoksin, IL-15, IL-2) salgılamakta, daha kalın, regrese olmayan lezyonlarda çok sayıda  $T_{H2}$  veya T regülatör CD4+ hücreleri TGF- $\beta$  ve IL-10 salgılamakta.  $T_{H1}$  hücrelerin güçlü hücre aracılı immün yanıtları geliştirdiği ve  $T_{H2}$  hücrelerin de alerjik yanıt ve/veya immünsüpresif faktörleri salgıladığı göz önünde bulundurulursa bu değişik hücre alt grupların dağılımları tümör mikroçevreyi etkilemesi beklenir (22). Regülatör T hücreleri de TIL'lerin içerisindeki CD4+ T hücrelerin CD25+/FoxP3+ olan bir alt grubudur (47).

Kısıtlı çalışmalarda yüksek seviyede B TIL'leri bazı kanser tiplerinde iyi prognoz göstergesi olduğu bulunmuştur. Ancak hümmoral immünitenin melanomdaki önemi daha çok

araştırılmalıdır, çünkü bugüne kadar olan çalışmalarda Ig depozitleri ve B hücrelerinin tümör mikroçevresinde nadir görüldüğü gösterilmiştir (48). NK hücreleri yine melanom TIL'ler arasında nadir görülen hücrelerdir. Diğer bir nadir hücre alt grubu da  $\gamma\delta$  T hücre ailesidir (49).

Şekil 2 lenfoid hücrelerin alt gruplarını göstermektedir (43). Tablo 4'te TIL immünofenotiplemesini ayrıntılı incelemek için önerilen markerler görülmektedir. İmmünofenotiplemenin artık rahatça ve ayrıntılı kullanılabilmesiyle gelecek çalışmalar TIL'lerin kompozisyonunun en az "canlılığı" kadar önemli olduğunu gösterebilecektir (43).



Şekil 2: Lenfoid hücrelerin alt grupları

Tablo 4: TIL immünofenotiplemesinde önerilen markerlar

Marker	Özgüllük
<b>Foxp3</b>	CD3, CD4 ve CD 27 ile birlikte Treg'leri belirleyebilir.
<b>CD27</b>	CD3, CD4 ve Foxp3 ile birlikte Treg'leri belirleyebilir. CD3, CD8, CD28 ve KLRG1, CD57 gibi markerlarla birlikte CD8+ T hücrelerin farklılaşma düzeylerini belirleyebilir.
<b>CD3 ve CD5</b>	T hücre alt gruplarını belirler. CD5 negatif boyanması ve CD3 yüzey boyanması NK türü belirteci olarak kullanılabilir.
<b>CD8</b>	T hücrelerinin sitotoksik tipinin belirteçidir.
<b>CD4</b>	T hücrelerinin regülatör ya da yardımcı tipinin belirteçidir.
<b>CD28</b>	CD3, CD8, CD27 ve KLRG1, CD57 gibi markerlarla birlikte CD8+ T hücrelerin farklılaşma düzeylerini belirleyebilir.
<b>CD57 ve KLRG1</b>	CD3, CD8, CD28 ve CD27 gibi markerlarla birlikte CD8+ T hücrelerin farklılaşma düzeylerini belirleyebilir. Bu markerlarla boyanmada CD5 varlığı, CD3 yüzey ve TCR boyanması NK türünü belirler.
<b>Vdelta 1 gamma delta TCR</b>	Korunmuş TCR ile MICA/B stres ligandlarına bağlanabilen gamma delta T hücre alt gruplarını belirler



<b>Pan-<math>\gamma\delta</math> TCR</b>	$\gamma\delta$ T hücrelerinin alt gruplarının belirteci
<b>Pan-<math>\alpha\beta</math> TCR</b>	$\alpha\beta$ T hücrelerinin alt gruplarının belirteci
<b>CD20</b>	B hücre tiplerinin oldukça spesifik bir belirteci. CD19 (sadece flowsitometride), PAX5, yüzey Ig (BCR) gibi markerlarla birlikte B hücreleri belirlemede kullanılabilir.
<b>CD16 ve CD56</b>	CD2, CD7 ve NK hücre reseptörleri örneğin; KLRG1 ile birlikte NK hücreleri belirlemede kullanılabilir. NK hücreleri CD5, yüzey CD3 (sCD3) ya da yüzey TCR ekspres etmezler.
<b>CD25 (IL2-R<math>\alpha</math>)</b>	Az ekspresyonu T hücre aktivasyon belirteçidir. Diğer markerlarla (Foxp3, CD27, CD4) birlikte güçlü CD25 ekspresyonu Treg'leri tanımlar.
<b>CD69 (Leu 23)</b>	T hücrelerdeki aktivasyon belirteçidir. TCR (212) ile aktive edilerek T hücrelerinde bulunur.
<b>CD122 (IL-2R<math>\beta</math>)</b>	T hücrelerinin önceki Ag maruziyetinin belirteçidir. Ayrıca, NK hücreleri tarafından da salgılanır.
<b>CD79a</b>	Tüm B hücrelerinin farklılaşma basamakları için belirteçtir. Pozitif boyanma normal kemik iliği B hücre öncüllerinden terminal olarak farklılaşmış plazma hücrelerine doğru gözlenir.
<b>CD138</b>	CD38 ve CD 79a ile birlikte plazma hücrelerinin belirteçidir. CD138 pozitif boyanan hücreler terminal olarak farklılaşmıştır, PAX5 ve CD20 için boyanmazlar ve CD45 için negatif olabilirler.
<b>CD45RO/ CD45RA</b>	Lökosit ortak antijeninin izotipidir. CD122 gibi, CD45RO önceki antijen maruziyetinin gösterilmesi için kullanılabilir.
<b>Perforin/ Granzym</b>	Sitotoksik granül ilişkili moleküllerdir. Efektör T hücrelerinde (çoğunluklaCD8+) belirlenir.
<b>NKG2D</b>	İmmünsağkalım fonksiyonlu bazı hücreler tarafından salgılanan stres ligand reseptör/kostimülator molekülüdür.

### 3. T REGÜLATÖR HÜCRELERİ (Treg)

Tümör infiltrate edici lenfositler antijen spesifik B hücrelerini, NK hücrelerini, adaptif immün efektör hücrelerini ve immün süpresif hücreleri içerir. Süpresör hücreler ilk defa 1970'lerde tanımlanmış ve Ag spesifik oldukları ve bir kez aktive olunca CD4+ hücreleri hedefleyip hem humoral hem hücrel immünitenin gelişmesini ve aktivasyonunu durdurduğu düşünülmüştür. Fenotipik belirteçlerin keşfi ile yaklaşık 20 yıl sonra otoimmün hastalıklara karşı toleransı düzenleyen (IL)-2 reseptör  $\alpha$ -zinciri(CD25) eksprese eden CD4+ hücreleri gösterilmiştir. Bu Treg'ler periferdeki naiv CD4+ T hücrelerinin %5-10'nunu oluşturmaktadır.

Timus kaynaklı Treg'ler sitokine bağımsız olmasıyla karakterize olan doğal Treg'lerdir ve kolayca yüksek CD4 ve CD25 ekspresyonları ile tanınır (50). Bu hücrelerin majör fonksiyonu otoimmün yanıtıdır. Regülatör T hücreleri hem doğal hem de kazanılmış immüniteyi uyarabilirler. Süpresyonun çeşitli aşamalarını etkileyerek otoimmün hastalıklar, organ transplantasyonu, enfeksiyon hastalıkları, alerji ve kanser gibi hastalıklarda da etkilidirler. Kanserde tümör hücreleri, doğal ve kazanılmış immünite arasındaki bağlantılar antitümör immün yanıt açısından önemlidir (3,12,13). Doğal Treg'ler kanda da bulunur ve fonksiyonlarını gösterdikleri perifere göç ederler. Periferde 'adaptive' Treg 'leri CD4+CD25- hücrelerden gelişebilir ve bu hücreler self ve nonself antijenlere karşı etkilidir. Antijene spesifik 'adaptive' Tregler doğal Treglerle ortak immünohistokimyasal özellikler taşır, bunun yanında apoptoza daha yatkındırlar ve çeşitli sitokinler gibi sağkalım faktörlerine ihtiyaçları vardır (38,51). Tregler antijen spesifik helper CD4+ ve sitotoksik CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonu ve sitokin üretimini durdurur.

FOXP3 (forkhead box P3 transcription factor) CD4+CD25+ hücrelerin süpresör olan bölümünü ortaya çıkarmaya yardımcı oldu. Farede sadece Treg'lerde eksprese olan FOXP3, 'forkheadwinged helix' transkripsiyon faktör geninin ürünüdür ve Treg'lerin en güvenilir belirteçidir.

Doğal Treg'lerin süpresör mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte membrana bağlı TGF- $\beta$  ile, sitokin salınımı ile (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35), cAMP ve ekstrasellüler adenosin sinyalleşmesiyle hücre-hücre etkileşimi ile olduğu düşünülmektedir. İndüklenebilir Treg'ler fonksiyonları açısından doğal Treg'lere çok benzerler, ancak periferde FOXP3 negatif naiv T hücrelerinden spesifik uyarılarla farklılaşır. Bir kez uyarılınca bu hücreler FOXP3, sitotoksik T lenfosit Ag-4 (CTLA-4) ve IL-10 eksprese ederler (50).

#### 4. S100B proteini

S100B kalsiyum bağlama motifi içeren calmodulin/parvalbumin/troponin C süperailisine ait bir proteindir. İki alt birimin homodimer ve heterodimerleri olarak bulunur. İntrasellüler ve ekstrasellüler düzenleyici görevleri vardır. Hücre içinde enzim düzenlenmesi, kalsiyum homeostazı, hücre iskeleti hareketi, hücre büyüme ve farklılaşması ve immünolojik rolleri vardır. Ekstrasellüler olarak S100 proteininin; inflamatuvar hücreler, astrositler, nöronlar, mikroglia, endotel ve epitelyal hücreler üzerine düzenleyici ve uyarıcı etkileri vardır (17).

S100 protein ailesi birçok alt molekülden oluşmaktadır; S100A1-14, S100B, S100P, S100Z, calbindin, profilaggrin, trychohyalin, repetin. S100 gen ekspresyonunda kanser, kardiyovasküler ve cilt hastalıkları gibi birçok patolojide bozukluklar gösterilmiştir. Yaklaşık 20 sene önce melanom hücrelerinin S100 proteininin solubl formunu salgılayabildikleri ve daha sonra da gliyom ve nöroblastom gibi tümörlerde de S100 proteininin varlığı gösterilmiştir. Tümörün içerisinde S100B yüksekliği malign melanomun yanı sıra tiroid karsinomu ve renal hücreli karsinomda gösterilmiştir ve S100B'nin yoğunluğunun direkt malignite derecesi ile korele olduğu bulunmuştur. Ayrıca S100B ekspresyonu ile sağkalım süresi arasında da ters ilişki vardır. S100B in vitro şartlarda protein kinaz ile p53'ün kalsiyum bağımlı fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Bunun sonucunda melanom ve diğer tümörlerde de önemli olan p53 tümör süpresör mekanizmaları baskılanır ve kontrolsüz tümör büyümesi gelişir. Serum S100B'nin malign melanom takibinde yararlılığı gösterilmiş ve klinik kullanımı olan bir biyomarker olmuştur. Özellikle metastatik melanomda S100B yükselişi hastalısız ve total sağkalım sürelerinin kısalması ile orantılıdır. Dolaşımdaki S100B yüksekliği kötü prognozun güçlü bir göstergesidir. Ayrıca S100B malign melanomun çeşitli evrelerinde de prognostik değerdedir. Ancak S100B yüksekliği maalesef malign melanom için spesifik değildir. Dolaşımdaki anormal seviyelerini karaciğer, böbrek, çeşitli inflamatuvar ve enfeksiyon hastalıklarında görebiliriz (52).

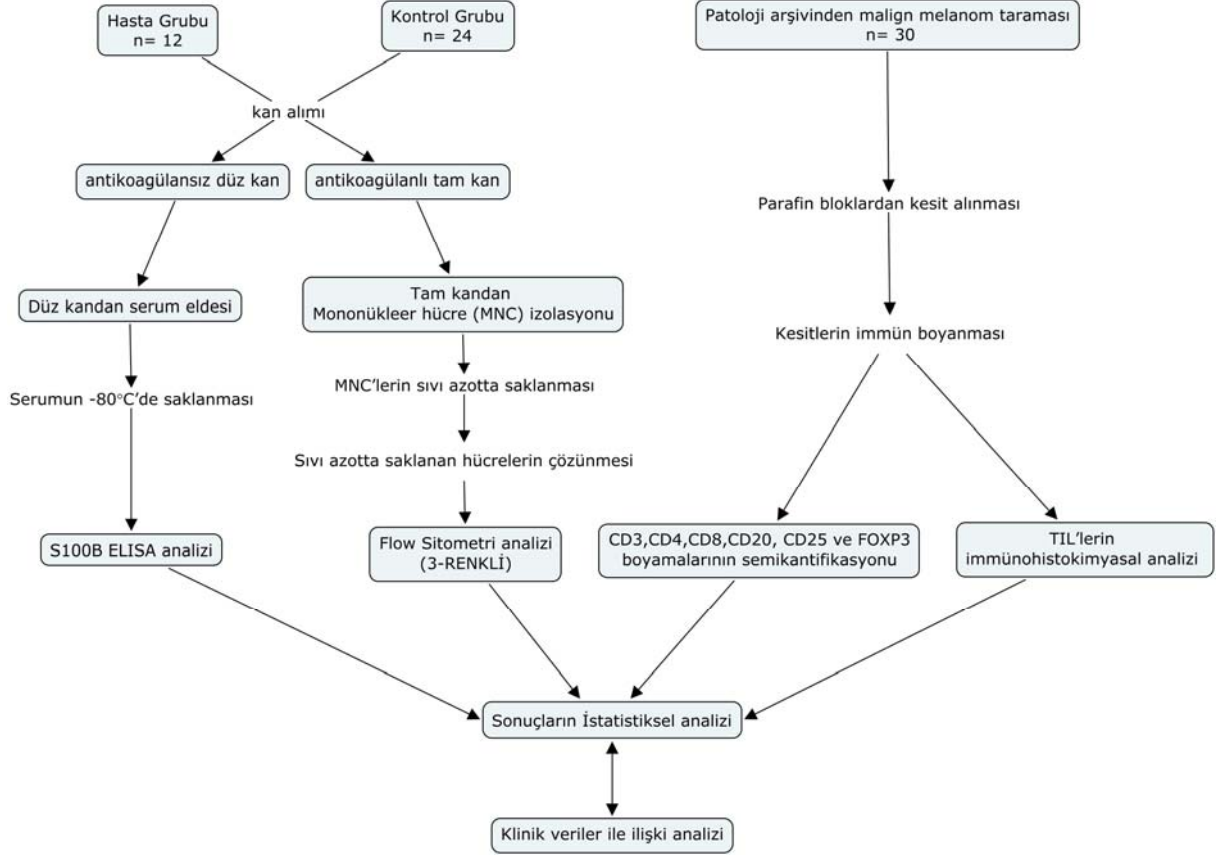
S100B'nin malign melanomda gösterilmiş yararlılıkları:

- Evreleme
- Prognoz tahmin edilmesi
- Tedavi başarısının ölçümü
- Yinelemenin öngörülmesi

S100B bağımsız prognostik bir markerdir ve tedavi öncesi dolaşımdaki konsantrasyonları hastanın sağkalım süresini tahmin edilmesinde yararlıdır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Tezde yapılan çalışmaların akış şeması Şekil 3'te verilmektedir.



Şekil 3: Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması

#### 1. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan hasta kan örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Polikliniğine Ağustos 2008 - Ağustos 2009 tarihleri arasında başvuran malign melanom hastalarından, kontrol kan örnekleri ise mamoplasti, rinoplasti gibi elektif cerrahi girişimler uygulanmak üzere başvuran hastalardan alındı. DEÜTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 05.Haziran.2008 tarih ve 221/2006 sayılı izni (EK.1) ile hastalardan ve kontrol olgularından aydınlatılmış onam (EK.2 ve EK.3) alındıktan sonra standart protokollere (53) göre serum ve sıvı azotta

mononükleer hücre (MNC) arşivi oluşturuldu. Çalışmaya 12 yeni malign melanom olgusu ile 24 kontrol bireyin kanları dahil edildi.

Ayrıca DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı (AD) arşivinden 2003-2009 yılları arasında tanı konulan 30 malign melanom olgusunun blokları yeniden değerlendirilerek (bu olguların 10'u kanlarını da analiz ettiğimiz yeni vakalardı) immünohistokimyasal incelemelerde bulunuldu.

## **2. Örnek toplanması**

### **2.1. Serum**

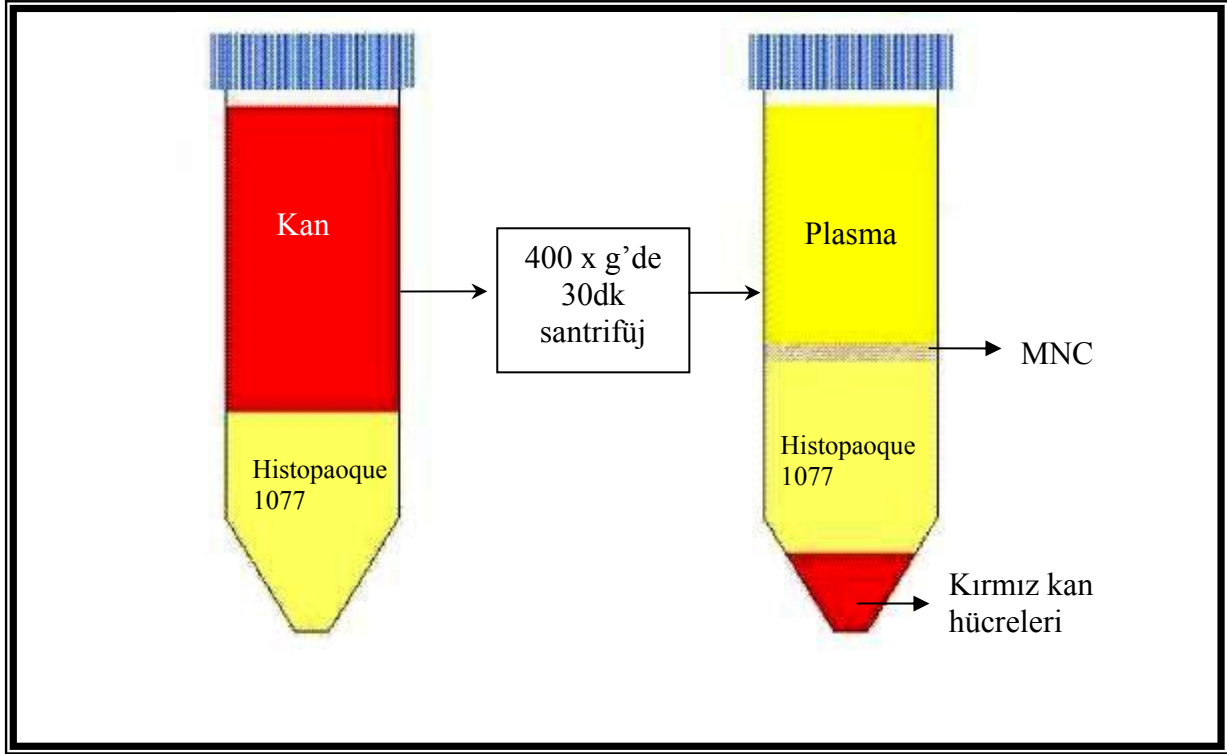
Serum eldesi için örnekler 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek serum ayrılıp, daha sonraki ELISA analizleri için, porsiyonlanarak -80°C'de saklandı.

### **2.2. Tam kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu**

Periferik kandan standart yöntemlerle MNC izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde yoğunluğu 1,077 g/ml'ye ayarlanmış polisükröz ve sodyum diatrizoat solüsyonu (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Antikoagülanlı kan örneği Histopaque üzerinde tabakalandırıldıktan sonra 1650 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan interfaz tabakasındaki MNC'ler alındı. PBS ile yıkama sonrası örneklerden hücre sayımı gerçekleştirildi.

#### ***Yöntem:***

1. Dibi konik santrifüj tüpüne 3.0 ml Histopaque-1077 ilave edilip ve oda ısısına gelmesi beklendi.
2. Histopaque-1077 üzerine 3.0 ml tam kan tabakalandırıldı.
3. Oda ısısında 30 dakika 400 x g'de (~1600 rpm) santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra dikkatlice bir pastör pipetiyle mononükleer hücre içeren opak interfaz tabakasını (Şekil 4) üst kısımdan 0.5 ml içinde aspire edildi.
5. Opak interfaz tabakayı dibi konik temiz bir konik santrifüj tüpüne transfer edildi.
6. Bu tüpe 7-8 ml %10 FBS'li RPMI-1640 ilave edilip, yavaşça karıştırıldı.
7. 250 g'de (~1200 rpm) 5 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatantı aspire ederek atıldı (Ficoll-paque'ın tamamen uzaklaştırılması).
9. 6, 7 ve 8. basamaklar tekrar edildi.



Şekil 4: Santrifüjden sonra tüpte görülen dört tabaka

### 2.3. Mononükleer Hücrelerin Dondurulması (Cryopreservation)

Hasta örneklerinden elde edilen MNC'ler daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için dondurulmuştur.

#### ***Gereç ve Solüsyonlar:***

- 1) Isı ile inaktive edilmiş fetal dana serumu (FBS / Biological Ind, 04-001-1B)
- 2) Dimetilsülfoksit (DMSO, D-2650, Sigma Chemical Co. Irvine, UK)
- 3) RPMI-1640 medium (Biological Ind, 01-100-1A)
- 4) Sıvı azota dayanıklı dondurma tüpleri (375418, Nunc Brand Products, Denmark)
- 5) Steril, dibi konik 12 ml'lik tüp (CellStar Greiner Labortechnik, 164 160)
- 6) Soğutmalı santrifüj, J6-MI (Beckman)
- 7) Sıvı nitrojen tankı (MVE Cryo System 4000, USA)

*Dondurma ortamı (Freezing medium):* %10 DMSO, %20 FBS içeren RPMI-1640. Hücreleri süspansiyon etmeden önce dondurma ortamı buzdolabında +4°C'ye soğutulmaktadır.

### **Yöntem:**

- 1) Son yıkamadan sonra hücre pelleti 2 ml +4°C'de soğutulmuş dondurma ortamıyla (%70 ortam,%20 FBS,%10 DMSO) resüspanse edilerek, dondurma tüplerine 1'er ml olacak şekilde porsiyonlandı.
- 2) Dondurma tüpleri kontrollü soğutucu içinde -80°C'lik dondurucuya konup, ertesi gün sıvı azota (-196°C) kaldırıldı.

## **2.4. Sıvı Azotta Dondurulan Hücrelerin Çözündürülmesi**

Sıvı azot arşivinden çıkarılan hücreler, hızla 37°C su banyosunda hafifçe sallayarak çözüldü. Hücre süspansiyonunda küçük buz kristalleri olduğu anda su banyosundan çıkarıldı. Tüpün dışı alkolle silindikten sonra hücreler 10 ml'lik steril dibi konik tüpe aktarıldı. İki dakika içinde hafifçe tüpü sallayarak damla damla soğuk (4°C) RPMI-1640 ilave edildi. Hücre süspansiyonu 200 g'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde döndürüldü. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler, PBS içinde süspanse edildi.

## **2.5. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Testi**

Hücre süspansiyonunda bulunan ölü hücreler özgün olmayan antikor bağlanmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle hücreler mikroboncuk bağlı antikor ile işaretlemeye önce % 0.4'lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi. Test, canlı hücrelerin boyayı membranlarından içeri geçirmeme prensibine dayanmaktadır. Kısaca, bire bir oranında hücre süspansiyonu örneği ile tripan mavisi lam üzerinde hafifçe karıştırıldı. Yaklaşık 2-3 dakika bekletildikten sonra ışık mikroskopunda en az 200 hücre sayıldı. Tripan mavisi ile boyanmayan hücrelerin yüzdesi hesaplandı. Tüm hücrelerde canlılık testi % 95'in üzerindeydi.

## **3. Flow Sitometrik Analiz**

Fluoresans işaretli monoklonal antikorlar yardımıyla hücre yüzey ve nükleer boyama yapılmıştır. Aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan örnekler flow sitometri cihazı BD FACSCalibur Flow Cytometer, 2008 (BD Biosciences) ve BD CellQuest Pro Version 6.0 The Premier Acquisition & Analysis Software'i kullanılarak değerlendirildi. Antikorlar (Tablo 5) üretici firmanın önerdiği miktarlarda kullanıldı.

**Tablo 5:** Flow sitometride kullanılan gereçler

	<b>İsim</b>	<b>Katalog No.</b>	<b>Şehir/Ülke</b>
1.	BD Pharmingen™ FITC Mouse Anti-Human CD4	BD 555346	San Diego, CA, USA
2.	BD Pharmingen™ FITC Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD 555748	San Diego, CA, USA
3.	BD Pharmingen™ PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD8	BD 341050	San Diego, CA, USA
4.	BD Pharmingen™ PerCP-Cy™5.5 Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD 552834	San Diego, CA, USA
5.	BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD25	BD 555434	San Diego, CA, USA
6.	BD Pharmingen™ APC-Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD 555751	San Diego, CA, USA
7.	BD Pharmingen™ PE Mouse anti-Human FOXP3	BD 560082	San Diego, CA, USA
8.	BD Pharmingen™ PE Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD 555749	San Diego, CA, USA
9.	BD Pharmingen™ Human FOXP3 Buffer Set	BD 560098	San Diego, CA, USA
10.	BD Pharmingen™ Stain Buffer (FBS)	BD 554656	San Diego, CA, USA
11.	BD Falcon 12x75mm,5ml polystyrene tube	BD 352052	Bedford, MA, USA
12.	BD FACSTFlow Optimized sheath fluid	BD 342003	San Jose, CA, USA
13.	BD CellWASH	BD 349524	San Jose, CA, USA
14.	BD FACSCalibur Flow Cytometer	BD 342 975	San Jose, CA, USA
15.	BD CellQuest Pro Version 6.0 The Premier Acquisition & Analysis Software		San Jose, CA, USA



**Yöntem:**

1. BD Pharmingen Buffer Seti'ndeki Bufferlar kullanımdan önce dolaptan çıkarılarak oda ısısına getirildi.
2. Hastalardan hazırlanan periferik kan MNC'leri BD Pharmingen Stain Buffer ile  $10^5$  hücre olacak şekilde sulandırıldı.
3. Test tüplerine 100  $\mu$ l MNC konuldu ve üzerine 20'şer  $\mu$ l CD4-FITC, CD8-PerCP-Cy5.5 ve CD25- APC monoklonal antikorları ilave edildi. Başka bir test tüpüne ise aynı şekilde antikorların izotipik kontrolleri eklendi. Vorteks edilerek oda ısısında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
4. 2 ml wash buffer eklendi ve 250xg hızda 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Sonraki basamaklar için Human FOXP3 Buffer A ve Buffer C hazırlandı:
  - a. Buffer A: 10X Buffer A 1:10 distile suyla sulandırıldı.
  - b. Buffer C: Buffer B 1/50 oranında Buffer A ile sulandırıldı.
6. Hücreleri fikse etmek için tüpte kalan hücre pelleti nazikçe kaldırıldı ve üzerine 2 ml Buffer A eklendi. Vorteks edilerek oda ısısında ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyonun sonunda hücreler 500xg'de 5 dakika santrifüj edilerek fiksatif uzaklaştırılır. İşlem sırasında pelletin kalkmamasına özen gösterildi.
8. Hücreleri yıkamak için tüplere 2 ml BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) eklendi ve pellet nazikçe kaldırıldı. 5 dakika süresince 500xg'de santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırıldı.
9. Hücreleri geçirgen hale getirmek için tüpte kalan hücre pelleti nazikçe kaldırıldıktan sonra üzerine 0,5 ml Buffer C eklendi. Vorteks edilerek oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
10. Hücreleri yıkamak için tüplere 2 ml BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) eklendi ve pellet nazikçe kaldırıldı. 5 dakika süresince 500xg'de santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırıldı.
11. Tüplere 20  $\mu$ l FOXP3 antikor ve başka bir test tüpüne aynı şekilde antikorun izotipik kontrolü eklendi. Vorteks edilerek oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

12. Hücreleri yıkamak için tüplere 2 ml BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) eklendi ve pellet nazıkçe kaldırıldı. 5 dakika süresince 500xg'de santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırıldı.
13. Tüplerde kalan hücre pelleti 500 µl wash buffer ile kaldırıldı ve hemen analize geçildi.

### ***Çok Renkli Flow Sitometri Analiz İşlemi:***

Flow sitometri cihazında hücrelerden elde edilen veriler kullanılarak 10 ayrı hücre görüntüsü (7dot plot ve 3 histogram) ve izotipik kontrol görüntüleri oluşturuldu.

**1.dot plot**→ Dar açılı ışık saçılımı (FSC) ile 90° açıyla ışık saçılım (SSC) parametresi kullanılarak oluşturulan görüntüde hücre boyutu ve granülaritesi kontrol edildi. Lenfositler ayırt edilerek kapı alındı.

**2.dot plot**→ CD4-FITC'in ışıma verdiği fluoresans-1 (FL1)'e karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta granülariteye bağlı hücrelerin CD4 ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile belirlenen eşik değerinin üzerindeki fluoresans ışımaları CD4+ hücreler kabul edildi. Bu hücreler üzerinde işaretleme yaparak hücrelerin yüzde olarak ne kadarının CD4 eksprese ettiği belirlendi.

**İzotipik kontrol dot plot**→APC ve PE fluoresans boyanmanın yanında otofluoresans veya özgün olmayan bağlanmaya bağlı zemin boyanmasını elemek için kullanıldı.

**3.dot plot**→ CD4 kapısı kullanılarak CD25-APC (FL4)'e karşı FOXP3-PE (FL2) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD25 ve FOXP3 ekspresyonları değerlendirildi. CD4 pozitif hücreler bu görüntüye tanıtılmasıyla CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı.

**4.dot plot**→ Lenfosit kapısı üzerinde CD4-FITC (FL1)'e karşı CD8-PerCP-Cy5.5 (FL3) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD4 ve CD8 ekspresyon oranları değerlendirildi.

**5.dot plot**→ Lenfosit kapısı üzerinde CD4-FITC (FL1)'e karşı CD25-APC (FL4) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD4

pozitifliği gösteren hücreler CD25 ekspresyonuna göre şu şekilde üçe ayrıldı:  $CD4^+CD25^-$ ,  $CD4^+CD25^{++}$  ve  $CD4^+CD25^{high}$

Histogramlar yardımıyla  $CD4^+$  ve  $FOXP3^+$  olan hücrelerde CD25 ekspresyonları analiz edildi.

**İzotipik kontrol histogram**→ Yerleştirilen markerlar histogramlardaki gerçek pozitif hücre popülasyonunu bulmaya yardımcı olur.

**1.histogram**→ 5. dot plottaki 1. grubu oluşturan  $CD4^+CD25^-$  hücrelerde  $FOXP3$  pozitifliği, histogramda izotipik kontrol ile oluşturulan markere göre, yüzde değer olarak saptandı.

**2.histogram**→ 5. dot plottaki 2. grubu oluşturan  $CD4^+CD25^{++}$  hücrelerde  $FOXP3$  pozitifliği, histogramda izotipik kontrol ile oluşturulan markere göre, yüzde değer olarak saptandı.

**3.histogram**→ 5. dot plottaki 3. grubu oluşturan  $CD4^+CD25^{high}$  hücrelerde  $FOXP3$  pozitifliği, histogramda izotipik kontrol ile oluşturulan markere göre, yüzde değer olarak saptandı.

**6.dot plot**→  $CD8$ -PerCP-Cy5.5'in ışıma verdiği  $FL3$ 'e karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta granülariteye bağlı hücrelerin  $CD8$  ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile belirlenen eşik değerin üzerindeki fluoresans ışımaları  $CD8^+$  hücreler kabul edildi.

**7.dot plot**→  $CD8$  kapısı kullanılarak  $CD25$ -APC ( $FL4$ )'e karşı  $FOXP3$ -PE ( $FL2$ ) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde  $CD25$  ve  $FOXP3$  ekspresyonları değerlendirildi.  $CD8$  pozitif hücreler bu görüntüye tanıtılmasıyla  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı.

#### 4. ELİSA Analizi

S100B konsantrasyonu “sandwich” enzim immunoassay yöntemiyle tayin edildi. İnsan S100B ELISA kitinin (Biovendor, Heidelberg, Almanya) kullanım bilgilerine göre kalibratörler, kalite kontrolleri ve hasta serumları poliklonal anti-sığır S100B antikor kaplı mikrotitrasyon kuyucuklarında 120 dakika inkübe edildi. Bu sürede mevcut tüm S100B

molekülleri kaplı ve detektör antikorlara bağlandı. İnkübasyon ve yıkama sonrasında, horseradish peroksidaz (HRP) işaretli monoklonal anti-insan S100B antikoru kuyulara eklendi ve yakalanmış S100B ile inkübe edildi. Doksan dakika inkübasyon ve başka bir yıkama adımından sonra, kalan konjugatın tetrametilbenzidin (TMB) substratı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyonuna izin verildi.

Reaksiyon asidik solüsyon ile durduruldu ve çıkan sarı renk ürünü spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçüldü. Horseradish peroxidase renk substratı tetrametilbenzidin (TMB)'ni renksiz bir solüsyondan mavi (veya stop reaktifi eklendikten sonra sarı) bir solüsyona dönmesini katalize eder. Absorbans S100B konsantrasyonu ile orantılıdır. S100B standartları ile elde edilen standart grafik yardımıyla hastalarda spektrofotometrik olarak ölçülen absorbanslara karşılık gelen S100B konsantrasyonları hesaplandı.

Kullanılan kitin duyarlılığı 20pg/mL'dir ve seçiciliği test edilmiş olup insan S100A1; S100P, S100Z, nöroglobin ve GFAP'e karşı çapraz reaktivite göstermediği belirtilmiştir.

### ***Yöntem prosedürü***

1. Örnek ve standartlar kuyucuklara 100'er µL pipetlendi.
2. Plak kapatıcı film ile kaplanarak çalkalayıcıda (300 rpm) oda ısısında iki saat inkübe edildi.
3. Kuyucuklar üç kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
4. Kuyucuklara 100'er µL streptavidin-peroksidaz konjugat pipetlendi.
5. Plak kapatıcı film ile kaplanarak çalkalayıcıda (300 rpm) oda ısısında 90 dakika inkübe edildi.
6. Kuyucuklar beş kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
7. Kuyucuklara 100'er µL TMB substratı pipetlendi.
8. Plak kapatıcı film ile kaplanarak oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
9. Kuyucuklara 100'er µL stop solüsyonu pipetlendi.
10. Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucu ile 450 nm'de ölçüldü.

Konsantrasyonları 50-2000 pg/ml arasında olan S100B standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri ile kantitasyon yapıldı.

## 5. İmmünohistokimya

Her hastadan histolojik kriterleri karşılayan ve H&E boyama ile en fazla tümörü temsil eden doku blokları seçildi. Belirlenen bloklardan CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak belirlemek amacıyla 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak poli-L-lizin kaplı lamlar üzerine yerleştirildi. Standart streptavidin-biotin immünoperoksidaz metodu CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3 antikorları (Tablo 6) ile uygulandı.

**Tablo 6:** İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar.

Antikor	İsim	Klonu	Firma ve Katalog No	Şehir/Ülke
Anti-CD3	RABBIT ANTI-HUMAN CD3 MONOCLONAL (CLONE SP7)	SP7	Spring, M3074	Fremont, CA, USA
Anti- CD20	CD 20 RABBIT MONOCLONAL ANTIBODY (CLONE SP32)	SP32	Spring, M3324	Fremont, CA, USA
Anti-CD4	CD4 mouse monoclonal antibody	4B12	Novocastra, ncl-CD4-368	Newcastle, UK
Anti-CD8	CD8 (SP16)	SP16	Neomarker, RM-9116-	Cheshire, UK
Anti- CD25	Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Interleukin-2 Receptor	4C9	Novocastra, NCL-CD25-305	Newcastle, UK
Anti-FOXP3	FOXP3 antibody [236A/E7]	236A/E7	Abcam, ab20034	Cambridge, MA, USA

### Kullanılan antikorlar:

- CD3: T lenfositler için
- CD20: B lenfositleri için
- CD4: T helper lenfositler için
- CD8: T sitotoksik lenfositler için
- CD25: T regülatör lenfositler için
- FOXP3: T regülatör lenfositler için

Kısaca doku kesitleri ksilende deparafinize edilerek, %100, %95 ve %90'lık alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi ve distile suda bekletildi. Endojen peroksidaz aktivitesi, PBS'teki %0,3 lük hidrojen peroksit solüsyonunda oda ısısında 10 dakika bekletilme ve TRIS tamponuyla yıkama sonucu bloklandı. Primer antikorlar ile oda ısısında 60 dakika süreyle inkübe edildi ve TRIS tampon ile yıkandı.

Bağlayıcı antikor (Multi-species Ultra Streptavidin detection system-HRP; Signet, Massachusetts, USA) ile streptavidin peroksidaz kompleksi (DAKO LSAB Kit, K-0675, Carpintera, USA) ardışık olarak eklenip 10 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra TRIS tampon ile yıkandı. Renk vererek peroksidaz aktivitesinin görüntülemesini sağlamak amacıyla 5 dakika süreyle %0,03'lük 3,3-diaminobenzidin (DAB) kromojeniyle muamele edildi.

Kesitler deiyonize suda yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile karşıt boyama yapıp kapatılma işlemleri yapıldı. Tüm antikorların immünolojik boyanmalarında tonsilla palatina pozitif kontrol dokusu olarak ve primer antikor ile TRIS tamponun yer değiştirmesi de negatif kontrol olarak kullanıldı.

### **İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi**

Histolojik kriterleri en çok karşılayan alan seçilerek ışık mikroskopunda (Nikon, Tokyo, Japan) değerlendirildi. Işık mikroskopunda küçük büyütmede (100x) bütün tümör alanları tarandı ve her bir antikor için boyanan hücrelerin tüm tümör hücrelerine olan oranı x200 büyütmede yüzde ile belirtildi. Stromal sitoplazmik CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve nükleer FOXP3 ekspresyonları Hussein ve ark. (38) ile Mourmouras ve ark. (16)'ın yöntemleri modifiye edilerek semikantitatif olarak skorlandı. Buna göre pozitif boyanan hücrelerin yüzdelere göre skorlamalar;  $\leq 5=0$ ,  $5-25=1$ ,  $26-50=2$ ,  $51-75=3$  ve  $>76=4$ . FOXP3 ekspresyonunda skorlama yerine, pozitif boyanan hücre yüzdeleri kullanıldı.

## **6. İstatistiksel Analizler**

### **6.1. Verilerin Kaydedilmesi**

Analizlerden elde edilen veriler “Microsoft Excel 2003” ticari programı kullanılarak kaydedildi.

### **6.2. Veri Alanları Tanımı ve Verilerin Kantitatif Hale Dönüştürülmesi**

İstatistiksel değerlendirme öncesinde; “olgu bilgi formundan” elde edilen tüm verilerin düzenlemesi yapıldı. Veriler kantitatif hale getirildi; uygun olmayanlar veriler ise yarı kantitatif hale getirildi.

### **6.3. Verilerin Analizi , Tablo ve Grafiklerle Gösterilmesi**

İstatistiksel değerlendirmeler, tablo hazırlama ve grafik çizimi için “Excel 2003” ve “SPSS for Windows 11.0” ticari programlar kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel değerlendirmelerde; grup ortalamalarını karşılaştırmak için non-parametrik bir test olan “Mann Whitney U testi” , regresyon analizi için “Spearman’s Rho korelasyon testi” kullanıldı. Tüm analizlerde p değerinin 0,05’ten küçük olduğu değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Sonuçların Tablo ile gösteriminde “tanımlayıcı” ve “çapraz” Tablolar; grafik ile gösteriminde “kutu“, ve “gruplanmış bar” grafikleri kullanıldı.

## 4. BULGULAR

---

Araştırmada kullanılan hasta kan rnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD polikliniğine Ağustos 2008-Ağustos 2009 tarihleri arasında başvuran malign melanom hastalarından, kontroller ise mamoplasti, rinoplasti gibi elektif cerrahiler için başvuran hastalardan alındı. DEÜTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunun 05.Haziran.2008 tarih ve 221/2006 sayılı izni (EK.1) ile hastalardan ve kontrollerden aydınlatılmış onayı (EK.2 ve EK.3) alındıktan sonra standart protokollere (53) göre serum ve sıvı azotta mononükleer hücre (MNC) arşivi oluşturuldu. Çalışmaya 12 yeni malign melanom olgusu ile 24 kontrol bireyin kanları dahil edildi. Ayrıca DEÜTF Hastanesi, Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 2003-2009 yılları arasında tanı konulan 30 malign melanom olgusunun blokları çıkarılarak immünhistokimyasal incelemelerde bulunuldu. Kanları alınan 10 hastanın patoloji blokları da bunların arasındaydı.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol gruplarına ait demografik özellikleri sırasıyla Tablo 7 ve 8'de verilmektedir.



**Tablo 7:** Çalışmaya dahil edilen malign melanom olgularının demografik verileri

Örnek No	Yaş	Cinsiyet	Örnek cinsi: Kan	Örnek cinsi: Doku	Örnek alınma Tarihi
Hasta 1	66	E	+	+	04.09.2008
Hasta 2	55	E	+	+	06.10.2008
Hasta 3	40	K	+	—	20.10.2008
Hasta 4	74	E	+	+	10.11.2008
Hasta 5	81	E	+	+	10.11.2008
Hasta 6	40	E	+	+	28.11.2008
Hasta 7	54	E	+	+	23.12.2008
Hasta 8	64	E	+	+	02.03.2009
Hasta 9	37	E	+	+	03.03.2009
Hasta 10	50	E	+	—	14.05.2009
Hasta 11	45	E	+	+	01.07.2009
Hasta 12	64	E	+	+	27.07.2009
Hasta 13	35	K	—	+	01.07.2009
Hasta 14	32	E	—	+	07.04.2004
Hasta 15	49	K	—	+	11.05.2009
Hasta 16	79	K	—	+	02.01.2005
Hasta 17	61	K	—	+	07.04.2008
Hasta 18	37	E	—	+	12.02.2008
Hasta 19	71	K	—	+	16.09.2008
Hasta 20	44	K	—	+	11.11.2007
Hasta 21	80	E	—	+	21.03.2007
Hasta 22	63	K	—	+	01.11.2007
Hasta 23	75	E	—	+	01.09.2007
Hasta 24	64	E	—	+	05.07.2007
Hasta 25	46	K	—	+	01.02.2006
Hasta 26	53	K	—	+	11.07.2007
Hasta 27	32	K	—	+	01.04.2007
Hasta 28	43	K	—	+	11.07.2006
Hasta 29	71	K	—	+	01.02.2006
Hasta 30	69	K	—	+	20.11.2005
Hasta 31	60	K	—	+	17.06.2003
Hasta 32	74	E	—	+	14.01.2003

E:erkek, K:kadın

**Tablo 8:** Çalışmaya dahil edilen sağlıklı kontrol olgularının demografik verileri.

Örnek No	Yaş	Cinsiyet	Kan alınma tarihi
Kontrol 1	64	E	27.07.2009
Kontrol 2	55	E	27.07.2009
Kontrol 3	54	K	27.07.2009
Kontrol 4	70	K	27.07.2009
Kontrol 5	49	E	29.07.2009
Kontrol 6	25	E	29.07.2009
Kontrol 7	50	E	29.07.2009
Kontrol 8	40	E	29.07.2009
Kontrol 9	55	K	31.07.2009
Kontrol 10	76	E	31.07.2009
Kontrol 11	58	E	31.07.2009
Kontrol 12	77	E	31.07.2009
Kontrol 13	45	E	31.07.2009
Kontrol 14	60	K	31.07.2009
Kontrol 15	32	E	04.08.2009
Kontrol 16	34	K	04.08.2009
Kontrol 17	40	K	04.08.2009
Kontrol 18	79	E	04.08.2009
Kontrol 19	27	E	06.08.2009
Kontrol 20	68	E	06.08.2009
Kontrol 21	31	E	06.08.2009
Kontrol 22	52	E	06.08.2009
Kontrol 23	62	E	06.08.2009
Kontrol 24	70	E	07.08.2009

E: erkek, K: kadın

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarını oluşturan olguların cinsiyete göre dağılımları Tablo 9'da gösterilmiştir. Gruplar uygun cinsiyet dağılımı göstermekte olup gruplar arasında fark yoktur ( $p=0.094$ ).

**Tablo 9:** Grupların cinsiyete göre dağılımı.

			Cinsiyet		Toplam
			Erkek	Kadın	
Grup	Hasta	Sayı	17	15	32
		Yüzde	%53,1	%46,9	%100,0
	Kontrol	Sayı	18	6	24
		Yüzde	%75,0	%25,0	%100,0
Toplam	Sayı	35	21	56	
	Yüzde	%62,5	%37,5	%100,0	

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarını oluşturan olguların yaş ortalamasına göre dağılımı Tablo 10’da gösterilmektedir. Gruplar yine yaş ortalaması bakımından uygun dağılım göstermektedir (p=0.431).

**Tablo 10:** Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı.

Grup	Yaş ortalaması	Standart Sapma	Sayı
Hasta	56,50	15,23	32
Kontrol	53,04	18,12	24
Toplam	54,77	16,51	56

## 1. ELISA analizi Yöntemi ile elde edilen S100B sonuçları

Konsantrasyonları 50-2000 pg/ml arasında olan S100B standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri ile kantitasyon yapıldı. Sonuçlar Tablo 11, 12 ve Tablo 13'te görülmektedir.

**Tablo 11:** Hastaların S100B Analizi Sonuçları

Örnek no	S100B (pg/mL)
Hasta 1	138,80
Hasta 2	260,80
Hasta 3	54,80
Hasta 4	1210,80
Hasta 5	738,80
Hasta 6	48,80
Hasta 7	632,80
Hasta 8	376,80
Hasta 9	90,80
Hasta 10	2934,80
Hasta 11	180,80
Hasta 12	88,80
<b>Ortalama</b>	<b>563,13</b>

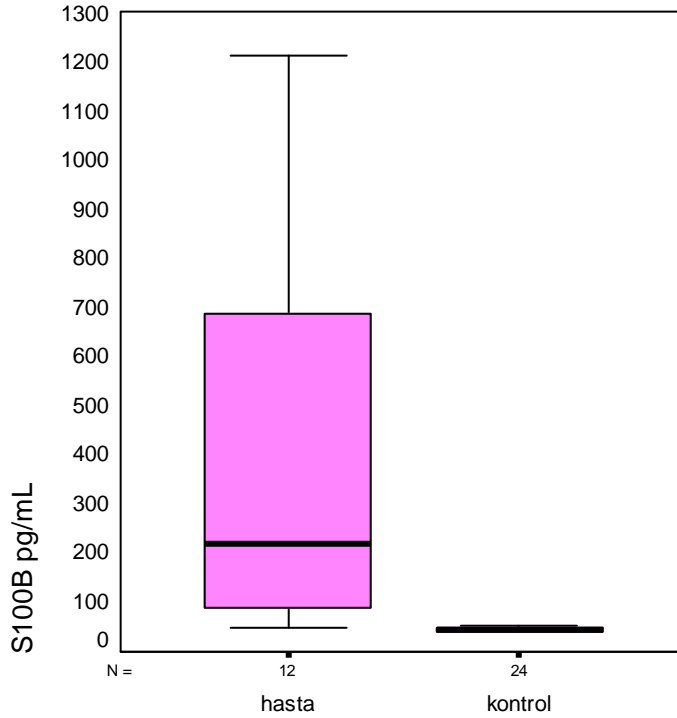
**Tablo 12:** Sağlıklı kontrollerin S100B Analizi Sonuçları

Örnek no	S100B (pg/mL)
Kontrol 1	38,80
Kontrol 2	42,80
Kontrol 3	48,80
Kontrol 4	58,80
Kontrol 5	44,80
Kontrol 6	42,80
Kontrol 7	38,80
Kontrol 8	38,80
Kontrol 9	40,80
Kontrol 10	46,80
Kontrol 11	48,80
Kontrol 12	44,80
Kontrol 13	42,80
Kontrol 14	48,80
Kontrol 15	42,80
Kontrol 16	44,80
Kontrol 17	38,80
Kontrol 18	44,80
Kontrol 19	46,80
Kontrol 20	42,80
Kontrol 21	54,80
Kontrol 22	40,80
Kontrol 23	38,80
Kontrol 24	38,80
<b>Ortalama</b>	<b>44,22</b>

**Tablo 13:** S100B analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırması

		<b>S100B</b>
<b>Hasta</b>	Ortalama	563,13
	Sayı	12
	<b>Standart Sapma</b>	825,91
	Min.	48,80
	Max.	1210,80
<b>Kontrol</b>	Ortalama	44,21
	Sayı	24
	<b>Standart Sapma</b>	5,16
	Min.	38,80
	Max.	58,80
<b>Toplam</b>	Ortalama	217,19
	Sayı	36
	<b>Standart Sapma</b>	525,31
	Min.	38,80
	Max.	1210,80
<b>Mann-Whitney U</b>		5
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,001

S100B ortalamaları hasta grubunda 563,13 pg/ml ve kontrol grubunda 44,22 pg/ml olup fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ) (şekil 5).

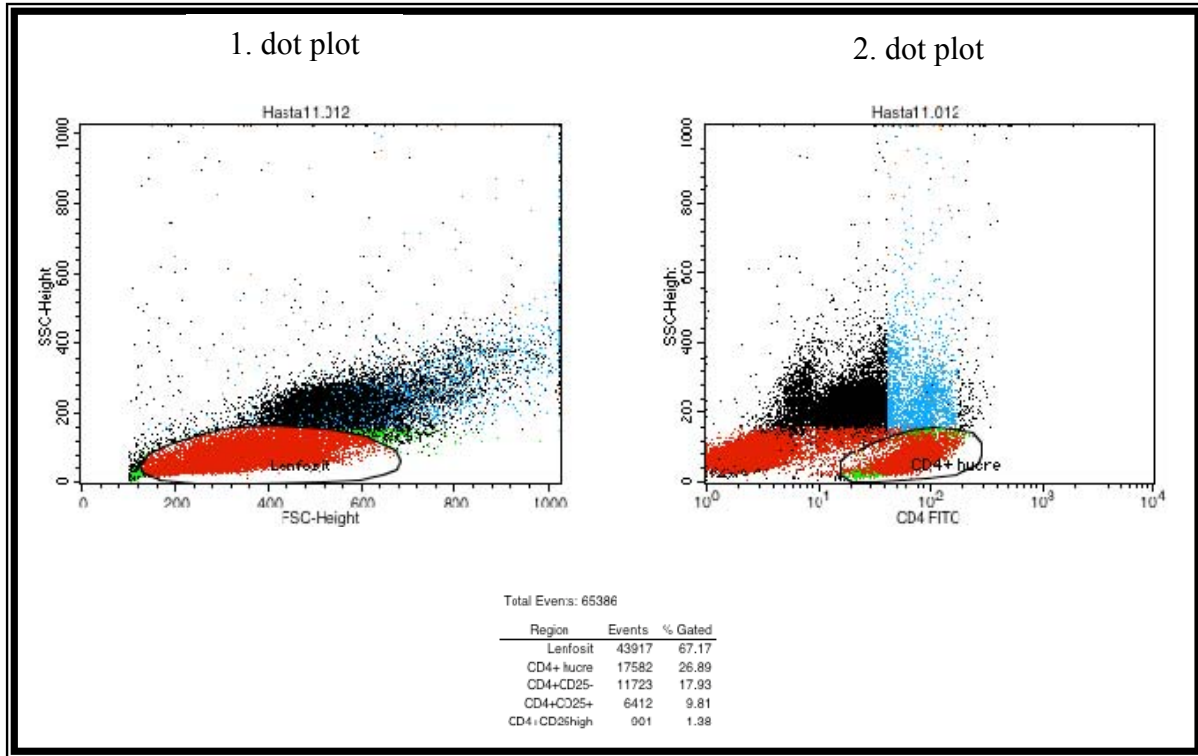


**Şekil 5:** Hasta ve kontrol grubunda S100B düzeylerinin kutu grafiği ile gösterilmesi

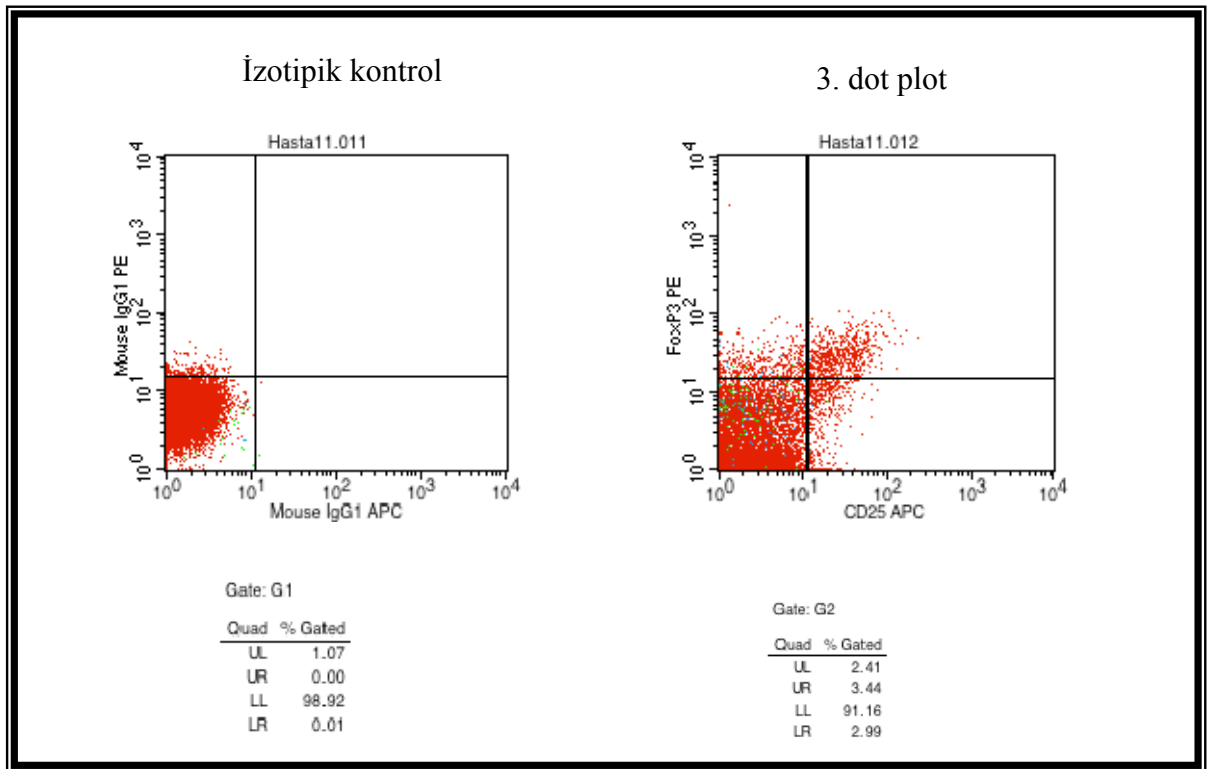
## 2. Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

Flow sitometrik analizler, dual argon ve diyot lazer sistemli FACSCalibur Flow Cytometer, 2008 (BD Biosciences) flow sitometri cihazı ve CellQuest acquisition/analysis software'ı kullanılarak gerçekleştirildi. Flow sitometri cihazında elde edilen veriler kullanılarak 10 ayrı hücre görüntüsü (7dot plot ve 3 histogram) oluşturuldu. Şekil 6 ve 7'de hasta ve kontrol grubunu temsil eden birer örnekte yapılan analizler görülmektedir.

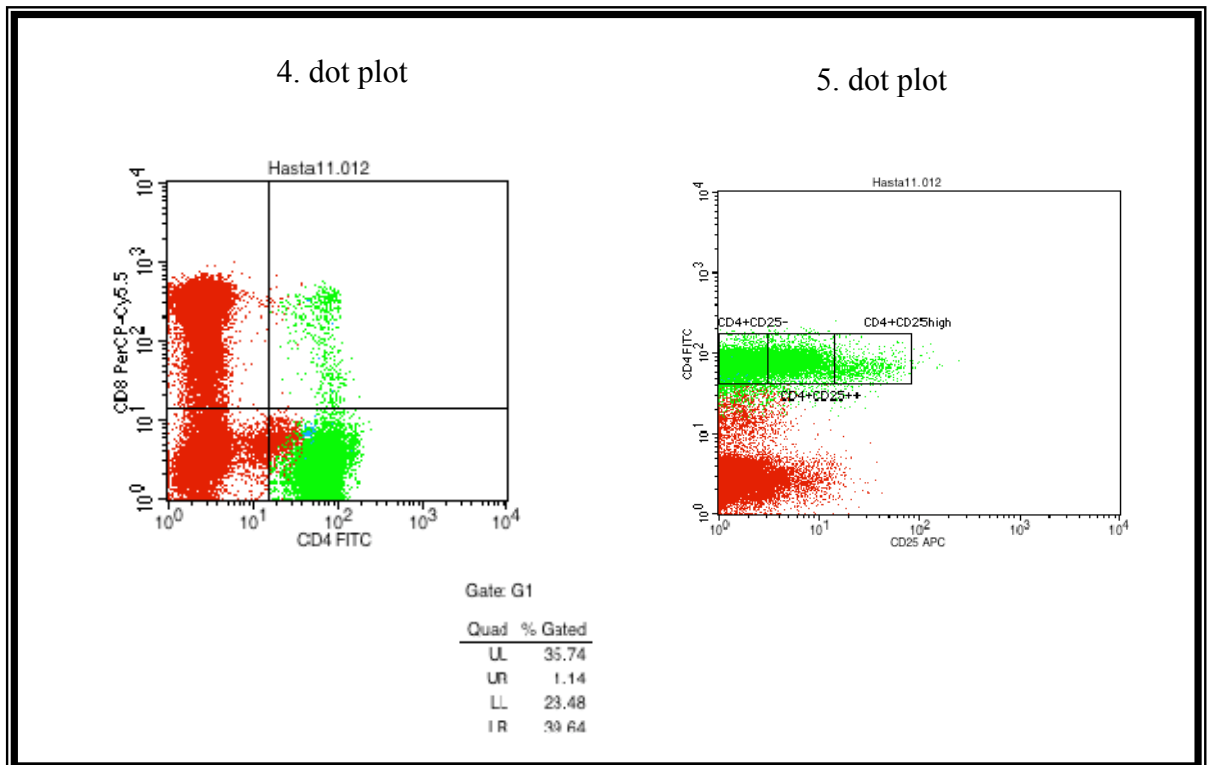
Şekil 6-a Örnek hastadaki dot plot ve histogram görüntüleri



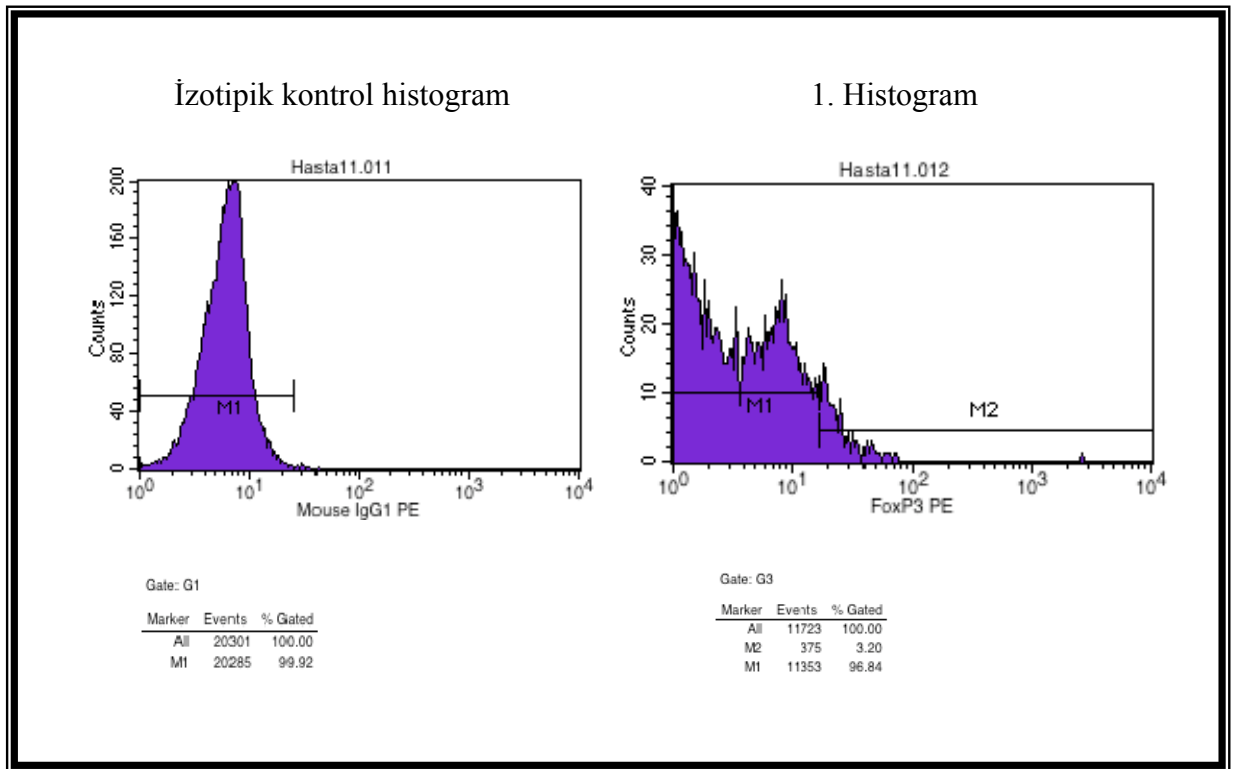
Şekil 6-b:



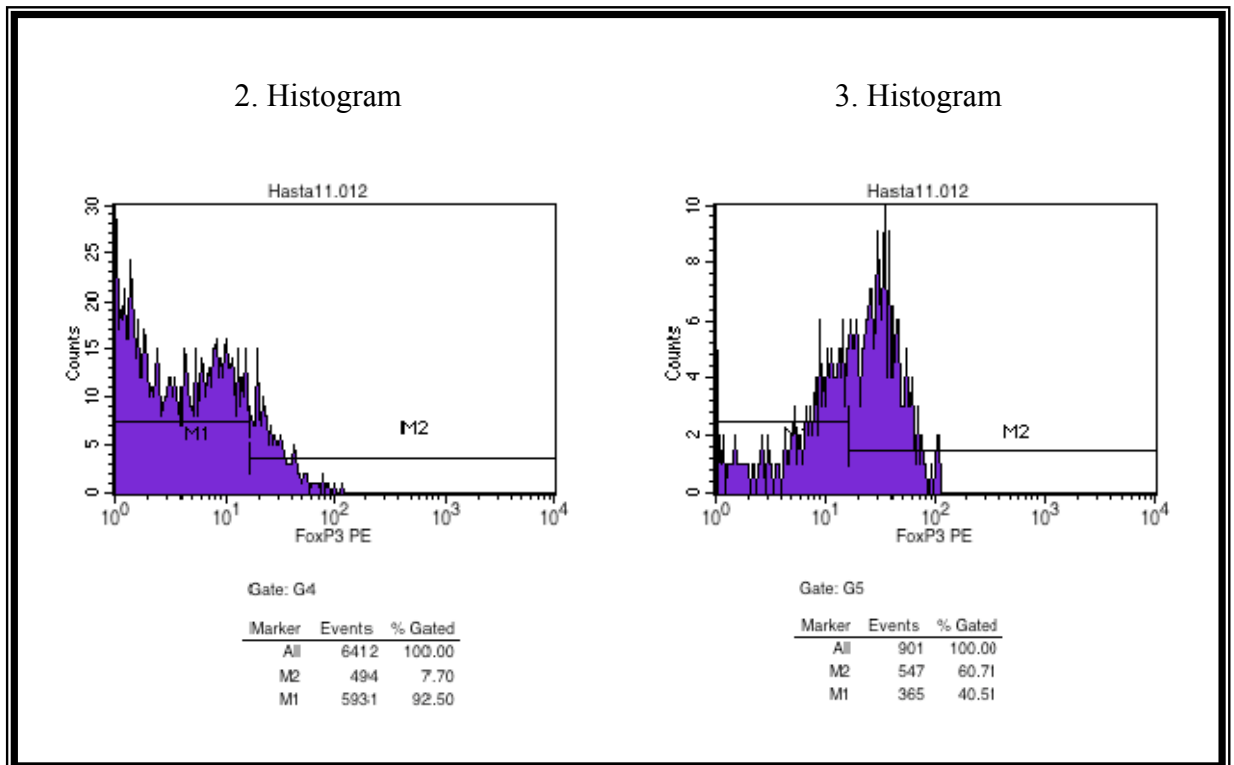
Şekil 6-c



Şekil 6-d

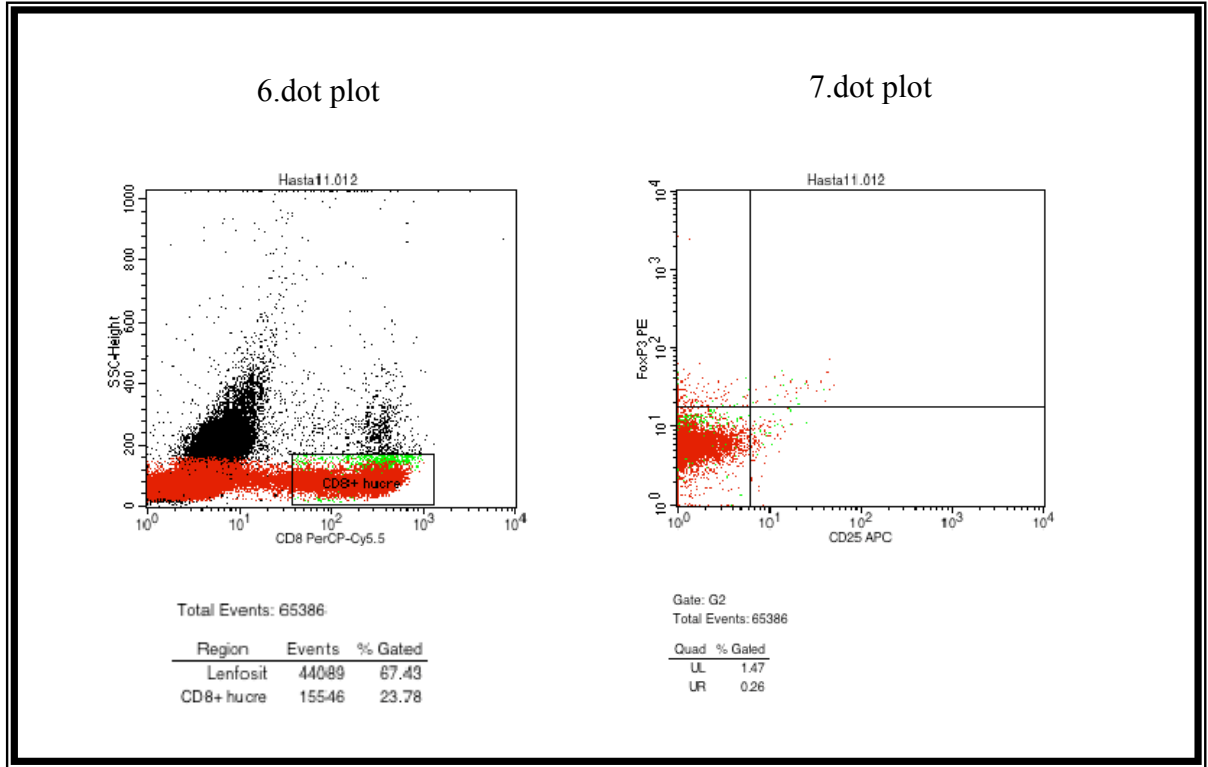


Şekil 6-e

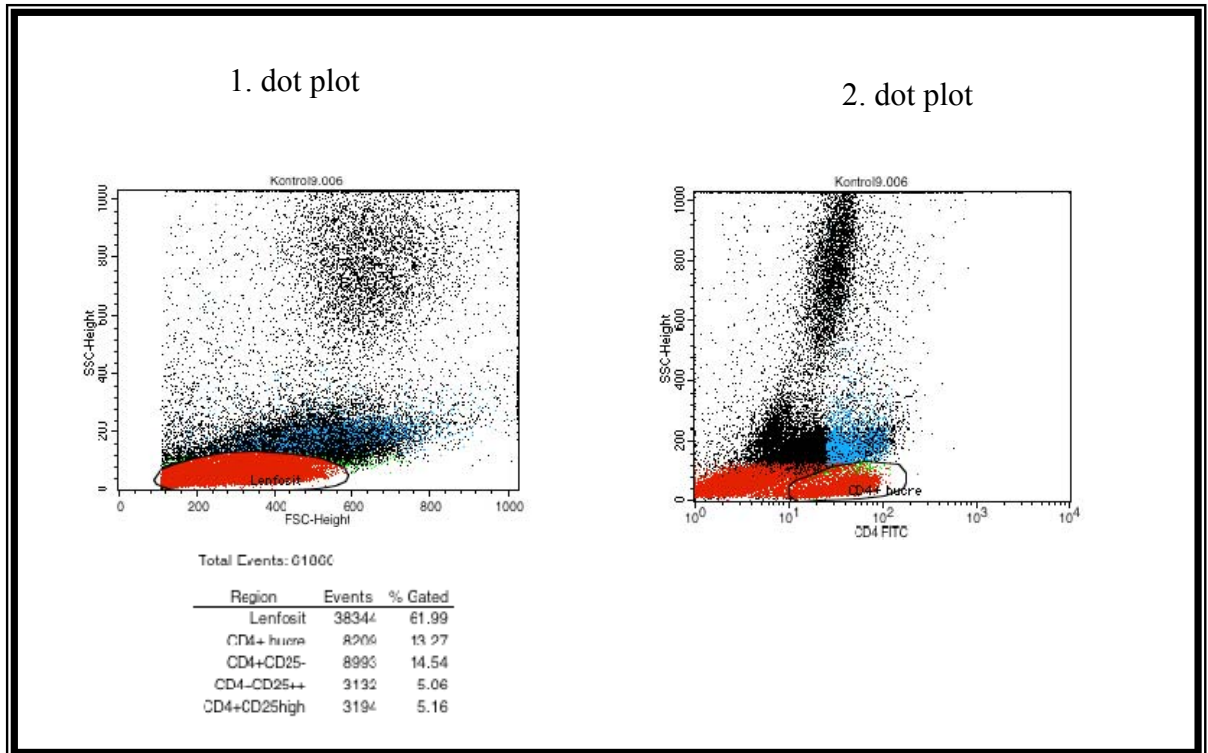




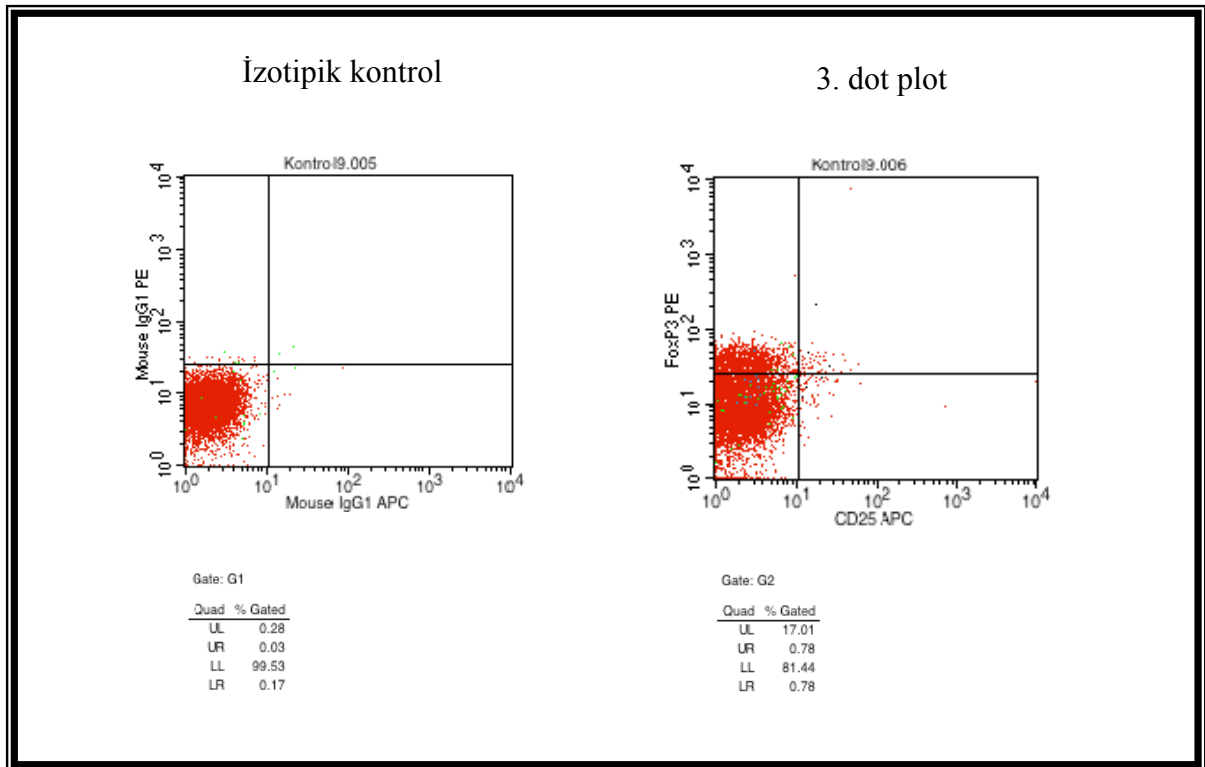
Şekil 6-f



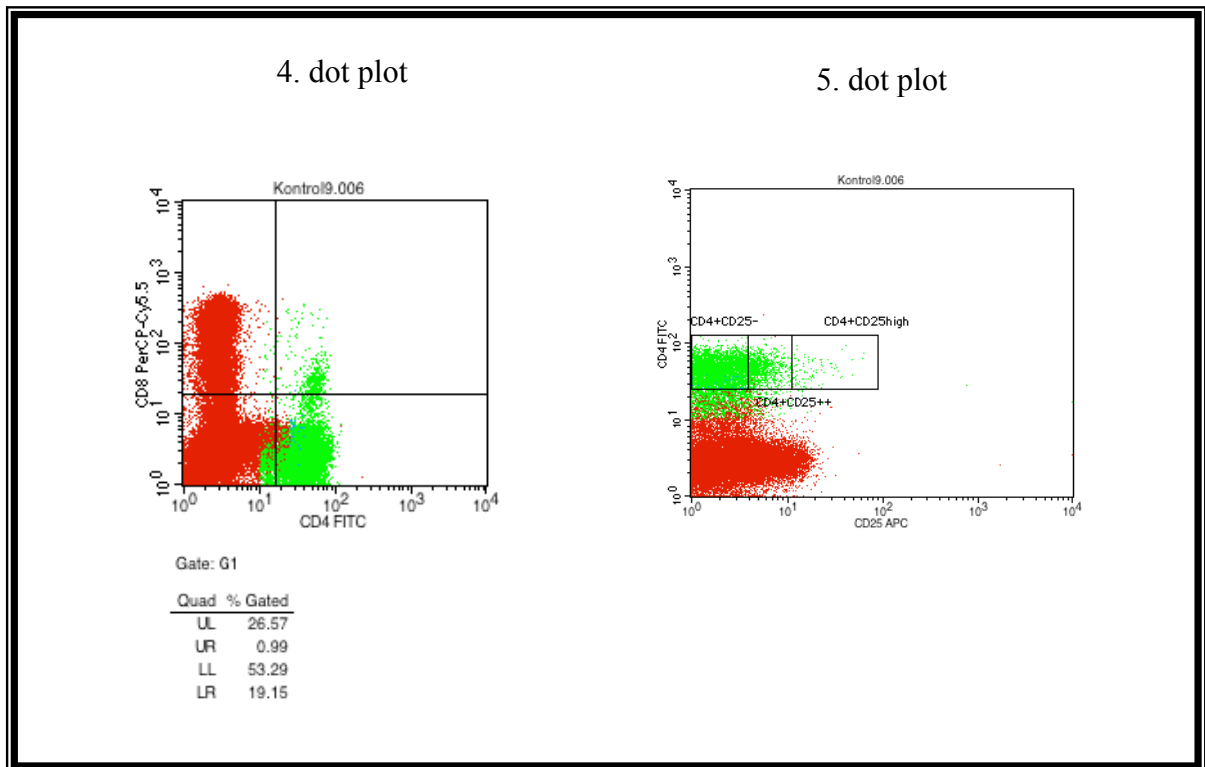
Şekil 7-a: Örnek sağlıklı kontrol için dot plot ve histogram görüntüleri



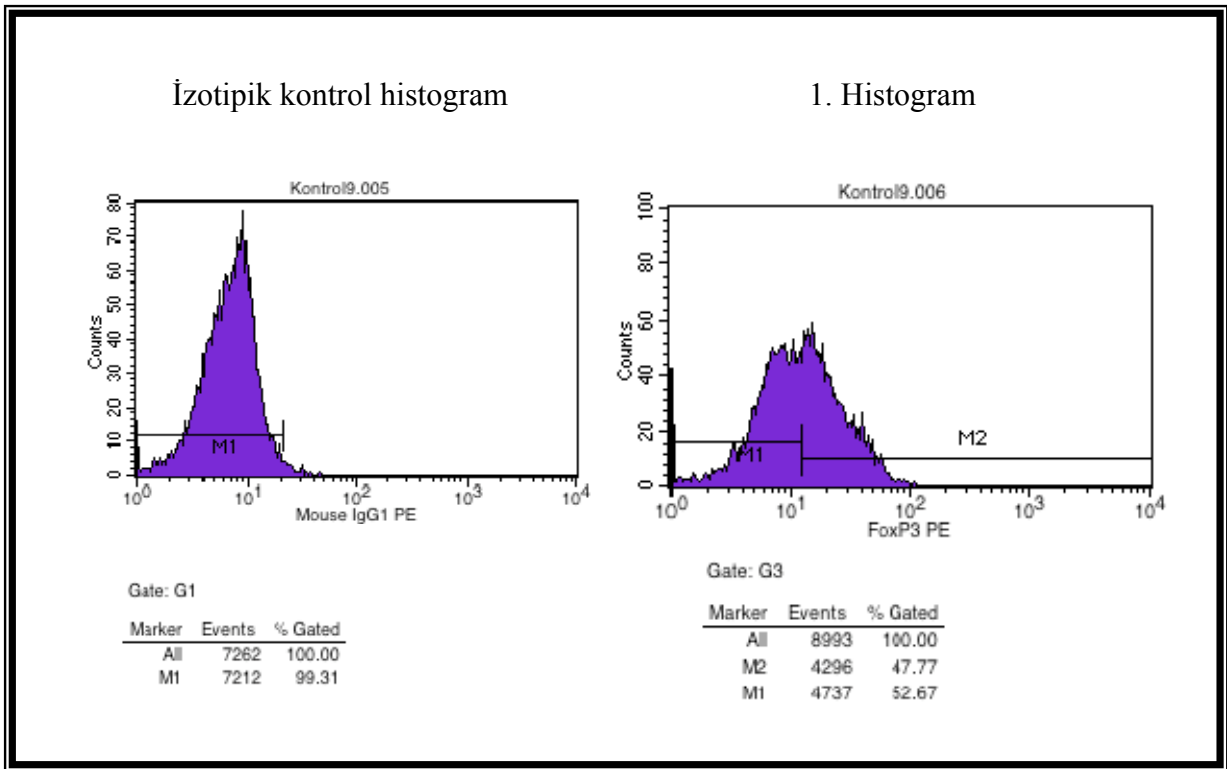
Şekil 7-b:



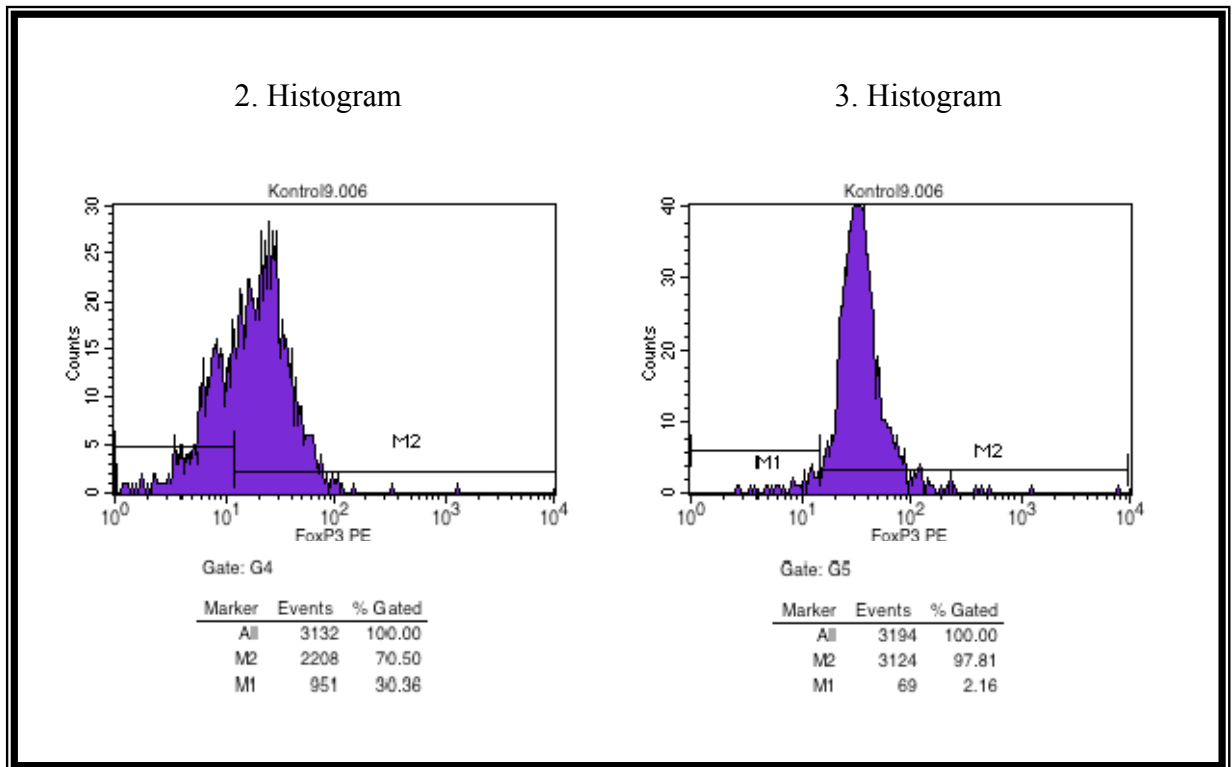
Şekil 7-c:



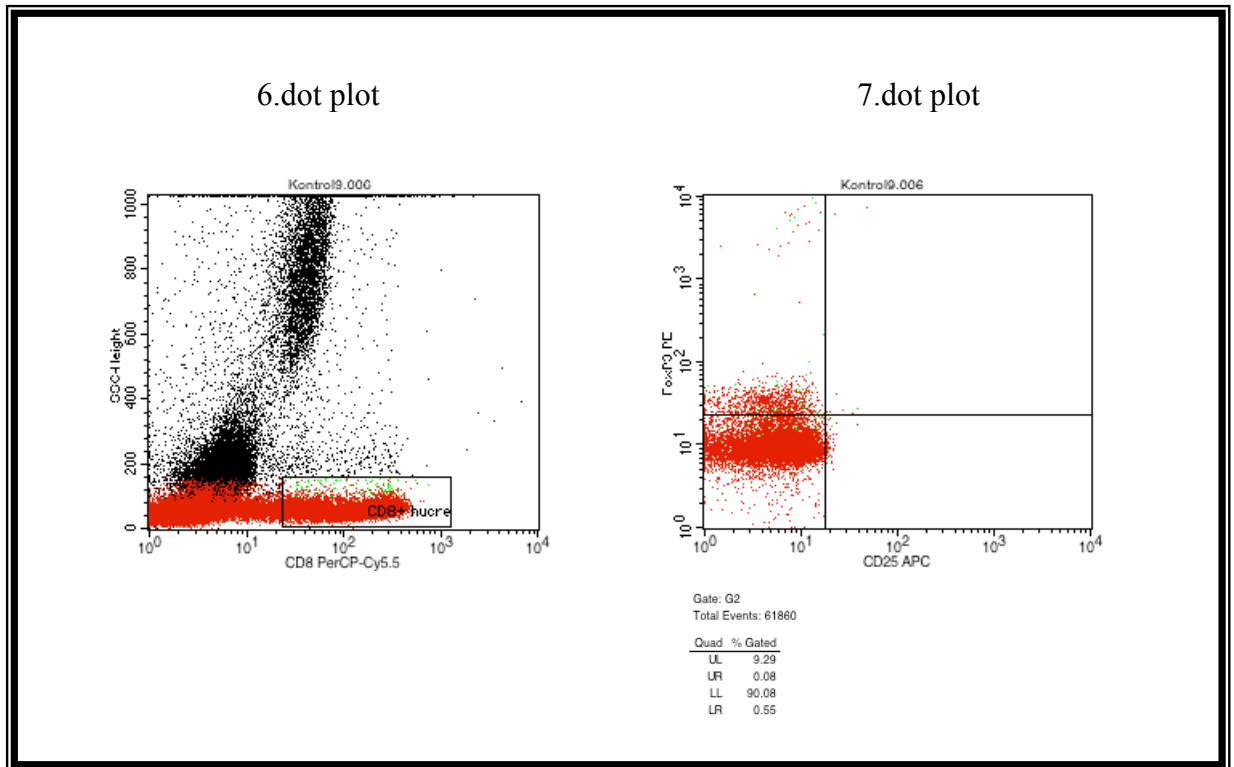
Şekil 7-d:



Şekil 7-e:



Şekil 7-f:



## **Görüntü Analizi:**

**1.dot plot**→ Dar açılı ışık saçılımı (FSC) ile 90° açıyla ışık saçılım (SSC) parametresi kullanılarak oluşturulan görüntüde hücre boyutu ve granülaritesi kontrol edildi. Lenfositler ayırt edilerek kapı alındı.

**2.dot plot**→ CD4-FITC'in ışığa verdiği fluoresans-1 (FL1)'e karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta granülariteye bağlı hücrelerin CD4 ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile belirlenen eşik değerinin üzerindeki fluoresans ışımaları CD4<sup>+</sup> hücreler kabul edildi. Bu hücreler üzerinde işaretleme yaparak hücrelerin yüzde olarak ne kadarının CD4 eksprese ettiği belirlendi.

**İzotipik kontrol dot plot**→APC ve PE fluoresans boyanmanın yanında otofluoresans veya özgün olmayan bağlanmaya bağlı zemin boyanmasını elemek için kullanıldı.

**3.dot plot**→ CD4 kapısı kullanılarak CD25-APC (FL4)'e karşı FOXP3-PE (FL2) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD25 ve FOXP3 ekspresyonları değerlendirildi. CD4 pozitif hücreler bu görüntüye tanıtılmasıyla CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı.

**4.dot plot**→ Lenfosit kapısı üzerinde CD4-FITC (FL1)'e karşı CD8-PerCP-Cy5.5 (FL3) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD4 ve CD8 ekspresyon oranları değerlendirildi.

**5.dot plot**→ Lenfosit kapısı üzerinde CD4-FITC (FL1)'e karşı CD25-APC (FL4) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD4 pozitifliği gösteren hücreler CD25 ekspresyonuna göre şu şekilde üçe ayrıldı: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>

Histogramlar yardımıyla CD4<sup>+</sup> ve FOXP3<sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonları analiz edildi.

**İzotipik kontrol histogram**→ Yerleştirilen markerler histogramlardaki gerçek pozitif hücre popülasyonunu bulmaya yardımcı olur.

**1.histogram**→ 5. dot plottaki 1. grubu oluşturan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> hücrelerde FOXP3 pozitifliği, histogramda izotipik kontrol ile oluşturulan markere göre, yüzde değer olarak saptandı.

**2.histogram**→ 5. dot plottaki 2. grubu oluşturan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> hücrelerde FOXP3 pozitifliği, histogramda izotipik kontrol ile oluşturulan markere göre, yüzde değer olarak saptandı.

**3.histogram**→ 5. dot plottaki 3. grubu oluşturan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> hücrelerde FOXP3 pozitifliği, histogramda izotipik kontrol ile oluşturulan markere göre, yüzde değer olarak saptandı.

**6.dot plot**→ CD8-PerCP-Cy5.5'in ışığa verdiği FL3'e karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta granülariteye bağlı hücrelerin CD8 ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile belirlenen eşik değerinin üzerindeki floresans ışıkları CD8<sup>+</sup> hücreler kabul edildi.

**7.dot plot**→ CD8 kapısı kullanılarak CD25-APC (FL4)'e karşı FOXP3-PE (FL2) parametreleri kullanılarak oluşturulan floresans dot plot görüntüsünde CD25 ve FOXP3 ekspresyonları değerlendirildi. CD8 pozitif hücreler bu görüntüye tanıtılmasıyla CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı.

Olgulara ait mononükleer hücre örneklerinde, flow sitometri ile CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonları çok renkli analiz yapılarak değerlendirildi. CD4-FITC & SSC noktalama (dot plot) görüntüsünde CD4 pozitif hücreler tanımlandı ve en az 10000 CD4<sup>+</sup> hücre sayıldı. Üzerinde kapı alınan bu hücreler FL2, FL3& FL4 dot plot görüntülerine tanıtılarak analiz gerçekleştirildi. Cihazın günlük kalibrasyonları yapıldı. Floresans eşik değerleri izotipik antikorlar kullanılarak ayarlandı. Hasta ve kontrol grubuna ait CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyon analiz sonuçları Tablo 14, 15, 16, 17, 18 ve 19'da gibi saptanmıştır. Sonuçların gruplar arası karşılaştırılması Tablo 14, 15, 16, 17, 18 ve 19'da gösterilmiştir. Grup ortalamaları bar grafiği ile Şekil 8'de gösterilmiştir.

**Tablo 14:** Hasta grubuna ait CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarının analiz sonuçları

Olgu No	Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
Hasta 1	75,56	37,21	1,86	13,88	22,97	5,66	6,64	0,97
Hasta 2	90,66	38,93	1,78	21,54	15,30	1,72	2,09	0,22
Hasta 3	89,77	44,93	2,09	30,49	12,69	1,56	1,08	0,11
Hasta 4	70,07	20,80	0,75	15,38	14,82	1,74	1,98	0,36
Hasta 5	78,86	34,47	1,96	23,77	11,50	1,50	2,22	0,26
Hasta 6	84,61	21,92	0,66	14,21	10,73	1,12	2,46	0,20
Hasta 7	75,47	19,25	1,64	11,54	11,88	1,29	2,34	0,66
Hasta 8	88,35	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	2,10	0,01
Hasta 9	84,36	37,86	1,86	19,95	15,51	2,51	1,53	0,10
Hasta 10	71,18	18,48	0,61	12,26	14,88	1,07	1,52	0,13
Hasta 11	67,17	26,89	1,11	17,93	9,81	1,38	3,44	0,26
Hasta 12	78,77	35,27	1,57	22,59	11,89	1,30	2,70	0,30
<b>Ortalama</b>	<b>79,57</b>	<b>28,88</b>	<b>1,35</b>	<b>17,40</b>	<b>13,25</b>	<b>1,82</b>	<b>2,51</b>	<b>0,30</b>

\* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

**Tablo 15:** Hasta grubuna ait CD4<sup>+</sup> ve FOXP3<sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonlarının analiz sonuçları

Olgu No	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
Hasta 1	15,08	22,66	73,24
Hasta 2	1,45	5,14	39,08
Hasta 3	3,42	7,82	45,98
Hasta 4	3,23	4,63	30,14
Hasta 5	1,55	6,14	36,71
Hasta 6	20,70	30,61	81,00
Hasta 7	42,88	38,55	60,11
Hasta 8	24,56	31,81	68,37
Hasta 9	6,10	13,77	51,28
Hasta 10	5,57	9,39	45,85
Hasta 11	3,20	7,70	60,71
Hasta 12	2,47	6,21	42,15
<b>Ortalama</b>	<b>10,85</b>	<b>15,37</b>	<b>52,89</b>

\* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

**Tablo 16 :**Kontrol grubuna ait CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarının analiz sonuçları

Olgu No	Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
Kontrol 1	71,47	22,03	0,78	19,76	11,34	0,79	0,94	0,02
Kontrol 2	75,62	33,05	1,45	28,41	9,65	0,99	1,53	0,16
Kontrol 3	86,57	39,56	1,45	24,04	16,68	1,48	1,13	0,17
Kontrol 4	84,75	40,34	1,26	19,9	20,74	2,89	1,42	0,04
Kontrol 5	60,9	10,83	0,62	8,41	6,17	2,48	1,5	0,06
Kontrol 6	87,47	18,47	0,46	13,05	7,24	1,03	2,62	0,06
Kontrol 7	54,63	12,44	0,68	23,16	6,84	0,91	0,61	0,03
Kontrol 8	70,39	14,93	0,64	14,6	4,2	2,42	1,72	0,09
Kontrol 9	61,99	13,27	0,72	14,54	5,06	5,16	0,78	0,08
Kontrol 10	72,02	15,47	0,80	15,04	5,6	2,53	2,04	0,14
Kontrol 11	81,57	21,68	1,38	18,98	7,21	2	0,58	0,12
Kontrol 12	85,73	31,05	0,85	19,93	11,1	3,95	0,83	0,07
Kontrol 13	76,07	20,96	0,84	18,04	7,41	1,14	0,46	0
Kontrol 14	83,23	42,47	2,57	30,45	15,12	3,14	1,48	0,18
Kontrol 15	76,57	10,96	0,43	12,29	4,17	1,85	2,56	0,02
Kontrol 16	74,46	19,01	1,30	20,01	7,14	3,54	0,16	0,02
Kontrol 17	58,58	18,77	3,68	18,54	9,65	1,55	0,28	0,23
Kontrol 18	51,33	12,62	0,81	13,05	8,02	2,08	0,76	0,03
Kontrol 19	84,82	30,69	1,00	22,29	13,56	2,62	1,73	0,05
Kontrol 20	75,65	31,21	1,56	18,33	16,92	2,02	0,89	0,07
Kontrol 21	83,1	41,12	2,19	31,78	12,28	1,82	1,61	0,08
Kontrol 22	64,52	14,33	1,62	10,84	4,64	1,07	1,18	0,12
Kontrol 23	81,95	16,8	0,37	14,54	5,41	0,83	0,96	0,04
Kontrol 24	70,05	25,45	2,22	11,98	14,92	2,63	1,03	0,03
<b>Ortalama</b>	<b>73,89</b>	<b>23,23</b>	<b>0,78</b>	<b>18,42</b>	<b>9,63</b>	<b>2,12</b>	<b>1,20</b>	<b>0,08</b>

- Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.



**Tablo 17:** Kontrol grubuna ait CD4<sup>+</sup> ve FOXP3<sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonlarının analiz sonuçları

<b>Olgu No</b>	<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup></b>	<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>++</sup> FOXP3<sup>+</sup></b>	<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup></b>
<b>Kontrol 1</b>	1,86	3,84	42,09
<b>Kontrol 2</b>	1,55	4,09	46
<b>Kontrol 3</b>	4,16	5,66	30,43
<b>Kontrol 4</b>	3,09	9,3	50,33
<b>Kontrol 5</b>	20,14	16,87	65,81
<b>Kontrol 6</b>	4,15	10,48	76,32
<b>Kontrol 7</b>	0,78	6,31	70,31
<b>Kontrol 8</b>	10,83	23,88	83,25
<b>Kontrol 9</b>	47,77	70,5	97,81
<b>Kontrol 10</b>	26,77	44,5	87,08
<b>Kontrol 11</b>	8,57	18,76	69,4
<b>Kontrol 12</b>	0,25	1,36	8,19
<b>Kontrol 13</b>	3,85	9,27	32,06
<b>Kontrol 14</b>	14,98	25,64	62,47
<b>Kontrol 15</b>	3,68	17,24	46,85
<b>Kontrol 16</b>	9,34	22,86	89,93
<b>Kontrol 17</b>	24,29	27,75	84,15
<b>Kontrol 18</b>	15,32	22,39	71,51
<b>Kontrol 19</b>	19,88	40,09	70,07
<b>Kontrol 20</b>	18,5	28,54	77,64
<b>Kontrol 21</b>	16,12	42,35	86,27
<b>Kontrol 22</b>	11,64	37,68	92,37
<b>Kontrol 23</b>	18,86	42,11	91,01
<b>Kontrol 24</b>	14,46	14,59	73,09
<b>Ortalama</b>	<b>12,54</b>	<b>22,75</b>	<b>66,85</b>

\* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

**Tablo 18:** CD4, CD25, FOXP3 ve CD8 ekspresyonlarının analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması

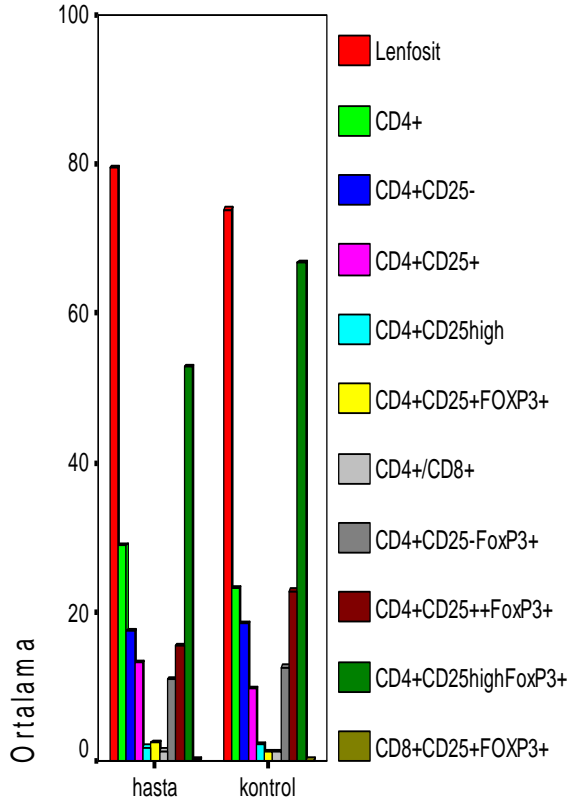
Grup	Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>Hasta</b>								
<b>Ortalama</b>	79,57	28,88	1,35	17,4	13,25	1,82	2,51	0,3
<b>Sayı</b>	12	12	12	12	12	12	12	12
<b>Standart Sapma</b>	7,98	10,6	0,63	6,72	3,96	1,27	1,44	0,27
<b>Kontrol</b>								
<b>Ortalama</b>	73,89	23,23	1,24	18,42	9,63	2,12	1,2	0,08
<b>Sayı</b>	24	24	24	24	24	24	24	24
<b>Standart Sapma</b>	10,6	10,39	0,79	6,09	4,64	1,09	0,65	0,06
<b>Toplam</b>								
<b>Ortalama</b>	75,79	25,11	1,27	18,08	10,84	2,02	1,64	0,15
<b>Sayı</b>	36	36	36	36	36	36	36	36
<b>Standart Sapma</b>	10,06	10,65	0,73	6,23	4,7	1,15	1,15	0,19
<b>Mann-Whitney U</b>	5	100	121	134	77	112,5	38,5	44
<b>Çift yönlü p değeri</b>	0,000*	0,14	0,44	0,737	0,025*	0,29	0,000*	0,001*

\* Çift yönlü *p* değeri istatistiksel olarak anlamlıdır  $p < 0.05$

**Tablo 19 :** CD4<sup>+</sup> ve FOXP3<sup>+</sup> olan hücrelerde CD25 ekspresyonlarının analiz sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılması

Grup	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>Hasta</b>			
Ortalama	10,85	15,37	52,89
Sayı	12	12	12
Standart Sapma	12,78	12,2	15,79
<b>Kontrol</b>			
Ortalama	12,54	22,75	66,85
Sayı	24	24	24
Standart Sapma	10,91	16,8	22,93
<b>Toplam</b>			
Ortalama	11,97	20,29	62,2
Sayı	36	36	36
Standart Sapma	11,41	15,64	21,65
Mann-Whitney U	122,5	107	79
Çift yönlü p değeri	0,471	0,214	0,029*

Çift yönlü p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır p<0.05



**Şekil 8 :** Hasta ve kontrol grubuna ait flow sitometride analiz edilen hücrelere ait ortalamaların bar grafiği ile gösterilmesi

- Lenfositlerin ortalamaları hasta grubunda 79,57 ve kontrol grubunda 73,89 olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).
- $CD4^+CD25^+$  hücrelerin ortalamaları hasta grubunda 13,25 ve kontrol grubunda 9,63 olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,025$ ).
- $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  hücrelerin ortalamaları hasta grubunda 2,51 ve kontrol grubunda 1,2 olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).
- $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücrelerin ortalamaları hasta grubunda 0,3 ve kontrol grubunda 0,08 olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,001$ ).
- $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  hücrelerin ortalamaları hasta grubunda 52,89 ve kontrol grubunda 66,85 olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,029$ ).

Hastaların klinik verileri Tablo 20 ve 21’de gösterilmiştir.

**Tablo 20:** Çalışmada yer alan hastalara ait demografik, klinik, patolojik ve tedavi uygulamalarına ait veriler (1-16 hasta)

Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Yaş	64	55	40	74	81	40	54	64	37	50	45	64	35	32	49	79
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Kadın	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Kadın
Tümör Boyutu (mm)	40x40	80x50	50x10	22x16	100x40	10x10	DM	8x7	DM	DM	10x9	10x3	20x12	7x6	3x2	6x4
ABCDE Kriterleri	ABCD	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	DM	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	DM	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE
Lokalizasyon	B-B	Alt E	B-B	Alt E	G	G	G	G A/Ü E	G	G	B-B	Alt E	Üst E	Alt E	B-B	B-B
Uzak metastaz	Yok	AC	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Beyin	Yok	Yok	Yok	Yok	AC, KC, Periton	KC
Aile Öyküsü	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Breslow	0.9 mm	10,0 mm	2.26 mm	3.2 mm	2.3 mm	1.23 mm	5 mm	5 mm	4 mm	4,2mm	4.5 mm	0.92 mm	1.9 mm	0.5 mm	1.6 mm	1.65 mm
Clark Seviyesi	III	IV	IV	IV	III	III	III	V, IV, IV	IV	III	IV	III	III	I	IV	III
Tümör Ülserasyonu	Yok	Fokal	Fokal	Santral	Fokal	Yok	Yok	Fokal	Yok	Var	Yok	Yok	Santral	Yok	Yok	Yok
Yapılan Operasyon	Greft	Flep	Flep	Primer	Greft	Primer	Primer	Primer	Flep	Primer	Greft	Primer	Primer	Primer	Primer	Primer
SLN Biyopsisi	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Yok	Var	Yok	Var	Var	Var	Yok	Yok	Var
SLN Pozitifliği	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	mikromet
RLND	Yok	İD	BBD + SP	İD	İD	Yok	BAD	Yok	İD	AD	BBD	Yok	Yok	Yok	Yok	BD
RLND Sonucu	Yok	0/11	1/8	SH	0/16	Yok	Sağ 3/11 Sol 5/19	Yok	0/21	0/3	Sağ 0/7 Sol 1/3	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Adjuvan Tedavi	IFN	Yok	Yok	Yok	IFN	Yok	IFN	KT+RT	Yok	IFN, KT, RT	Yok	Yok	Yok	Yok	IFN	Yok

**DM:** Dış merkez  
**B-B:** Baş-boyun  
**Alt E:** Alt ekstremité  
**Üst E:** Üst ekstremité  
**G:** Gövde

**AC:** Akciğer  
**KC:** Karaciğer  
**SH:** Sinus histiyositozu

**İD:** İnguinal diseksiyon  
**BBD:** Bilateral boyun diseksiyonu  
**AD:** Aksiler diseksiyon  
**BAD:** Bilateral aksiler diseksiyon  
**SP:** Superfisiyal parotidektomi

**IFN:** Interferon tedavisi  
**KT:** Kemoterapi  
**RT:** Radyoterapi

**Tablo 21:** Çalışmada yer alana hastalara ait demografik, klinik, patolojik ve tedavi uygulamalarına ait veriler (17-32 hasta)

Hasta No	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Yaş	61	37	71	44	80	63	75	64	46	53	32	43	71	69	60	74
Cinsiyet	Kadın	Erkek	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek	Erkek	Kadın	Kadın	Kadın	Kadın	Kadın	Kadın	Kadın	Erkek
Tümör Boyutu (mm)	15x15	DM	25x17	DM	DM	3x2	30x40	DM	DM	DM	10x10	9x8	13x8	15x8	11x10	35x31
ABCDE Kriterleri	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE	ABCDE
Lokalizasyon	Alt E	Üst E	B-B	G	B-B	Alt E	B-B	G	G	G	G	Alt E	Alt E	B-B	Alt E	Alt E
Uzak metastaz	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	AC	Kemik	Yok	Yok	Yok	KC	Yok	Yok	Duodenum
Aile Öyküsü	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Breslow	2.8mm	10 mm	0,8	2.7 mm	5.5 mm	7 mm	3 mm	2,7 mm	4,7mm	1,06 mm	3,18 mm	4 mm	2.08 mm	2.23mm	1.9 mm	4.5 mm
Clark Seviyesi	IV	V	I	III	III	IV	IV	IV	IV	II	II	IV	IV	IV	III	IV
Tümör Ülserasyonu	Yaygın	Belirgin	Yok	Belirgin	Yok	Ülsere	Yok	Ülsere	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Ülsere
Yapılan Operasyon	Greft	Primer	Greft	Primer	Primer	Greft	Primer	Primer	Primer	Primer	Primer	Primer	Primer	Primer	Greft	Greft
SLN Biyopsisi	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Yok
SLN Pozitifliği	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Var	Var	Yok	Yok	Var	mikromet	Yok	Yok
RLND	Yok	AD	Yok	AD	Yok	AD	Yok	AD	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	BD	Yok	İD
RLND Sonucu	Yok	4/11	Yok	SH 0/20	Yok	Yok	Yok	9/24	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	SH 0/31	Yok	0/6
Adjuvan Tedavi	IFN	IFN	Yok	IFN	Yok	IFN	Yok	KT	KT	Yok	IFN	IFN	IFN	IFN	Yok	IFN, KT

**DM:** Dış merkez  
**B-B:** Baş-boyun  
**Alt E:** Alt ekstremité  
**Üst E:** Üst ekstremité  
**G:** Gövde

**AC:** Akciğer  
**KC:** Karaciğer  
**SH:** Sinus histiyositozu

**İD:** İnguinal diseksiyon  
**BBD:** Bilateral boyun diseksiyonu  
**AD:** Aksiler diseksiyon  
**BAD:** Bilateral aksiler diseksiyon  
**SP:** Superfisiyal parotidektomi

**IFN:** Interferon tedavisi  
**KT:** Kemoterapi  
**RT:** Radyoterapi

- 20 hastada melanom baş boyun ve gövdedeyken 12 hastada ekstremitelerdeydi.
- 32 hastanın 8'inde uzak metastaz vardı.
- 32 hastanın 17'sinde SLN biyopsi sonucu pozitif gelmiştir.

Hastaların periferik kanlarından çalışılan parametrelerin tümör lokalizasyonuna uzak metastaz ve ülserasyon varlığına göre ortalamaları Tablo 22, 23, 24, 25, 26 ve 27' de görülmektedir.

**Tablo 22 :** Tümör lokalizasyonuna göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları

		Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>Baş ve gövde</b>	Ortalama	79,48	27,95	1,34	16,59	13,00	1,90	2,59
	Sayı	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
	<b>Standart Sapma</b>	7,80	11,29	0,69	7,44	4,52	1,48	1,66
	Min.	67,17	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	1,08
	Max.	89,77	44,93	2,09	30,49	22,97	5,66	6,64
	<b>Ekstremiteler</b>	Ortalama	79,83	31,67	1,37	19,84	14,00	1,59
Sayı		3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
<b>Standart Sapma</b>		10,34	9,59	0,54	3,90	1,85	0,25	0,39
Min.		70,07	20,80	0,75	15,38	11,89	1,30	1,98
Max.		90,66	38,93	1,78	22,59	15,30	1,74	2,70
<b>Toplam</b>		Ortalama	79,57	28,88	1,35	17,40	13,25	1,82
	Sayı	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
	<b>Standart Sapma</b>	7,98	10,60	0,63	6,72	3,96	1,27	1,44
	Min.	67,17	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	1,08
	Max.	90,66	44,93	2,09	30,49	22,97	5,66	6,64
	<b>Mann-Whitney U</b>		13	10	12	8	9	9
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,926	0,518	0,781	0,309	0,405	0,405	0,926

**Tablo 23:** Tümör lokalizasyonuna göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları

		CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	Breslow	S100B
<b>Baş ve gövde</b>	Ortalama	13,67	18,72	58,14	0,30	2,93	577,47
	Sayı	9,00	9,00	9,00	9,00	20,00	9,00
	Standart Sapma	13,73	12,41	14,45	0,31	1,51	919,62
	Min.	1,55	6,14	36,71	0,01	0,80	48,80
	Max.	42,88	38,55	81,00	0,97	5,50	2934,80
<b>Ekstremitte</b>	Ortalama	2,38	5,33	37,12	0,29	4,07	520,13
	Sayı	3,00	3,00	3,00	3,00	12,00	3,00
	Standart Sapma	0,89	0,81	6,24	0,07	3,27	604,29
	Min.	1,45	4,63	30,14	0,22	0,50	88,80
	Max.	3,23	6,21	42,15	0,36	10,00	1210,80
<b>Toplam</b>	Ortalama	10,85	15,37	52,89	0,30	3,35	563,13
	Sayı	12,00	12,00	12,00	12,00	32,00	12,00
	Standart Sapma	12,78	12,20	15,79	0,27	2,35	825,91
	Min.	1,45	4,63	30,14	0,01	0,50	48,80
	Max.	42,88	38,55	81,00	0,97	10,00	2934,80
<b>Mann-Whitney U</b>		3	1	2	8	107	12
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,052	0,021*	0,033*	0,308	0,613	0,782

\* Çift yönlü p değeri anlamlıdır  $p < 0.05$



**Tablo 24:** Uzak metastaz varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları

		Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>Uzak metastaz var</b>	Ortalama	79,30	28,92	1,38	17,50	12,89	1,91	2,65
	Sayı	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
	Standart Sapma	7,50	10,68	0,63	7,10	4,27	1,38	1,54
	Min.	67,17	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	1,08
	Max.	89,77	44,93	2,09	30,49	22,97	5,66	6,64
<b>Uzak metastaz yok</b>	Ortalama	80,92	28,71	1,20	16,90	15,09	1,40	1,81
	Sayı	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	Standart Sapma	13,77	14,46	0,83	6,56	0,30	0,46	0,40
	Min.	71,18	18,48	0,61	12,26	14,88	1,07	1,52
	Max.	90,66	38,93	1,78	21,54	15,30	1,72	2,09
<b>Toplam</b>	Ortalama	79,57	28,88	1,35	17,40	13,25	1,82	2,51
	Sayı	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
	Standart Sapma	7,98	10,60	0,63	6,72	3,96	1,27	1,44
	Min.	67,17	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	1,08
	Max.	90,66	44,93	2,09	30,49	22,97	5,66	6,64
<b>Mann-Whitney U</b>		8	10	7	9	4	8	4
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,667	1,000	0,519	0,830	0,197	0,667	0,197

**Tablo 25:** Uzak metastaz varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları

		CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	Breslow	S100B
<b>Uzak metastaz var</b>	Ortalama	12,32	16,99	54,97	0,32	3,16	356,20
	Sayı	10,00	10,00	10,00	10,00	24,00	10,00
	Standart Sapma	13,57	12,78	16,53	0,29	2,22	388,58
	Min.	1,55	4,63	30,14	0,01	0,50	48,80
	Max.	42,88	38,55	81,00	0,97	10,00	1210,80
<b>Uzak metastaz yok</b>	Ortalama	3,51	7,27	42,47	0,18	3,93	1597,80
	Sayı	2,00	2,00	2,00	2,00	8,00	2,00
	Standart Sapma	2,91	3,01	4,79	0,06	2,76	1890,80
	Min.	1,45	5,14	39,08	0,13	1,60	260,80
	Max.	5,57	9,39	45,85	0,22	10,00	2934,80
<b>Toplam</b>	Ortalama	10,85	15,37	52,89	0,30	3,35	563,13
	Sayı	12,00	12,00	12,00	12,00	32,00	12,00
	Standart Sapma	12,78	12,20	15,79	0,27	2,35	825,91
	Min.	1,45	4,63	30,14	0,01	0,50	48,80
	Max.	42,88	38,55	81,00	0,97	10,00	2934,80
<b>Mann-Whitney U</b>		5	6	5	7	81,5	4
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,283	0,390	0,283	0,519	0,528	0,197

**Tablo 26 :** Ülserasyon varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları

		Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>Ülserasyon var</b>	Ortalama	77,66	29,73	1,45	16,68	13,80	2,21	3,19
	Sayı	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Standart Sapma	6,54	8,14	0,47	4,18	4,89	1,76	1,80
	Min.	67,17	19,25	0,66	11,54	9,81	1,12	1,53
	Max.	84,61	37,86	1,86	22,59	22,97	5,66	6,64
<b>Ülserasyon yok</b>	Ortalama	81,48	28,03	1,24	18,12	12,71	1,44	1,83
	Sayı	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	Standart Sapma	9,42	13,38	0,79	8,98	3,14	0,31	0,44
	Min.	70,07	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	1,08
	Max.	90,66	44,93	2,09	30,49	15,30	1,74	2,22
<b>Toplam</b>	Ortalama	79,57	28,88	1,35	17,40	13,25	1,82	2,51
	Sayı	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
	Standart Sapma	7,98	10,60	0,63	6,72	3,96	1,27	1,44
	Min.	67,17	10,56	0,27	5,29	7,05	1,04	1,08
	Max.	90,66	44,93	2,09	30,49	22,97	5,66	6,64
<b>Mann-Whitney U</b>		12	16	17	15	18	16	4
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,337	0,749	0,873	0,631	1,000	0,749	0,025*

\* Çift yönlü p değeri anlamlıdır  $p < 0.05$

**Tablo 27:** Ülserasyon varlığına göre periferik kandan çalışılan parametrelerin ortalamaları

		CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	Breslow	S100B
<b>Ülserasyon var</b>	Ortalama	15,07	19,92	61,42	0,42	2,40	196,80
	Sayı	6,00	6,00	6,00	6,00	18,00	6,00
	Standart Sapma	15,40	12,99	14,14	0,33	1,49	218,41
	Min.	2,47	6,21	42,15	0,10	0,50	48,80
	Max.	42,88	38,55	81,00	0,97	5,00	632,80
<b>Ülserasyon yok</b>	Ortalama	6,63	10,82	44,36	0,18	4,58	929,47
	Sayı	6,00	6,00	6,00	6,00	14,00	6,00
	Standart Sapma	8,91	10,43	13,19	0,12	2,71	1063,43
	Min.	1,45	4,63	30,14	0,01	1,90	54,80
	Max.	24,56	31,81	68,37	0,36	10,00	2934,80
<b>Toplam</b>	Ortalama	10,85	15,37	52,89	0,30	3,35	563,13
	Sayı	12,00	12,00	12,00	12,00	32,00	12,00
	Standart Sapma	12,78	12,20	15,79	0,27	2,35	825,91
	Min.	1,45	4,63	30,14	0,01	0,50	48,80
	Max.	42,88	38,55	81,00	0,97	10,00	2934,80
<b>Mann-Whitney U</b>		11	9	6	10,5	55,5	7
<b>Çift yönlü p değeri</b>		0,262	0,150	0,055	0,229	0,007*	0,078

\* Çift yönlü *p* değeri anlamlıdır  $p < 0.05$

- Baş, boyun ve gövde de lokalize olan melanomlarda ekstremitelerde melanomu olan hastalara göre kanlarında CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri yüksekti (sırasıyla P=0,021 ve P=0,033).
- Ülserasyonu olmayan hastaların kanlarında CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri ortalama 3,19 hücreyken, ülserasyonu olan hastalarda bu ortalama 1,83 hücreydi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı (p=0,025).

### 3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Otuz iki hastanın ikisinin patoloji arşivimizdeki dokularının sadece metastatik lenf nodu olması nedeniyle toplam 30 örnekte immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Otuz hasta bloğundan CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3 ekspresyonları immünohistokimyasal olarak belirlendi. Pozitif boyanan hücrelerin yüzdelere göre skorlamalar şu şekilde değerlendirildi:

≤%5	=	0
%5-25	=	1
%26-50	=	2
%51-75	=	3
>%76	=	4

FOXP3 ekspresyonunda skorlama yerine, pozitif boyanan hücre yüzdeleri kullanıldı. Bulgular Tablo 28’de gösterilmiştir.

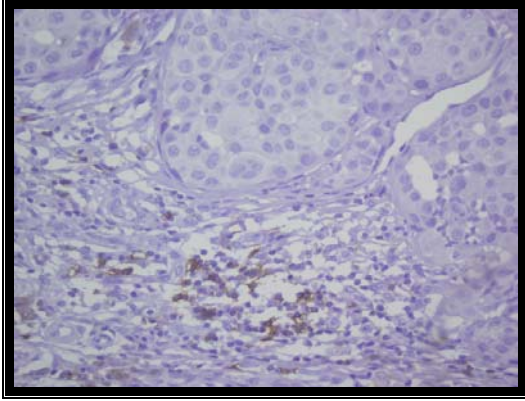
**Tablo 28:** Tümörü infiltrate eden lenfositlerde CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3’ün ekspresyon sonuçları

Hasta No	CD20	CD3	CD4	CD8	CD25	FOXP3%
1	2	3	3	2	2	24
2	1	3	2	2	1	29
3	metastaz örneği					
4	1	3	2	2	1	31
5	0	4	3	1	1	15
6	1	4	2	2	1	27
7	1	3	4	2	1	14
8	1	4	2	2	1	14
9	2	4	1	2	1	13
10	metastaz örneği					
11	1	4	3	2	1	17
12	2	4	2	2	1	26
13	1	4	3	2	1	16
14	2	4	4	2	4	13
15	3	4	3	4	2	12
16	1	4	2	3	2	20
17	2	4	2	3	1	18
18	2	3	2	2	1	6
19	2	4	2	2	1	5
20	3	3	2	1	2	17
21	2	3	2	1	2	18
22	2	3	3	2	1	34
23	2	3	1	2	0	6
24	1	3	2	1	2	21
25	1	4	2	1	1	2
26	1	4	3	1	1	13
27	2	4	3	3	1	12
28	1	4	2	3	2	20
29	1	4	2	2	1	22
30	1	4	3	1	1	17

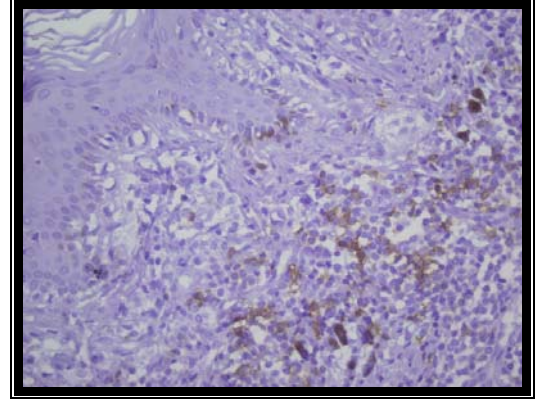
31	1	4	2	1	2	18
32	1	4	2	1	1	12

- Tümörü infiltrate eden T lenfositleri %75'in altında olan hastaların Breslow kalınlıkları, bu hücrelerin %75'in üzerinde olan hastalara göre yüksektir (p=0,021).
- Erkeklerde kadınlara göre tümörü infiltrate eden sitotoksik T lenfositlerinin tamamı %50'nin altındaydı ve bu fark anlamlıdır (p=0,014).
- Ülserasyonu olmayan hastalarda tümörü infiltrate eden T lenfositleri %75'in üzerindeydi (p=0,045).

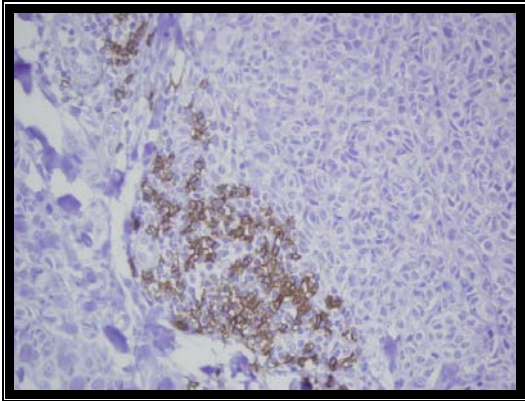
Resim 1-20'de immünohistokimyasal ekspresyonuna bakılan her parametre için skorlamada kullanılan değerlere birer örnek verilmiştir.



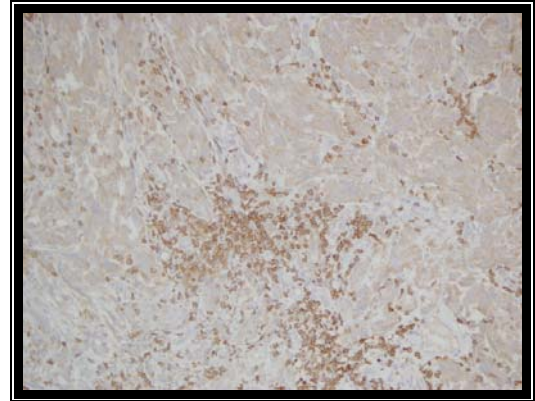
**Resim 1:** Tümörü infiltrate eden lenfositlerde CD20 için skor 1.



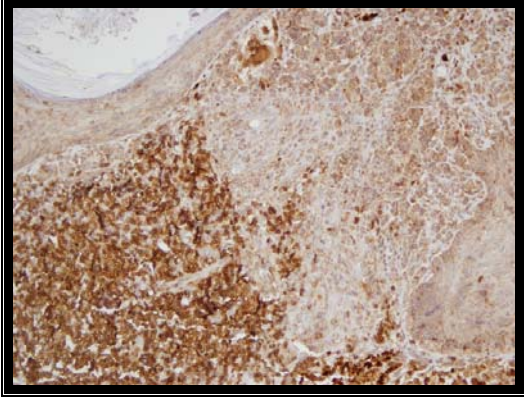
**Resim 2:** Tümörü infiltrate eden lenfositlerde CD20 için skor 2.



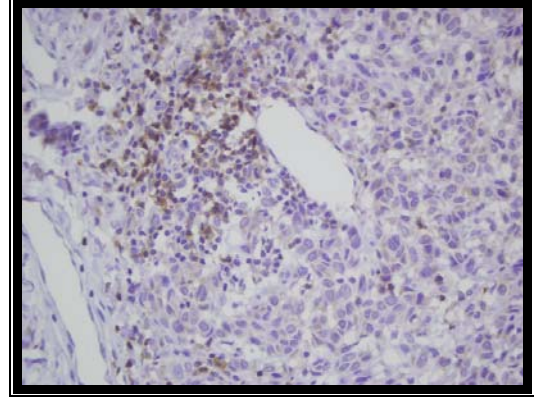
**Resim 3:** Tümörü infiltrate eden lenfositlerde CD20 için skor 3.



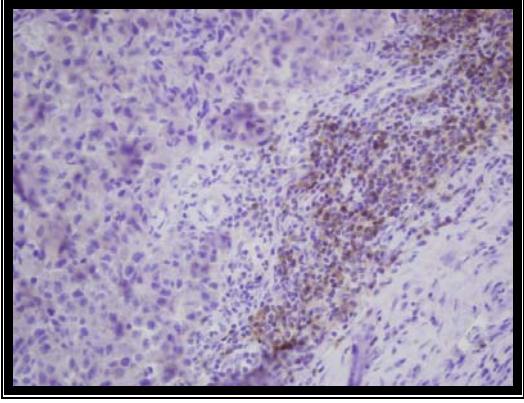
**Resim 4:** Tümörü infiltrate eden lenfositlerde CD3 için skor 3.



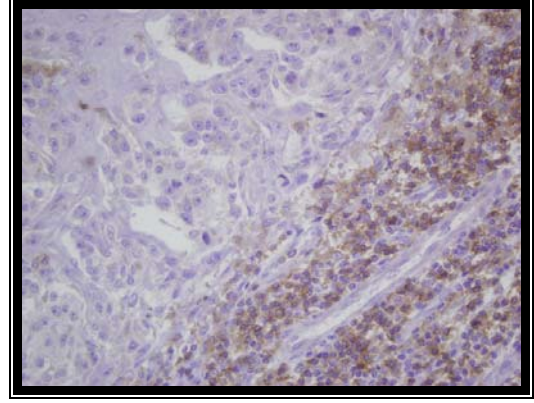
**Resim 5:** Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD3 için skor 4.



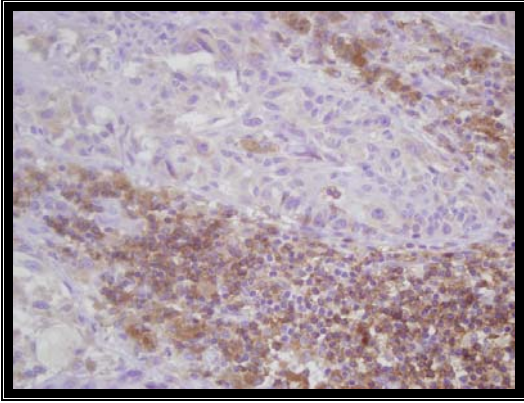
**Resim 6 :**Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 1.



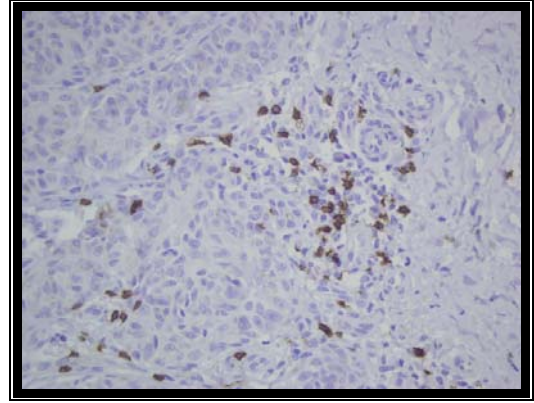
**Resim 7 :**Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 2.



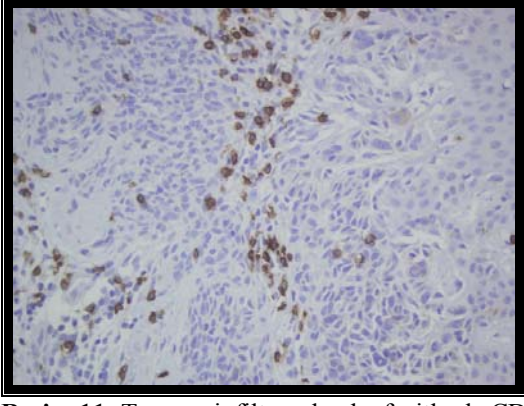
**Resim 8 :**Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 3.



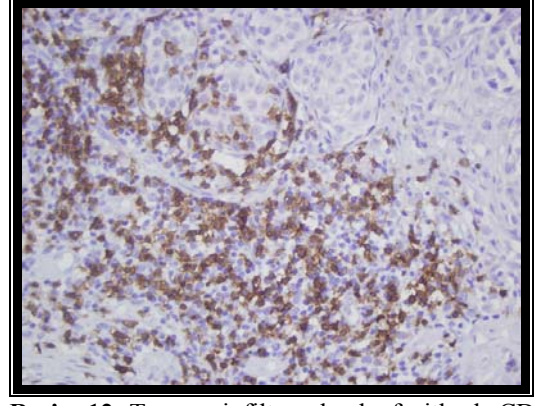
**Resim 9:** Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD4 için skor 4.



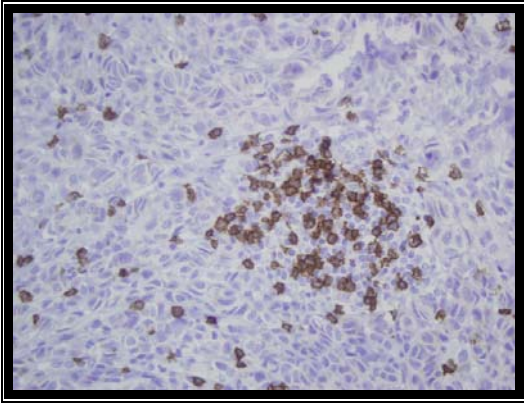
**Resim 10:** Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 1.



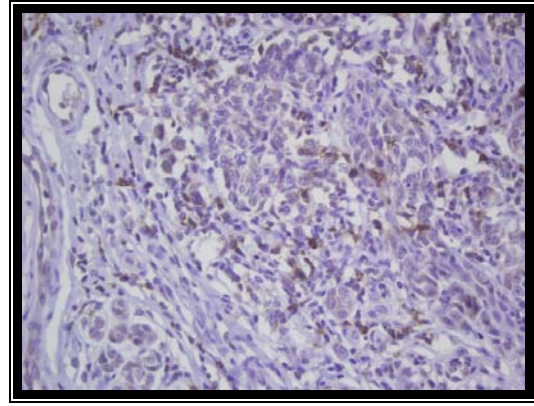
**Resim 11** :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 2.



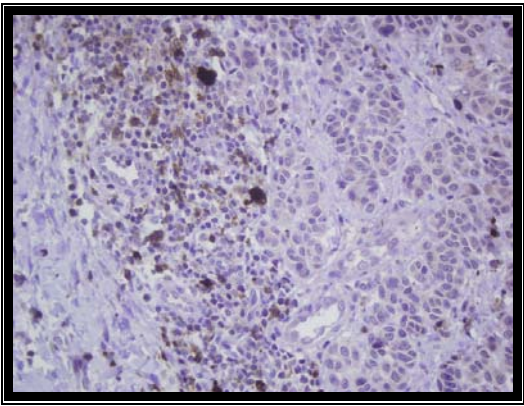
**Resim 12** :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 3.



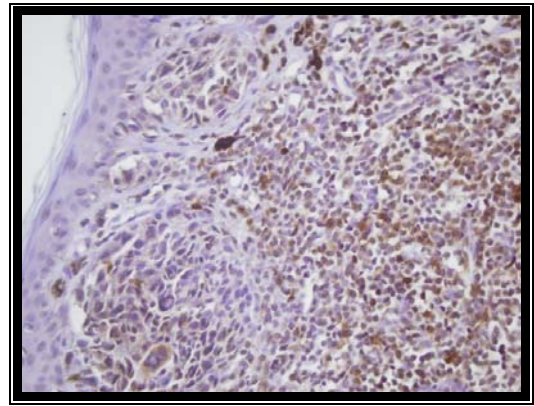
**Resim 13**: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD8 için skor 4.



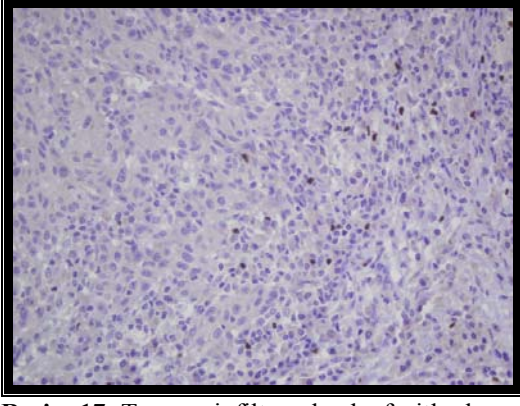
**Resim 14**: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD25 için skor 1.



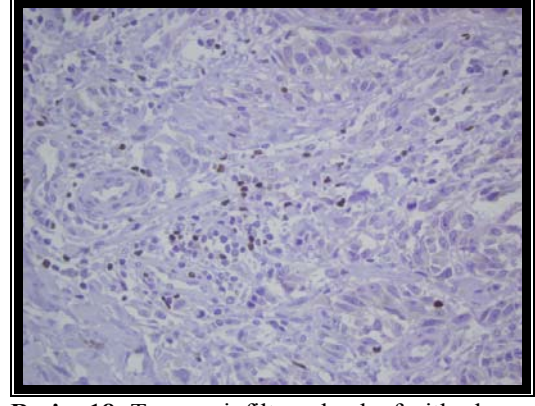
**Resim 15**: Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD25 için skor 2.



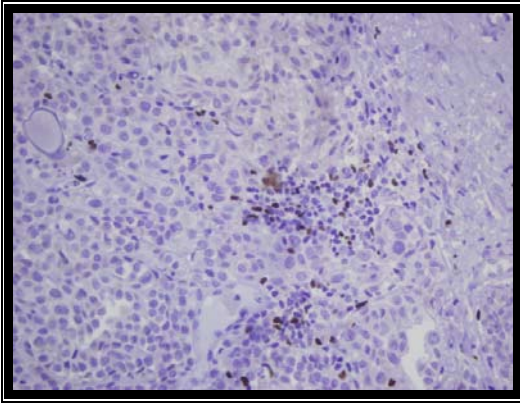
**Resim 16** :Tümörü infiltre eden lenfositlerde CD25 için skor 4.



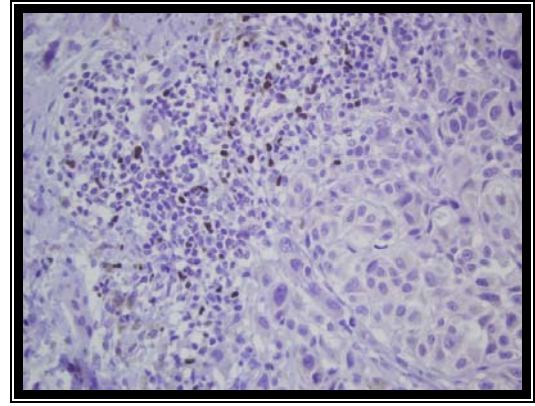
**Resim 17:** Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %6.



**Resim 18:** Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %12.



**Resim 19 :**Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %20.



**Resim 20 :**Tümörü infiltre eden lenfositlerde FOXP3 %27.

#### **4. Korelasyon analiz sonuçları**

Hastaların klinik verileri ile kanda ve dokuda ölçülen parametreler arasındaki korelasyon analizinin sonuçları Tablo 29'da görülmektedir.



**Tablo 29 : Korelasyon analizleri**

	Spearman's Rho	IHC-CD8	IHC-CD3	IHC-CD20	IHC-CD4	IHC-CD25	IHC-FOXP3	Breslow	Clark	S100B	Lenfosit	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	
<b>IHC-CD8</b>	r	1,000	0,158	0,312	0,041	-0,003	0,079	-0,065	0,087	-0,406	-0,058	-0,058	-0,522	0,174	-0,058	0,058	-0,524	0,406	0,290	0,406	0,000
	p	,	0,405	0,093	0,828	0,988	0,679	0,732	0,646	0,244	0,873	0,873	0,122	0,631	0,873	0,873	0,120	0,244	0,416	0,244	1,000
<b>IHC-CD3</b>	r	0,158	1,000	-0,251	0,092	-0,054	-0,274	-0,429	-0,176	-0,426	0,213	-0,071	0,284	-0,569	-0,426	0,071	-0,178	-0,071	0,142	0,213	-0,642
	p	0,405	,	0,180	0,629	0,776	0,142	0,018*	0,352	0,219	0,554	0,845	0,426	0,086	0,219	0,845	0,622	0,845	0,695	0,554	0,046*
<b>IHC-CD20</b>	r	0,312	-0,251	1,000	-0,079	0,196	-0,204	-0,114	-0,117	-0,638	-0,055	0,444	-0,062	0,603	0,381	0,180	0,125	0,139	0,153	0,264	0,157
	p	0,093	0,180	,	0,679	0,299	0,280	0,548	0,537	0,047*	0,879	0,199	0,864	0,065	0,277	0,618	0,730	0,702	0,674	0,462	0,666
<b>IHC-CD4</b>	r	0,041	0,092	-0,079	1,000	0,161	-0,039	-0,212	-0,387	0,374	-0,544	-0,282	-0,203	-0,203	-0,098	0,610	0,237	0,151	0,256	0,138	0,651
	p	0,828	0,629	0,679	,	0,396	0,840	0,260	0,035*	0,287	0,104	0,430	0,573	0,573	0,787	0,061	0,510	0,678	0,476	0,704	0,041*
<b>IHC-CD25</b>	r	-0,003	-0,054	0,196	0,161	1,000	0,207	-0,303	-0,284	-0,174	-0,174	0,290	-0,290	0,522	0,522	0,522	0,349	0,174	0,174	0,406	0,524
	p	0,988	0,776	0,299	0,396	,	0,273	0,103	0,129	0,631	0,631	0,416	0,416	0,122	0,122	0,122	0,323	0,631	0,631	0,244	0,120
<b>IHC-FOXP3</b>	r	0,079	-0,274	-0,204	-0,039	0,207	1,000	-0,025	0,056	-0,012	-0,043	0,146	0,207	0,188	0,152	0,091	-0,262	-0,426	-0,608	-0,249	0,280
	p	0,679	0,142	0,280	0,840	0,273	,	0,898	0,770	0,973	0,907	0,688	0,567	0,602	0,675	0,802	0,464	0,220	0,062	0,487	0,432
<b>Breslow</b>	r	-0,065	-0,429	-0,114	-0,212	-0,303	-0,025	1,000	0,580	0,501	0,056	-0,322	-0,326	-0,196	-0,291	-0,294	-0,295	0,025	0,053	-0,119	-0,288
	p	0,732	0,018	0,548	0,260	0,103	0,898	,	0,000	0,097	0,863	0,307	0,301	0,541	0,359	0,353	0,352	0,940	0,871	0,712	0,364
<b>Clark</b>	r	0,087	-0,176	-0,117	-0,387	-0,284	0,056	0,580	1,000	-0,008	0,296	0,086	0,043	-0,128	0,128	-0,397	-0,107	-0,066	-0,152	-0,047	-0,536
	p	0,646	0,352	0,537	0,035	0,129	0,770	0,000	,	0,981	0,351	0,791	0,895	0,691	0,691	0,202	0,740	0,838	0,638	0,885	0,073
<b>S100B</b>	r	-0,406	-0,426	-0,638	0,374	-0,174	-0,012	0,501	-0,008	1,000	-0,469	-0,580	-0,371	0,021	-0,154	-0,245	-0,291	-0,091	-0,217	-0,490	0,182
	p	0,244	0,219	0,047	0,287	0,631	0,973	0,097	0,981	,	0,124	0,048*	0,236	0,948	0,633	0,443	0,359	0,779	0,499	0,106	0,571
<b>Lenfosit</b>	r	-0,058	0,213	-0,055	-0,544	-0,174	-0,043	0,056	0,296	-0,469	1,000	0,462	0,315	0,028	0,007	-0,315	0,291	-0,035	0,091	0,070	-0,567
	p	0,873	0,554	0,879	0,104	0,631	0,907	0,863	0,351	0,124	,	0,131	0,319	0,931	0,983	0,319	0,359	0,914	0,779	0,829	0,054
<b>CD4<sup>+</sup></b>	r	-0,058	-0,071	0,444	-0,282	0,290	0,146	-0,322	0,086	-0,580	0,462	1,000	0,790	0,517	0,720	-0,084	0,823	-0,490	-0,378	-0,175	-0,004
	p	0,873	0,845	0,199	0,430	0,416	0,688	0,307	0,791	0,048	0,131	,	0,002*	0,085	0,008*	0,795	0,001*	0,106	0,226	0,587	0,991
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	r	-0,522	0,284	-0,062	-0,203	-0,290	0,207	-0,326	0,043	-0,371	0,315	0,790	1,000	0,154	0,455	-0,189	0,694	-0,769	-0,678	-0,531	-0,056
	p	0,122	0,426	0,864	0,573	0,416	0,567	0,301	0,895	0,236	0,319	0,002	,	0,633	0,138	0,557	0,012*	0,003*	0,015*	0,075	0,863
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	r	0,174	-0,569	0,603	-0,203	0,522	0,188	-0,196	-0,128	0,021	0,028	0,517	0,154	1,000	0,713	-0,280	0,424	-0,147	-0,217	-0,259	0,182
	p	0,631	0,086	0,065	0,573	0,122	0,602	0,541	0,691	0,948	0,931	0,085	0,633	,	0,009*	0,379	0,170	0,649	0,499	0,417	0,571
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup></b>	r	-0,058	-0,426	0,381	-0,098	0,522	0,152	-0,291	0,128	-0,154	0,007	0,720	0,455	0,713	1,000	-0,021	0,690	-0,336	-0,427	-0,259	0,333
	p	0,873	0,219	0,277	0,787	0,122	0,675	0,359	0,691	0,633	0,983	0,008	0,138	0,009	,	0,948	0,013*	0,286	0,167	0,417	0,291
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup></b>	r	0,058	0,071	0,180	0,610	0,522	0,091	-0,294	-0,397	-0,245	-0,315	-0,084	-0,189	-0,280	-0,021	1,000	-0,081	0,070	0,189	0,462	0,616
	p	0,873	0,845	0,618	0,061	0,122	0,802	0,353	0,202	0,443	0,319	0,795	0,557	0,379	0,948	,	0,803	0,829	0,557	0,131	0,033*
<b>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	r	-0,524	-0,178	0,125	0,237	0,349	-0,262	-0,295	-0,107	-0,291	0,291	0,823	0,694	0,424	0,690	-0,081	1,000	-0,326	-0,228	-0,231	0,175
	p	0,120	0,622	0,730	0,510	0,323	0,464	0,352	0,740	0,359	0,359	0,001	0,012	0,170	0,013	0,803	,	0,301	0,477	0,470	0,585
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup></b>	r	0,406	-0,071	0,139	0,151	0,174	-0,426	0,025	-0,066	-0,091	-0,035	-0,490	-0,769	-0,147	-0,336	0,070	-0,326	1,000	0,930	0,734	-0,112
	p	0,244	0,845	0,702	0,678	0,631	0,220	0,940	0,838	0,779	0,914	0,106	0,003	0,649	0,286	0,829	0,301	,	0,000*	0,007*	0,729
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>FOXP3<sup>+</sup></b>	r	0,290	0,142	0,153	0,256	0,174	-0,608	0,053	-0,152	-0,217	0,091	-0,378	-0,678	-0,217	-0,427	0,189	-0,228	0,930	1,000	0,832	-0,182
	p	0,416	0,695	0,674	0,476	0,631	0,062	0,871	0,638	0,499	0,779	0,226	0,015	0,499	0,167	0,557	0,477	0,000	,	0,001*	0,571
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup></b>	r	0,406	0,213	0,264	0,138	0,406	-0,249	-0,119	-0,047	-0,490	0,070	-0,175	-0,531	-0,259	-0,259	0,462	-0,231	0,734	0,832	1,000	-0,130
	p	0,244	0,554	0,462	0,704	0,244	0,487	0,712	0,885	0,106	0,829	0,587	0,075	0,417	0,417	0,131	0,470	0,007	0,001	,	0,688
<b>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup></b>	r	0,000	-0,642	0,157	0,651	0,524	0,280	-0,288	-0,536	0,182	-0,567	-0,004	-0,056	0,182	0,333	0,616	0,175	-0,112	-0,182	-0,130	1,000
	p	1,000	0,046	0,666	0,041	0,120	0,432	0,364	0,073	0,571	0,054	0,991	0,863	0,571	0,291	0,033	0,585	0,729	0,571	0,688	,

- Tümörü infiltre eden T lenfositleri ile Breslow kalınlığı ve hastaların kanında ölçülen  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücreleri arasında ters yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,018$ ,  $p=0,046$ ).
- Tümörü infiltre eden B lenfositleri ile serum S100B arasında ters yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,047$ ).
- Tümörü infiltre eden T helper lenfositleri ile Clark seviyesi arasında ters ve hastaların periferik kanlarında ölçülen  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,035$ ,  $p=0,041$ ).
- Hastaların periferik kanlarında ölçülen  $CD4^+$  hücreleri ile serum S100B arasında ters yönde,  $CD4^+CD25^-$ ,  $CD4^+CD25^{high}$  hücreleri ve  $CD4^+/CD8^+$  hücre oranı arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,048$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,008$ ,  $p=0,001$ ).
- $CD4^+CD25^-$  hücreleri ile  $CD4^+/CD8^+$  hücre oranı arasında pozitif,  $CD4^+CD25^-FOXP3^+$  ve  $CD4^+CD25^{++}FOXP3^+$  hücreleri arasında ters yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,012$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,015$ ).
- $CD4^+CD25^{high}$  hücreleri ile  $CD4^+CD25^+$  hücreleri ve  $CD4^+/CD8^+$  hücre oranı arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,009$ ,  $p=0,013$ ).
- $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  ve  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,033$ ).
- $CD4^+CD25^-FOXP3^+$  ve  $CD4^+CD25^{++}FOXP3^+$  ile  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p<0,001$ ,  $p=0,007$ ).
- $CD4^+CD25^{++}FOXP3^+$  ile  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,001$ ).

## 5. TARTIŞMA

---

Malign melanom, deri kanserleri içinde gittikçe artan sıklığı ve diğer birçok maligniteden farklı olarak daha çok genç hasta grubunu etkilemesi nedeni ile önem taşımaktadır (54). Malign melanomların dikkat çeken bir başka özelliği de yüksek metastaz kapasitesi ve ileri evre olgularda hala etkin bir tedavisinin olmaması nedeniyle mortalitenin yüksek olmasıdır. Malign melanom tanısının erken dönemde konulmasının hastanın yaşam süresi ve kalitesine önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. Malign melanomu, diğer solid tümörlerden ayıran belirgin özellikleri, kemoterapi ajanlarına gösterdiği intrinsek direnç ve hastalık seyrinin değişkenliğidir. Bu özellikler, malign melanomda cerrahi dışı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini ve standart hale getirilmesini engellemektedir. Bu doğrultuda hastaya özel tedavilerin geliştirilmesi söz konusu olmaktadır (5). Diğer solid tümörlerden farklı olarak spesifik bir immün cevap sayesinde melanom hastalarında spontan regresyonun görülmesi immünoterapistlerin ilgisini bu hastalığa çekmiş ve günümüzde immünoterapinin başarıya ulaşan hedeflerinden biri haline gelmiştir (2,6).

İmmün cevabı başlatan antijene spesifik efektör yanıtı, periferik kandaki lenfositlerin %70-80'ini oluşturan T lenfositleri oluşturmaktadırlar. Lenfositlerin efektör ve regülatör olmak üzere iki ayrı fonksiyonu vardır. Çeşitli çözünür maddeler üreterek diğer lökosit aktivitelerini de regüle ederler. İmmün sistem, tümör rejeksiyonunda kritik bir role sahiptir ve T lenfositleri, etkili bir tümör immün yanıtın gelişmesinde en önemli hücrelerdir. Bu nedenle, tümörlü olgularda pek çok immün tedavi modeli, T hücre yanıtının aktivasyonuna odaklanmaktadır (7-11). Lenfosit alt gruplarının neoplazilerde immüno-regülatör role sahip oldukları bilinmektedir. İyi işlev gören bir immün sistem tümörlere karşı konakçı savunma mekanizmalarının işletilmesinde gereklidir. Yine iyi görev yapan bir immün sistem sadece terapötik anlamda değil, prognostik anlamda da (lenfosit aberasyonlarının kötü bir prognoz kriteri olabileceği gibi) bir kriter olarak kabul edilebilir.

Timus kökenli bir doğal regülatör T hücre popülasyonu self ve nonself antijenlere karşı immün yanıtın kontrolünde önemli role sahip olduğuna dair giderek artan kanıtlar bulunmaktadır. CD4<sup>+</sup> T hücrelerin CD25 ekspresyon eden grubunun immünsüpresif aktivitede görev aldıkları görülmüştür. Ancak, özellikle insanlarda yeni aktive olmuş CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T

hücrelerinde de eksprese olduğu için, CD25'in tek başına Treg markeri olarak kullanılması sınırlıdır (50). Bir transkripsiyon faktörü olan FOXP3, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücrelerin süpresör olan bölümünü ortaya çıkarmaya yardımcı olmaktadır (38,50,51,55-58).

Bu araştırmanın temel amacı, malign melanom hastalarında tümör infiltre edici lenfositlerin immünohistolojik karakterizasyonu ve dolaşımdaki regülatör T hücrelerinin S100B ile karşılaştırarak prognozu saptamadaki gücünün araştırılmasıdır.

Bu nedenle;

1. Tümör infiltre edici lenfositlerinin saptanması için; Parafine gömülü doku arşivinden 30 hastada immünohistokimya yöntemiyle CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 ve FOXP3 ekspresyonlarının yer ve miktar analizi,
2. 12 yeni malign melanom hastasının (24 sağlıklı kontrol) serumundan S100B proteininin ELISA ile ölçümü,
3. Dolaşımdaki T regülatörlerin sıklığının tam kanda Flow Sitometre ile ölçümü ve
4. Treg'ler ile S100B arasındaki korelasyonun saptanması ve hastaların klinik verileriyle madde 1–3 ilişkisinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada kullanılan hasta kan örnekleri DEÜTF Hastanesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı Polikliniğine Ağustos 2008 – Ağustos 2009 tarihleri arasında başvuran malign melanom hastalarından; kontroller ise mamoplasti, rinoplasti gibi elektif cerrahiler için başvuran ve herhangi bir kanseri olmayan hastalardan alındı. Çalışmaya, üç kadın ve dokuz erkek olmak üzere 12 yeni malign melanom olgusu ile altısı kadın 24 kontrol bireyin kanları dahil edildi. Ayrıca DEÜTF Hastanesi, Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 2003–2009 yılları arasında tanı konulan 17'si erkek 30 malign melanom olgusunun blokları çıkarılarak immünohistokimyasal incelemelerde bulunuldu. Kanları alınan 10 hastanın patoloji blokları da bunların arasındaydı. Hastaların yaş ortalaması 56,50 iken kontrol olgularınki 53,04'dir. Gruplar, yaş ortalaması ( $p=0.431$ ) ve cinsiyet ( $p =0.094$ ) bakımından istatistiksel olarak uygun dağılım göstermektedirler.

Porsiyonlanarak -80°C de saklanan hasta serumları, S100B konsantrasyonunun "sandwich" enzim immünoassay yöntemiyle tayin edilmesinde kullanıldı. Konsantrasyonları 50–2000 pg/ml arasında olan S100B standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri ile kantitasyon yapıldı. S100B ortalamaları hasta grubunda 563,13 pg/ml ve kontrol grubunda 44,22 pg/ml olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p <0,001$ ).

S100B'nin kanda yükselmesi melanom hastalarının yinelemeleri için oldukça iyi bir belirteçtir ve Kruijff S. ve ark. Evre III melanomda yükselmiş S100B'nin kısa hastaliksız sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (59). Bu araştırmada 33 farklı çalışmanın S100B için *cut-off* değerleri verilmiştir. Bu değerler 0,05–3 µg/L arasında olup, bizim çalışmamızda en düşük S100B hasta değeri 0,049 µg/L ve sağlıklı kontrol bireylerinde S100B ortalama değeri 0,044 µg/L olduğu için literatürlerde seçilmiş en düşük *cut-off* değeri olan 0,05 µg/L ve üstü bizim çalışmamız için de sınır alınabilir.

Normal ile hastalığın ayırımında kullanılan S100B *cut-off* değerleri farklı otoanalizörler için değişim göstermektedir. LIAISON Sangtec 100 cihazında 0,12 µg/L baz alınırken, Elecsys S100 cihazında 0,105 µg/L normal olarak kabul edilmektedir (60). *Cut-off* değerinin hemen üzerindeki değerler gri bölge olarak değerlendirilir (Ör. 0,12–0,20 µg/L, LIAISON Sangtec 100) ve hastadan bir ay sonra tekrar kan alınıp S100B ölçümünün tekrarlanması gerektirir. S100B yüksekliğinin tekrarlanması durumunda, tümör yinelemesi açısından vücut taraması gerekmektedir. Gri bölgenin üzerindeki S100B değerlerde tümör yinelemesi açısından hastada ayrıntılı incelemeye gidilmelidir. Serum S100B sonuçlarının yorumunda dikkat edilmesi gereken noktalar ve problemler şu şekilde sıralanabilir:

- Oda ısısında üç saatten fazla tutulan örneklerde yanlış S100B yükseklikleri ortaya çıkabilmektedir;
- Santral sinir sistemi hasarı olan veya kan beyin bariyerinin bozulduğu hastalarda serum S100B yükselebilir;
- Gliyom veya histiyositom gibi ikincil tümörler serum S100B yüksekliğine neden olabilir;
- Karaciğer veya böbrek fonksiyonlarının bozukluğunda S100B yüksekliği olabilir. Bu durumda, karaciğer sirozu yanında primer karaciğer tümörü veya metastaz düşünülmelidir.
- Sağlıklı kontrollerin %2-5'inde normalin üzerinde S100B değerleri olabilmektedir. Bundan dolayı her hastanın kendi S100B başlangıç değerinin tanı anında ölçülmesi ve hastalık seyrinin bu değer esas alınarak izlenmesi önem taşımaktadır.
- Ayrıca, akılda tutulması gereken bir nokta da metastaz gösteren melanom hastalarının %5'inde S100B değeri yükselmemesidir.

Dikkat edilmesi gereken özellikler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda kan örnekleri laboratuvara girdikten 30–120 dakika süre içerisinde santrifüj edilip, -80°C dondurucuda analiz zamanına kadar saklanmıştır (saklama süresi maksimum 11 ay) ve kontrol grubunu oluşturan bireyler de yukarıda sayılan hastalıkları taşımadıklarını bildirmişlerdir.

Banfalvi T. ve ark. Evre III ve Evre IV melanom hasta grupları arasında serum S100B'nin anlamlı derecede farklı olduğunu göstermiştir (61). Evre III melanomda serum S100B 0,01–5 µg/L arasındayken, evre IV'te üst değer 24,49 µg/L'ye çıkmaktadır.

Bizim çalışmamızda da serum S100B değerleri çok yüksek olan hastaların Breslow kalınlıkları ve Clark seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 11 ve 20). Ancak hasta sayımızın düşük olması nedeniyle serum S100B ile hastanın klinik verileri (tümör lokalizasyonu, uzak metastaz, ülserasyon, SLN pozitifliği, Clark seviyesi ve adjuvan terapi alıp almadığı) arasında yapılan karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Benzer şekilde, flow sitometrik olarak ölçülen dolaşımdaki regülatör hücreler ile S100B arasında ilişki bulunamadı. Serum S100B ile tümörü infiltre eden B lenfositleri ve hastaların periferik kanlarında ölçülen CD4<sup>+</sup> hücreleri arasında ters yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,047$ ,  $p=0,048$ ). Hastalık seyrinin iyi bir belirteci olan S100B'den faydalanarak efektör lenfositlerin tümör hücreleri tarafından baskılanmış olabileceğini söylemek mümkündür.

Dolaşımdaki regülatör T hücrelerin ölçümü için Flow Sitometrik analiz tekniğinden yararlanıldı. Literatürde dolaşımdaki Treg'leri değerlendiren çalışmaların genelde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücreleri değerlendirdikleri görülmüştür (62-65). Rosenberg SA. 2005'te altı hasta ve üç kontrol olgusunda, dolaşımdaki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücrelerini değerlendirerek IL-2 tedavisinde bu hücrelerin arttığını göstermiştir. 2007 yılında Vence L ve ark. çalışmalarında dolaşımdaki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ve tümör antijenine spesifik Treg'lerin metastatik melanomda yüksek olduğunu, ama sağlıklı bireyde saptanmadığını gösterdiler. Bundan dolayı antijen spesifik Treg'ler metastatik melanomda immünoterapi açısından yeni bir hedef olabileceğini vurgulamaktadırlar (66). 2008 yılında Jandus C. ve ark. melanom hastaları (n=42) ile sağlıklı kontrollerin dolaşımlarındaki Treg'leri CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri ölçerek göstermişlerdir (62). Araştırmacılar FOXP3 ekspresyonunun sadece CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/high</sup> hücrelerine spesifik olmadığını ve bu hücrelerin de homojen olarak FOXP3 pozitif olmadıklarını göstermişlerdir.

Bizim çalışmamız ile bu araştırmaların sonuçlarını karşılaştıracak olursak, aynı şekilde biz de FOXP3'ün sadece CD4<sup>+</sup> hücrelerin yüksek CD25 pozitifliğinde eksprese olmadığını

gösterdik. Düşük CD25 ekspresyonu olan hücrelerde ve de CD8 eksprese eden hücrelerde FOXP3 protein ekspresyonunu saptadık (Tablo14- 17). CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri ile CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı (Tablo 29)(p=0,033).

Aynı çalışmada, CD25'i orta seviyede eksprese eden hücrelerde yüksek oranda FOXP3'ün eksprese olduğu gösterilirken, bu ekspresyonun CD25<sup>high</sup> olan hücre grubunun %30'unda olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca FOXP3'ün CD8<sup>+</sup> olan hücrelerde saptanmadığı ifade edilmektedir (62).

Bizim çalışmamızda, yüksek seviyede CD25 ekspresyonu olan hücrelerdeki FOXP3 ekspresyonu orta düzeyde CD25 ekspresyonu olan hücrelere göre 3 kat fazlaydı. Bu bulguyu, yüksek seviyedeki CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> hücrelerin süpresör etki yapmaya başlamış Treg hücreleri oldukları yönünde değerlendirmek mümkündür. Ancak, hasta grubunda bu hücreler kontrol grubuna göre düşüktü (Tablo19). Melanomu olan hastalardaki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg'lerin düşüklüğü, bu hücrelerin T hücreleri üzerine olan süpresör etkilerinin azlığını ve bu da T hücrelerinin tümör savunmasında aktive olduğunu gösterebilir.

Hastalarımızda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekken ( $p=0,025$ ,  $p <0,001$ ), FOXP3 pozitifliğini CD25 ekspresyon miktarına göre değerlendirdiğimizde aralarındaki farkın sağlıklı kontroller yönüne değişmesi, aydınlatılması gereken önemli bir noktadır (Tablo18,19).

Günümüzde sağlıklı bireylerin periferik kanındaki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücreleri hakkında bilgi içeren çok az çalışma vardır (62,67). Sağlıklıların periferik kanında % 1,1–5,7 arasında CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücreleri bulan Janus ve ark. kadınlarda bu hücrelerin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Hastalarda ise CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücreleri %1,8–10,4 arasında bulunurken, cinsiyet arasında fark yoktur. Kendi çalışmamızda da sağlıklı kontrollerde kadınlardaki Treg hücrelerini gösteren alt grupların erkeklere göre daha yüksek olduğunu gördük, ancak olgu sayısının düşüklüğü nedeniyle, fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Baş, boyun ve gövdelerine lokalize melanomu olan hastalarda, ekstremitelerinde melanomu olan hastalara göre periferik kanlarında CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>FoxP3<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> hücreleri yüksekti (sırasıyla  $p=0,021$  ve  $p =0,033$ ). Ayrıca tümör ülserasyonu göstermeyen hastalarda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri ülserasyonlulara göre yüksekti ( $p=0,025$ ).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hücrelerde FOXP3 pozitifliğini incelediğimizde CD25 ekspresyonunun artmasıyla FOXP3 proteininin de arttığını görmekteyiz (Tablo 19). Ancak, CD25 için düşük veya hiç ekspresyonu olmayan hücrelerde de FOXP3'ün bulunması, sadece CD25 ekspresyon varlığıyla Treg tayinine gidilemeyeceği ortak görüşünü tekrar desteklemektedir. Bu bulgumuz daha önceki çalışmalarla da uyumluydu (62,68).

Bizim araştırmamızdaki gibi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> hücrelerin hastalarda daha yüksek olduğunu bulan çalışmalarda (62, 65) şu hipotez vurgulanmaktadır: Tümör hücreleri tarafından yüksek seviyede salgılanan sitokinler (Ör. IL-2, TGFβ) tarafından CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücrelerinin lokal proliferasyonu ve CD4<sup>+</sup> hücrelerin Treg'lere dönüşümü sağlanabilir. Tümör hücreleri bu mekanizmayla kendi büyümelerini Treg'leri artırarak gerçekleştirdikleri düşünülebilir. Bizim çalışmamızla da desteklenen bu hipotezin güçlendirilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çoğu ileri seviye malign melanom ve metastazlarda doku seviyesindeki TIL'lerin erken evre melanoma göre daha düşük seviyede olduğu gösterilmiştir (16,39,69). Genel olarak CD4<sup>+</sup> hücreleri ön planda olmakta ve tümör progresyonunda CD8<sup>+</sup> lenfositlerinde düşüklük izlenmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgileri ile desteklenmekteydi:

- Tümörü infiltre eden CD3<sup>+</sup> lenfositleri %75'in altında olan hastaların Breslow kalınlıkları, bu hücrelerin %75'in üzerinde olan hastalara göre yüksek bulunmuştur ( $p = 0,021$ ).
- Erkeklerde kadınlara göre tümörü infiltre eden CD4<sup>+</sup> lenfositlerinin tamamı %50'nin altındaydı ve bu fark anlamlıdır ( $p = 0,014$ ).
- Ülserasyonu olmayan hastalarda tümörü infiltre eden CD3<sup>+</sup> lenfositleri %75'in üzerindeydi ( $p = 0,045$ ).
- Tümörü infiltre eden T helper lenfositleri ile Clark seviyesi arasında ters ve hastaların periferik kanlarında ölçülen CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p = 0,035$ ,  $p = 0,041$ ).
- Tümörü infiltre eden B lenfositleri ile serum S100B arasında ters yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p = 0,047$ ).

Tüm bu anlamlı korelasyonları bir araya getirecek olursak, hastalık prognozu ile TIL varlığı arasında ters yönde bir ilişki olduğunu ve tümörü süprese edecek olan lenfositlerin azlığının bu tümörün gelişmesine neden olduğunu söylemek mümkündür.



TIL'lerin içerisinde yer alan Treg'lerin, sitotoksik lenfositlerin aktivitesini inhibe ederek, immün süpresyonu kontrol ettikleri gösterilmiştir. Kanserde, özellikle melanomda  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Treg'lerini doku seviyesinde araştıran az sayıda çalışma vardır. Bu araştırmaların sonucunda  $CD4^+CD25^+FOXP3^+/CD8^+$  hücre oranının artması prognoz ile ters yönde korele olduğu gösterilmiştir (16, 70–73). Mourmouras V. ve ark. (16) melanomun subtiplerinde yaptıkları çalışmalarında Treg'lerin hem 'junctional', hem 'compound atypical' nevus hem de malign melanomun radyal büyüme fazında yüksek prevelansta olduğunu gösterdiler. Bu bulgunun sonucunda araştırmacılar Treg'lerin melanom büyümesini desteklediğini ve melanomagenezis sırasında erken immüntoleransı uyardığını öne sürmektedirler.

Bizim çalışmamızda tümörü infiltre eden lenfositler arasında FOXP3 ekspresyonu gösteren hücreler ile hastanın klinik verileri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Tümörü infiltre eden T lenfositleri ile periferik kan  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücreleri arasında ters yönde, anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,046$ ) ve tümörü infiltre eden  $CD4^+$  T lenfositleri ile  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücreleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon saptandı ( $p=0,041$ ). TIL'lerin kompozisyonu ağırlıklı olarak T hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Kanseler arası farklılıktan çok hastalar arasındaki farklılıktan kaynaklanan geniş bir aralıkta eksprese olmaktadır. Bazı hastalarda  $CD4^+$  T hücreleri %90 oranında temsil edilirken diğer hastalarda %90 oranında  $CD8^+$  T hücreleri görülmektedir (43). Bu çalışmada hasta grubunda yüksek bulunan  $CD8^+CD25^+FOXP3^+$  hücreleri dokudaki T lenfositleri ile ters ve  $CD4^+$  T lenfositleri ile pozitif korelasyonda olmasını, tümörü çevreleyen helper T lenfositlerin sitotoksik T lenfositleri uyarmak üzere artış gösterdiği şeklinde açıklamak mümkündür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

---

Bu çalışma sonunda elde ettiğimiz veriler, Treg'lerin anti tümör immünesinde olası bir rolü olduğunu göstermektedir. Ancak henüz anlaşılamayan bulguların açıklanabilmesi için Treg'lerin daha fazla karakterize edilmesi gerekmektedir. Gelecekte Treg'ler için spesifik marker ekspresyonunu araştıran, inhibisyon mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik ve antijen özgünlüğünü dikkate alan çalışmalar dizayn edilmesinin yararlı olacağı öngörülmektedir. Bununla beraber, CD4<sup>+</sup> T hücrelerini artırma ve Treg hücrelerini kısıtlamaya yönelik yeni kanser aşı programları hem CD8<sup>+</sup> T hücreleri hem de antijen spesifik immün cevabı düşünerek değerlendirilmelidir.

### **S100B için öneriler**

Malign melanomda hastalık seyrinin iyi bir belirteci olan S100B'den faydalanarak evreleme, prognoz tahmin edilmesi, tedavi başarısının ölçümü ve yinelemenin öngörülmesi sağlanabilir. Avrupa'daki birçok ülkenin melanom klinik izlem rehberlerinde önerildiği gibi ülkemizde de S100B takibinin yapılmasını önerebiliriz. Bu rehberlerde önerilen izlem şeması şu şekildedir (60):

1. Tanı sırasında bir kez bakılması.
2. Evre I / II melanomlarda erken metastazın saptanması amacıyla bakılabilir.  
Breslow < 1mm ise bir daha bakılmasına gerek yoktur, eğer Breslow >1mm ise  
3-6 ayda bir bakılır
3. Evre III'te (rejyonel metastaz varlığında) 3-6 ayda bir bakılır
4. Evre IV'te (uzak metastaz varlığında) prognoz ve tedavi izlemi için her tedavi küründe bir kez bakılır.

### **Dolaşımdaki Treg'ler için öneriler**

CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> hücrelerin sağlam kontrollerdeki standart sapmaların yüksekliği nedeniyle en az 1,8 katlık bir artışın farklı artış olarak değerlendirilmesi önerilmektedir (62).

Ayrıca cinsiyete göre fark göstermesi de dikkate alınarak menstruasyon siklusüne göre de fark olacağı (74) göz önünde bulundurulmalıdır.

### **Doku seviyesindeki TIL'ler için öneriler**

Treg'lerin doku düzeyinde rutinde çalışılmasının getirebileceği yenilikler: Prognostik bir marker olarak rutine geçmesi, tedavi hedefi olarak rolü olup olamayacağı bu verilerden elde edilebilir ve melanom hastalarının tedavi monitorizasyonunda histolojik bir parametre olarak kullanılmasını mümkün kılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

---

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
2. Enk AH, Becker JC, Schuler G. Immunotherapy of malignant melanoma--basic principles and novel therapeutic approaches. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006 Aug;4(8):635-45. Review. German
3. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2001 Apr;13(2):134-40. Review
4. Karabulut B, Sezgin V. C., Göksel G, Şanlı U. A, Uslu R, Göker E. Yüksek riskli malign melanomun adjuvan tedavisinde orta yüksek doz interferon alfa-2b tedavisinin etkinliği ve tolerabilitesi. *Int J Hematol and Oncol.* 2005,15 (1): 006-014
5. Becker JC, Kirkwood JM, Agarwala SS, Dummer R, Schrama D, Hauschild A. Molecularly targeted therapy for melanoma: current reality and future options. *Cancer.* 2006 Nov 15;107(10):2317-27. Review
6. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:175-208. Review
7. Wang RF: Functional control of regulatory T cell and cancer immotherapy. *Seminars in Cancer Byology* 2006;16:106-114
8. Rosenberg SO: CD4+ Lymphocytes: A Critical Components of Antitumor Immunity. *Cancer Investigation* 2005; 23:413-419
9. Gerloni M, Zanetti M: CD4 T in tumor immunity. *Springer Semin Immun*

2005;27:37-49

10. Lopez M, Aguilera R, Perez C, Mendoza AN: The role of regulatory T Lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines.

Immunobiology 2006;211:127-36

11. Abbas A.K., Lichtman A.H. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System Nov.2004

12. Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. J Immunother. 2006 May-Jun;29(3):233-40. Review

13. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. Blood. 2006 Aug 1;108(3):804-11. Review

14. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 20;102(51):18538-43.

15. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2006 May 1;107(9):3639-46.

16. Mourmouras V, Fimiani M, Rubegni P, Epistolato MC, Malagnino V, Cardone C, Cosci E, Nisi MC, Miracco C. Evaluation of tumour-infiltrating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases. Br J Dermatol. 2007 Sep;157(3):531-9.

17. Harpio R, Einarsson R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. Clin Biochem. 2004 Jul;37(7):512-8. Review

18. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.
19. Lotze MT, Ramsey DM, Kirkwood JM, et al. Cutaneous melanoma. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (editors). *Cancer: principles and practice of oncology*. 8th edition. Lippincott Williams and Wilkins, London, UK; 2008.
20. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Apr 1;101(7):452-74. Epub 2009 Mar 24. Review.
21. Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, Gogas HJ. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3445-55. Review.
22. Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman JJ 3rd. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Apr;105(5):1774-99; quiz 1800-1. Review.
23. Greene MH, Clark WH Jr, Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med*. 1985 Apr;102(4):458-65.
24. Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):383-95, vii. Review.
25. Liu T, Soong SJ. Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 1996;76:1205.
26. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009 Aug;20 Suppl 6:vi1-7.

27. Sober AJ, Chuang TY, Duvic M, Farmer ER, Grichnik JM, Halpern AC, Ho V, Holloway V, Hood AF, Johnson TM, Lowery BJ; Guidelines/Outcomes Committee. Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Oct;45(4):579-86.
28. Buzzell RA, Zitelli JA. Favorable prognostic factors in recurrent and metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1996 May;34(5 Pt 1):798-803. Review.
29. Klimek VM, Wolchok JD, Chapman PB, Houghton AN, Hwu WJ. Systemic chemotherapy. *Clin Plast Surg*. 2000 Jul;27(3):451-61, ix-x. Review.
30. Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):501-13, ix. Review.
31. Rouse CR, Allen A, Fosko S. Review of the 2002 AJCC cutaneous melanoma staging system. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2003 Feb;11(1):1-8. Review.
32. Homsy J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control*. 2005 Oct;12(4):223-9. Review.
33. Torabian S, Kashani-Sabet M. Biomarkers for melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2005 Mar;17(2):167-71. Review.
34. Ali-Salaam P, Ariyan S. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsies. *Clin Plast Surg*. 2000 Jul;27(3):421-9, ix. Review.
35. Scolyer RA, Murali R, McCarthy SW, Thompson JF. Pathologic examination of sentinel lymph nodes from melanoma patients. *Semin Diagn Pathol*. 2008 May;25(2):100-11. Review.
36. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic

melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*. 1994 Mar 23-30;271(12):907-13.

37. Ma D, Ariyan S. The use of isolated limb perfusion to manage recurrent malignant melanoma. *Clin Plast Surg*. 2000 Jul;27(3):441-50, ix. Review.

38. Hussein MR, Elasers DAH, Fadel SA, Omar AE. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. *J Clin Pathol* 2006; 59:316–24.

39. Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006; 42: 760-767.

40. Moore OS Jr, Foote FW Jr. The relatively favourable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 1949; 2: 635-642.

41. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-727.

42. Elder DE, Guerry D 4th, VanHorn M, Hurwitz S, Zehngebot L, Goldman LI, LaRossa D, Hamilton R, Bondi EE, Clark WH Jr. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). *Cancer* 1985; 56: 413-418.

43. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009 Apr 2;9:3.Review.

44. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 4th ed. New York (NY): Garland Science; 2005.

45.Kawakami Y. New cancer therapy by immunomanipulation: development of immunotherapy for human melanoma as a model system. *Cornea* 2000; 19(3 Suppl): S2-S6.



46. Mandruzzato S, Rossi E, Bernardi F, Tosello V, Macino B, Basso G, Chiarion-Sileni V, Rossi CR, Montesco C, Zanovello P. Large and dissimilar repertoire of Melan-A/MART-1-specific CTL in metastatic lesions and blood of a melanoma patient. *J Immunol* 2002; 169: 4017-4024.
47. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32.
48. Ralfkiaer E, Hou-Jensen K, Gatter KC, Drzewiecki KT, Mason DY. Immunohistological analysis of the lymphoid infiltrate in cutaneous malignant melanomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987; 410: 355-361.
49. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006; 118: 1-10.
50. Nizar S, Copier J, Meyer B, Bodman-Smith M, Galustian C, Kumar D, Dalglish A. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *Br J Cancer*. 2009 Jun 2;100(11):1697-703. Epub 2009 Apr 21. Review.
51. Chatenoud L, Bach JF. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J Clin Invest*. 2006 Sep;116(9):2325-7
52. Molina R, Navarro J, Filella X, Castel T, Ballesta AM. S-100 protein serum levels in patients with benign and malignant diseases: falsepositive results related to liver and renal function. *Tumour Biol* 2002;23:39-44.
53. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 613619.

54. Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW:Cutaneous melanoma: Update prevention, screening, diagnosis and treatment.Am Fam Physician 72:269-276, 2005
55. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol. 2005;6: 345-352.
56. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. Epub 2003 Jan 9.
57. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. Cell. 2006 Jul 28;126(2):375-87.
58. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. Immunity. 2005 Mar;22(3):329-41.
59. Kruijff S, Bastiaannet E, Muller Kobold AC, van Ginkel RJ, Suurmeijer AJ, Hoekstra HJ. S-100B Concentrations Predict Disease-Free Survival in Stage III Melanoma Patients. Ann Surg Oncol. 2009 Jul 28.
60. Ugurel S. Serum markers for melanoma. Hautarzt. 2005 Feb;56(2):173-84;185-6.
61. Bánfalvi T, Boldizsár M, Gergye M, Gilde K, Kremmer T, Ottó S. Comparison of prognostic significance of serum 5-S-Cysteinyl-dopa, LDH and S-100B protein in Stage III-IV malignant melanoma. Pathol Oncol Res. 2002;8(3):183-7. Epub 2003 Jan 6.
62. Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. Cancer Immunol Immunother. 2008 Dec;57(12):1795-805.
63. Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, Xie W, Friedman AH, Archer GE, Herndon JE 2nd, Bigner DD, Dranoff G, Sampson JH. Increased regulatory T-cell fraction amidst a

diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3294-302.

64. Griffiths RW, Elkord E, Gilham DE, Ramani V, Clarke N, Stern PL, Hawkins RE. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Nov;56(11):1743-53.

65. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4<sup>+</sup> CD25(hi) Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in cancer patients. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2409-14.

66. Vence L, Palucka AK, Fay JW, Ito T, Liu YJ, Banchereau J, Ueno H. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 26;104(52):20884-9. Epub 2007 Dec 18

67. Fritzsching B, Oberle N, Pauly E, Geffers R, Buer J, Poschl J, Krammer P, Linderkamp O, Suri-Payer E. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood.* 2006 Nov 15;108(10):3371-8.

68. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med.* 2006 Jul 10;203(7):1701-11. Epub 2006 Jul 3.

69. Lyle S, Salhany KE, Elder DE. TIA-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes in nevi and melanomas. *Mod Pathol* 2000; **13**:52–5.


70. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:5423–34.

71. Viguier M, Lemaitre F, Verola O et al. Foxp3 expressing CD4+CD25 (high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; **173**:1444–53.
72. Sato E, Olson SH, Ahn J et al. Intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *PNAS* 2005; **102**:18538–43.
73. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H et al. The expression of the regulatory T cell specific Forkhead Box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:8326–31.
74. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2572

## EK.1: ETİK KURUL ONAYI

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 20.06.2008/ 252

<p><b>Etik Kurul Üyeleri</b> Prof.Dr.Taner ÇAMSARI Prof.Dr.Tunç ALKIN Prof.Dr.Mustafa SEÇİL Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK Doç.Dr.Murat DUMAN Doç.Dr.Güven ASLAN Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN Yunus KARSLI</p> <p><b>Etik Kurul Başkanı</b> Prof.Dr.Taner ÇAMSARI</p> <p><b>Etik Kurul Sekreteri</b> Hatice İGÇİ</p>	<p><b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,</b></p> <p>Etik Kurulumuzun 19 Haziran 2008 tarih ve 01/14/2008 no.lu toplantısında; 236/2004 Protokol numaralı Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Can KARACA'nın proje yöneticisi ve Uzm.Dr.Araş.Gör.Serpi Tanrıverdi AKHİSAROĞLU'nun sorumlusu olduğu, "<b>Malign melanomda regülatör T hücrelerinin yeri</b>" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.</p> <p>Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p>Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.</p> <p> <b>Prof. Dr.Taner ÇAMSARI</b> <b>Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları</b> <b>Etik Kurul Başkanı</b></p>
--	---

Tel: 0232 412 22 54

## EK.2: GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

**Çalışmanın Adı:** Malign Melanomda Regülatör T Hücrelerinin Yeri

Dünyada görülme sıklığı artan malign melanom, diğer tümörlere göre çok farklı bir doğal seyir izlemektedir. Erken tanı için risk altında olan toplumlarda tarama yöntemleri geliştirilmektedir. Tüm bunlara karşın hastalığın sıklığı artmakta ve bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer tümörlerden farklı olarak spesifik bir immun cevap sayesinde melanom hastalarında iyileşme görülmesi immunoterapistlerin ilgisini bu hastalığa çekmiş ve günümüzde immunoterapinin başarılı hedeflerinden biri haline gelmiştir.

Bu çalışmada; malign melanom hastalarında kandan elde edilebilen ve hastanın immunitisini, tedavi izlemine ve prognozunu gösterebilen belirteçler araştırılacak ve hastalardan alınan doku örneklerinden adoptif T hücre tedavisinde kullanılan tümör infiltre edici lenfosit (TIL) kültürleri oluşturulacak ve çoğaltılacaktır.

Bu amaçla; tedavi alan tüm hastaların tedavi öncesi ve tedavi sırasında (normal kontrole geldikleri 30 gün arayla) rutin kan alımları esnasında 5 ml venöz kan alınacaktır. Kan alınan yerin çevresinde morluk, kızarıklık ve ısı artışı ortaya çıkabilir. Bunun için bölgesel soğutma, kolun yükseğe kaldırılması ve antibiyotik tedavisi gerekebilir. Ayrıca seçilen 6 hastadan tümörlü dokudan örnek alınacaktır. Olası cerrahi komplikasyonlar (kanama, enfeksiyon, yara yerinin ayrılması) ortaya çıkabilir. Bu komplikasyonların giderilmesi için uzun süreli pansuman uygulanması, antibiyotik kullanımı veya ikinci bir operasyon (kanamanın durdurulması, olası yara yerinin ayrılması) gerekebilir.

Bu çalışma ile malign melanom hastalarının tedavilerinde immunoterapi seçeneği için Dokuz Eylül Üniversitesinde bir yöntemi geliştirmeyi amaçlamaktayız ve sizin tedavinize yansımayacaktır. Çalışmada 40 gönüllü hastadan kan ve 6 gönüllü hastadan doku örneği alınması planlanmaktadır. Çalışmaya katılmayı kabul etmeniz halinde 12 ay süreyle izleneceksiniz.

Yapılan bu araştırma hastalığınız ile ilgili olarak size tedaviniz açısından ek tıbbi yarar sağlamamaktadır. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

*Çalışmayla ilgili sorularınızı yöneltebileceğiniz araştırmacılar:*

Uzm. Dr. Serpil Tanrıverdi Akhisaroğlu, Onkoloji Enstitüsü AD, 412 58 73

Yard.Doç.Dr. Cenk Demirdöver, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahisi AD, 412 35 09

Prof.Dr.Can Karaca, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahisi AD, 412 35 02

- Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.

- Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir.
- Bu çalışmada yer aldığımız süre içerisinde kayıtlarımızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarımız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır.
- Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

**Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.**

**Hastanın:**

**Adı :**

**Soyadı :**

**Telefon Numarası:**

**Adres:**

**Tarih :**

**İmza :**

**Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin**

**Adı :**

**Soyadı :**

**Telefon Numarası :**

**Tarih :**

**İmza :**

**Araştırma Yapan Araştırmacının**

**Adı :**

**Soyadı :**

**Telefon Numarası :**

**Tarih :**

İmza :

## EK.3: SAĞLIKLI KONTROLLER İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

**Çalışmanın Adı:** Malign Melanomda Regülatör T Hücrelerinin Yeri

Dünyada görülme sıklığı artan malign melanom, diğer tümörlere göre çok farklı bir doğal seyir izlemektedir. Erken tanı için risk altında olan toplumlarda tarama yöntemleri geliştirilmektedir. Tüm bunlara karşın hastalığın sıklığı artmakta ve bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer tümörlerden farklı olarak spesifik bir immun cevap sayesinde melanom hastalarında iyileşme görülmesi immunoterapistlerin ilgisini bu hastalığa çekmiş ve günümüzde immunoterapinin başarılı hedeflerinden biri haline gelmiştir.

Bu çalışmada; malign melanom hastalarında kandan elde edilebilen ve hastanın immunitisini, tedavi izlemine ve prognozunu gösterebilen belirteçler araştırılacak ve hastalardan alınan doku örneklerinden adoptif T hücre tedavisinde kullanılan tümör infiltre edici lenfosit (TIL) kültürleri oluşturulacak ve çoğaltılacaktır.

Bu amaçla; Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahiye gelen 40 sağlıklı kontrol bireyinden rutin kan alımları esnasında 5 ml venöz kan alınacaktır. Kan alınan yerin çevresinde morluk, kızarıklık ve ısı artışı ortaya çıkabilir. Bunun için bölgesel soğutma, kolun yükseğe kaldırılması ve antibiyotik tedavisi gerekebilir.

Bu çalışma ile malign melanom hastalarının tedavilerinde immunoterapi seçeneği için Dokuz Eylül Üniversitesinde bir yöntemi geliştirmeyi amaçlamaktayız ve sizin tedavinize yansımayacaktır. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

*Çalışmayla ilgili sorularınızı yöneltebileceğiniz araştırmacılar:*

Uzm. Dr. Serpil Tanrıverdi Akhisaroğlu, Onkoloji Enstitüsü AD, 412 58 73

Yard.Doç.Dr. Cenk Demirdöver, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahisi AD, 412 35 09

Prof.Dr.Can Karaca, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahisi AD, 412 35 02

- Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.
- Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir.
- Bu çalışmada yer aldığımız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır.



- Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

**Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.**

**Sağlıklı Kontrol Birevinin;**

**Adı :**

**Soyadı :**

**Telefon Numarası:**

**Adres:**

**Tarih :**

**İmza :**

**Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin**

**Adı :**

**Soyadı :**

**Telefon Numarası :**

**Tarih :**

**İmza :**

**Araştırma Yapan Araştırmacının**

**Adı :**

**Soyadı :**

**Telefon Numarası :**

**Tarih :**

**İmza :**