Laçin CEVHERTAŞ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM
DALI

MALİGN MELANOMA OLGULARINDA YENİ B HÜCRE ALT GRUPLARININ ARAŞTIRILMASI

Laçin CEVHERTAŞ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI

MALİGN MELANOMA OLGULARINDA YENİ B HÜCRE ALT GRUPLARININ ARAŞTIRILMASI

Laçin CEVHERTAŞ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

BURSA-2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "MALİGN MELANOMA OLGULARINDA YENİ B HÜCRE ALT GRUPLARININ ARAŞTIRILMASI" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Laçin CEVHERTAŞ
28/01/2022

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

28/01/2022

Adı Soyadı: Laçin Cevhertaş

Anabilim Dalı: İmmünoloji

Tez Konusu: Malign melanoma olgularında yeni B hücre alt gruplarının araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	✓	❑	
Dış Kapak Sayfası	✓	❑	
İç Kapak Sayfası	✓	❑	
Kabul Onay Sayfası	✓	❑	
Sayfa Düzeni	✓	❑	
İçindekiler Sayfası	✓	❑	
Yazı Karakteri	✓	❑	
Satır Aralıkları	✓	❑	
Başlıklar	✓	❑	
Sayfa Numaraları	✓	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	✓	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	✓	❑	
Kaynaklar	✓	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. H. Barbaros Oral

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak
ETİK BEYANI ..... **II**
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **III**
İÇİNDEKİLER ..... **IV**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VII**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **VIII**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1 Malign Melanoma **2**
2.1.1 Tanım **2**
2.1.2 Epidemiyoloji **2**
2.1.3 Etiyoloji ve Patofizyoloji **3**
2.1.3.1 Etiyoloji **3**
2.1.3.2 Patofizyoloji **6**
2.1.4 Klinik Tanı **7**
2.1.5 Evreleme **8**
2.1.5.1 Malign melanoma TNM sınıflandırılması **8**
2.1.5.1.1 Klinik sınıflandırma **10**
2.1.5.1.2 Patolojik sınıflandırma **14**
2.1.5.1.3 Prognostik faktörler **17**
2.2 Metastatik Malign Melanomada İlaç Tedavisi **18**
2.2.1 Kemoterapi **18**
2.2.2 Hedeflenmiş Tedavi **18**
2.2.3 İmmünoterapi **19**
2.2.3.1 İmmün ilişkili yan etkiler **22**
2.2.4 ICI tedavisinde biyolojik ve serolojik belirteçler **24**
2.2.4.1 Tümör yanıtı için biyo-belirteçler **24**
2.2.4.2 İmmün ilişkili yan etkiler için biyo-belirteçler **28**
2.3 B Hücreleri **30**
2.3.1 B Hücreleri fenotipleri, işlevleri ve bağışıklık sistemi ilişkisi **30**

2.3.2 BAFF-APRIL ekseni ve reseptörleri: BAFF-R, TACI, BCMA 32
2.3.3 B Hücrelerinin metastatik melanomadaki rolleri 35
2.3.4 B hücreler ve immünoterapi yanıtlarındaki rolleri 37
2.3.5 İmmün ilişkili yan etkilerde B hücre reaktivitesinin mekanizması 38
2.3.6 İmmün ilişkili yan etkilerde B hücrelerin potansiyel biyo-belirteç olarak rolleri 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 40
3.1 Araç ve Gereçler 40
3.1.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar 40
3.1.2 Deneylerde kullanılan çözeltiler 41
3.1.3 Deneylerde kullanılan akan hücre ölçer ilişkili reaktifler 42
3.1.4 Elisa ölçüm kit ve malzemeleri 42
3.1.5 Cihazlar 43
3.2 Çalışma grubu 43
3.2.1 Klinik örnekler 43
3.3. Yöntem 46
3.3.1 Periferik kan mononükleer hücre (PKMH) eldesi 46
3.3.2 Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonlarının Belirlenmesi 46
3.3.2.1 Hücre Yüzey Boyaması 46
3.3.2.2 Akan hücre ölçer kompanzasyon ayarı 48
3.3.2.3 Akan hücre ölçer ile analiz 48
3.3.2.4 Akan hücre ölçer verilerinin analizi 49
3.3.3 Serum ayrıştırılması 50
3.3.4 Serum BAFF ve APRIL seviyelerinin saptanması 51
3.3.4.1 ELISA verilerinin analizi 52
3.4 İstatistiksel analizler 53
4. BULGULAR 54
4.1 Hasta popülasyonu ve özellikleri 54
4.1.1 ICI tedavisi yanıtlarının değerlendirilmesi 54
4.1.2 İmmün-ilişkili yan etkilerin değerlendirilmesi 55
4.2 Akan hücre ölçer sonuçlarının değerlendirilmesi 56
4.2.1 Hasta örnekleri ve kontrol grubunda ana B hücre belirteçlerinin değerlendirilmesi 56
4.2.1.1 ICI tedavi sürecinde tedavi öncesi, erken yanıt ve geç B hücre yanıtları 57

4.2.1.2 ICI tedavi sürecinde B hücre ilişkili belirteçlerin hastalarda irAEs'e göre değerlendirilmesi 60

4.2.1.3 ICI tedavi sürecinde aynı vizitteki B hücre popülasyonlarının değerlendirilmesi 62

4.2.1.4 ICI tedavi sürecinde aynı vizitteki B hücre popülasyonlarının irAEs'e göre değerlendirilmesi 64

4.2.2 Hasta örnekleri ve kontrol grubunda B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçleri açısından değerlendirilmesi 66

4.2.2.1 ICI tedavi sürecinde tedavi öncesi, erken yanıt ve geç B hücre yanıtlarında yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi 66

4.2.2.2 ICI tedavi sürecinde B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçlerinin hastalarda irAEs'e göre değerlendirilmesi 68

4.2.2.3 ICI tedavi sürecinde aynı vizitteki B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi 69

4.2.2.4 ICI tedavi sürecinde aynı vizitte ki B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçlerinin irAEs'e göre değerlendirilmesi 70

4.3 Serum BAFF ve APRIL protein konsantrasyonlarının değerlendirilmesi 72

4.3.1 Hasta örneklerinin, ICI tedavi sürecinde ve tedavi öncesinde kontrol grubu ile değerlendirilmeleri 72

4.3.2 ICI tedavisi sürecinde serum proteinlerinin hastalarda irAEs'e göre değerlendirilmesi 74

4.4 Serum proteinleri ve B hücre popülasyonları arasındaki ilişki 75

4.4.1 APRIL ve BAFF proteinleri ve B hücre yüzey belirteçleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi 75

4.4.2 BAFF protein seviyeleri ve B hücre popülasyonları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi 77

4.5 Serum proteini BAFF'ın ROC analizi ile değerlendirilmesi 80

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 83

6. KAYNAKLAR 94

7. SİMGELER VE KISALTMALAR 106

8. EKLER 108

9. TEŞEKKÜR 110

10. ÖZGEÇMİŞ 111

TÜRKÇE ÖZET

İmmün kontrol noktası inhibitör (ICI) tedavisinin malign melanoma olgularındaki etkinliğinin belirlenmesi için öngörücü biyo-belirteçlerin tanımlanması, tedavi seçimine ve klinikte takibine yardımcı olması açısından önemlidir. Malign melanomada ICI'nin ana hedefi T hücre efektör fonksiyonları olmasına rağmen, olgun ve farklılaşmış B hücre fenotiplerinin de ICI yanıtları ile pozitif ilişkide olduğu öne sürülmekte ancak ICI tedavisindeki rollerine yönelik çalışmalar az sayıdadır. Bu çalışmada, uzun süreli takip edilen metastatik melanoma (MM)'lı olguların ICI immünoterapisine verdikleri B-hücre aracılı immün yanıtları, tedaviye yanıt veren (YV) ve yanıtsız (YZ) olgulardaki B hücre alt gruplarındaki farklılıkların saptanması ve B hücre ilişkili sitokinlerin prognostik ve öngörücü klinik biyo-belirteç olarak kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. MM'li olgular ve sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örneklerinden akan hücre ölçer ile B hücre alt grupları saptanmıştır. Aynı grupların serum örneklerinden BAFF ve APRIL sitokin seviyeleri Elisa yöntemi ile tespit edilmiştir. ICI tedavisinin, YZ olgularda naif B hücre frekanslarını periferde arttırırken, dönüşmüş bellek (IgD-CD27+), klasik (CD21+CD27+), dönüşmemiş bellek B hücre ve IgA+ B hücre frekanslarını azalttığı saptanmıştır. Tedavinin erken ve geç vizitlerinde dönüşmüş (IgM-IgD-) ve dönüşmüş bellek B hücreler YV'lerde yüksek frekanslarda bulunmuştur. ICI tedavisinin, CD21-/dü dönüşmüş B hücre frekanslarının YZ olgularda arttırdığı, YV olgularda BAFF-R ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. YZ olgulara nazaran her vizitte BAFF-R ve TACI ekspresyonları YV olgularda yüksek tespit edilmiştir. Tedavi başlangıcında YZ olguların BAFF serum konsantrasyonlarının, kontrollerden ve YV olgulardan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışma sonuçları, serum BAFF seviyelerinin, BAFF-R ve TACI ekspresyonlarının ve CD21-/dü B hücre frekanslarının ICI tedavisi altındaki MM'li hastaların efektif anti-tümör yanıtlarında rolü olduğunu ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metastatik melanoma, immünoterapi, B hücre, BAFF, BAFF-R

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of new B cell subgroups in malignant melanoma cases.

Determining predictive bio-markers is beneficial for selecting and monitoring the effect of immune checkpoint inhibitor (ICI) treatment in malignant melanoma patients. Although the main target of ICI in malignant melanoma is T cell effector functions, it is suggested that mature and differentiated B cell phenotypes also have a positive relationship with ICI response. However, there are few studies in this context have been conducted. This longitudinal study aimed to investigate the B cell-related immune responses to ICI therapy in metastatic melanoma (MM) patients, differences of B cell subgroups between responding and non-responding MM patients regarding their state of response to ICI treatment, the potential utilization of B cell-related cytokines as prognostic and predictive clinical bio-markers to immunotherapy. Peripheral blood samples were taken from MM patients and healthy donors and B cell subsets were analysed by flow cytometry. BAFF and APRIL serum levels were detected by Elisa in same groups. While ICI treatment increased naive B cell frequency in non-responders, switched memory (IgD-CD27+), classical (CD21+CD27+), unswitched memory B cell and IgA+ B cell frequencies were decreased. Switched (IgM-IgD-) and switched memory B cell frequency were elevated in responders at early and late visits. During ICI treatment, CD21-/lo switched B cell frequencies were increased in NR patients, BAFF-R expression was decreased in R patients. Responders had higher expression of BAFF-R and TACI than non-responders at all visits. At the initiation of ICI therapy, BAFF serum concentrations were detected to be significantly higher in non-responders compared to responders and healthy controls. Results of the thesis suggest that serum levels of BAFF, BAFF-R and TACI expressions and CD21-/lo B cell frequencies can have a role in effective anti-tumour responses in MM cases under immunotherapy.

Keywords: Metastatic melanoma, immunotherapy, B cell, BAFF, BAFF-R

1. GİRİŞ

Malign melanoma melanositlerin malignant dönüşümünden kaynaklanan agresif bir cilt kanseri türüdür. Aynı zamanda en immünojenik tümörlerden bir tanesidir (De Vellis, Pietrobono, & Stecca, 2021). Metastatik melanoma hastalarının sağ kalımı immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı ile önemli derecede artmıştır. Ancak tüm hastalar bu tedaviye yanıt vermemektedir. İlaveten, kontrol noktası immünoterapisi metastatik melanoma hastalarının yarısından fazlasında derece 3 veya daha yüksek tedavi-ilişkili yan etkilere yol açmakta, bu sebepten ötürü hastaların yaklaşık %40'ı tedaviyi bırakmak zorunda kalmaktadır. Bu nedenle hastalarda immün ilişkili yan etkilerin gelişmesi, immün kontrol noktası inhibitör tedavisinin uygulanması ve değerlendirilmesi açısından en büyük engellerden biridir (Das ve ark., 2018; Larkin ve ark., 2015). Bazı immün ilişkili yan etkilerin T hücre aracılı, bazılarının ise B hücre aracılı olduğu gösterilmiştir (Das ve ark., 2018; Sznol ve ark., 2017). Ancak, kontrol noktası inhibisyonu ve tedavi süresince immün yanıtların takip edildiği çalışmalar çoğunlukla T hücrelerine odaklanmasına rağmen, yeni bulgular B hücrelerin önemini vurgulamaktadır (Da Gama Duarte ve ark., 2018). Ancak, B hücrelerin tedavinin erken dönemindeki değişikliklerinin sistematik analizi ve otoimmünite ile olan ilişkileri hala anlaşılamamıştır. İmmün kontrol noktası inhibitör tedavisinin metastatik melanoma hastalarındaki etkinliği ve toksisitesinin belirlenmesi için öngörücü biyo-belirteçlerin tanımlanması, tedavi seçimi ve rehberliğine yardımcı olması açısından önem teşkil etmektedir. İdeal biyo-belirteçlerin periferal sıvılardan ulaşımı ve ölçülmesi kolay olmalı ve melanomaya duyarlı ve özgü olmalıdır. Bu sayede tanı, prognoz ve tedavinin klinikte takibi için kullanılabilir. Yapmış olduğumuz çalışmada uzun süreli takip edilen metastatik melanoma hastalarının periferik kanlarından B hücreleri izole etmeyi, bu hücre grubunun alt gruplarını saptamayı ve immün kontrol noktası tedavisi sürecinde B hücre yanıtlarını değerlendirmeyi, aynı zamanda prognostik veya toksisite öngörücü invazif olmayan klinik biyo-belirteç olarak tanısal kullanılabilme potansiyellerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Malign Melanoma

2.1.1 Tanım

Malign Melanoma (MM), epidermal melanositlerden türeyen kötü huylu (malign) bir tümördür. Tüm deri kanserlerinin %2'sini oluşturmaktadır. Melanoma genellikle deri yüzeyinde oluşur ancak deri haricinde herhangi bir dokuda da oluşabilmektedir: oral mukoza, nazoferinks, paranazal sinüsler, trake, bronşlar ve bronşiyoller, vulva vajina, anüs, idrar yolu, merkezi sinir sistemi ve göz gibi (Cummins ve ark., 2006).

2.1.2 Epidemiyoloji

Kutanöz malign melanoma insidansında son 70 yılda istikrarlı bir artış mevcuttur (Leiter, Keim, & Garbe, 2020). Dünya geneline bakıldığında, yirminci en yaygın kanser tipi olduğu görülmektedir. Çoğunlukla sanayi ülkelerinde, özellikle Kuzey Amerika (Carr, Smith, & Wernberg, 2020), Kuzey Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda'da (Whiteman, Green, & Olsen, 2016) keskin artışları mevcutken , daha fazla pigmentasyonun mevcut olduğu Asya ve Afrika ülkelerinde melanoma insidansının büyük ölçüde değişmediği bildirilmiştir (Erdmann ve ark., 2013).

Yaşa göre standardize edilmiş en yüksek MM insidans oranları Avustralya (yıllık 50,3/100000) ve Yeni Zelanda'dan (47,4/100000) bildirilmiştir. Bunları Danimarka (33,9/100000), Norveç (32,7/100000), Amerika Birleşik Devletleri beyaz popülasyonu (32,4/100000) ve İsveç (29,3/100000) takip etmektedir (Olsen, Green, Pandeya, & Whiteman, 2019). Ülkemizde epidemiyolojik veriler sınırlı olmak ile birlikte, 2015 Türkiye Kanser İstatistikleri Raporunda yer alan veriler, cinsiyete göre melanoma insidansının erkeklerde 1,5/100000 ve kadınlarda 1,4/100000 oranında olduğunu göstermektedir (Acer & Kaya Erdoğan, 2019).

Ülkemizde Ege üniversitesi Kanser Araştırma Merkezi veri tabanı ile yapılan bir çalışma, 1992-2017 yılları arasında melanoma olgusu görülme sıklığında anlamlı derecede bir artışın yanı sıra, mortalitede de bir artış eğilimi olduğunu bildirmiştir (Acar ve ark., 2020). XX. yüzyılın ortalarından itibaren farklı ülkelerce yürütülmüş retrospektif çalışmalar, yaşa göre standartlaştırılmış melanoma ölüm oranlarının hem erkek hem de kadınlarda artmış olduğunu doğrulamaktadır (Leiter ve ark., 2020).

2.1.3 Etiyoloji ve Patofizyoloji

2.1.3.1 Etiyoloji

MM'nın çevresel, genetik ve bireysel faktörlerin karmaşık etkileşimleri sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Melanoma oluşumunda yaygın/atipik nevus, deri fenotipi, ailede melanoma öyküsü, aktinik hasar, güneş yanığı öyküsü ve özellikle çocukluk ve gençlik döneminde aşırı derecede ultraviyole radyasyona (UV) maruz kalmak önemli risk faktörleri arasında kabul edilmektedir (Carr ve ark., 2020).

Ultraviyole Radyasyon

Ultraviyole radyasyon MM'nın ana nedenidir. Kutanöz melanomlarda UV sebebiyle oluşan mutasyon birikimi ve çokluğu, melanomagenezde UV radyasyonun önemini vurgulamaktadır. Güneş ışığının farklı dalga boylarından UVA (320-400 nm) ve UVB (280-320 nm) epidermise, sadece UVA dermise ulaşabilmektedir. UVA radyasyonu, melanosit DNA'sında siklobütan pirimidin dimerleri oluşumuna, DNA tamir mekanizmasında bozukluklara ve takiben melanositlerde DNA hasar yanıtları oluşmasına neden olarak melanoma gelişimini tetiklemektedir (Khan, Travers, & Kemp, 2018). Pek çok araştırma yoğun ultraviyole ışığa ve mesleki olarak güneşe maruz kalmanın (20 yıldan fazla) melanositlere neoplastik karakter kazandırdığı ve melanoma gelişimine neden olduğunu göstermektedir (Carr ve ark., 2020).

Anatomik Lokasyon

MM'ların vücutta farklı bölgelerde gelişmesi güneşe maruz kalınan bölgelerin belirgin paternleri ile ilişkilidir. Aynı zamanda cinsiyete ve yaşa bağlı olarakta değişkenlik göstermektedir. 2018 yılı İngiltere verilerine bakıldığında, 65 yaş üstü kadınlarda MM en çok alt bacakta görülürken, sırasıyla üst bacak, boyun ve baş bölgesi ve gövde en çok görülen vücut bölgeleridir. Erkeklerde ise bu sıra gövde, baş ve boyun, üst bacak ve alt bacak şeklindedir (Memon ve ark., 2021).

Yaş, Cinsiyet

Son 40 yılda MM insidansının kadın ve erkeklerde istikralı ve önemli derecede artmakta olduğu, esas olarak orta yaşlılarda (35-64 yaş) ve yaşlılarda (65+ yaş) sürekli bir artış gösterdiği gözlenmiştir (Memon ve ark., 2021). Farklı etnik köken ve tüm anatomik lokasyonlara bakıldığında genç kadınlarda artan bir insidans mevcut iken, 40-50 yaş sonrasında erkeklerde daha yüksek bir MM insidansı görülmektedir (Yuan ve ark., 2019). UV radyasyon sonucu oluşan melanomalar sıklıkla daha geç yaşta ortaya çıkmakta ve erken yaşta konulan tanıların çevresel faktörlere nazaran, patofizyolojik faktörler ve/veya genetik ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

UV radyasyon maruziyetine dayandırılan MM'nın erkeklerde görülme insidansının kadınlarda yüksek olmasının olası nedenleri, kadın ve erkekler arası deri bariyer tamir mekanizmaları arasındaki biyolojik farklılıklar ve kadınlarda UV radyasyonunun sebep olduğu hasarın erkeklere nazaran daha iyi tamir edilmekte olmasıdır (Memon ve ark., 2021). Ayrıca, melanoma ilişkili östrojen reseptörleri/insülin-benzeri büyüme faktör 1 reseptörü (IG1R) yolağında bulunan melanoma ilişkili *IGF1 rs1520220* and *IGF1R rs2229765* tek nükleotid polimorfizm'li varyantlarının da kadınlara nazaran erkeklerde önemli derecede bir risk faktörü oluşturabileceği gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2020).

Melanositik Nevus

Kutanöz MM'ların yaklaşık üçte birinin önceden var olan nevülerden (konjenital tip ve akkiz) oluştuğu, çoğunluğunun ise kendiliğinden oluştuğu gözlenmiştir. Çok sayıda tipik veya atipik melonositik nevus varlığı kutanöz melanoma gelişimi için risk faktörüdür (Cummins ve ark., 2006). 60 yaş üstü erkeklerde tek bir nevusun melanomaya dönüşümünün yılda 1/33000 veya daha az olduğu, 20 yaşındaki bir bireyin ise herhangi bir nevüsünün hayatı boyunca dönüşüm geçirme riski erkekler için yaklaşık 1/3164 ve kadınlar için ise 1/10800 olarak tahmin edilmektedir (Tsao, Bevona, Goggins, & Quinn, 2003).

İmmünsüpresyon

Zayıflamış bir immün sisteme sahip hastaların cilt kanseri geliştirme riski artmaktadır. Solid organ transplant öyküsü olan hastaların 2-4 kat daha fazla melanoma geliştirdikleri gözlenmiştir. İlaveten, siklosporin ve sirolimus gibi bazı immünsüpresanların kullanımı artan melanoma insidansı ile ilişkilidir. Literatürde HIV infekte bireylerin MM geliştirme riski rapor edilmiş olsa da bu durum tartışmalıdır (Carr ve ark., 2020).

Aile Öyküsü ve Genetik Duyarlılık

Ailesinde melanoma öyküsü olan bireylerde bulunmayanlara karşı melanoma gelişme riski yaklaşık iki kat yüksektir. Ailesel melanomanın, tüm melanoma vakalarının %10'undan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Markovic ve ark., 2007). Ailesel melanoma aynı zamanda heterojendir. 2 ana kalıtsal gen tanımlanmıştır: *cyclindependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A)* ve *cyclin-dependent kinase 4* (*CDK4)*. *CDKN2A* retinoblastoma yolağındaki hücre döngüsünün negatif regülatörü olan p16 proteinini ve p53 apoptoz yolağında bulunan p14ARF proteinini kodlarken, *CDK4* sadece retinoblastoma yolağında yer alır (Carr ve ark., 2020; Tucker, 2009). *CDKN2A* germline mutasyonları Avustralya, Kuzey Amerika, Avrupa ve İsrail'den gelen

melanoma eğilimli ailelerin %39'unda tespit edilmiştir. *CDK4* genindeki mutasyonların görülme sıklığı *CDKN2A* genine göre daha düşüktür (Tucker, 2009).

Melanositlerin melanomaya dönüşümü eksojen ve endojen olayların karmaşık bir etkileşimiyle gerçekleşir. Melanocortin-1 receptor *(MC1R)* genindeki varyasyonlar pigment çeşitliliğinin önemli bileşenleridir. Farklı *MC1R* varyantlarının melanoma riski ile ilişkili olduğu meta-analizler sayesinde gösterilmiştir (Tucker, 2009). MC1R indirekt olarak pigmentasyonun ana regülatörü *MITF* genini de aktive ederek melanin üretimini destekler, Sadece *MITF* geninin tüm melanomaların %4-21'inde çoğalmış olarak bulunmaktadır. Bunlara ilaveten, *ASIP* (*agouti signalling* protein), *OCA2* (*oculocutaneous albinism* II), *PAX3* (paired box 3), *EDNRB* (*endothelin receptor type B*), *SLC45A2* (*solute carrier family 45 member* 2), *SOX10, TYRP1* (*tyrosinase-related protein 1*) and *TYR* (*tyrosinase*) pigmentasyon-ilişkili genlerde de germline polimorfizmleri bulunmuştur (Schadendorf, Fisher, ve ark., 2015).

Ayrıca *MC1R* pigmentasyon yolaklarından başka mekanizmalar aracılığıyla da melanoma riskine katkıda bulunabilir. Germline *MC1R* değişiminin, somatik *BRAF* mutant melanomalar ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (Tucker, 2009). Malign MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) yolağında bulunan gen ve protein değişiklikleri ile de ilişkilidir. MM'ların yaklaşık %65'i RAS-RAF-MEK-ERK yolağı içerisindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve yaklaşık %40'ı *BRAF* geninde (öncelikle V600 kodonunda) yüksek oranda mutasyon barındırır (Greco ve ark., 2019)

2.1.3.2 Patofizyoloji

Epidermisin basal tabanında yer alan melanositler kutanöz dokunun savunma mekanizmasını oluşturur. UV radyasyona maruz kalan keratinositler, MSH (*melanocyte stimulating hormone*) üretirler. Melanositler üzerinde bulunan MC1R reseptörüne bağlanan MSH, melanin üretilmesinden ve salınmasından sorumludur. Melanin melanozomlarda sentezlenir ve melanositlerden keratinositlere taşınarak UV radyasyondan korunmayı sağlar (Moreira, Bicker, Musicco, Persichetti, & Pereira, 2020). Melaninin bu koruyuculuğu, UV radyasyonun geniş spektrumunu bloke etmesi

ve bu sayede DNA'da daha fazla değişim olmasını engellemesinden kaynaklanmaktadır (Leonardi ve ark., 2018).

MM DNA da geri dönüştürülemeyen mutasyonların meydana gelmesiyle başlar. Metastatik malign melanoma veya melanomagenez, epidermiste bulunan atipik melanositlerin anormal şekilde çoğalması, daha sonrasında dermise ve subkutan hücresel dokuya yayılması ve diğer organlara lenfatik yollar veya kan dolaşımı ile yayılması sürecidir. (Moreira ve ark., 2020). Melanomogenezin 5 ana aşaması bulunur ve bunlar sayesinde çoğalmaları fark edilebilmekte ve lezyonlar gözlemlenebilmektedir: melanositik hiperplaziye sahip melanositik nevüs, anormal farklılaşma; anormal farklılaşan ve melanositik nüklear atipi ve melanositik displeziye sahip melanositik nevüs, primer melanomanın radyal büyüme fazı (RGP); primer melanomanın vertikal büyüme fazı (VGP); metastatik melanoma, şeklinde sıralanmaktadır. RGP'ye geçişle birlikte lezyon büyümesinin sınırlı oluşu ve kendi kendini kontrol etmesi ortadan kalkar. Primer melanoma hücrelerinin RGP'de progresyonu ardışık ve merkezidir. Bu hücreler belirsiz ve bağımsız olarak otonom kismi büyümeye sahiptirler. Metastatik melanoma, hücreler VGP'ye geçiş sırasında otonomi kazandığında gelişmeye başlar. Bu son iki fazdaki farklı hücre tipleri ve dağılımları melanomanın histolojik sınıflandırılmasına yol göstermektedir (Moreira ve ark., 2020).

2.1.4 Klinik Tanı

Melanoma genellikle rutin cilt muayenesi sırasında keşfedilmektedir. Pek çok lezyon asemptomatik olsa da, hastalar pigmentli cilt lezyonlarında devamlı bir kabuklanma, kaşıntı, veya kanamadan yakınmakta ve şüphe doğurmaktadır (Rashid & Tsao, 2021). Lezyonun belirlenmesinde ve tanı koyulması için biyopsi kararı alınması için klinikte en çok kullanılan ABCDE kriteri olup ve şu şekilde tanımlanmaktadır:

A: asimetri için

B: sınır düzensizliği

C: renk değişikliği

D: çapı 6 mm'den büyük

E: zamanla değişme veya gelişme

Metastatik bölgelere göre klinik görüntü değişmektedir (Rashid & Tsao, 2021). Melanomanın tanısı ve saptanabilirliği için invazif olmayan görüntüleme teknolojileri pre-biyopsi ve kantitatif teknikler post-biyopsi, floresan *in situ* hibridizasyonu, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, dizileme, kütle spektrometrisi ve immünohistokimya teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır (Davis, Shalin, & Tackett, 2019).

Melanomanın lokasyonuna bağlı olarak ince-iğne aspirasyonu kullanılarak biyopsi, çekirdek (*core*) biyopsi, ekzisyonel biyopsi veya ensizyonal (kesit) biyopsi ile hastalık patolojik olarak doğrulanmalıdır (Coit ve ark., 2019).

2.1.5 Evreleme

2.1.5.1 Malign melanoma TNM sınıflandırılması

AJCC (*American Joint Committee of Cancer*) evreleme sistemi melanoma tanısı konan hastaların evrelemesinde, prognostik değerlendirmesinde ve klinik karar alınmasında 2010 senesinden beri kullanılmaktadır. Evre terimi; (*stage*) tümörün anatomik uzantıları T (primer tümör), N (lenf nodları) ve M (uzak metastaz) tanımlanarak ve gerekli kansere özgü prognostik faktörler ile birleştirilerek kullanılmaktadır. T, N ve M tanımları ayrıntılı bir şekilde tablo 1, 2 ve 3 de listelenmiştir. Ek olarak, klinik evre alt grupları, patolojik evre III alt grupları 2018 itibariyle devre dışı bırakılmıştır (Amin ve ark., 2017).

Klinik ve patolojik sınıflandırma tanımları, primer tümör bölgesinin eksizyonu olup olmaması ve tanısal çalışma sırasında veya tedavi sürecinde mikroskobik değerlendirmede bölgesel lenf nodlarının klinik/radyolojik inceleme/tanı biyopsisi yapılarak incelenip incelenmediğine dayanır.

Tablo 1. Primer Tümör (T) Tanımı (Amin ve ark., 2017)

T kategorisi	Kalınlık	Ülserasyon Durumu
TX: primer tümör kalınlığı değerlendirilemez	Uygulanamaz	Uygulanamaz
T0: primer tümör kanıtı yoktur (örn., bilinmeyen vea tamamen gerilemiş melanoma)	Uygulanamaz	Uygulanamaz
Tis (*in situ* melanoma)	Uygulanamaz	Uygulanamaz
T1	≤1,0 mm	Bilinmeyen veya belirtilmemiş
T1a	<0,8 mm	Ülserasyon yok
T1b	<0,8 mm 0,8-1,0 mm	Ülserasyon var Ülserasyon var veya yok
T2	>1,0–2,0 mm	Bilinmeyen veya belirtilmemiş
T2a	>1,0–2,0 mm	Ülserasyon yok
T2b	>1,0–2,0 mm	Ülserasyon var
T3	>2,0-4,0 mm	Bilinmeyen veya belirtilmemiş
T3a	>2,0–4,0 mm	Ülserasyon yok
T3b	>2,0–4,0 mm	Ülserasyon var
T4	>4,0 mm	Bilinmeyen veya belirtilmemiş
T4a	>4,0 mm	Ülserasyon yok
T4b	>4,0 mm	Ülserasyon var

Tablo 2. Bölgesel Lenf düğümü (N) Tanımı (Amin ve ark., 2017)

	Lenf düğümü ve/veya lenfatik metastaz kapsamı	
N Kategorisi	Tümör tutulumlu bölgesel lenf düğümü sayısı	In-transit, satellite, ve/veya microsatellite metastaz varlığı
NX	Değerlendirilmemiş lenf düğümleri (örn., SLN biyopsisi yapılamamış, bölgesel düğümler önceden alınmış)	Hayır
N0	Bölgesel lenf düğümü metastazı saptanmamış	Hayır
N1	Tek bir lenf düğümü tutulumu veya tümör tulumu olmayan lenf düğümü durumunda in-transit, satellite, ve/veya microsatellite metastazlar	
N1a	Bir klinik olarak gizli (okkult)	
N1b	Bir klinik olarak tespit edilmiş	Hayır
N1c	Lenf düğümü hastalığı yok	Evet
N2	İki veya üç lenf düğümü tutulumu veya bir lenf düğümü tutulumlu in-transit, satellite, ve/veya mikrosattellite metastaz bulgusu	
N2a	Iki veya üç klinik olarak gizli (örn., SLN biyopsisi ile saptanmış)	Hayır
N2b	Iki veya üç, en az biri klinik olarak saptanmış	Hayır
N2c	Bir klinik olarak gizli veya saptanmış	Evet
N3	Dört veya daha fazla lenf düğümü tutulumu veya iki veya daha fazla lenf düğümü tutulumlu in-transit, satellite, ve/veya microsatellite metastazlar, veya in-transit, satellite, ve/veya microsatellite metastaz varlığı veya yokluğunda herhangi bir sayıda konglomere düğümüve/veya microsatellite metastazlar	

N3a	Dört veya daha fazla klinik olarak gizli (örn., SLN biyopsisi ile saptanmış)	Hayır
N3b	Dört veya daha fazla, en az biri klinik olarak saptanmış, veya herhangi bir sayıda konglomere düğüm bulgusu	Hayır
N3c	Iki veya daha fazla klinik olarak gizli veya saptanmış ve/veya herhangi bir sayıda konglomere düğüm bulgusu	Evet

Tablo 3. Uzak Metastaz Tanımı (Amin ve ark., 2017)

M kategorisi	**M Kriteri**	
	Anatomik Bölge	LDH Seviyesi
M0	Uzak metastaz yok	Uygulanamaz
M1	Uzak metastaz var	
M1a	Cillte, kasta dahil olmak üzere yumuşak dokuya, ve/veya bölgesel olmayan lenf düğümüne uzak metastaz	Kayıt edilmemiş veya özellikle belirtilmemiş
M1a(0)		Yükselmemiş
M1a(1)		Yükselmiş
M1b	Hastalığın M1a bölgeleri varlığında veya yokluğunda akciğere uzak metastaz	Kayıt edilmemiş veya özellikle belirtilmemiş
M1b(0)		Yükselmemiş
M1b(1)		Yükselmiş
M1c	Hastalığın M1a veya M1b bölgeleri varlığında veya yokluğunda MSS olmayan visceral dokulara uzak metastaz	Kayıt edilmemiş veya özellikle belirtilmemiş
M1c(0)		Yükselmemiş
M1c(1)		Yükselmiş
M1d	Hastalığın M1a, M1b, veya M1c bölgeleri varlığında veya yokluğunda MSS'ne uzak metastaz	Kayıt edilmemiş veya özellikle belirtilmemiş
M1d(0)		Normal
M1d(1)		Yükselmiş
M kategori içi takılar: (0) LDH yükselmemiş, (1) LDH yükselmiş. Kayıt edilmemiş veya özellikle belirtilmemiş ise takı kullanılmaz.		

2.1.5.1.1 Klinik sınıflandırma

Klinik evreleme başlangıç tedavisini belirlemede esastır. Ayrıca hasta kohortlarını karşılaştırmak açısından da kritik öneme sahiptir. Klinik sınıflandırma, tanıdan başlangıç tedavisinin başlatılmasına kadar olan süredeki bulgulardan yapılır (tablo 4). Klinik evre I ve II klinik, radyolojik ve/veya laboratuvar değerlendirilmeleri göz önüne alınarak bölgesel veya uzak bölgelerde metastaz yokluğu şeklinde tanımlanır. Malign melanomda klinik evre III bölgesel metastaz bulgusuna sahip hastaları ifade eder. Bölgesel metastaz, primer tümörün tanı biyopsinin mikroskobik değerlendirmesi sırasında bölgesel lenf nodları veya satellite veya in-transit metastazlar olarak veya mikrosatellitler şeklinde lokal bölgesel metastazlar şeklinde

keşfedilir. Klinik evre IV uzak bölgede veya bölgelerde metastaz olan melanoma hastalarını ifade eder.

Breslow tümör kalınlığı

Melanomada T kategorisi melanomanın kalınlığının ölçülmesi ile tanımlanır. Epidermisin granüler tabakasından en derin tabadaki (epidermis veya subkutis) invazif tümör hücresine kadar olan mesafe olarak ölçülmektedir. AJCC evreleme sistemi 8.baskıda T-kategorisi sınıfları birer tam sayı olarak 1,0 ve 2,0 ve 4,0 mm olarak belirlenmiştir.

In situ melanoma, belirlenmemiş melanoma ve çoklu primer melanomalar

In situ melanoma sahip hastalar T0 değil Tis şeklinde, melanoma görüntüsü görülmediği durumlarda ise TX olarak kategorize edilmektedir. Birden fazla primer kutanöz melanoma varlığında, her bir cilt bölgesi farklı bir primer bölge olarak birbirinden ayrı olarak kategorize edilmelidir. Aynı bölgesel nodüle drene olan çoklu primer melanomalı hastaların en yüksek T kategorisine sahip nodülü metastazının başlangıcı olarak atanır ve N kategorisi de bunu yansıtmalıdır. Şayet eşzamanlı melanomalar mevcut ise, T kategorisi atanarak *m* takısı eklenir (Amin ve ark., 2017).

Primer tümörde ülserasyon

T kategorisinin belirlenmesindeki ikinci kriter, primer tümörde ülserasyondur. Melanoma ülserasyonu üst derinin tam kalınlığında bozukluk (stratum korneum ve bazal membranın dermoepidermal bağlantısının yokluğu), reaktif değişkenlerin bulgusu (fibrin katmanı ve nötrofiller), ve kalınlaşma, arka planda kalma veya travma veya cerrahi müdahalenin yokluğunda etrafı saran epidermisin reaktif hiperpilazisi olarak pek çok özelliğin bileşimi ile karakterizedir (Amin ve ark., 2017; Spatz ve ark., 2003).

Bilinmeyen primer bölgeden metastatik melanoma

Genellikle, başlangıcı bilinen melanomalar ile aynı evreleme kriteri uygulanmaktadır.

Eğer hasta öncelikle lenf nodu metastazına sahip ise ve uygun evrelemede diğer bölgelerin metastazı görülmüyor ise, bölgesel olduğu varsayılmalıdır (evre IV yerine evre III) (Amin ve ark., 2017).

Epidermal bileşeni olmayan melanoma

Nadiren de olsa melanomanın primer tümör mü metastaz mı olduğu kesin olarak sadece patolojik inceleme ile yapılamayabilinir. Bu durum özellikle epidermisin üzerinde *in situ* bileşenin olmadığı dermiste yer alan melanoma için geçerlidir. Böyle durumlarda klinik bilgi (küçük bir kitle bırakarak zamanla kaybolan pigmentli plak hikayesi gibi) ile ilişki kurulması esastır.

Tablo 4. AJCC 8. Baskı Prognostik Evreleme Sistemi, Klinik (cTNM) (Amin ve ark., 2017)

T … olduğunda	N… olduğunda	M… olduğunda	Takiben Patolojik Evre…
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Herhangi bir T, Tis	≥N1	M0	III
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	IV

Uzak metastaz

Melanoma hastalarında beyin, spinal kord, beyin zarı, veya merkezi sinir sistemi (MSS)'nin diğer bileşenleri gibi MSS metastazlarının gelişimi kötü prognoz ile ilişkidir (Davies ve ark., 2011). AJCC evreleme sistemi 8.baskıda ayrı bir M kategorisi eklenmiştir. M1c dışlanarak yerine gelen M1d, aktif beyin ve diğer MSS metastazlarının kategorize edilmesinde kullanılmaktadır. Bu düzeltilmiş M

kategorisine hastalarda azalmış veya yükselmiş LDH (laktat dehidrogenaz) seviyeleri sırasıyla (0) ve (1) takılarını alır. LDH seviyesi bilinmeyen hastalar ise hiçbir takı almaz (M1a, M1b, M1c ve M1d). İlaveten, viseral bölgeye metastazın olduğu ve primer melanomanın bilinmediği durumlarda M1 kategorisi kullanılarak evre IV melanoma olarak belirtilmelidir (Amin ve ark., 2017).

Melanomada doğru evrenin görüntüleme ile belirlenmesi

Melanoma hastalarının radyolojik görüntülenmesi, metastatik hastalığın varlığını ve bölgesel (nodül ve intransit) ve/veya uzak metastatik hastalığı (cilt/yumuşak doku/uzak nodül/intramusküler, akciğer, viseral, veya MSS) saptamak ve doğru klinik evrenin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Hastalığın bölgesel (N kategorisi) atanması, bölgesel nodülün klinik olarak gizli (sentinel lenf nodu (SLN) biyopsisi ile tespit) olup olmadığına dayanır. Ultrason, bilgisayarlı tomografi (BT) veya pozitron emisyon tomografisi (PET)/BT görüntüleme tekniği veya fiziksel değerlendirme ile belirlenmektedir (Amin ve ark., 2017).

Erken-evre melanoma da görüntüleme

In situ melanoma (evre 0) ve invazif melanoma (klinik evre I ve II) hastalarının kanserlerinin evrelemesi için görüntülemeye gerek duyulmaz (Sabel & Wong, 2009). Yüksek riskli şüpheli fiziksel değerlendirmeye sahip klinik evre II melanoma hastaları (örn, T4cN0M0) için primer bölgeye direne olan lenf nodlarının ultrason ile muayene edilmesi düşünülebilir (Amin ve ark., 2017).

Evre III ve IV melanoma da görüntüleme

Klinik evre III melanoma hastalarında semptomların yokluğunda veya uzak metastaz varlığında, kesitsel görüntüleme (BT veya PET/BT) muhtemel eşzamanlı gizli uzak metastazın varlığını değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Evre IV hastaları için rutin kesitsel görüntüleme, özellikle PET/BT, evre ilişkili anatomik metastatik bölgeleri belirleyebilmektedir (Amin ve ark., 2017; Reinhardt ve ark.,

2006) İlaveten, kontrastla arttırılmış beyin manyetik resonans (MR) görüntüleme MSS metastazı evre IV M1d varlığını değerlendirmek için en duyarlı testtir (Amin ve ark., 2017).

2.1.5.1.2 Patolojik sınıflandırma

Patolojik evre I ve II melanoma hastaları bölgesel ve uzak metastazın olmadığı, primer invazif kutanöz melanoma hastalarıdır. Patolojik evre III'e sahip melanoma hastalarında uzak metastaz görülmez iken bölgesel metastaz, bölgesel lenf nodu ve/veya mikrosatellite/satellite/in-transit metastaz, patolojik bulguları mevcuttur. Primer bölgenin tamamen eksizyonu veya yeniden eksizyonu pT sınıflandırılması için gereklidir. Patolojik evre IV melanoma hastalarında bir veya birden fazla uzak bölgede metastaz bulgusu mevcut olup, klinik (cM1) ve/veya histolojik (pM1) ile ifade edilir(Amin ve ark., 2017).

Breslow Kalınlığı

Genel kuralları 'klinik sınıflandırma' başlığında belirtilmiştir. Ek olarak, eğer melanomadan kesit veya kısmi biyopsi alındıysa, maksimum tümör kalınlığı pT kategorisi için kullanılmaktadır.

Mikrosatellitler

Mikrosatellitler, primer melanomanın derininde veya ona komşu mikroskobik kutanöz ve/veya subkutanöz metastazlardır. Primer tümörün özellikle de geniş ekzisyonu ile patolojik değerlendirilmesi ile saptanır. Metastatik tümör hücreleri primer tümörden devamsız olmalıdır. Klinik olarak lenf nodu tutulumunun olmadığı bir veya birden fazla mikrosatellitler veya büyük şekilde görünür satellite veya in-transit metastazların varlığı hastaların klinik evre III'e atanmalarını şart koşmaktadır (Amin ve ark., 2017).

Bölgesel Lenf Nodu Metastazı

Klinik veya radyolojik bölgesel lenf nodu metastazı olmayan ancak mikroskobik olarak nodal metastaz bulgusuna sahip hastalar (genellikle SLN biyopsisi ile tespit edilir) 'klinik olarak gizli' şeklinde tanımlanmaktadır. Tümör tutulumu olan nodların sayısına göre N1a, N2a veya N3a olarak gruplara ayrılır (tablo 5). İğne veya SLN biyopsisi ile klinik olarak saptanan ve sistemik tedavi alan hastalar klinik sınıflandırma ile cN1 veya daha büyük numara ile tanımlanmaktadır. Eğer hastanın SLN biyopsisi metastaz için pozitif ise, pN1(sn) şeklinde gösterilmelidir (Amin ve ark., 2017).

Ek olarak, lenf düğümünden komşu dokulara kadar uzayan bir nodal metastazın varlığı ekstra nodal uzantı (ENU) şeklinde tanımlanır. Genellikle klinik olarak saptanan büyük nodal metastaz ile bağlantılıdır. Tümörün ENU'sı melanoma hastaları için kötü prognostik bir parametredir (Balch ve ark., 2000).

Nodal olmayan bölgesel metastazlar: Mikrosatellitler, satellitler, ve in-transit metastazlar

Mikrosatellitler, satelitler, ve in-transit metastazların varlığı veya yokluğu sayısından bağımsız olmak ile beraber N-kategori ölçütüdür. Satellit metastazlar, primer melanomanın 2 cm içerisinde oluşan büyük ve görünebilir kütanöz ve/veya subkutanöz metastazlardır. Mikrosatelitler ayrıntılı olarak klinik sınıflandırma bölümünde bahsedilmiştir. In-transit metastazlar klinik olarak belirgin, dermal ve/veya subkutanöz metastazlardır. Primer melanomadan 2 cm'den daha fazla uzaklıkta olup, primer tümör ve bölgesel lenf düğümlerinin ilk kademesi arasında yer alır. Satellit ve in-transit metastazların varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir (Buzaid ve ark., 1997). Mikrosatellit, satellite, ve/veya in-transit metastaza sahip hastalar pozitif bölgesel lenf nodu sayılarına göre N1c, N2c, veya N3c şeklinde kategorize edilmektedir (tablo 5). N1c ataması bölgesel lenf düğümünde tümör tutulumunun olmamasını gerektirirken, N2c tek bir düğümde tutulum; ve N3c iki veya daha fazla lenf tutulumunda kullanılır (Amin ve ark., 2017).

Uzak Metastatik Hastalığın Anatomik Bölgeleri

Cilt, subkutanöz doku, uzak lenf düğümlerine veya kasa uzak metastazı olan hastalar M1a ile karakterize edilir ve diğer anatomik bölgelerde yer alan uzak metastazlara göre iyi prognoz ile ifade edilmektedir. İlaveten, ciltte, subkutanöz dokuda veya uzak lenf düğümlerinde eşzamanlı metastaz varlığı veya yokluğu olmaksızın, hastalarda akciğer metastazı varlığı M1b olarak kategorize edilir ve 'orta prognoz' olarak tanımlanmaktadır. MSS haricinde herhangi bir diğer viseral bölge metastazı olan hastalar ise kötü prognoza sahip olup M1c ile tanımlanırken, MSS metastazı bulgusu olan her hasta M1d kategorisine atanır ve M kategorisindeki en kötü prognoza sahiptirler (Amin ve ark., 2017).

Tablo 5. AJCC 8. Baskı Prognostik Evreleme Sistemi, Patolojik (pTNM) (Amin ve ark., 2017)

T … olduğunda	N… olduğunda	M… olduğunda	Takiben Patolojik Evre…
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b/c, N3b/c	M0	IIIC
T1a/b, T2a	N1a, N2a	M0	IIIA
T1a/b, T2a	N1b/c, N2b	M0	IIIB
T2b, T3a	N1a/b/c, N2a/b	M0	IIIB
T1a/b, T2a/b, T3a	N2c, N3a/b/c	M0	IIIC
T3b, T4a	Herhangi bir N ≥ N1	M0	IIIC
T4b	N1a/b/c, N2a/b/c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Herhangi bir T, Tis	Herhangi bir N	M1	IV

2.1.5.1.3 Prognostik faktörler

Serum LDH

Melanoma için bir serum etmeni AJCC evreleme sisteminin 7.baskısından itibaren artmış LDH seviyeleri M kategorisine eklenmiştir. Serum LDH evre IV hastalarında sağ kalımın bağımsız bir öngörücüsü olarak bulunmuştur (Amin ve ark., 2017; Bedikian ve ark., 2008). Ayrıca, immünoterapi klinik araştırmalarında, tedavi öncesi LDH seviyesi ipilimumab ve PD-1 (*programmed cell death 1*) antikor tedavisi alanlarda genel sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, LDH seviyesi artmış hastalar anti-PD-1 tedavisine muhtemelen daha az cevap vermektedir (Weide ve ark., 2016).

Primer Tümör Mitotik Hızı

Mitotik hız AJCC evreleme sisteminin 8.baskısından itibaren T-kategorisinden çıkartılmıştır ancak prognozda ana belirliyecilerden biri olarak önemini korumaktadır. Tüm primer invazif melanomalarda kayıt altına alınmalı ve değerlendirilmesi önerilmektedir.

Tümör-infiltre Lenfositler (TIL)

TIL'ler, tümörün yuvalandığı yere infiltre olur ve bozabilmekte ve/veya tümör hücrelerine karşı gelen lenfositler olarak tanımlanmaktadır. TIL'in varlığının en yaygın derecelendirilmesi şu şekilde yapılmaktadır:

1. İnfiltre TIL yokluğu
2. Enerjik olmayan infiltre TIL: tümör içerisinde lenfosittik infiltrasyonun odak bölgeleri
3. Enerjik olan infiltre TIL: TIL'in tüm tümöre yayılması

Pek çok çalışma primer kutanöz melanomada TIL infiltrasyonunun avantajlı bir prognostik faktör olduğunu önermektedir (Azimi ve ark., 2012; Taylor, Patel, Panageas, Busam, & Brady, 2007).

2.2 Metastatik Malign Melanomada İlaç Tedavisi

Son yıllardaki MM ve akciğer kanseri mortalitesindeki düşüş, tedavilerdeki gelişmeler ile ilişkilidir. MM için ölüm oranı 2009-2013 yılları arası durağan (stabil) iken, takiben gelen 5 yıllık süre zarfında (2014-2018 yılları arasında) yıllık 5,7% azalış göstermektedir (Siegel, Miller, Fuchs, & Jemal, 2021). Rezeksiyon veya sistemik tedavi sınırlı metastatik melanoma varlığında uygulanabilmektedir.

2.2.1 Kemoterapi

Evre IV uzak metastatik melanoma kötü prognoza sahip olup ortalama sağ kalım tanıdan sonra 6-8 ay arasıdır. Öncelikli tedavi palyatiftir (hafifletici) ve ileri derece melanoma tedavisi için onay alan tek kemoterapi ajanı olan dakarbazin içerebilir (Mays & Nelson, 1999). Malignant melanomanın iyi bilinen antijenik özellikleri tümör aşıları ve diğer umut verici immünoterapilerin geliştirilmesine yol açmıştır.

2.2.2 Hedeflenmiş Tedavi

BRAF mutasyonuna sahip hastalarda mutant BRAF seçici inhibitörlerin (dabrafenib, encorafenib, vemurafenib) ek olarak kullanıldığı klinik araştırmalar umut verici sonuçlar sunmuştur. *BRAF* ve *NRAS* mutasyonlarını barındıran ileri seviye MM hastaları için MEK inhibitörleri (trametinib, cobimetinib, binimetinib), MAPK kaskadının aktivasyonunu azaltarak hücre büyümesini inhibe edebilmekte ve hücre ölümüne yol açabilmektedir (Grimaldi ve ark., 2017).

BRAF ve MEK inhibitör kombinasyon tedavisi ile tek BRAF inhibitör kullanımına göre hastaların genel sağ kalımı ve progresyonsuz sağ kalımı daha yüksektir (Rashid & Tsao, 2021). Çift-kör, randomize ve placebo kontrollü yapılan çok merkezli klinik araştırma, cerrahi müdahele yapılamayan ileri evre *BRAF* V600 mutasyonlu melanoma hastalarının cobimetinib ve vemurafenib'in ile kombine tedavisinin klinik faydasını onaylamıştır ve hastaların sağ kalımını arttırmak üzere standart tedavide ilk seçenek olarak kullanılmasının yolunu açmıştır (Ascierto ve ark.,

2016). Bir başka klinik faz III çalışması, dabrafenib ve trametinib veya tek dabrafenib ile tedavi edilen aynı evre *BRAF* V600 mutant MM hastalarında 3 yıllık genel sağ kalımın %62' ye ulaştığını göstererek bu kombinasyonun tedavide ilk seçenek olarak uygulanmasını destekler niteliktedir (Long ve ark., 2017).

2.2.3 İmmünoterapi

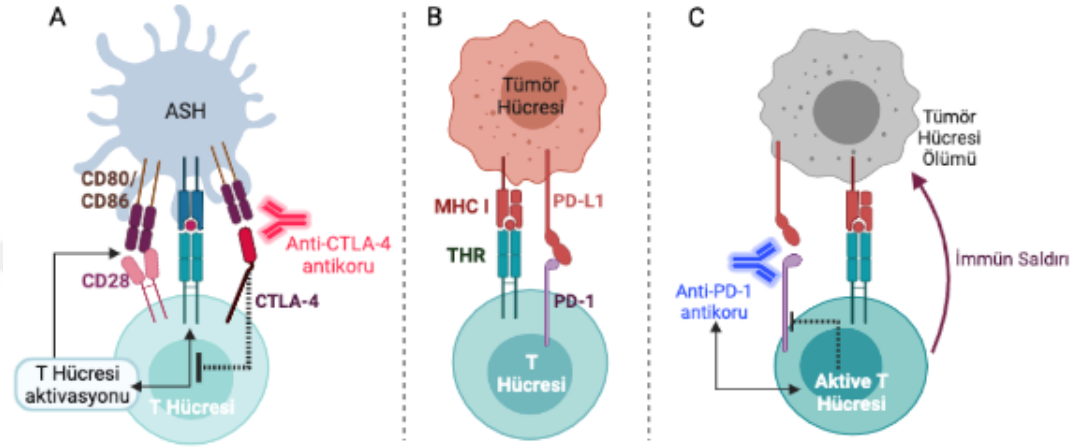
İmmün hücrelerin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlayan terapötik hedefler 'kontrol noktası molekülleri' olarak bilinir. Immün kontrol noktası inhibitör (*immune checkpoint inhibitor*, ICI)'leri ile immünoterapi pek çok tümör tipleri için tedavi paradigmasını değiştirmiş ve ileri derece MM hastalarında sağ kalımı önemli derece arttırmıştır (Hussaini ve ark., 2021).

Cerrahi müdahele ile çıkarılamayan metastatik melanoma tedavisinde ilk kullanılan ajan yüksek doz IL (interleukin)-2 (aldesleukin)'dir. Direkt olarak T-hücre proliferasyonunu ve anti-tümör aktiviteyi destekler ancak az sayıda seçilmiş hasta tedaviye yanıt vermekte ve ortalama sağ kalım ise sadece 8-9 ay ile sınırlı olmaktadır (Rothermel, Sarnaik, Khushalani, & Sondak, 2019). Oysaki, CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)* ve PD-1 antikor immünoterapileri ile bu hastalarda sağ kalımın önemli derecede arttığı gözlenmiştir (Rothermel ve ark., 2019) ve bu yüzden sistemik tedavi olarak yerini almıştır.

İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin mekanizması

CTLA-4 ve PD-1 reseptörleri antijene yanıt veren T hücrelerin aktivasyonunun düzenlemesinde görev alır (Weinmann & Pisetsky, 2019). T hücre aktivasyonu için 2 sinyal gerekir. Birincisi, THR (T hücre reseptörü) tarafından antijenin tanınması ve takiben antijen-sunan hücre (ASH)'nin MHC sınıf II molekülleri ile antijeni sunmasıdır. İkincisi ise CD28'e bağlanan CD80 veya CD86 ile sinyalin iletilmesidir. T hücre yüzeyinde bulunan CTLA-4, CD28 ile yarışarak CD80/CD86 bağlanarak T hücre aktivasyonunu engeller (şekil 1'de görüldüğü gibi). İmmünoglobulin süper ailesi üyesi PD-1 molekülünün esas görevi periferal toleransı sürdürmektedir (Weinmann & Pisetsky, 2019). T hücreler tarafından eksprese olan PD-1, tümör hücrelerinin veya

ASH'lerin üzerindeki PD-L1'e bağlanarak antijen-spesifik T hücrelerin apoptozuna neden olur (şekil 1'de görüldüğü gibi) ve *regulatory T-cell* (Treg) hücrelerin apoptozunu ise azaltır. Bu etkileşim normalde otoimmüniteyi engellerken, kanser hücreleri PD-L1 ekspresyonlarını yukarı çekerek bu durumu kendi çıkarları için kullanırlar ve immün sistemden kaçarlar.



Şekil 1. İmmün kontrol noktası ve inhibitörlerinin mekanizması. **A.** CTLA-4 inhibitörü CTLA-4-CD80 veya CTLA-4-CD86 etkileşimini bloke ederek (kesikli çizgi ile gösterilmiştir) T hücre aktivasyonunu sağlar. **B.** PD-1-PD-L1 aracılı T hücre tükenmişliği **C.** PD-1 inhibitörleri PD-1-PD-L1 etkileşimini engellerken (kesikli çizgi) T hücre aktivasyonunu ve sağ kalımına olanak sağlar.)

Anti-CTLA-4 tedavisi tümör çevresindeki Treg hücreleri Fc-reseptör-aracılı etkileşimler ile elimine edebilmektedir (Weinmann & Pisetsky, 2019). Bu nedenle de tümör çevresindeki T hücre/Treg hücre oranı artmakta ve kuvvetmuhtemel anti-tümör yanıtları arttırmaktadır. Ancak Treg hücreler ve tip 17 yardımcı (Th17) hücrelerde dengesizliğe neden olarak immün ilişkili yan etkilerin ortaya çıkmasına yol açar (Selby ve ark., 2013).

PD-1-PD-L1 blokajının klinik uygulanması sonucu susturulan PD-L1, CD8+T poliklonal genişlemeye yol açarken aynı zamanda THR hiper aktivesi T hücrelerin genişlenmesine de neden olur. Hiperaktif T hücreler, güçlü bir şekilde ani-tümör yanıt verebilir. Sonuç olarak, bu hücreler bazı hastalarda doku ve organ hasarına yol açan oto-reaktif inflamatuvar yan etkilere neden olabilirler (Zuazo ve ark., 2017).

Günümüzde 3 adet ICI melanoma tedavisi için onay almıştır: anti-CTLA-4 antikoru ipilimumab ve anti-PD-1 antikorları nivolumab ve pembrolizumab.

ICI'lerinin BRAF mutasyon durumundan bağımsız olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Eggermont ve ark., 2018). Ancak, primer ve sekonder direnç ve yanıtı öngören belirteçlerin yokluğu hala ICI tedavisi için sorun teşkil etmektedir (Christofi, Baritaki, Falzone, Libra, & Zaravinos, 2019).

Anti-CTLA-4, İpilimumab

İpilimumab [YERVOY; Bristol-Myers Squibb (BMS)], IgG1 izotipinde insan monoklonal antikoru (mAb) olup, cerrahi müdahale ile çıkarılamayan metastatik melanoma için 2011 yılında FDA (*food and drug administration*) onayı alan ilk kontrol noktası molekülü inhibitörüdür. Anti- CTLA-4 tedavisi T hücreler üzerindeki negatif regülatör olarak bilinen CTLA-4'ün ASH'lerin üzerindeki ligandı B7 ile etkileşimini engeller. Klinik araştırmaların toplu analizi sonunda sağ kalım platosunun 3 yıl ve sağ kalım oranının %20-%26 arasında olduğu saptanmıştır (Schadendorf, Hodi, ve ark., 2015).

Anti-PD-1 antikorları

PD-1 reseptörü, esas olarak ASH üzerinde eksprese olan PD-L1 ve PD-L2, aynı zamanda tümör hücreleri üzerinde de ifade edilen iki ligandına bağlanarak immün süpresyona neden olur. Bu reseptörlerin ifadelerinin artması, esas olarak tümör hücrelerin apoptozunu ve sitotoksik T-hücre aktivitesini inhibe ederek immün sistemin tümörleri ortadan kaldırmasına engel olur (Hazarika ve ark., 2017).

Anti-PD-1 antikorları nivolumab (Hazarika ve ark., 2017) ve pembrolizumab (Barone ve ark., 2017) cerrahi müdahale ile çıkarılamayan metastatik melanoma tedavisi için 2014 yılında FDA onayı almıştır. Bu antikorlar kemoterapiye kıyasla (%27 vs %10) ve ipilimumab ile karşılaştırıldığında (pembrolizumab %36-%37 vs %13 ve nivolumab %44 vs %19), ileri derece melanomada daha yüksek yanıt oranları göstermiştir (Rothermel ve ark., 2019; Schachter ve ark., 2017). 2018 yılında tedaviden-muaf hastalar ile yapılan klinik araştırmalardan elde edilen verilen 4-yıl sağ kalım oranları, pembrolizumab için %44 ipilimumab için %36 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, anti-PD-1 tedavisi cerrahi müdahale yapılamayacak hastalar için en etkin tedavi yöntemidir.

İmmün kontrol noktası inhibitörleri kombinasyonları

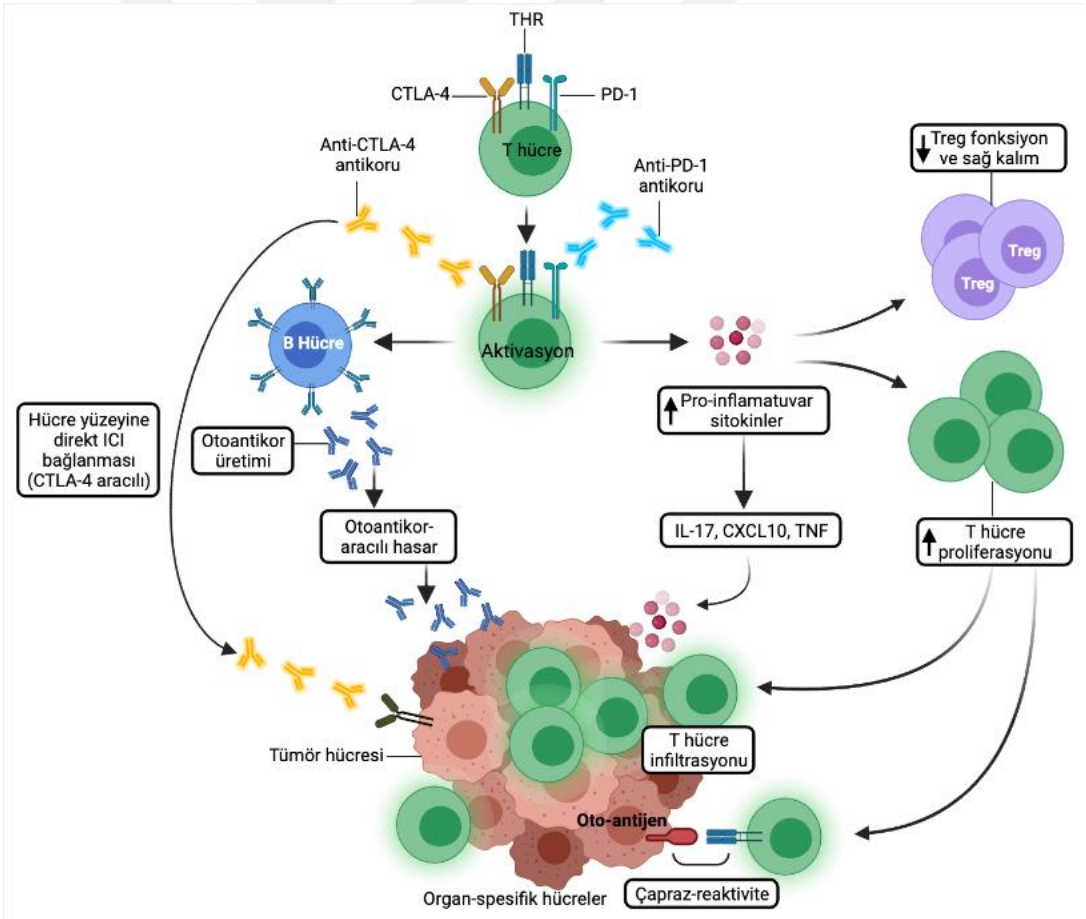
ICI ile monoterapi hastaların sağ kalımını önemli derecede arttırmış olsa da yanıt oranları oldukça düşüktür. ICI tedavisinden fayda görecek hasta sayısının çoğaltılması için anti-CTLA-4 mAb ve anti-PD-1 mAb kombinasyonu prospektif klinik araştırmalar ile değerlendirilmiştir. İki mAb'un birlikte verilmesi, yani kombinasyonel tedavi, tek ajana (ipilimumab veya nivolumab) kıyasla klinik olarak fayda gören hasta sayısını arttırmıştır. Check-mate-067 randomize klinik faz III çalışmasında, cerrahi eksizyon yapılamayan/metastatik melanoma hastaları sırasıyla tek ipilimumab ve nivolumab, sadece nivolumab ve sadece ipilimumab ile tedavi edilmiştir. Yanıt oranlarının sırasıyla %57,6; %43,7 ve %19 olduğu ve 5-yıllık sağ kalım oranlarının kombinasyonel kolda %52, nivolumab grubunda %44 ve ipilimumab kolunda %26 olduğu görülmüş ancak tek tedaviye kıyasla ilaca bağlı toksisitede de artış olduğu gözlemlenmiştir (Larkin ve ark., 2015; Larkin ve ark., 2019).

2.2.3.1 İmmün ilişkili yan etkiler

Kontrol noktası inhibitörleri klinik faydalarına rağmen, engellediği mekanizmalar öz-hücrelere toleransı uyararak komplikasyona neden olabilir. Kontrol noktası inhibitör tedavisi ile ilişkili inflamatuvar yan etkiler immün-ilişkili yan etkiler (irAEs) olarak tanımlanır. ICI tedavisi gastrointestinal sistem (kolit ve diare), deri (dermatitis, pruritus), karaciğer (hepatit) ve endokrin organları (hipofizit ve tiroid) etkiler. Gastrointestinal, endokrin ve dermatolojik toksisiteler daha sık görülmekle birlikte, ölümcül irAEs olan nörotoksisite, kardiyotoksisite, ve pulmonar toksisiteler de yan etkiler olarak ortaya çıkmaktadır, ancak görülme sıklıkları daha azdır (Choi & Lee, 2020). Yakın zamanda yapılan meta-analiz ile elde edilen verilerde, anti-CTLA-4 antikor tedavisinde kolit, hipofizit ve döküntünün yaygın, pnömoni, hipotroid, artrit ve vitiligo gelişiminin anti-PD-1 tedavisinde daha sık görüldüğü saptanmıştır (Khoja, Day, Wei-Wu Chen, Siu, & Hansen, 2017). irAEs görülme sıklığı ise tek tedaviye göre kombinasyonel tedavide daha yüksektir (Wolchok ve ark., 2017).

İmmün ilişkili yan etkilerin mekanizması

CTLA-4 ve PD-1 inhibitörleri immün yolakları spesifik olmayan şekilde aktive eder. İki tedavi için de benzer immün toksisite profilleri mevcuttur. Ancak, frekans ve klinik görünüm açısından farklar vardır (Khoja ve ark., 2017). Hem CTLA-4 hem de PD-1 inhibisyonu T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu arttırırken, Treg hücrelerin işlevselliğini zayıflatır ve muhtemelen hümoral immünitenin etkinliğini de arttırır (şekil 2'de görüldüğü gibi) (Ramos-Casals ve ark., 2020). ICI'leri oto-antijenlere karşı periferik toleransı etkileyerek çeşitli organlarda irAEs ile ilişkili oto-antikor oluşumuna yol açar. Aynı zamanda, T-hücrelerden interferon-γ ve tümör nekroz faktör (TNF), IL-1RA, CXCL10 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasını arttırır ve aşırı bir tümör dışı inflamasyona neden olur ve bu durum otoimmünite ile sonuçlanabilir (Hussaini ve ark., 2021; Ramos-Casals ve ark., 2020).



Şekil 2. İmmün-ilişkili yan etkilerin mekanizması. irAEs'in mekanızması hangi ICI tedavisinin kullanıldığına bağlıdır (anti-PD-1 veya anti-CTLA-4 inhibitörü). CTLA-4 inhibitörleri pek çok hücresel değişimleri endükler: T hücre aktivasyonu ve proliferasyonu, zayıflayan CD4+CD25+ Treg hücre sağ kalımı ve tip 17 yardımcı T hücrelerin sayısındaki artış. İlaveten, sağlıklı hücreler üzerindeki antijenler ve anti-tümör T hücreler arasında çapraz reaktiviteyi uyarabilir veya oto-antikor üretimini tetikleyebilir.

2.2.4 ICI tedavisinde biyolojik ve serolojik belirteçler

Her ne kadar ICI ile M hastalarının genel sağ kalımı artmış olsa da tedavinin etkinliği sınırlı kalmakta ve tümör regresyonu sağlanamayabilmektedir. İlaveten, ICI kullanımı spesifik yan etkilere, özellikle irAEs, yol açabilmektedir. Cerrahi eksizyon yapılamayan MM hastalarıyla yapılan klinik faz 3 çalışmasında, tek nivolumab (n = 313) ve tek ipilimumab (n = 311) veya kombine (n = 313) tedavi alan hastalardan sırasıyla %21, 28, ve %59'u derece 3 ve 4 irAEs geliştirmiş ve dört hasta şiddetli irAEs sebebiyle hayatını kaybetmiştir (Wolchok ve ark., 2017). Bu nedenlerle birlikte hastaların gereksiz tedavi almamasını sağlamak ve irAEs'i en aza indirmek için, tümör yanıtını ve irAEs oluşumunu öngörecek biyo-belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.4.1 Tümör yanıtı için biyo-belirteçler

Objektif yanıt oranı (*objective response rate*, ORR), progresyonsuz sağ kalım (*progression free survival*, PFS) veya genel sağ kalım (*overall survival*, OS) için çeşitli faktörler potansiyel biyo-belirteçler olarak rapor edilmiştir.

Cinsiyet

Anti-PD-1 antikor tedavisi alan melanoma hastalarında erkeklerin önemli derecede daha iyi ORR'na sahip oldukları gösterilmiştir (Nosrati ve ark., 2017).

Yaş

Klinik araştırmalar, 60 yaş üstü MM hastalarının pembrolizumab'a önemli derecede daha iyi tümör yanıtı verdiğini (Kugel ve ark., 2018) ve 65 yaş üstü anti-PD-1 tedavisi alan melanoma hastalarının ise daha iyi bir ORR'na sahip olduklarını göstermiştir (Nosrati ve ark., 2017).

Tümör Büyüklüğü

Pembrolizumab ile tedavi edilen melanoma hastalarında tükenmiş, CD8 T hücrelerin yenilenmesinin tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu, aynı zamanda bu hücrelerin tümör büyüklüğüne oranının daha iyi bir ORR ile bağlantılı olduğu ve hastaların daha uzun OS'a sahip oldukları saptanarak (Huang ve ark., 2017), tümör büyüklüğünün ICI tedavisinde yetersiz yanıtı belirleyebilecek bir faktör olduğu gösterilmiştir.

İmmün hücre infiltrasyonu

Pembrolizumab tedavisi alan melanoma hastalarında invazif sınırda CD8+ TIL'in varlığının, daha yüksek PD-1/PD-L1 ekspresyonu ile ilişkide olduğu saptanırken, aynı zamanda hastaların daha iyi tümör yanıtı verdikleri de görülmüştür. İlaveten tedavi öncesi ve sonrası arasındaki zaman zarfında, tümör merkezi ve invazif sınırda CD8+ TIL'lerin artışının tümör regresyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Tumeh ve ark., 2014).

Hücre yüzey molekülleri ve ilişkili moleküller

Melanoma klinik araştırmalarında anti-PD-1 antikorlarının PD-L1 pozitif tümörlü hastalarda daha iyi yanıt verdiği gözlemlenmişse de PD-L1 pozitif ve negatif ekspresyon çalışmalar arasında farklılık göstermektedir (Daud ve ark., 2016; J. S. Weber ve ark., 2015). PD-L1 ekspresyonunun farklı antikorlar ile saptanması ve farklı patologlar ile değerlendirilmesi çözülmeyi bekleyen bir sorundur. Tümör PD-L1 ekspresyonunun değerlendirilmesinin standartize edilmesi, öngörücü bir faktör olarak kullanılmasını arttıracaktır.

Aktive geleneksel T hücre ve Treg hücreler tarafından ifade edilen ko-stimülatör molekül *inducible T cell co-stimulator* (ICOS)'un, periferik kandaki CD4+ T hücrelerde 12 hafta boyunca yüksek ekspresyonunun, ipilimumab tedavisi alan MM hastalarının sağ kalım süresinin artması ile ilişkili olduğu (Carthon ve ark., 2010)

gösterilse de ICOS ekspresyonun potansiyel biyo-belirteç olarak kullanılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yüzey moleküllerinin çözünmüş izoformları

İpilimumab tedavisi başlamadan serumda 200 pg/mL 'den daha yüksek çözünmüş CTLA-4 (sCTLA-4) seviyeleri melanoma hastalarında hem daha iyi ORR'na hem de daha iyi OS ile ilişkili olduğunun gösterilmesi (Pistillo ve ark., 2019), sCTLA-4'ün ipilimumab tedavisine yanıtta potansiyel bir biyo-belirteç olabileceğini düşündürmektedir. İlaveten, tedavi öncesi serumda yüksek sPD-L1 seviyeleri, çeşitli ICI tedavisi alan MM hastalarında yetersiz yanıt ve daha kısa OS ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Zhou ve ark., 2017). Ayrıca, tümör ilişkili makrofajların CD163+ M2 tip ilişkili sCD163'ün kutanöz MM'li nivolumab tedavine yanıt veren hastalarda önemli derecede artarken, mukozal melanomalı hastalarda böyle bir artışın görülmemesi (Fujimura, Sato, Tanita, Kambayashi, Otsuka, Fujisawa, Yoshino, Matsushita, Funakoshi, Hata, Yamamoto, Uchi, Nonomura, Tanaka, Aoki, Imafuku, Okuhira, Wada, ve ark., 2018), kanser tipine göre sCD163'ün ICI tedavisinde biyo-belirteç olarak kullanılmasını önermektedir.

Sitokinler

Nivolumab tedavisinde, tam remisyon, kısmi remisyon ve uzun-dönem stabil hastalık yanıtı gösteren melanoma hastalarında yanıtsızlara göre serum TNF-α seviyesi daha düşük olduğu (Tanaka ve ark., 2017), tedavi öncesi serum IL-6, interferon-γ ve IL-10 seviyelerinin yüksekliğinin ise yanıt veren hastalar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yamazaki ve ark., 2017).

Periferik kan hücre sayıları

İpilimumab tedavisi alan evre IV melanoma hastalarında relatif lenfosit sayılarının hem tedavi öncesi (Martens ve ark., 2016) hem de 2 doz ipilimumab sonrasında yüksek olmasının (Wilgenhof ve ark., 2013), nivolumab tedavisi alanlarda

da 3 ve 6 hafta sonrasında absolüt lenfosit sayılarının yüksekliğinin (Nakamura ve ark., 2016) daha uzun OS ile ilişkili olduğu yapılan farklı çalışmalar ile gösterilmiştir. İlaveten, ipilimumab tedavisi öncesi ileri evre melanoma hastalarında yüksek absülüt ve relatif eosinofil sayılarının daha uzun bir OS süresi ile ilişkili olduğu (Martens ve ark., 2016), pembrolizumab tedavisi öncesinde de relatif eozinofil sayılarının yüksekliğinin hem uzun süreli OS hem de daha iyi bir ORR'na sahip oldukları gözlenmiştir (Weide ve ark., 2016). Tersine, yüksek nötrofil-lenfosit oranının pembrolizumab tedavisi alan ileri derece MM hastaları için kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuş ve güçlü bir prediktif faktör olduğu gösterilmiştir (Nakamura ve ark., 2019).

İpilimumab tedavisi öncesinde dolaşımda yüksek seviyelerde Treg hücre varlığı uzun süreli OS ile ilişkiliyken, tedavinin ilerleyen haftalarında (12 hafta sonra) sayılarının düşmesi hastalığın daha iyi kontrolünü sağlamakta ve daha uzun süreli OS ile ilişkilendirilmektedir (Martens ve ark., 2016). Diğer taraftan kandaki miyeloid türevli süpresör hücrelerin frekansının tedavi öncesi (ipilimumab veya nivolumab) MM hastalarında yüksek olması ise daha kısa bir OS süresi ile ilişkilidir (J. Weber ve ark., 2016).

LDH

İleri seviye MM hastalarında tedavi öncesi normalden yüksek serum LDH seviyelerinin zayıf prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Bedikian ve ark., 2008). Bu bulgu, ipilimumab ile tedavi olan MM hastalarında da zayıf anti-tümör yanıtı bulunması ile desteklenmektedir (Delyon ve ark., 2013).

Mutasyon yükü

Anti-PD1 tedavisi öncesi melanoma biyopsileriyle yapılan transkriptomik analizlerle tedaviye yanıt veren hastalarda, DNA tamir geni *BRCA2*'de mutasyonların birikmesinin artan sağ kalım süresi ile ilişkili olduğu (Hugo ve ark., 2016) ve tedavi

öncesi yüksek mutasyon ve neoantijen yüküne sahip MM hastalarının ipilimumab tedavisinden klinik fayda sağladıkları gözlenmiştir (Van Allen ve ark., 2015).

Dolaşan tümör DNA'sı (stDNA)

Kanda bulunan tümör-kökenli küçük DNA parçaları stDNA olarak adlandırılır ve çeşitli kanser tiplerinde yüksek seviyelerde bulunması kötü prognoz ile bağlantılıdır (Heitzer, Ulz, & Geigl, 2015). Anti-PD1 antikorları ile tedavi sürecinde ısrarlı bir şekilde artmış stDNA'na sahip MM hastalarının, tedaviye kötü yanıt verdikleri saptanmış, aynı zamanda daha kısa PFS ve OS ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Lee ve ark., 2017).

Antikorlar

Melanoma-türevli antijenlere TRP1/TYRP1, TRP2/TYRP2, gp100, MelanA/MART1 ve kanser/testis antijeni NY-ESO-1' e özgü antikorların serumdaki miktarları, metastatik melanoma hastalarında tedavi başlangıcında ICI'lere yanıt verenlerde, yanıtsız hastalara göre daha yüksek bulunmuş ve aynı zamanda OS süresinin daha iyi olduğunu saptanmıştır (Fässler ve ark., 2019). Bu bulgular, belirtilen antikorların ICI tedavisinde tümör yanıtını öngörebilecek potansiyel yeni biyo-belirteçler olarak kullanılmalarını öngörmektedir.

2.2.4.2 İmmün ilişkili yan etkiler için biyo-belirteçler

ICI tedavisi immün yanıtı arttırdığı için hem irAEs'e hem de tümör regresyonuna neden olabilmektedir. Pek çok araştırma bu iki olay arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Genel olarak irAEs'in varlığı ICI tedavisi alan melanoma hastalarında daha uzun OS ile ilişkilidir (Choi & Lee, 2020; Teulings ve ark., 2015).

Cinsiyet

Her ne kadar MM'lu erkek hastalar ICI tedavisine kadınlara nazaran daha olumlu yanıt verseler de ipilimumab tedavisi alan kadınlarda irAEs görülme oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Valpione ve ark., 2018).

Serum Faktörleri

Zayıf tümör yanıtı ile benzer olarak, tedavi öncesi sirküle IL-6 seviyelerinin ipilimumab tedavisi alan melanoma hastalarında irAEs görülme sıklığı ile negatif bir ilişki içerisinde olduğu bulunmuştur (Valpione ve ark., 2018). Nivolumab tedavisi alan hastalarda ise, tedavi sonrasında dolaşımdaki IL-6 seviyelerindeki artışın irAEs'in gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2017). Başlangıçtaki düşük seviyelerdeki IL-6 ve ICI tedavisi sonrası artış, irAEs gelişimini öngörmede işe yarayabilir.

Neoadjuvan olarak ipilimumab tedavisi alan ve IL-17 sitokin seviyesi kanda daha yüksek olan MM hastalarında, tedavi öncesi ve tedavinin farklı noktalarında daha fazla irAEs'in görüldüğü saptanmıştır (Tarhini ve ark., 2015). Bu bulgu yan etkilerin öngörülebilmesi açısından önemlidir.

Çözünür CD163 (sCD163) ve CXCL5

Pek çok otoimmün hastalıkta biyo-belirteç olan sCD163 ve CD163+ makrofajların ürettiği CXCL5 seviyelerinin, irAEs geliştiren melanoma hastalarında nivolumab tedavisi başlangıcı ve erken yanıtta kandaki seviyelerinin yan etki geliştirmeyenlere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Fujimura, Sato, Tanita, Kambayashi, Otsuka, Fujisawa, Yoshino, Matsushita, Funakoshi, Hata, Yamamoto, Uchi, Nonomura, Tanaka, Aoki, Imafuku, Okuhira, Furudate, ve ark., 2018).

Periferik kan hücreleri

Anti-PD-1 tedavisine başlanılan melanoma hastalarında tedavi başlangıcındaki artmış nötrofil-lenfosit oranının zayıf yanıt ile ilişkili olduğu ve absolüt eozinofil sayılarının endokrin bazlı irAEs'in görülmesiyle pozitif bir ilişkisi olduğu gözlemlenmiştir. (Nakamura ve ark., 2019). Kanda μL'de 240'dan fazla absolüt eozinofil sayısı endokrin ilişkili yan etkilerin öngörülmesi açısından umut verici bir biyo-belirteçtir (Nakamura ve ark., 2019). Eozinofillerin yanı sıra, total beyaz kan hücre sayısında artış ve relatif lenfosit sayısındaki azalışla beraber relatif nötrofil sayısındaki artışın, nivolumab tedavisi alan melanoma hastalarında akciğer veya gastrointestinal irAEs'in gelişmesiyle ilişkili olduğu da gözlenmiştir (Fujisawa ve ark., 2017).

Bağırsak Mikrobiyomu

İpilimumab tedavisi başlangıcında *Faecalibacterium* sınıfı bakterilerle zenginleşmiş bir mikrobiyoma sahip melanoma hastalarında, kolit-ilişkili immün yan etkilerin insidansının daha yüksek olduğu görülmüştür (Chaput ve ark., 2017). Tersine *bacteroidetes* şubesine ait bakterilerin çoğalmış varlığı, hastaların ipilimumab tedavisi ile uyarılan kolit gelişimine direnç gösterdikleri gösterilmiştir (Dubin ve ark., 2016).

2.3 B Hücreleri

B hücreler kısa-dönem ve uzun-dönem hümoral antikor yanıtlarının oluşumundan sorumlu lenfosit popülasyonudur. Koruyucu ve patojenik antikorlar üretebilmekle beraber, bu çok yönlü işlevsellikleri, B hücrelerini terapötik hedefler ve hastalık biyo-belirteçleri olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır.

2.3.1 B Hücreleri fenotipleri, işlevleri ve bağışıklık sistemi ilişkisi

İnsan periferik kan B hücreleri yüzey fenotipik belirteçlerine göre tanımlanır ve çeşitli alt gruplara ayrılır (Tablo 6) (Sanz ve ark., 2019). Bu hücreler her ne kadar

değişken ve sınırlı sayıda fenotipik belirteçlere sahip olsalar da fonksiyonel özellikler (regülasyon, aktivasyon, anerji) ile birleştirilerek değerlendirilebilmektedirler.

B hücreleri hem peptit hem de karbohidrat yapıdaki antijenlere farklı yollardan çeşitli antikor yanıtları üretmektedir. B hücreler aynı MHC ile sunulan peptidlere benzer yanıt vermektedir. T hücrelerin aktive olduğu (T-bağımlı antijenler) bu durum haricinde T-bağımsız çözünmüş antijenler aracılığıyla da aktive olabilmektedirler (Breitfeld ve ark., 2000). Yüksek-aviditeli moleküllerin pek çok sayıda B hücre reseptörü (BHR)'ne çapraz bağlanması ile tek bir sinyal üzerinden veya spontane BHR'ü ve patern tanıma reseptörüne bu moleküllerin bağlanması ile de iki sinyal üzerinden T hücreden bağımsız yanıt verebilmektedirler (Berkowska ve ark., 2011). Aktive B hücreler çeşitli fonksiyonlara sahiptir. ASH olarak davranabildikleri gibi, sitokin/kemokin salgılayabilirler ve antikor üretebilirler (Egbuniwe, Karagiannis, Nestle, & Lacy, 2015). B hücreleri tarafından üretilen bu antikorlar aglütinasyon, reseptör nötralizasyonu, kompleman aktivasyonu, opsonizasyon ve antikor-bağımlı hücresel sitotoksisite fonksiyonları üzerinden tümör gözetimine katılmaktadır.

Antijenin tipine ve BHR afinitesine göre primer B hücre yanıtlarının indüklenmesi ile ekstra foliküler bölgede veya foliküler germinal merkez (GC)'lerin içerisinde B hücreler efektör hale geçmektedir. T-bağımsız antijenlerin uyardığı B hücreler ilk yanıtı vererek eksta-foliküler plasmablastlara dönüşür ve geçici ve orta-afiniteli sirküle IgM üretirler (Berkowska ve ark., 2011). T-bağımlı antijenlere verilen geç yanıt GC içerisinde gerçekleşir ve B hücreler klonal olarak genişlerken afinite maturasyonu ile gelişirler ve IgM izotipinden IgA, IgG veya IgE sınıf dönüşümü gerçekleştirirler.

İzotip değişimi geçiren foliküler GC-türevli plasmablastlar antijen maruziyetinden sonra haftalar boyu sirkülasyonda kalan yüksek-affiniteli IgG üretmektedirler (Haynes, Kelsoe, Harrison, & Kepler, 2012).

Tablo 6. İnsanda periferik kandaki B hücrelerin 7 ana belirteç ile sınıflandırılması.

B hücre popülasyonları (CD19+)		Ana Belirteçler	Ek belirteçler	İşlev/özellikler
Geçici (*Transitional*)	**T1/T2**	IgD+ CD27– CD38++ CD24++	CD10++/+ IgM++ MTG+ CD10/IgM Ekspresyonu = T1 > T2 > T3	Gelişimsel öncüler
	T2-MZP	IgD+ CD27– CD38 ++ CD24++ CD21++	CD10+ IgM++	MZ öncüleri
	T3	IgD+ CD27– CD38+ CD24+ CD21+	CD10+/– IgM+ MTG+	Gelişimsel öncüler veya aktive naif
Naif	**Dinlenen (*resting*)**	IgD+ CD27– CD38+ CD24+ CD21+	IgM+ MTG–	Antijenle karşılaşmamış olgun hücreler
	Aktive	IgD+ CD27– CD38– CD24– CD21–	IgM+ MTG+ CD95+ CD23– CD11c+ T-bet+ FcRL5+ SLAMF7+ CXCR5–	Kısa-ömürlü PB ve GC reaksiyonları
	Anerjik	IgD+ CD27– CD38+/dü CD24+ CD21–	IgMlow/–	Yetersiz-yanıt. Toleransın sürdürülmesi
Bellek	**Dönüşmemiş (*unswitched*)**	IgDlo CD27+ CD38+/dü CD24+ CD21+	CD1c+ IgM++	Doğal bellek
	Dönüşüm öncesi (*Pre-switched*)	IgD– CD27+ CD38+/dü CD24+ CD21+	IgM+	Dönüşüö öncesi bellek; erken IgM bellek IgG bellek öncüleri
	Dönüşmüş dinlenen	IgD– CD27+ CD38+/dü CD24+ CD21+	IgG/IgA+ CD95–	Var olan bellek rezervuarı
	Dönüşmüş aktive	IgD– CD27+ CD38– CD24– CD21–	IgG/IgA+ CD95+ CD86+	Efektör bellek-PB/PC öncüleri
	Atipik doku yerleşik	IgD– CD27–CD38dü CD24dü CD21–	FcRL4+ IgM/IgG/IgA+ FcRL5+	Mukozal gözetim; tükenmiş bellek; BHR yetersiz yanıt bellek
Antikor-salgılayan hücreler	**Erken PB**	IgD– CD27dü/+ CD38++ CD24–	CD20+/– HLA-DR+ CD138–	Naif ve bellek-kökenli PB öncüleri
	PB	IgD– CD27 ++ CD38+ + + CD24–	CD20– HLA–DR+ CD138– Ki67+	Antikor sekresyonu
	PC	IgD– CD27 ++ CD38+ + + CD24–	CD19+/– CD20– CD138+	Antikor sekresyonu
Regülatör B hücreler (Breg)		Farklı ana popülasyonlar ve alt gruplara benzeyen çeşitli yüzey fenotipleri: Pro-B-10 ve B10 (IL-10 üretimi ile tanımlanır IL-35 üreten Bregler (IL-35 üretimleri ile tanımlanır)		T hücre ve monosit inflamatuvar ve otoimmün yanıtların azaltılması
Regülatör Plazma hücreler (PCreg)		**IgD– CD27++ CD38++**	CD19+/– CD138+ IL−10+ veya IL−35+IgMyü or IgA (farklı populasyonlar)	Anti-tümör yanıtlar gibi İmmün yanıtların baskılanması
B1 hücreler	**IgD++ CD27+**		IgM+ CD43+ CD70– CD11c+ CD14+ CD5+/–	Doğal oto-antikorların üretimi

2.3.2 BAFF-APRIL ekseni ve reseptörleri: BAFF-R, TACI, BCMA

Hümoral immünolojik belleğin korunması açısından spesifik B hücrelerinin sürdürülebilirliği önemlidir ve anti-apoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-W'nun

varlığı ile ilişkilidir. Bunlarla birlikte, sitokinler ve reseptörleri gibi dış sinyaller de bellek B hücre'lerin uzun ömürlü olmaları açısından önemlidir (Müller-Winkler ve ark., 2021).

A proliferation-inducing ligand (APRIL) ve *B cell-activating factor* (BAFF) TNFSF ailesi reseptörlerindendir. İki ligand da *transmembrane activator and CAML interactor* (TACI) ve *B cell maturation antigen* (BCMA) reseptörlerine farklı affinitelerle bağlanmaktadır. Ayrıca BAFF, BAFF-R'ye de bağlanır. BAFF, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, T hücreler ve nötrofiller tarafından eksprese edilmektedir (Kampa, Notas, Stathopoulos, Tsapis, & Castanas, 2020). Membranda eksprese olan TACI ve BCMA parçalanarak membrandan koparak çözünmüş formları sirkülasyondaki BAFF ve APRIL ligandlarına bağlanabilmekte ve membrandaki TACI ve BCMA seviyelerinde azalmaya neden olabilmektedir (Hoffmann ve ark., 2015; Laurent ve ark., 2015).

BAFF ve APRIL B hücre olgunlaşmasında ve farklılaşmasında çeşitli rollere sahiptir. Her iki çözünmüş protein de B hücre sağ kalımı ve olgunlaşmasında rol alır. Sitokin BAFF'ın BAFF-R'üne bağlanması foliküler ve marjinal zone B hücrelerin gelişmesi ve homeostazı açısından kritik öneme sahiptir. İlaveten, olgun naif B hücre alt gruplarının da sağ kalımları açısından BAFF-R'den gelecek sinyallere ihtiyaçları vardır (Smulski & Eibel, 2018). TACI reseptörü ise, B hücre proliferasyonunu inhibe ederek plazma hücrelerine farklılaşmayı destekler (Ou, Xu, & Lam, 2012). BCMA tercihen olgun B lenfositler üzerinde eksprese olsa da hematopoetik kök hücreler veya hematopoetik olmayan dokularda da minimal düzeyde eksprese olmaktadır ve kemik iliği uzun-ömürlü plazma hücrelerinin devamlılığı açısından gereklidir (Shah, Chari, Scott, Mezzi, & Usmani, 2020). Oysaki BAFF-R ekspresyonu plazma hücrelerinde düşük seviyededir veya hiç yoktur. (O'Connor ve ark., 2004). Her üç reseptörde sirküle B lenfositlerde eksprese olur ve pro-apoptotik protein Bim seviyesini azaltarak apoptozu engeller (Craxton, Draves, Gruppi, & Clark, 2005).

APRIL proteininin kanser hücre hatlarının çoğalmasında görev aldığı gösterilmiş olsa da, BAFF molekülünün ya hücre proliferasyonunu arttırdığı ya da

apoptozu arttırdığı rapor edilmiştir (Kampa ve ark., 2020). İki molekül de non-hematolojik maligniteler için potansiyel hedef moleküller olarak önerilmiş olsa da insan ileri seviye melanoma hastalığında APRIL-BAFF ve reseptörlerinin, aynı zamanda da rollerinin üzerine sistematik araştırmalar mevcut değildir.

In vitro deneylerde melanoma ilişkili antijen NY-ESO1 ile aktive edilen B hücrelerde BAFF varlığında antijen sunumu artırmakta ve antijen-spesifik sitotoksik T lenfosit'lerin (STL) çoğaldığı gözlemler; farelerde insan melanoma tümör xenograftlarında küçülme ile de desteklenmiştir (Yiwen ve ark., 2016). BAFF'ın fare splenositlerinden izole edilen B hücrelerde CD40, CD80/CD86, CD23, CD21, CD5 ve PD-L1 ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir (Yarchoan ve ark., 2020). İlaveten, *in vivo* fare melanoma modelinde BAFF'ın TME (tümör mikroçevresi)'de Th1 yanıtlarını arttırdığı, aynı zamanda FOXP3+CD4+ Treg hücre frekansını da arttırdığı gözlenmiştir (Yarchoan ve ark., 2020). BAFF tedavisi CD8+ STL sayılarını arttırmasının yanı sıra dalakta yerleşik Treg ve B hücreler üzerindeki PD-L1 ekspresyonunu arttırmaktadır. Aynı çalışmada Kanser Genom Atlası'ndaki metastatik melanoma hasta veri analizi ile BAFF'ın TME'deki artmış ekspresyonunun hasta sağ kalımı ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Yarchoan ve ark., 2020).

Serum BAFF seviyelerinin retrospektif olarak incelendiği son bir araştırmada ise, uveal melanoma hastalarında metastazlı hastalarda metastaz bulunmayan hastalara göre BAFF seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Hastalarda metastatik yük ve BAFF serum seviyeleri arasında orta pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiş, ayrıca metastazlı ve metastaz olmayan hastaların klinikte erken dönemde birbirinden ayırt edilmelerinde BAFF serum seviyelerinin prognostik etkinliğe sahip olduğu önerilmiştir (Lin & Süsskind, 2021).

Tüm bu araştırmalar, BAFF'ın immün modülasyonda kompleks bire role sahip olduğunu desteklemektedir. BAFF, anti-tümör immüniteyi desteklerken aynı zaman da farklı immün regülatör fonksiyonlara da sahiptir.

2.3.3 B Hücrelerinin metastatik melanomadaki rolleri

Tümör-infiltre B hücreler

Tümör mikro çevresinin yapısına ve B hücre fenotiplerine bağlı olarak tümör infiltre B (TIB*)* hücreler pro-tümör veya anti-tümör etki gösterebilirler.

Tersiyer lenfoid yapılar (TLS, *tertiary lymphoid structures*) tümör bölgesinde kümeleşen ve organize olan lenfoidlerdir. Primer ve metastatik melanoma lezyonlarında varlıkları gösterilmiş ve bununla birlikte TIB hücre yoğunluğunun da ICI tedavisine yanıt ve artan sağ kalım ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (Helmink ve ark., 2020; Stowman ve ark., 2018). ICI tedavisi naif metastatik melanoma evre IIIB-IV hastaları ile yapılan bir çalışmada, TLS'da yüksek yoğunluktaki CD8+ T hücrelerin varlığıyla beraber, somatik hipermutasyon geçiren ve çoğalmakta olan B hücreler, CD21+CD20+ ve plazma B-hücreler (CD138+)'in varlıkları saptanmıştır. Somatik hipermutasyon geçiren TIB hücrelerin yüksek oranlarının OS süresini arttırdıkları, ancak CD21+CD20+ B-hücrelerin zayıf OS ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Lynch ve ark., 2021).

Tümör infiltre lenfositlerde ise germinal merkez benzeri yapıların oluştuğu ve B hücrelerin çoğaldığı görülmekle birlikte, tümör dokusunda bellek B hücrelerin ICI tedavisine yanıt veren evre III MM hastalarında daha yüksek frekansta bulunduğu, yanıt vermeyen hastalarda naif B hücre popülasyonunun baskın olduğu gösterilmiştir (Helmink ve ark., 2020). Bu bilgiler TIB hücrelerin metastatik melanomadaki ve ICI tedavi yanıtlarındaki potansiyel rollerini desteklemektedir.

Dolaşan B hücreler ve antikorlar

Pek çok çalışma melanomada farklılaşmış çeşitli B hücre fenotiplerinin, bellek, plasmablast ve plasma hücrelerin varlıkları gösterilmektedir. MM hastalarında artan frekanstaki plasmablastlar, ısrarlı ve fonksiyonel anti-tümör B hücre yanıtlarını göstermiştir (DeFalco ve ark., 2018). Her ne kadar plasmablastların melanomada

potansiyel pozitif rolleri gösterilse de, bu hücrelerin plastisiteye sahip olmaları nedeniyle TGF-β ve IL-10 ekspresyonlarına bağlı olarak regülatör fenotipten pro-tümör fenotipe geçici dönüşümleri meydana gelebilmektedir (Griss ve ark., 2019).

IL-10 üreten Breg hücreler, Treg ve M2-tip makrofajlarla beraber tümör mikro çevresindeki STL hücreleri güçlü bir şekilde baskılarken, aynı zamanda alternatif Th2 yanıtlar aracılığıyla IL-4 varlığında B hücrelerde IgG4 izotip dönüşümünü uyarır (Satoguina, Weyand, Larbi, & Hoerauf, 2005). Melanoma hastalarının OS sürelerinde negatif prognostik serum belirteci olan IgG4 (Karagiannis ve ark., 2015), melanoma hastalarının CD49b+CD73+ B hücre alt grubu tarafından eksprese edildiği ve salgıladıkları VEGF gibi pro-anjiyojenik sitokinlerin hastalarda artmış olduğu gösterilmiştir (van de Veen ve ark., 2020).

Tümör-spesifik antikorlar

Serumdaki tümör-spesifik antikorların melanoma hastalarındaki bulgusu 51 sene öncesine kadar gitmektedir (Lewis ve ark., 1969). B hücre farklılaşması ve tümöre özgü antikorların üretimi, tümör antijenlerinin değişen profilleri ve mikro çevre tarafından etkilenen dinamik bir süreçtir. Melanoma, tümör spesifik antijenlerin ve melanoma farklılaşma antijenlerindeki değişimler sebebiyle heterojen ve değişken bir yapıya sahiptir (Da Gama Duarte ve ark., 2018). Serolojik çalışmalar, hücre içi melanosit ve melanoma-ilişkili antijenler (MİA) olan TYR, TRP-1, TRP-2 ve *melanoma-associated glycoprotein antigen family* (gp100)'i tanıyan veya kanser-testis antijenlerine (CT) spesifik IgG tipteki antikorların varlığı MM hastalarında gösterilmiştir (Da Gama Duarte ve ark., 2018). Ancak CT antijeni-spesifik antikorların çalışmaya katılan metastatik hastaların yarısında saptanması, MM hastalarında dolaşımda her zaman immünojenik antijenlere spesifik antikorların bulunmayabileceğini, bu sebeple hastaların antikor yanıtlarını indüklemede yetersiz kalabildiklerini ortaya koymuştur (Robbins ve ark., 2011).

2.3.4 B hücreler ve immünoterapi yanıtlarındaki rolleri

İmmünoterapiden fayda sağlanılmasında, var olan artmış genel antikor yanıtlarının rol oynadığı düşünülmektedir (Da Gama Duarte ve ark., 2018). İmmünoterapi antikor üretimini tetikleyerek baskılanmış immün sistemi aktive edebilmektedir. Bundan dolayı antikor repertuvarındaki değişimlerin izlenmesi ile de tedavinin etkinliği takip edilebileceği öngörülmektedir. Ancak, prospektif olarak immünoterapinin analitik ve klinik değerlendirmeleri için etkili biyo-belirteçlere ihtiyaç vardır.

ICI tedavisi sırasında hümoral immün yanıtların değerlendirilmesi için çalışmalar tedavinin farklı zamanlarında alınan örnekler değerlendirilerek yapılmaktadır. MM tanısı alan hastalara tedavi başlangıcında, yani sıfırıncı günde bakıldığında, ipilimumab tedavisi alan hastaların B hücrelerinin TLS' da yerleşik olduğu, bu yerleşik CD20+ B hücrelerin CD8+ T hücreler ile birlikte TLS'deki fazlalığının artan sağ kalım ile ilişkili olduğu (Cabrita ve ark., 2020) gözlenmiştir. IL-10 salgılayan B hücre popülasyonunun anti-CTLA-4 tedavisine yanıt vermeyen hastalarda arttığı gösterilse de, IL-10+ Breg hücrelerin varlığının nivolumab yanıtı ile ilişkisi bulunamamıştır (Selitsky ve ark., 2019). TME'de plasmablast-benzeri fenotipin (CD19+CD20+CD38+CD138-) en yaygın B hücre fenotipi olduğu ve tedavi başlangıcında indüklenmiş plasmablast popülasyonunun da anti-PD1 tedavisine verilen artmış immün yanıt ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Griss ve ark., 2019). Farklı Anti-PD-1 tedavisi alan tüm MM hasta gruplarında, melanoma farklılaşma antijenlerine (TRP-1, TRP-2, gp100, MelanA) özgü ve CT antijeni NY-ESO-1'a spesifik antikorların, yanıt verenlerde tedavi öncesi serumlarında daha yüksek seviyelerde seyrettikleri gözlenirken (Fässler ve ark., 2019), aynı tedavileri alan farklı hasta gruplarında ise IgG, IgG1, IgG2 ve IgG3 antikor titrelerinin PFS süresi ile pozitif korele olduğu, ipilimumab ve nivolumab kombine tedavisinde ise sadece IgG2 izotipindeki titre yüksekliğinin OS süresi ile pozitif ilişkisi gösterilmiştir (Diem ve ark., 2019). İpilimumab ve nivolumab kombinasyonu alan farklı hasta gruplarında ise tedavi başlangıcında, melanoma antijen spesifik IgG tip antikorların yanıt verenlerde yanıtsız hastalara göre yüksek olduğu bulunurken, bu antikorların genellikle IgG1 ve

IgG2 izotiplerinde olduğu saptanmıştır (Fässler ve ark., 2019). İpilimumab tedavisinden bir yıl sonra tedaviye yanıt veren hastalarda plasmablast frekansının yüksek olarak bulunması ve plasmablastların ürettikleri antikorların somatik hipermutasyon seviyelerinde yükseklik gözlenmesi, yanıt veren hastalarda ısrarlı bir B hücre yanıtının devam ettiğini desteklemektedir (DeFalco ve ark., 2018). Tüm bu bulgular B hücre özelliklerinin ICI tedavisinde önemli bir prognostik ve prediktif rollere sahip olduklarını destekler niteliktedir.

2.3.5 İmmün ilişkili yan etkilerde B hücre reaktivitesinin mekanizması

ICI tedavisinin amacı sitotoksik T hücreleri arttırmak olsa da, bu ajanlar direkt veya indirekt olarak B hücreleri etkilemektedir. B hücrelerde ICI tedavisinde erken dönemdeki değişimlerin, genelde 6 ay sonrasında görülen yüksek orandaki derece 3 veya daha yüksek irAEs ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir. (Das ve ark., 2018). T hücrelerin tersine, B hücrelerin belirli koşullar altındaki otoreaktiviteleri daha iyi bilinmektedir. Anti-PD1 tedavisi alan metastatik maligniteli hastalar, tiroidit veya hipotiroid anomalisi olan hastalar tiroid bezi antijenlerine karşı otoantikor geliştirirken (Orlov, Salari, Kashat, & Walfish, 2015), benzer olarak ICI tedavisi altındaki hastalar adacık hücrelere karşı antikor geliştirdikleri gösterilmiştir (Hughes ve ark., 2015). Ipilimumab'ın anti-PD-1 ajanından daha önce uygulandığı kombine tedavi alan hastalarda ise hastaların %44,4'ü anti-tiroid antikorları ve tiroid dengesinde bozukluk görüldüğü saptanmıştır. Bu bulgular, anti-CTLA-4 ile başlatılan ve anti-PD1 ile desteklenen tedavilerin B hücre otoimmünitesine neden olduğunu desteklemektedir (de Moel ve ark., 2019).

irAEs'in başlangıcı klasik otoimmünite ile bağdaştırılmakla beraber kanser immünoterapisinde kısıtlamalara neden olmaktadır. İpilimumab tedavisi altındaki evre III-IV MM hastalarında öz antijenleri ve kanser antijenlerini tanıyan antikorlardaki artışın, hastalarda irAEs ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Sistemik B hücre deregülasyonu, bakteriyel enfeksiyonlar ile ilişkili kronik inflamasyona neden olarak rastgele kanser-spesifik olmayan otoantijenlerin salınması sebebiyle olabileceği öne sürülmüştür (Da Gama Duarte ve ark., 2018).

2.3.6 İmmün ilişkili yan etkilerde B hücrelerin potansiyel biyo-belirteç olarak rolleri

ICI tedavisi başlanmadan önce bazı biyo-belirteçlerin varlığı, irAEs gelişmesi riskinin yüksek olduğu ile ilişkilidir. Pre-terapötik serum oto-antikorlarının varlığı bazı irAEs'in artan riski ile bağdaştırılmıştır. İleri seviye metastatik kanser hastalarında yapılan çeşitli araştırmalarda, miyozit görünen hastalarda anti-mAChR antikorları (Mammen ve ark., 2019), tiroidit geliştiren hastalarda anti-tiroid (Kobayashi ve ark., 2018), kolit geliştirenlerde anti-nükleer antikorların ve pnömoni geliştirenlerde ise anti- CD74 antikorlarının varlığı gösterilmiştir (Sakakida ve ark., 2020). Ancak bu çalışmaların hiçbiri sadece ICI tedavisine başlanılacak metastatik melanoma hastalarında yürütülmemiştir. B hücrelerin prediktif rollerini destekleyen ve sadece metastatik melanoma hasta grubunda yürütülen bir çalışmada, ICI başlangıcından ortalama 3 hafta sonra B hücrelerin değiştiği gösterilmiştir. Bulgularda, total B hücre sayılarının azalmasıyla birlikte, $CD21^{düşük}$ B hücreler ve plasmablastlar da bir artış, aynı zamanda $CD21^{düşük}$ B hücre klonlarında bir artış saptanmıştır. Bu bulgularla birlikte $CD21^{düşük}$PD-1+ bellek B hücrelerin de tedavi sürecinde erken yanıtta farklılaşması, artan irAEs riskinin önceden belirlenmesinde kullanılabileceklerini öne sürülmektedir (Das ve ark., 2018).

Prospektif çalışmalar yeni biyo-belirteçlerin klinik uygulamaya entegre edilmesi açısından önemlidir. ICI tedavisinin hangi hastalarda yan etkilere yol açabileceğinin ve hangi hastaların tedaviye cevap vereceklerinin belirlenmesi için biyo-belirteçlere ihtiyaç vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araç ve Gereçler

3.1.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar

RPMI 1640 L-Glutamine ile zenginleştirilmiş kültür medyumu (Lonza, Basel, İsviçre)
Lenfosit ayırma medyumu, 1,077 g/mL (Lonza, Basel, İsviçre)
Penisilin ve streptomisin (Gibco, Birleşik Krallık)
DMSO, dimetil sülfoksit (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
FCS, *fetal calf serum* (Invitrogen, Carlsbad, CA, A.B.D)
Penisilin-streptomisin (10,000 U/mL) (Life Technologies, Carlsbad, CA, A.B.D)
Steril PBS, fosfat tampon tuz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre
Steril distile su
Etilendiamintetraasetik (EDTA), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Sodyum sitrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Sitrik asit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Sodyum karbonat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
3,3′,5,5′-Tetrametillbenzidin (Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Hidrojen peroksit solüsyonu 31% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Sülfürik asit, H_2S0_4 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)
Bovin serum albümin, BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, İsviçre)

3.1.2 Deneylerde kullanılan çözeltiler

Hücre kültürü

- Dondurma Solüsyonu: (%45 FCS, %45 c-RPMI, %20 DMSO)
- Zenginleştirilmiş medium (c-RPMI): 500 mL'lik L-glutaminli (2mmol/L) RPMI-1640 medyum, steril şartlarda %1 oranında penisilin-streptomisin (5 mL) ve %10 oranında ısıtılıp inaktive edilmiş FCS (45 mL) ile zenginleştirildi.

FACS Boyama Tamponu

- PBS, 2 mM EDTA, %0,5 BSA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Deneyi

- Karbonat kaplama tamponu pH 9,5:

7,0 gr sodyum bikarbonat, 2,8 gr sodyum karbonat, 1 L distile su.

- Sitrat tamponu pH 5,6:

Sitrik asit 4,1 gr, sodyum sitrat 29,0 gr, 1 L distile su

- Yıkama tamponu: PBS (pH:7,4), %0,05 Tween 20
- Engelleyici tampon: PBS (pH: 7.4), %5 BSA, %0,05 Tween 20
- TMB karışımı, konsantrasyon 10 mg/mL:

Toz halinde 3,3′,5,5′-Tetrametilbenzedin, DMSO

- TMB substrat:

18 mL distile su

2 mL 1M sitrat tamponu, pH5,9

200 µL TMB karışımı

2,5 µL %30 H_20_2

3.1.3 Deneylerde kullanılan akan hücre ölçer ilişkili reaktifler

Akan hücre ölçer için kullanılan floresan işaretli boyalar tablo 7'de ve kontrolleri tablo 8' de gösterilmektedir.

Tablo 7. İmmün fenotipleme için kullanılan antikor listesi

Belirteç	Klon	Floresan boya	Firma
IgD	IA6-2	PECF594	BD Biosciences
IgM	MHM-88	PerCP/Cy5.5	Biolegend
IgG	keçi poliklonal	dylight405	Jackson
IgA	keçi poliklonal	AF488	Jackson
CD19	HIB19	APC/FIRE750	Biolegend
CD21	B-ly4	BV711	BD Biosciences
CD23	EBV CS-5	APC	Biolegend
CD24	ML5	PE	Biolegend
CD27	L128	BV510	BD
CD38	HIT2	BV781	Biolegend
BAFF-R	11C1	FITC	Biolegend
BCMA	19F2	PE/Cy7	Biolegend
TACI	1A1	PE	Biolegend
CD3	OKT3	PE-AF700	Biolegend
CD14	M5E2	Biotin	Biolegend
CD16	3G8	Biotin	Biolegend
CD235a	HIR2	Biotin	Biolegend
Zombie Yellow		BV605	Biolegend
Streptavidin		Brilliant Violet 605™	Biolegend

Tablo 8. İmmün fenotipleme için kullanılan antikor izotip kontrolleri

İzotip	Klon	Floresan boya	Firma
Fare, IgG1, k	MOPC-21	BV781	Biolegend
Fare, IgG2b, k	MOPC-11	PE	Biolegend
Fare, IgG1, k	MOPC-21	AF700	Biolegend
Fare, IgG1, k	MOPC-21	APC	Biolegend
Fare, IgG2b, k	MOPC-11	BV711	Biolegend
Sıçan, IgM, k	RTK2118	PE/Cy7	Nordic BioSite
Ermeni hamster, IgG	HTK888	PE/Cy7	Biolegend

3.1.4 Elisa ölçüm kit ve malzemeleri

- 96 kuyucuklu steril ELISA mikro plaklar (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom; Thermo Fisher Scientific)

- Serum proteinleri saptamada kullanılan reaktif ve kitler Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9. Elisa kit ve antikorları

Ad	Firma	Katalog No	Ek bilgi
Rekombinant İnsan APRIL (TNFSF13) (ELISA Std.)	BioLegend	591309	ELISA standartı
Saflaştırılmış anti-insan APRIL (TNFSF13, CD256) Antikoru	BioLegend	524801	İzotip : Fare IgG2a, κ Klon : 33H5
Biotin anti-insan APRIL (TNFSF13, CD256) Antikoru	BioLegend	524903	İzotip : Fare IgG2b Klon : 53E11
İnsan BAFF/BLyS/TNFSF13B DuoSet ELISA :	R &D systems	DY124-05	

3.1.5 Cihazlar

Mithras^2 LB 943, Berthold Tech. GmbH & Co.Kg, Bad Wildbad, Almanya)
FACS ARIA^{TM} III BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, A.B.D).
TC20^{TM} Automated cell counter, Bio-Rad Laboratories, CA, A.B.D

3.2 Çalışma grubu

Çalışmamız Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı, İsviçre Allerji ve Astım Araştırma Enstitüsü (*Swiss Institute of Allergy and Asthma Research*, SIAF) ve Saint Gallen Kanton Hastanesi Dermatoloji ve Allerji Bölümü (Kantonsspital St. Gallen Klinik für Dermatologie/Allergologie)'nün ortak çalışması sonucu gerçekleştirildi. Bu çalışma için etik kurul kararı Doğu İsviçre Etik Komisyonu (*Ethikkommission Ostschweiz*)'ndan (EKOS 16/079) ve ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Karar No: 2018-13/26) alındı. Çalışma Helsinki bildirgesine uyumlu olarak yürütüldü. Tüm hasta ve sağlıklı kontrollerden rızaları alındı.

3.2.1 Klinik örnekler

Prospektif kohort çalışmasının hastaları 2016-2018 yılları arasında cerrahi müdahele ile çıkarılamayan klinik evre IV metastatik melanoma tanısı konmuş ve anti-

PD1 ve/veya anti-CTLA-4 tedavisi alan ve takibi olan hastalardır. Bu çalışmadaki hastalar kontrol noktası inhibitörü pembrolizumab (Keytruda; MSD Merck Sharp & Dohme AG, 2 mg/kg üç haftada bir) veya ipilimumab (Yervoy; Bristol-Myers Squibb SA, 3 mg/kg 3 haftada bir) veya nivolumab (Opdivo; Bristol-Myers Squibb SA) ve ipilimumab kombine tedavisi (1 mg/kg and 3 mg/kg üç haftada bir) aldı. Hastalar 24 ay özenle takip edildi ve hala gelecekteki çalışmalar için takip edilmeye devam edilmektedir.

Biyolojik materyaller (kan örnekleri) 3 farklı zaman biriminde toplandı: tedavi başlangıcından hemen önce, tedavinin ilk uygulamasından 3 hafta sonra ve tedavi başlangıcından 9 ile 12 hafta sonrasına denk gelen 4/5'inci vizit. Bilgisayarlı tomografi taraması tedavi yanıtının değerlendirilmesi için 4. vizitin öncesinde uygulandı ve RECIST 1.1 kriterine göre değerlendirildi (Eisenhauer ve ark., 2009). İlk BT-taramasında progresif hastalık (*progressive disease*, PD) gösteren hastalarda 4-6 hafta arasında PD'yi doğrulamak ve psödoprogresyonu dışlamak için ikinci bir BT-taraması yapıldı. İmmünoterapiye yanıt, ya tamamen remisyon (*complete remission*, CR) veya kısmi remisyon (*partial remission*, PR) olarak tanımlandı. Yanıt vermeyenler ise stabil hastalık (*stable disease*, SD) veya PD gösterenler olarak tanımlandı. 26 hastadan 1 tanesi ilk BT taramasında PR gösterse de, ikinci bilgisayarlı tomografi sonucu PD olduğu için belirlediğimiz kriterlere uymayarak çalışmamızdan dışlandı. 10 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

İmmün ilişkili yan etkilerin gelişimi ve kontrolü tedavi başlangıcından itibaren takibe alındı ve döküntü, genel kaşıntı (*pruritus*), vitiligo, kolit, pnömoni, hepatit, tiroid, hipofizit, artrit, Guillain-Barre/Nöropati olarak Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.03 referans alınarak kategorize edildi ("Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 4.03," 2010). Çalışmamızdaki hastaların tedavi yanıtları, kullanılan kontrol noktası inhibitörleri, geliştirdikleri irAEs, BRAF mutasyonu durumları ve ilk BT yanıtları tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10. Çalışma grubu, tedavi yanıtları ve genel klinik karakterizasyonu

Hasta No	Yanıt	Tedavi	Oto-immün Toksisiteler	BRAF durumu	İlk BT taraması yanıtı
P3	Evet	Pembrolizumab	Yok	mutant	PR
P5	Evet	Pembrolizumab	Cilt döküntüsü,kızarıklığı/Sedef hastalığı	wt	Pseudoprogresion
P6	Evet	Ipilimumab +Nivolumab	Cilt döküntüsü,kızarıklığı/Sedef hastalığı	wt	PR
P14	Evet	Pembrolizumab	Tiroidit	wt	PR
P23	Evet	Pembrolizumab	Yok	wt	PR
P26	Evet	Ipilimumab	Yok	mutant	PR
P29	Evet	Pembrolizumab	Yok	wt	CR
P30	Evet	Pembrolizumab	Vitiligo	wt	PR
P31	Evet	Pembrolizumab	Tiroidit	wt	PR
P32	Evet	Pembrolizumab	Vitiligo, Kolit	wt	PR
P52	Evet	Ipilimumab +Nivolumab	Cilt döküntüsü,kızarıklığı/Sedef hastalığı, Kolit	mutant	PR
P66	Evet	Pembrolizumab	Tiroidit, Artrit	mutant	PR
P76	Evet	Ipilimumab +Nivolumab	Cilt döküntüsü,kızarıklığı/Sedef hastalığı, Kolit, Artrit	wt	PR
P2	Hayır	Pembrolizumab	Yok	wt	PD
P4	Hayır	Pembrolizumab	Yok	wt	SD
P8	Hayır	Pembrolizumab	Vitiligo	wt	PD
P10	Hayır	Pembrolizumab	Cilt döküntüsü,kızarıklığı/Sedef hastalığı	mutant	SD
P12	Hayır	Pembrolizumab	Yok	wt	PD
P22	Hayır	Ipilimumab +Nivolumab	Pnömoni	mutant	PD
P33	Hayır	Ipilimumab	Kolit, Hepatit, Guillain-Barre/Nöropati	wt	SD
P50	Hayır	Pembrolizumab	Yok	wt	SD
P63	Hayır	Ipilimumab +Nivolumab	Cilt döküntüsü,kızarıklığı/Sedef hastalığı, Artrit, Hepatit, Vitiligo	wt	PD
P71	Hayır	Pembrolizumab	Yok	mutant	PD
P72	Hayır	Pembrolizumab	Yok	mutant	PD
P75	Hayır	Pembrolizumab	Yok	wt	SD

wt; doğal fenotip, CR; tamamen remisyon, PR; kısmi remisyon, SD; stabil hastalık, PD; progresif hastalık

3.3. Yöntem

3.3.1 Periferik kan mononükleer hücre (PKMH) eldesi

Klinik evre IV metastatik melanoma tanısı konmuş kişilerden 3 farklı zamanda, sağlıklı donörlerden ise tek bir zamanda periferik kan heparinli 10 mL tüplere alındı. PMNH izolasyonu için densite gradyan yöntemi kullanıldı. Laminar akım altında periferik venöz kan örnekleri 1:1 oranında steril PBS/2 mM-EDTA ile sulandırıldıktan sonra içerisinde 4 mL lenfosit ayırma medyumu (yoğunluk 1,077 g/mL) bulunan steril 15mL'lik konik tüpün içerisine yayılarak 800G de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pastör pipet yardımı ile plazma atılarak, tüpün ortasında bulut halinde bulunan interfaz kısmı, PKMH'ler, toplanıp steril temiz 15 mL'lik konik tüplere aktarıldı. Önce 780 G, 10 dakika, +8°C'de takiben 300 G, 10 dakika, +4°C sıcaklığındaki PBS/EDTA ile yıkandı. Süpernatantlar atıldıktan sonra hücreler 1mL c-RPMI içerisinde resüspanse edildi ve TC20 otomatik hücre sayma makinası (Bio-Rad Laboratories, US) kullanılarak sayıldı. 2 mL'lik kiryotüplere 1:1 oranında dondurma solüsyonu ve hücrelerin bulunduğu cRPMI süspansiyonu hızlı bir şekilde karıştırılarak dondurma kabına konup -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuya kondu. 1 gün sonra örnekler sıvı azot tankına aktarıldı. Tüm hasta örnekleri toplandıktan sonra, sıvı azot tankından çıkartılan donmuş örnekler soğuk zincir ile -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.3.2 Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonlarının Belirlenmesi

B lenfositlerin seçilen fenotiplerine bakılması ve yüzey protein ifadelerinin belirlenmesi için izole edilen PMNH tablo 7'de belirtilen floresan işaretli antikorlar kullanılarak 2 farklı panel ile akan hücre ölçer analizi yapıldı.

3.3.2.1 Hücre Yüzey Boyaması

Tablo 10'da verilen floresan işaretli antikorlardan B hücre immün fenotiplendirilmesi ve molekül ekspresyonlarını yakalamak üzere 2 farklı panel yapıldı (tablo 11).

Tablo 11. B hücre ve ilişkili yüzey belirteçleri

Panel 1	Panel 2
CD19	CD19
IgD	IgD
IgM	IgM
IgA	CD27
IgG	BAFFR
CD21	BCMA
CD23	TACI
CD24	
CD27	
CD38	

Tablo 7 ve 8'de belirtilen tüm flurokrom konjuge antikorların ve izotipik kontrollerin son konsantrasyonları 1 µg/mL olacak şekilde FACS boyama tamponu ile dilüe edildi.

Deneysel Prosedür

-80°C derin dondurucudan alınan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda buzları eriyene kadar tutulup hızlı bir şekilde 15mL konik tüplere aktarıldı. Üzerlerine yavaş bir şekilde c-RPMI medyum eklendikten hemen sonra 350G hızda 8°C'de 7 dakika santrifüj edildi. Yıkamadan sonra süpernatant (üst sıvı) vakum pompası ile çekilip atılarak, pelet mikropipet yardımıyla dağıtıldı. Tüp ağzına kadar FACS boyama tamponu (%0,5 BSA içeren PBS) ile dolduruldu ve 2. bir yıkama gerçekleştirildi. Hücreler 150 µL PBS içerisinde 1 µL Zombie Yellow canlılık boyası kullanılarak 20 dakika +4°C'de karanlıkta inkübe edildi. Hücre süspansiyonları 5 mL'lik FACS boyama tüplerine alınarak üzerlerine 2 mL FACS boyama tamponu eklenerek 350G hızda 8°C'de ki santrifüjde 7 dakika yıkandı. Panel antikorlarından FACS boyama tamponu içerisinde kokteyl hazırlandı ve her bir hasta için 3 farklı FACS tüpünde kokteyl ve tampon toplam 100 µL hacimde olacak şekilde hücreler süspanse edilerek karanlıkta +4°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu biten tüplere 2 mL +4°C sıcaklıktaki FACS yıkama tamponu eklendi. Takiben 350G hızda 8°C'de 7 dakika santrifüj edilerek bağlanmayan floresan işaretli antikorlar yıkama ile uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri 100 µL hacminde 0,5 µg/mL konsatrasyonda Brilliant Violet 605™

Streptavidin ile 10 dakika +4°C'de karanlıkta inkübe edildi. Takiben 2 mL FACS boyama tamponu ile yıkandı. Santrifüjden çıkan hücreler süpernatant atılıp yeni tampon eklendikten sonra, yuvarlak tabanlı 12x75mm mavi filtreli FACS okutma tüplerine filtrelendi. Hücreler son hacim 200 µL olacak şekilde FACS boyama tamponunda süspanse edildi ve cihazda okutulana kadar +4°C sıcaklıkta ve karanlıkta bekletildi.

3.3.2.2 Akan hücre ölçer kompanzasyon ayarı

BD™ CompBeads özellikle tandem boyaların (örn; APC Fire750, PE-Cy7 gibi) bulunduğu akan hücre ölçer panellerinin kompanzasyon ayarlarında kullanılmaktadır. Çalışmamızda veriler okutulmadan önce polisitren yapıdaki bu boncuklar kullanılarak çok renkli akan hücre ölçer analizleri için floresan kompansasyon ayarları optimize edilmiştir.

Deneysel Prosedür

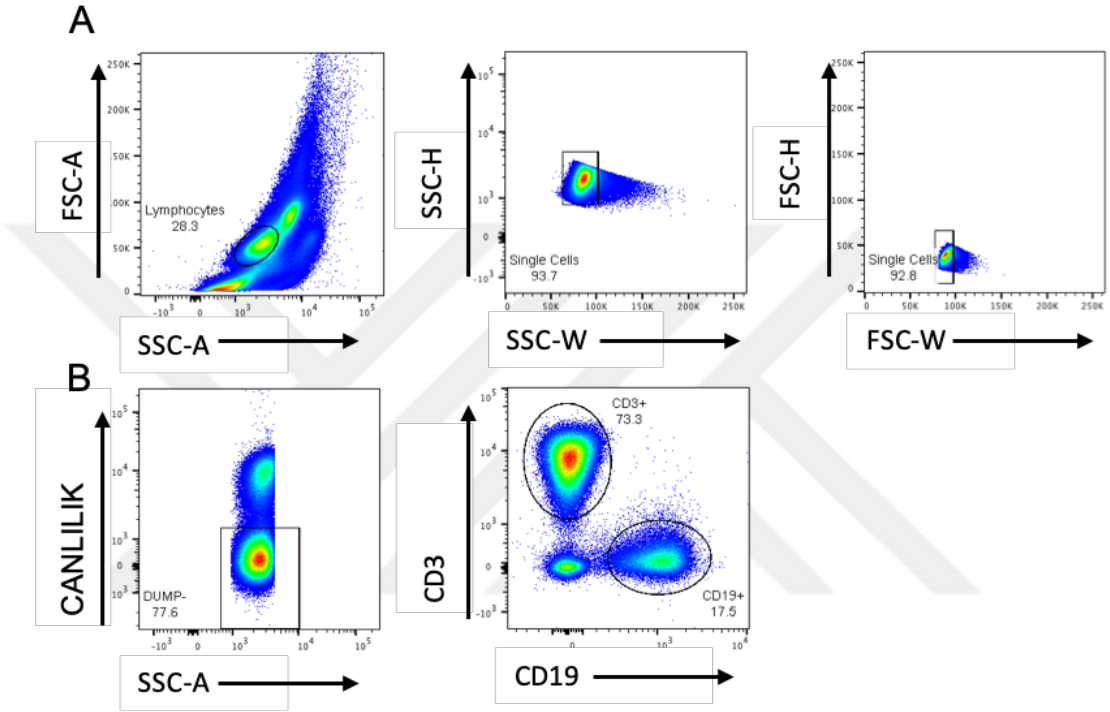
12x75mm test tüplerinin her birine birer damla pozitif ve negatif BD™ CompBeads (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) damlatıldı ve tüm farklı antikor konjugatları 100 µL FACS boyama tamponunda karanlıkta 10 dakika ve +4°C'de inkübe edildikten sonra 2 mL aynı tamponla 350g 5 dakika +8°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra antikorla kaplı boncuklar son hacim 200 µL olacak şekilde FACS boyama tamponunda süspanse edildi.

3.3.2.3 Akan hücre ölçer ile analiz

FACS ARIA™ III (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) cihazında tek renkli kompanzasyon ayarları uygun FSC/SSC (boyutsal/granüler) ayarları ve floresan dedektör (PMT) voltajları hücreler için ayarlandı. Kompanzasyon matriksi, Diva (BD, Biosciences, A.B.D) programında oluşturuldu. Hücre yüzey boyamasını takiben ölçümleri çok renkli akan hücre ölçer ile FACS ARIA™ III cihazında gerçekleştirildi. Diva yazılımı ile 500000-1000000 arası hücre toplandı. Bu veriler, FlowJo v10.0.7 (Tree Star, Ashland, OR) programı ile analiz edildi.

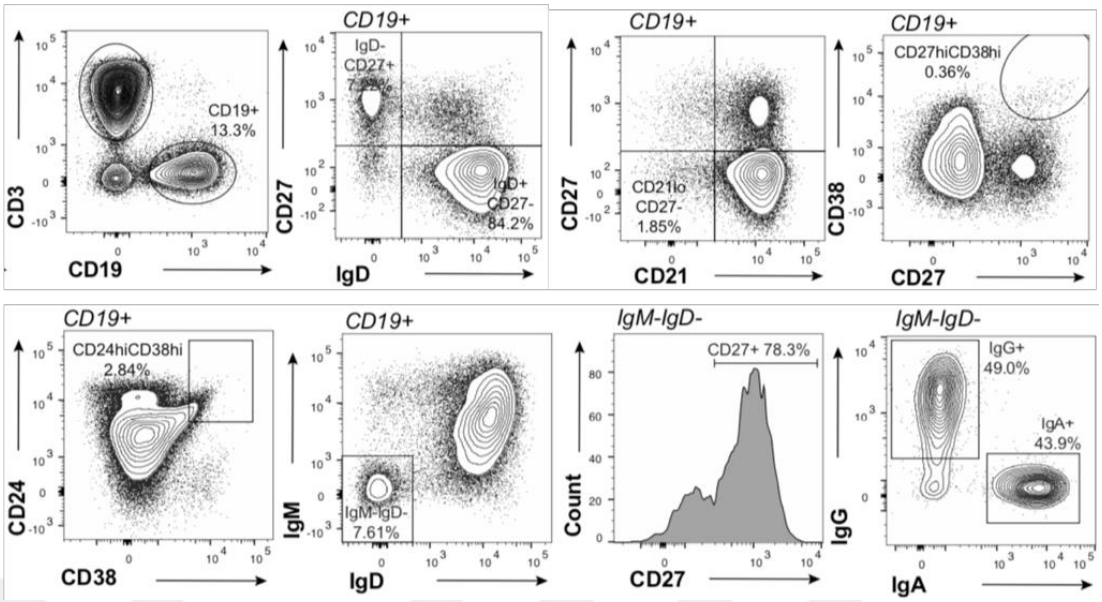
3.3.2.4 Akan hücre ölçer verilerinin analizi

İlk önce lenfositler FSC-A/SSC-A olacak şekilde kapılanıp, dublet hücreler dışlanarak sadece tek hücreler seçildikten sonra canlılık boyası negatif hücreler seçildi (şekil 3, A). Takiben biotin işaretli olmayan CD3- ve CD19+ hücreler kapılanarak B lenfositlere ulaşıldı (şekil 3, B)



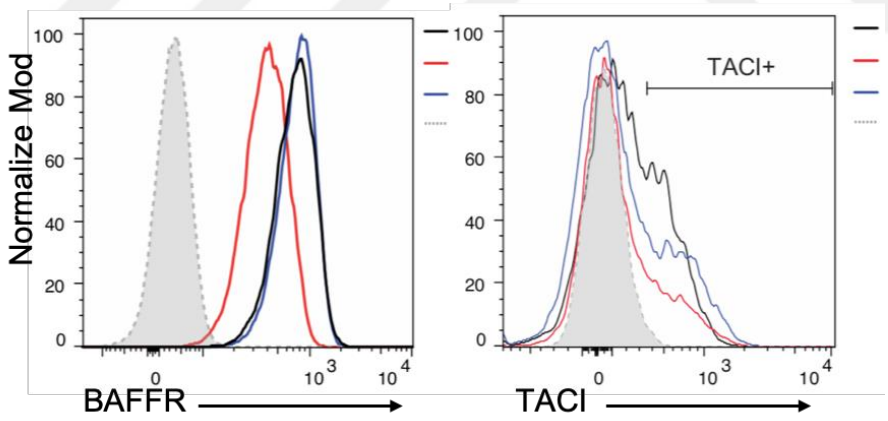
Şekil 3. Akan hücre ölçer verilerinde genel B hücrelerin (CD19+) kapılama stratejileri ve saçılım grafikleri. A. Lenfosit kapısı ileri saçılım (FSC) ve yana saçılım (SSC) plotundan seçildi ve dubletlerin ayırımı gerçekleştirildi. **B.** Canlılık boyası negatif hücreler ve CD14, CD16, CD235a pozitif hücreler seçildikten sonra CD3 negatif CD19+ B hücreler kapılandı.

Genel B hücreler kapılandıktan sonra, naif (IgD+CD27-), dönüşmüş CD27+ (IgD-CD27+), klasik bellek (CD27+CD21+), plasmablast (CD19+CD27^{yü}CD38^{yü}), geçici (transitional) B hücreler (CD24^{yü}CD38^{yü}), dönüşmüş B hücreler (CD19+IgM-IgD-), dönüşmüş bellek B hücreler (histogram grafiği) ve IgG+ ve IgA+ B hücreler şekil 4'te görüldüğü gibi alt gruplara ayrıldı.



Şekil 4. Genel B hücre alt gruplarının akan hücre ölçer analizleri ve histogram ve saçılım grafikleri ile gösterimi.

BAFF reseptörü ekspresyon düzeylerinin B hücre yüzeylerindeki ölçümlerinde sadece MFI (ortalama floresan yoğunluk) değerleri kullanıldı. Genel B hücrelerin BAFFR ve TACI reseptör analizleri şekil 5'te verilmektedir.



Şekil 5. CD19+ B hücrelerin BAFFR MFI değerlerinin ve TACI+ B hücrelerin histogram grafikleri. Çizgiler renklerine göre; kesikli gri çizgi negatif kontrolü, siyah sağlıklı kontrolü, kırmızı yanıt vermeyen hastaları, mavi yanıt veren hastaları göstermektedir.

3.3.3 Serum ayrıştırılması

Hasta ve sağlıklı gönüllülerden heparinsiz tüpe alınan periferik kan 30 dakika bekletildikten sonra 1500G'de 10 dakika santrifüj edildi. Kiryo tüplere alınan örnekler -80°C sıcaklığındaki derin dondurucuya kaldırıldı ve soğuk zincir ile SIAF'a taşındı.

3.3.4 Serum BAFF ve APRIL seviyelerinin saptanması

BAFF serum seviyeleri, *Human BAFF/BLyS/TNFSF13B DuoSet* ELISA geliştirme kiti (#DY124-05, R&D systems, Minneapolis, MN) ile ölçülürken, APRIL seviyeleri ise kendi hazırladığımız ELISA kiti ile ölçüldü. ELISA mikro plakları (#DY124-05, R&D systems, Minneapolis, MN) kuyucuklarına saflaştırılmış fare anti-insan APRIL antikoru (klon 33H5, Biolegend, San Diego, CA) (konsantrasyon PBS içerisinde 2 µg/mL) veya fare anti-insan BAFF/BlyS yakalama antikoru (#841899) (konsantrasyon PBS içerisinde 1 µg/mL) kuyu başı 50 µL olacak şekilde eklendi ve sırasıyla 16 saat 4°C'de ve oda ısısında inkübe edildi. Antikor kaplı plaklar kuyu başı 200 µL olacak şekilde 4 defa yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra kuyu başı 200 µL engelleyici tampon eklenerek oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Standart eğri için, insan APRIL ELISA standartı (#591309) engelleyici tampon içerisinde konsantrasyon 100 ng/mL'den 0,195 ng/mL'e olacak şekilde 2 kat dilüe edildi. İnsan BAFF/BLyS Standart (#841901) ise 10000 pg/mL'den 19,5 pg/mL olacak şekilde %1 BSA içeren filtrelenmiş PBS içerisinde 2 kat dilüe edildi ve 50'şer µL kuyucuklara eklendi. İlaveten, hastalar ve sağlıklı kontroller engelleyici tampon içerisinde 1:2 dilüe edilip kuyucuklara eklendi. Plaklar oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildikten sonra yıkama tamponu ile 4 defa yıkandı. Takiben, engelleyici tamponda 0.25 µg/mL konstrasyon olacak şekilde fare biotin anti-insan APRIL (#524903) veya %1 BSA içeren PBS'te 10 ng/mL konsantrasyon olacak şekilde biyotinlenmiş keçi anti-insan BAFF/BLyS saptama antikoru (#841900) kuyu başı 50 µL hacimde olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Plaklar 4 kez yıkandıktan sonra bağlı antikorları saptamak için anti-insan APRIL bulunan kuyucuklara biyotin-bağlayan protein avidin içeren 1:2000 PBS'te dilüe edilmiş *ExtrAvidin®−Peroxidase* (SIGMA) ve anti-insan BAFF bulunan kuyulara ise Streptavidin-HRP (#893975) PBS'te 40 defa sulandırılıp her bir kuyuya 50 µL hacimde eklendi. APRIL plakları 30 dakika, BAFF plakları ise 20 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi. Plaklar 5 defa yıkama tampon ile yıkandı. Her bir kuyuya 150 µL TMB substratı eklendikten sonra karanlıkta bekletilen plaklarda 13. dakikada peroksidaz reaksiyonu (mavi renk) saptandı ve plaklara hemen 50'şer µL 1Molar sülfirik asit eklendi ve reaksiyon durduruldu. Takiben mikro plaklardaki ışık absorbansı ELISA spektrofotometresinde (Mithras^2 LB

943, Berthold Tech. GmbH & Co.Kg, Bad Wildbad, Almanya) 450 nm'de ölçüldü (sürüm *Driver Version: 1,11*).

3.3.4.1 ELISA verilerinin analizi

En uygun sulandırma tespitinde grafiğin ani düşüş/çıkış gösterdiği en son sulandırma oranları göz önüne alındı.

Lineerlik

ELISA testlerinin doğrusallığı için, insan BAFF/BLyS Standartı (#841901) 10,000 pg/mL konsantrasyondan başlayarak son konsantrasyon 19,5 pg/mL olacak şekilde, APRIL ELISA standartı ise 100 ng/mL konsantrasyondan başlayarak (#591309) son konsantrasyon 0,195 ng/mL olacak şekilde, 1-, 2-,4-,8-,16-,32-64-128-, 256-, 512-defa PBS veya engelleyici tampon ile seri-dilüsyon yapılarak 10 farklı standart konsantrasyon elde edildi.

Log-lineer standart eğri oluşturulması

Standartların sulandırılmasıyla elde edilen konsantrasyonların logaritmik değerleri alınarak *arbitrary unit* Log10 (AU) 'lar elde edildi.

Her bir plak için, log-lineer standart eğriler bu AU'lar ve 450 nm de ölçülen absorbansları kullanılarak GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, California, A.B.D) yazılımında sigmoidal, 4PL X is log (*concentration*) fonksiyonu kullanılarak oluşturuldu. Hasta ve sağlıklı kontrollerin absorbans değerlerine karşılık gelen ara değerler hesaplandıktan sonra, bu değerler güç fonksiyonuyla anti logaritmaları alınarak proteinlerin serum konsantrasyonları elde edildi.

3.4 İstatistiksel analizler

Parametrik ve parametrik olmayan istatistiksel prosedürler, sayısal ölçümlerin gruplardaki normallik dağılımları, normal dağılım testleri Shapiro-Wilk testi ve D'Agostino & Pearson testi ile gerçekleştirildi. Tedavi öncesi hasta gruplarının ve sağlıklı kontrol grubunun karşılaştırılması standart sapmalar aynı ise tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi ve Tukey *post hoc* testi, değil ise Brown-Forsythe ve Welch ANOVA testi ile beraber Dunnett T3 *post hoc* testleri ile değerlendirildi. Aynı zaman diliminde 2 hasta grubu arasındaki karşılaştırılmalar için, normal dağılan değerlerde standart sapmaların benzer olması durumunda unpaired T testi, olmaması durumunda Welch's düzeltmesi kullanılırken, normal dağılmayan grupların kıyaslanmasında Mann-Whitney Testi kullanıldı. Hasta gruplarının tedavi sürecindeki değişimleri, normal dağılan değerler için, varyanslar homojen dağıldıysa tekrarlı ölçüm varyans analizi (RM one-way ANOVA) testi ve Tukey *post hoc* testi, değil ise Geisser-Greenhouse düzeltmesi ile birlikte aynı testler ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen grupların karşılaştırılmasında ise Friedman test ile beraber Dunn's *post hoc* testi kullanıldı. Veriler arasındaki ilişkiler, normal dağılmayan veriler için Spearman'ın korelasyon katsayısı (rho), normal dağılan veriler için Pearson'un korelasyon testi ile %95 güven seviyesinde test edildi. Tedavi yanıtını öngörmek için (kesme değeri) yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip receiver operating characteristic (ROC) eğrisi ile belirlendi. Hesaplamalar ve grafikler GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, California, A.B.D) yazılımı ile yapıldı. %95 güven aralığında p değeri 0.05 anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hasta popülasyonu ve özellikleri

Yaş

Çalışmamıza katılan tedavi yanıtsız hastaların yaşları 52-91 arasında değişiklik gösteriyordu. Hastaların ortalama yaşı 72,67, ortanca yaşı ise 75, standart sapması 11,28 olarak bulundu. Tedaviye yanıt veren olguların yaşları 56-90 arasında dağılırken, ortalama yaş 73,62, ortanca yaş 74, standart sapması ise 9,242 olarak bulundu.

Takip Süresi

Çalışmamızdaki olguların tedavi başlangıcı ve takip süresi yanıt veren ve vermeyen olgularda değişiklik göstermektedir. Tedavi yanıtı görülmeyen olgularda 12-113 ay arasında değişiklik gösteriyordu. Ortalama süre 51,77 ay, ortanca süre ise 40,83 ay, standart sapması 35,39 olarak belirlendi. Tedaviye yanıt veren hastalarda ise 41,92-115,2 ay arası değişiklik gösterirken, ortalama süre 98,24 ay, ortanca süre 104,5 ay, standart sapma ise 19,75 olarak bulundu.

4.1.1 ICI tedavisi yanıtlarının değerlendirilmesi

Çalışmamıza dahil edilen 25 metastatik melanoma hastasından 13 tanesi ICI tedavisine yanıt verirken 12 tanesi immünoterapiye yanıtsız kaldı. Toplam 20 hasta (%80), 18'i (%69,2) pembrolizumab ve 2'si (%8) ipilimumab monotedavisi alırken, 5 hasta (%20) ise nivolumab ve ipilimumab kombine tedavisi aldı. Toplamda olguların %40'ı monotedaviye yanıt verirken, %40'ı ise ICI tedavisine yanıtsız kaldı. Kombinasyonel immünoterapiye hastaların %12'si yanıt verirken, %8'i ICI tedavisine

yanıt vermedi. Evre IV metastatik melanoma hastalarının klinik karakterleri tablo 10 ve tablo 12'de gösterilmektedir.

Tablo 12. Metastatik melanoma olgularının klinik bilgileri

Hasta kodu	İmmünoterapi	Yanıt	irAEs	Takip süresi	Sağ kalım	Yaş	Metastatik bölge sayısı	Serebral metastaz
P10	Pembrolizumab	Hayır	Evet	1366	sağ	91	4	Evet
P12	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	190	ex	91	1	Hayır
P22	Ipilimumab +Nivolumab	Hayır	Evet	147	ex	60	5	Hayır
P2	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	192	ex	76	7	Hayır
P33	İpilimumab	Hayır	Evet	387	ex	75	2	Hayır
P4	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	526	ex	75	2	Hayır
P50	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	205	ex	75	3	Hayır
P63	Ipilimumab +Nivolumab	Hayır	Evet	1051	sağ	65	5	Hayır
P71	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	985	sağ	71	5	Hayır
P75	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	968	sağ	75	2	Hayır
P72	Pembrolizumab	Hayır	Hayır	984	sağ	52	1	Evet
P8	Pembrolizumab	Hayır	Evet	454	ex	66	3	Evet
P14	Pembrolizumab	Evet	Evet	1342	sağ	90	2	Hayır
P23	Pembrolizumab	Evet	Hayır	1282	sağ	67	1	Hayır
P26	İpilimumab	Evet	Hayır	1275	sağ	70	5	Hayır
P29	Pembrolizumab	Evet	Hayır	1255	sağ	82	3	Hayır
P30	Pembrolizumab	Evet	Evet	1254	sağ	85	5	Hayır
P31	Pembrolizumab	Evet	Evet	1247	sağ	70	2	Hayır
P32	Pembrolizumab	Evet	Evet	1247	sağ	65	1	Evet
P3	Pembrolizumab	Evet	Hayır	503	ex	74	2	Hayır
P52	Ipilimumab +Nivolumab	Evet	Evet	1163	sağ	56	3	Evet
P5	Pembrolizumab	Evet	Evet	1382	sağ	74	3	Hayır
P66	Pembrolizumab	Evet	Evet	1031	sağ	74	3	Evet
P6	Ipilimumab +Nivolumab	Evet	Evet	1380	sağ	82	3	Hayır
P76	Ipilimumab +Nivolumab	Evet	Evet	964	sağ	68	4	Evet

4.1.2 İmmün-ilişkili yan etkilerin değerlendirilmesi

ICI tedavisi altındaki toplam 14 olgu (%56) herhangi bir derecede immün-ilişkili yan etki geliştirdi: 6 cilt döküntüsü/sedef, 4 vitiligo, 4 kolit, 2 hepatit, 3 artrit,

3 tiroidit, 1 Guillain-Barre/Neuropati, 1 pnömoni. 11 olguda ise (%44) herhangi bir irAEs gelişmediği gözlemlendi. Tüm olgulara bakıldığında, irAEs geliştirenlerin %36'sının ICI tedavisine yanıt veren olgular, %20'sinin ise tedaviye yanıtsız olgular olduğu belirlendi. Sağlıklı kontroller, tedaviye yanıt veren (YV) ve yanıtsız (YZ) gruplar içerisinde toksisite geliştiren ve geliştirmeyen grupların örnek sayıları tablo 13'te verilmektedir.

Tablo 13. İmmün-ilişkili yan etki geliştiren olguların tedavi yanıtlarına göre dağılımları

	Kontrol	YZ -irAEs	YZ + irAEs	YV -irAEs	YV+ irAEs
Örnek sayısı	**10**	**7**	**5**	**4**	**9**

4.2 Akan hücre ölçer sonuçlarının değerlendirilmesi

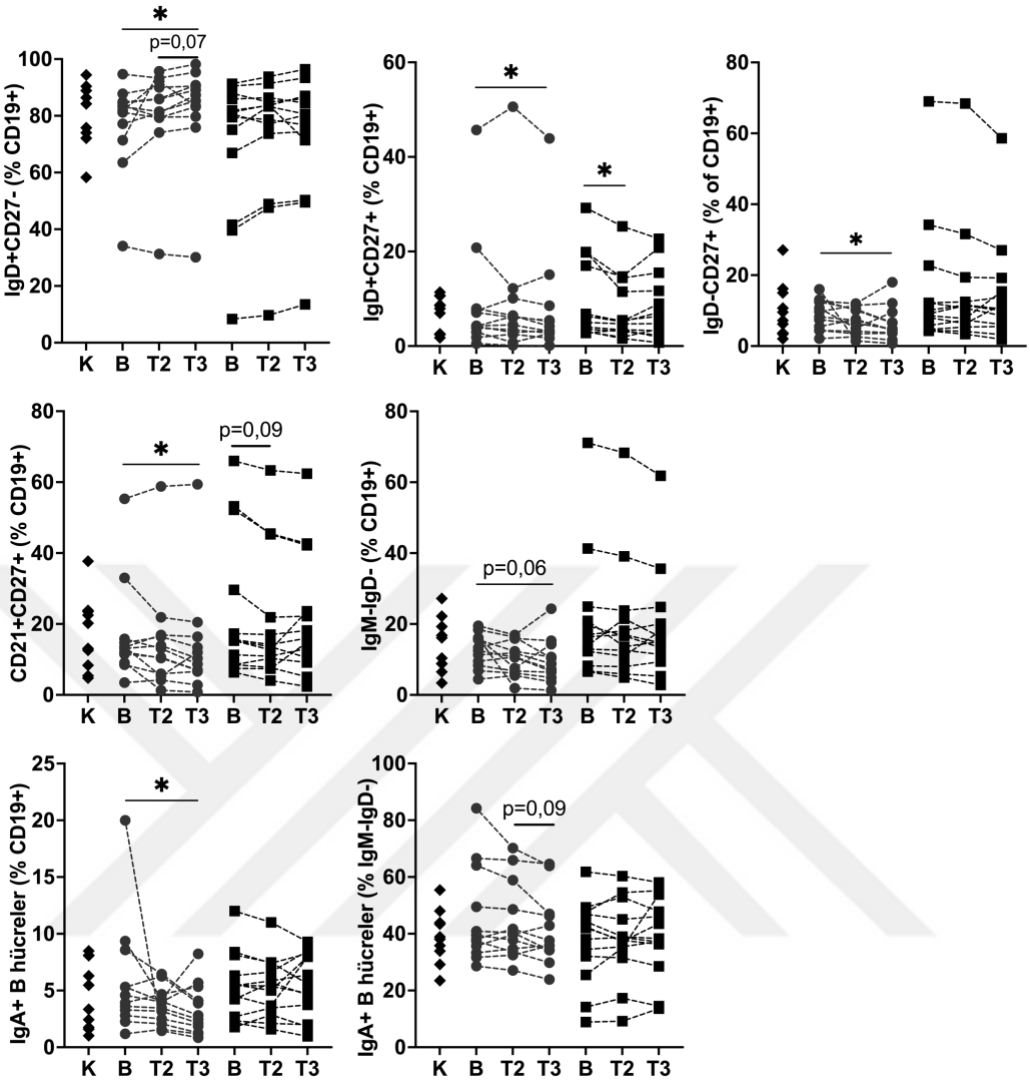
4.2.1 Hasta örnekleri ve kontrol grubunda ana B hücre belirteçlerinin değerlendirilmesi

Periferik kan ana B hücre alt gruplarından naif (IgD+CD27-), dönüşmüş CD27+ (IgD-CD27+), klasik bellek (CD27+CD21+), plazmablast (CD19+ $CD27^{yü}CD38^{yü}$), tranzisyonel B hücreler ($CD24^{yü}CD38^{yü}$), dönüşmüş B hücreler (CD19+IgM-IgD-), dönüşmüş CD27- (IgM-IgD-) B hücreler, dönüşmüş bellek B hücreler ve IgG+, IgA+ B hücre popülasyonları ve CD19+ IgG+, IgA+ B hücre frekanslarına bakıldığında sağlıklı kontroller ve ICI tedavisi başlangıcındaki yanıt veren ve yanıtsız hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlemlenmedi (sırasıyla; $p<0,80$; $p<0,78$; $p<0,78$; $p<0,75$; $p<0,67$; $p<0,41$; $p<0,18$; $p<0,18$; $p<0,59$; $p<0,82$; $p<0,40$; $p<0,81$). CD19+ IgA+ $CD21^{-/dü}$ hücreler yanıtsız grupta, CD21+ IgA izotipindeki B hücre frekansı ise kontrollerde daha yüksek bulunma eğilimindeydi (sırasıyla $p<0,057$; $p<0,06$). IgG izotipindeki CD21+ B hücre frekansı yanıt veren hastalarda, $CD21^{-/dü}$ popülasyonu ise yanıt vermeyen olgularda yüksek olma eğiliminde bulundu (sırasıyla, $p<0,07$; $p<0,07$).

4.2.1.1 ICI tedavi sürecinde tedavi öncesi, erken yanıt ve geç B hücre yanıtları

Üç farklı zaman diliminde toplanan hasta örnekleri tedavi öncesinde ise başlangıç (B), ICI ilk doz uygulamadan 3 hafta sonra B hücre erken yanıtının değerlendirildiği erken vizit (T2) ve tedavi başlangıcından 6-9 hafta sonra geç B hücre yanıtlarına bakıldığı geç vizit (T3) olarak değerlendirildi.

MM olgularında ICI tedavisi sürecinde yanıt veren ve tedaviye yanıtsız hasta gruplarının ana B hücre popülasyonlarının frekanslarında anlamlı derece değişiklikler saptandı. Tedaviye yanıtsız olgularda naif B hücre frekansının tedavi başlangıcından geç vizite artış gösterdiği, dönüşmemiş CD27+, bellek B (IgD-CD27+) , klasik bellek (CD21+CD27+) ve IgA+ CD19+ B hücrelerin frekanslarında anlamlı derecede bir düşüş tespit edildi. (Şekil 6). Aynı zamanda dönüşmüş (IgM-IgD-) B hücrelerde ve IgA+ dönüşmüş hücrelerde de aynı eğilim gözlemlendi (sırasıyla; $p = 0,06$ ve $p=0,09$). ICI tedavisine yanıt veren grupta ise ilk uygulama sonrasında dönüşmemiş CD27+ frekansının anlamlı derecede azaldığı saptandı (Şekil 6).

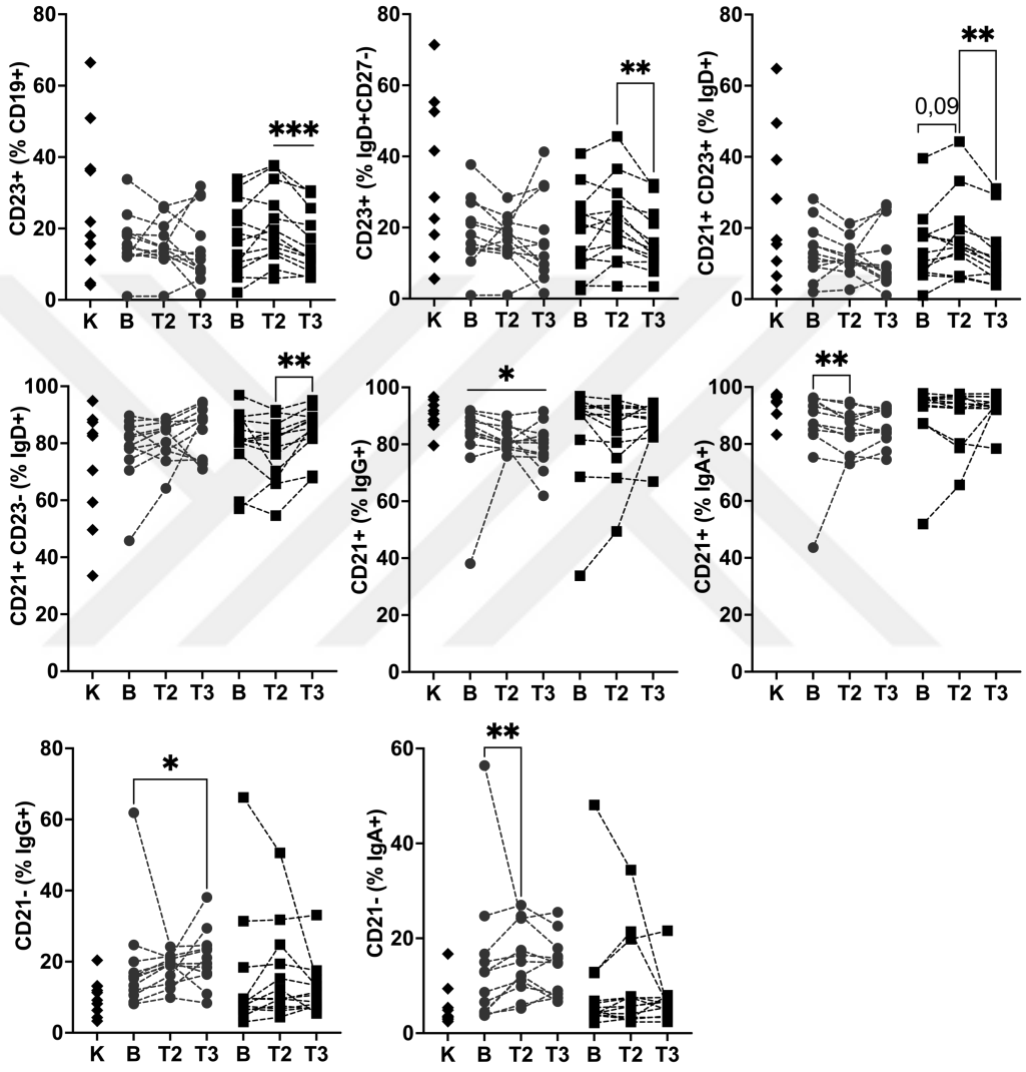


Şekil 6. Naif, dönüşmüş ve bellek B hücre frekanslarının tedavi süresinde değişimi. Kontrollerin ve ICI tedavisine yanıt veren ve yanıtsız olguların tedavinin ICI tedavisi sürecindeki B hücre oranları ve değişimleri gösterilmektedir. Baklava sembolü sağlıklı kontrolleri, daire sembolleri yanıt vermeyen grubu, kare semboller ise yanıt veren grubu temsil etmektedir. Hasta grupları içerisindeki istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler $p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: K, kontrol; B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit.

Periferik kanda dinlenme halindeki naif B hücreler CD21 ve CD23 ekspresyonuna sahip olmakla beraber, bu iki biyo-belirteç B hücre gelişmesi ve aktivasyonunda önem taşımakta ve insan B hücre çalışmalarında kullanılmaktadır (Sanz ve ark., 2019). Bu sebeplerden ötürü B hücre oto-reaktivitesi ve anerjisinde rol oynayan CD21 ve IgE reseptörü CD23 (FcεRII) MM'li olgularda daha detaylı incelendi.

ICI tedavisine yanıt veren olgularda, CD23 bulunan total B ve naif B hücre frekanslarıyla beraber CD21+CD23+ naif B hücre oranının tedavinin erken vizitten

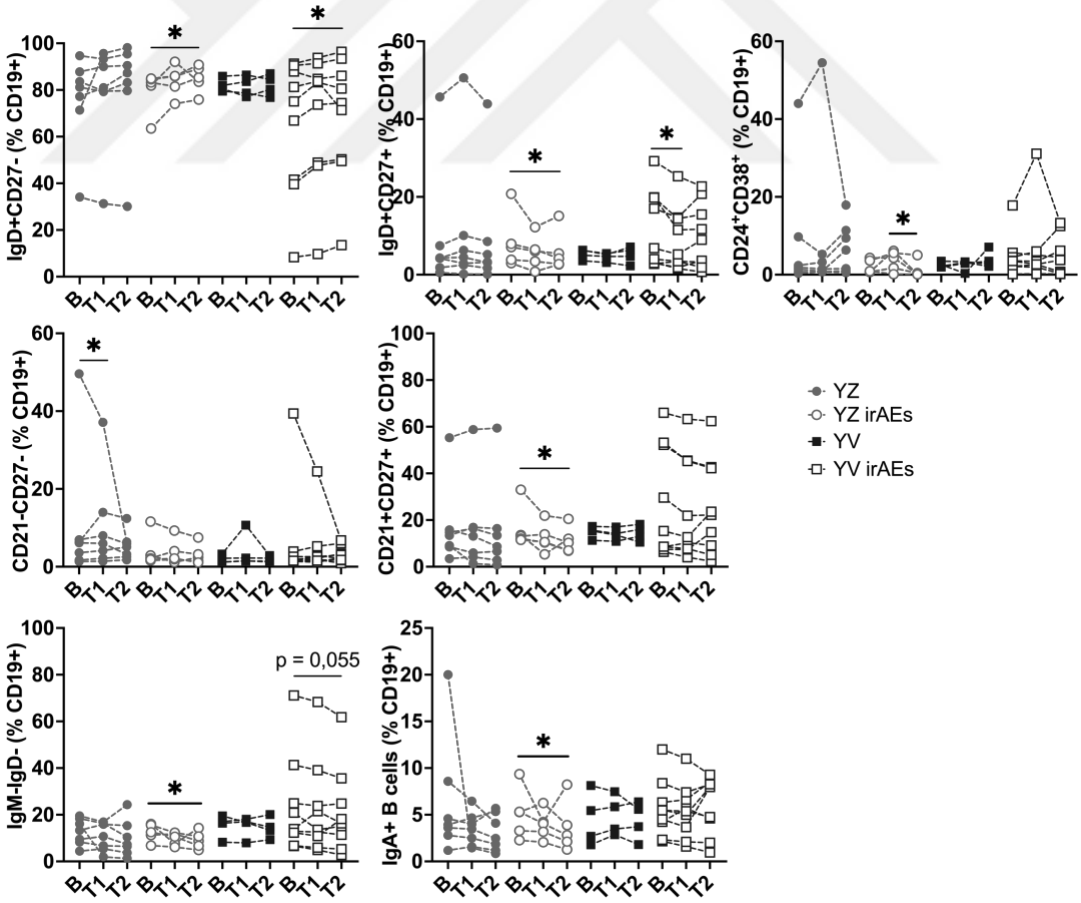
geç vizite anlamlı bir şekilde azalırken, CD21+CD23- naif B hücre popülasyonun arttığı saptandı (Şekil 7). Tedaviye yanıtsız olgularda ise IgG izotipindeki B hücrelerin CD21+ olan popülasyonun tedavi başlangıcından geç vizite, IgA izotipindekilerin ise erken vizite azaldığı, tersine $CD21^{-/dü}$ hücrelerin ise arttığı belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. CD21 ve CD23 ilişkili B hücre frekanslarının tedavi süresinde değişimi. Kontrollerin ve ICI tedavisine yanıt veren ve yanıtsız olguların ICI tedavisi sürecindeki B hücre oranları ve değişimleri gösterilmektedir. Baklava sembolü sağlıklı kontrolleri, daire sembolleri yanıt vermeyen grubu, kare semboller ise yanıt veren grubu temsil etmektedir. Hasta grupları içerisindeki istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: K, kontrol; B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit.

4.2.1.2 ICI tedavi sürecinde B hücre ilişkili belirteçlerin hastalarda irAEs'e göre değerlendirilmesi

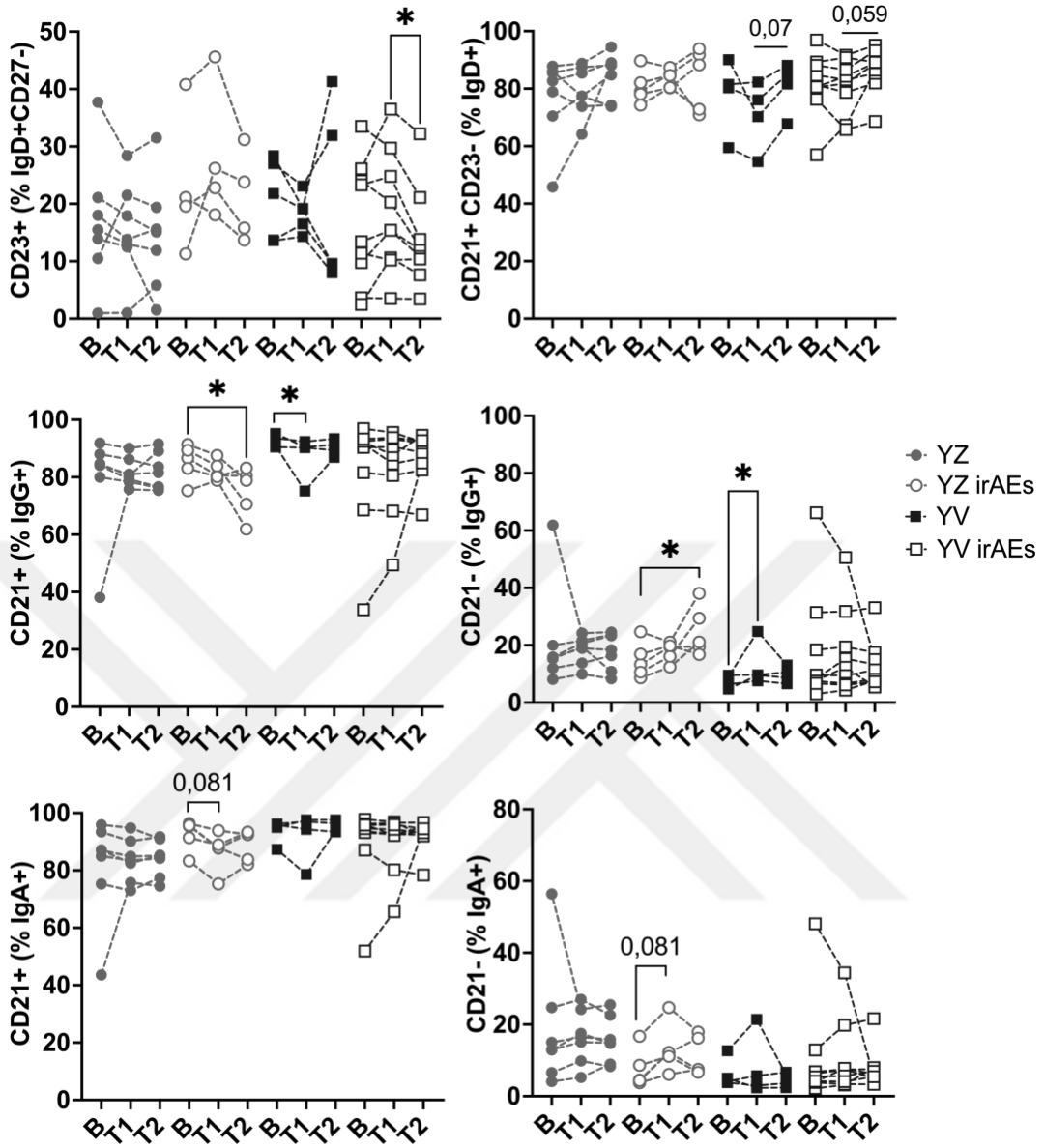
Tedavi sürecinde irAEs geliştiren olgularda naif B hücre popülasyonun frekansının arttığı gözlemlendi (şekil 8). Tedaviye yanıtsız ve toksisite geliştirmeyen grupta ise sadece atipik bellek B hücre (CD21-CD27-) frekanslarının arttığı belirlendi (şekil 8). Tedaviye yanıt vermeyen ve irAEs geliştiren olgularda, dönüşmemiş IgD+CD27+, klasik bellek B hücre, dönüşmüş B hücreler (IgM-IgD-) ve IgA+ B hücre frekanslarının tedavi geç vizitte azaldığı, tranzisyonel B hücrelerin ise erken vizitten geç vizite azaldığı belirlendi (Şekil 8). Tedaviye YV irAEs geliştiren olgularda ise dönüşmemiş CD27+ B hücre frekansında erken vizite anlamlı bir azalma gözlemlenirken, aynı azalma trendi tedavi sürecinde izotip dönüşümü geçirmiş (IgM-IgD-) B hücrelerde de mevcuttu (p=0,055).



Şekil 8. Naif, dönüşmüş ve bellek B hücre frekanslarının tedavi süresince toksisite üzerinden değişimi. ICI tedavisine yanıtsız ve yanıt veren olgular immünoterapi sırasında immün ilişkili toksisite geliştirenler ve geliştirmeyenler olarak gruplandırılıp, ICI tedavisi sürecindeki B hücre frekanslarının değişimleri değerlendirildi. İçi dolu daire ve kareler toksisite

geliştirmeyen, içi boş semboller ise tedavi sürecinde toksisite geliştiren olguları temsil etmektedir. Daireler YZ, kareler ise YV olguları sembolize etmektedir. Hasta grupları içerisindeki istatistiksel anlamlı değişimler $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; irAEs, immün-ilişkili yan etkiler.

YV olgular incelendiğinde, irAEs geliştiren grupta CD23+ naif B hücre frekansında tedavinin erken ve geç vizitleri arasında azaldığı belirlendi (Şekil 9). Aynı olgularda irAEs geliştirmeyen grupta kompleman reseptörü CD21 belirtecindeki değişikliklere bakıldığında, CD21+IgG+ izotipindeki B hücre frekanslarının erken dönemde azalırken, $CD21^{-/dü}$ IgG+ popülasyonun frekansının arttığı gözlemlendi (Şekil 9). Benzer olarak, YZ olgularda irAEs geliştiren hasta grubunda IgG izotipindeki CD21+ popülasyonun tedavinin başlangıcından geç vizite azalırken, $CD21^{-/dü}$ IgG+ B hücre frekanslarının arttığı tespit edildi (Şekil 9). CD21+ ve $CD21^{-/dü}$ IgA izotipindeki aynı tipteki erken vizit değişimleri anlamlı bulunmadı (sırasıyla, $p<0,081$; $p<0,081$). CD21+CD23- naif B hücre popülasyonun YV olgularda irAEs varlığında/yokluğunda erken-geç dönem ekseninde artma eğilimleri ($p<0,059$; $p<0,07$) olduğu belirlendi (Şekil 9).

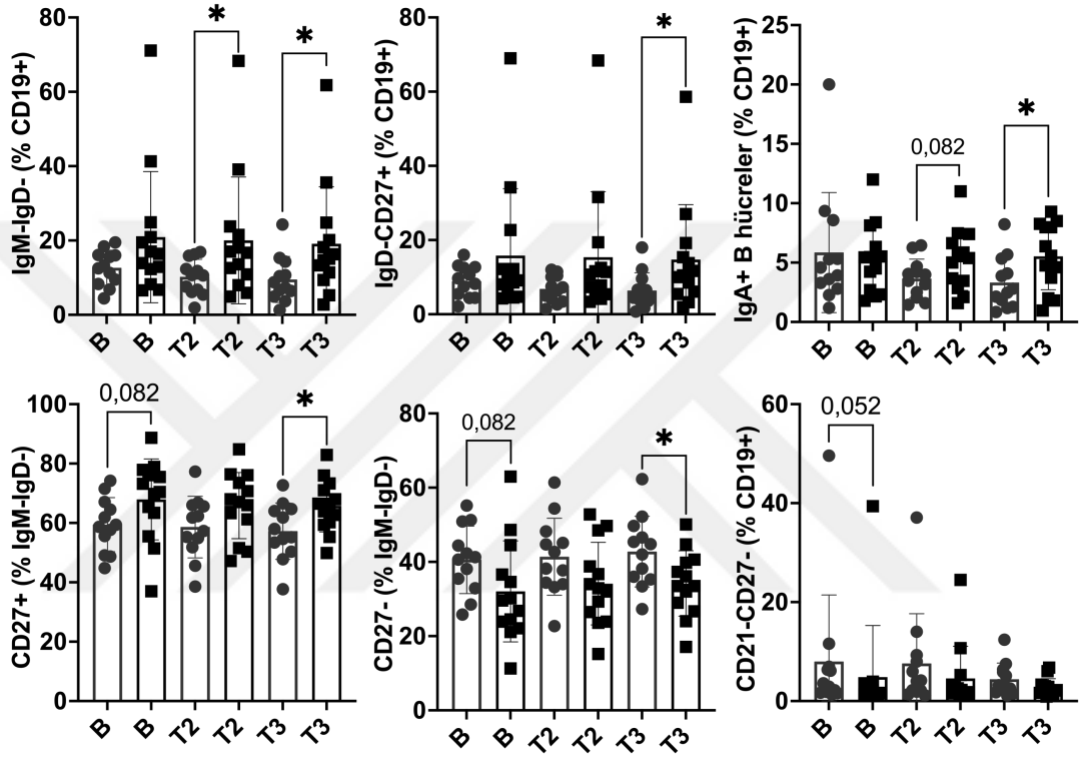


Şekil 9. CD21 ve CD23 ilişkili B hücre frekanslarının tedavi süresince toksisite üzerinden değişimi. ICI tedavisine yanıtsız ve yanıt veren olgular immünoterapi sırasında immün ilişkili toksisite geliştirenler ve geliştirmeyenler olarak gruplandırılıp ICI tedavisi sürecinde B hücre frekanslarının değişimleri değerlendirildi. İçi dolu daire ve kareler toksisite geliştirmeyen, içi boş semboller ise tedavi sürecinde toksisite geliştiren olguları temsil etmektedir. Daireler YZ, kareler ise YV olguları sembolize etmektedir. Hasta grupları içerisindeki istatistiksel anlamlı değişimler 0,01<p<0,05 ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; irAEs, immün-ilişkili yan etkiler.

4.2.1.3 ICI tedavi sürecinde aynı vizitteki B hücre popülasyonlarının değerlendirilmesi

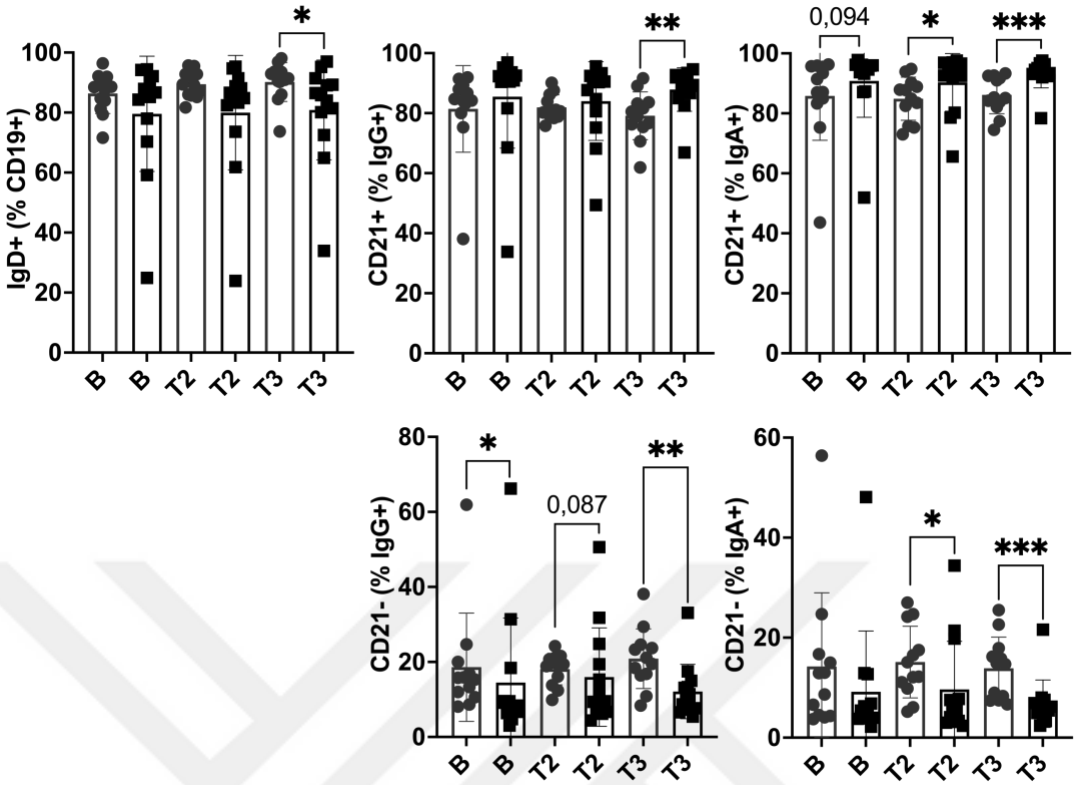
Tedavi başlangıcında hasta grupları arasında anlamlı bir fark saptanmasa da atipik bellek B hücre frekansı (CD21-CD27-) yanıtsız hastalarda yanıt verenlere göre daha yüksek (p=0,052) bulundu (Şekil 10). İlk doz tedaviyi takiben, erken vizitteki farklılıklara bakıldığında, dönüşmüş B hücrelerin yanıt veren olgularda anlamlı

derecede yüksek olduğu, aynı zamanda geç yanıtta da bu popülasyona ilaveten bellek CD19+ B hücrelerin, bellek dönüşmüş B hücrelerin (CD27+IgM-IgD-), IgA+ B hücre popülasyonlarının tedaviye yanıt veren olgularda anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 10). Sadece dönüşmüş bellek olmayan (CD27- IgM-IgD-) B hücre frekansının yanıtsız olgularda yüksek olduğu gözlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Naif, dönüşmüş ve bellek B hücre frekanslarının aynı zaman diliminde hasta grupları arasındaki farkları. Tedavi sürecinde aynı vizitelerdeki B hücre oranları ICI tedavisine yanıt veren ve vermeyen olgular arasında karşılaştırıldı. Saçılım grafikleri standart sapma barları ile birlikte verilmektedir. Daire sembolleri immünoterapiye yanıt vermeyen grubu, kare semboller yanıt veren grubu temsil etmektedir. Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlı değişimler $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit.

Geç vizitte YZ olgularda naif B hücre frekansı YV olgulara kıyasla daha yüksek bulundu (Şekil 11). IgA izotipinde ki B hücrelerin CD21+ popülasyonu tedavinin erken ve geç vizitelerinde YV olgularda daha yüksek iken, $CD21^{-/dü}$ popülasyonu YZ olgularda anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 11). IgG izotipindeki B hücrelere bakıldığında, CD21+ B hücre frekansının YV olgularda tedavinin geç vizitinde daha yüksek, $CD21^{-/dü}$ hücrelerin ise hem tedavi başlangıcında hem de geç vizitte YZ olgulara kıyasla daha düşük frekansta oldukları tespit edildi (Şekil 11).



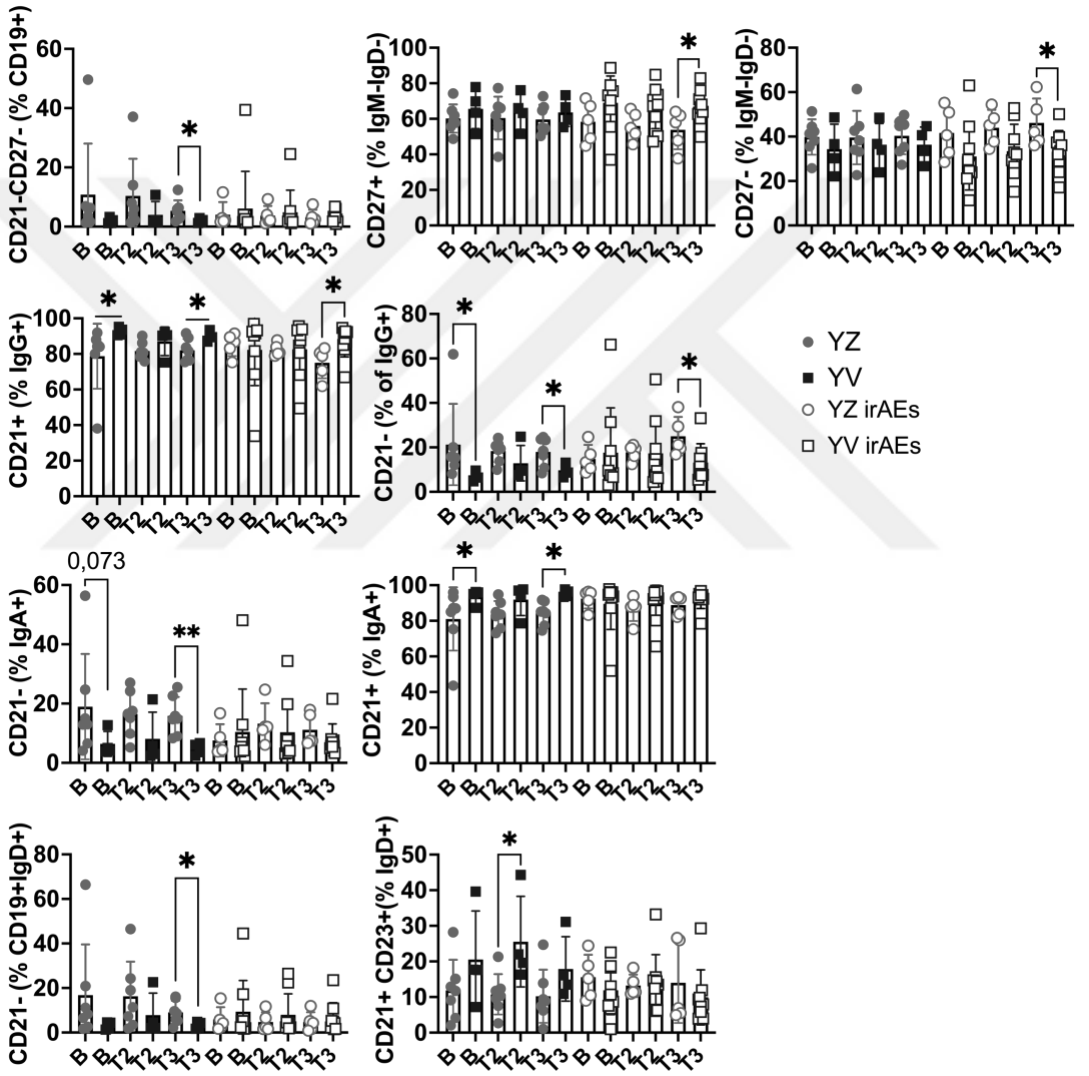
Şekil 11. CD21 ilişkili B hücre frekanslarının aynı zaman dilimlerindeki hasta grupları arasındaki farkları. ICI tedavisine yanıt veren ve vermeyen olguların aynı vizitelerdeki B hücre frekansları, saçılım grafikleri standart sapma barları ile birlikte verilmektedir. Daire sembolleri immünoterapiye yanıt vermeyen grubu, kare semboller yanıt veren grubu temsil etmektedir. Aynı vizitlerde hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlı değişimler $p<0,05$ ise *, $0,001<p<0,01$ ise **, $p<0,001$ ise *** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit.

4.2.1.4 ICI tedavi sürecinde aynı vizitteki B hücre popülasyonlarının irAEs'e göre değerlendirilmesi

Tedavi sürecinde aynı vizitte irAEs geliştiren olgulara bakıldığında, tedavinin geç döneminde dönüşmüş B ve klasik bellek B hücre frekanslarının YV hasta grubunda daha yüksek bulunma eğiliminde olmalarıyla beraber (p=0,08; p=0,089), CD27+ dönüşmüş B hücrelerin YV olgularda anlamlı derecede daha fazla oranda bulundukları, CD27- popülasyonun ise YZ gruba nazaran daha düşük oranda oldukları belirlendi (Şekil 12). Tedavinin aynı basamağında, diğer bir ana B hücre popülasyonu olan atipik bellek B hücreler ise YZ ve irAEs geliştirmeyen grupta, YV gruba nazaran daha yüksek frekanstaydı (Şekil 12).

Tedavi sürecinde irAEs geliştirmeyen olgular aynı vizitte incelendiğinde, IgG izotipindeki B hücrelerin CD21+ popülasyonun tedavi başlangıcında ve geç

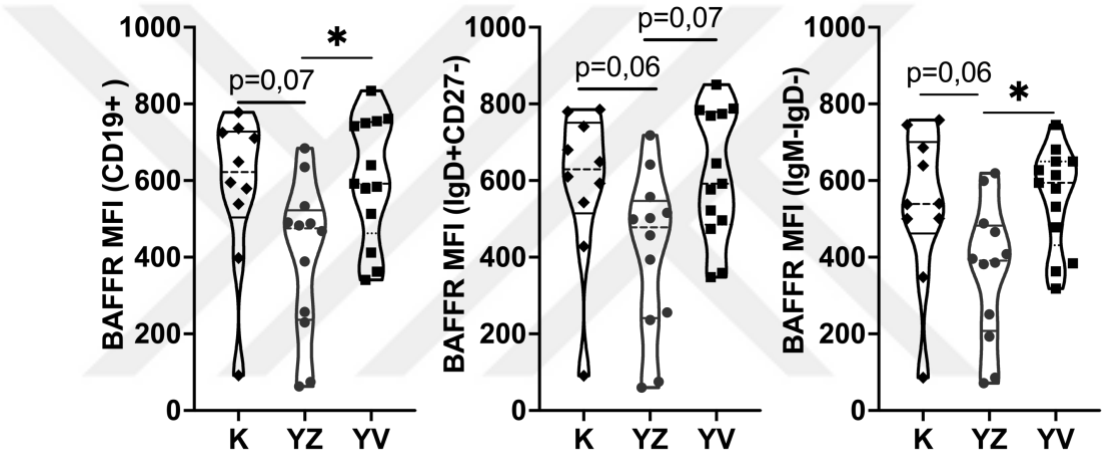
döneminde YV grupta daha yüksek frekansta olduğu, $CD21^{-/dü}$ popülasyonun frekansının ise YZ grupta daha yüksek bulunduğu tespit edildi (Şekil 12). irAEs geliştiren olgularda tedavinin geç döneminde de aynı anlamlı fark bulundu (Şekil 12). IgA+ izotipine bakıldığında, CD21+ popülasyonun irAEs geliştirmeyen olgularda YV'lerde daha yüksek frekansı bulundukları gözlemlenirken, $CD21^{-/dü}$ IgA+ hücre popülasyonunun sadece tedavinin geç döneminde YZ olgularda daha yüksek oranlarda olduğu tespit edildi (Şekil 12).



Şekil 12. B hücre popülasyonlarının aynı zaman dilimlerindeki immün ilişkili toksisite olan ve olmayan yanıta göre farkları. ICI tedavisine yanıtsız ve yanıt veren olgular immünoterapi sırasında immün ilişkili toksisite geliştirenler ve geliştirmeyenler olarak gruplandırılarak, tedavi sürecinde aynı vizitelerdeki B hücre frekansları saçılım grafikleri ile görülmektedir. Barlardaki çubuklar standart sapmaları ifade ederken, daire sembolleri immünoterapiye yanıt vermeyen, kareler yanıt veren olguları temsil etmektedir. İçi dolu daire ve kareler toksisite geliştirmeyen, içi boş daire ve kareler tedavi sürecinde toksisite geliştiren olguları temsil etmektedir. Aynı vizitelerdeki gruplar arası istatistiksel farklar $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; irAEs, immün-ilişkili yan etkiler

4.2.2 Hasta örnekleri ve kontrol grubunda B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçleri açısından değerlendirilmesi

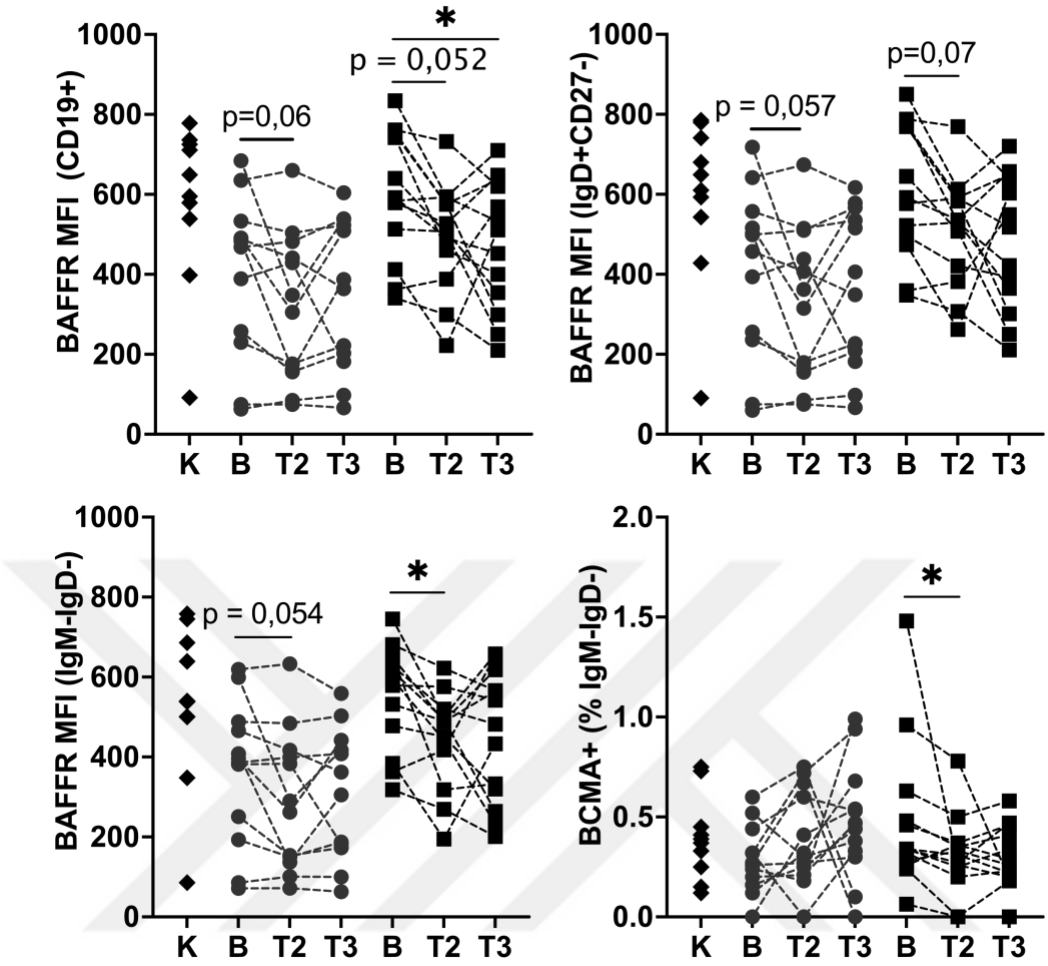
Kontrol grubu ve tedavi başlangıcında hasta grupları BAFF reseptörleri BAFF-R, TACI ve BCMA açısından değerlendirildi. Tedavi başlangıcında BAFF-R ekspresyonunun hem tüm CD19+ B hücre popülasyonunda hem de dönüşmüş B hücrelerde yanıt veren hasta grubunda yanıt vermeyen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla eksprese edildiği saptandı (Şekil 13). Total, naif ve dönüşmüş B hücre popülasyonlarında BCMA ve TACI reseptörleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi.



Şekil 13. Sağlıklı kontroller ve hasta grupları arasında B hücrelerin yüzey BAFF reseptörlerinin karşılaştırılması. Tedavi başlangıcında ki YV ve YZ olgular ile beraber kontrol grubunun total B, naif B ve dönüşmüş B hücre popülasyonlarının BAFF-R MFI değerleri violin grafiği ile gösterilmektedir. Kalın çizgi grup içi medyan değerleri, kesikli çizgiler ise çeyrek değerleri ifade etmektedir. Baklava sembolü sağlıklı kontrolleri, daire sembolleri yanıt vermeyen grubu, kare semboller ise yanıt veren grubu temsil etmektedir. Üç grup arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklar $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: K, kontrol; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; MFI, *mean fluorescence intensity.*

4.2.2.1 ICI tedavi sürecinde tedavi öncesi, erken yanıt ve geç B hücre yanıtlarında yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi

Ana B hücre grupları CD19+, naif B hücre (IgD+CD27-) ve dönüşmüş B hücre popülasyonlarının BAFF-R, TACI, BCMA ifadeleri ve frekansları tedavi sürecinde değerlendirildi.

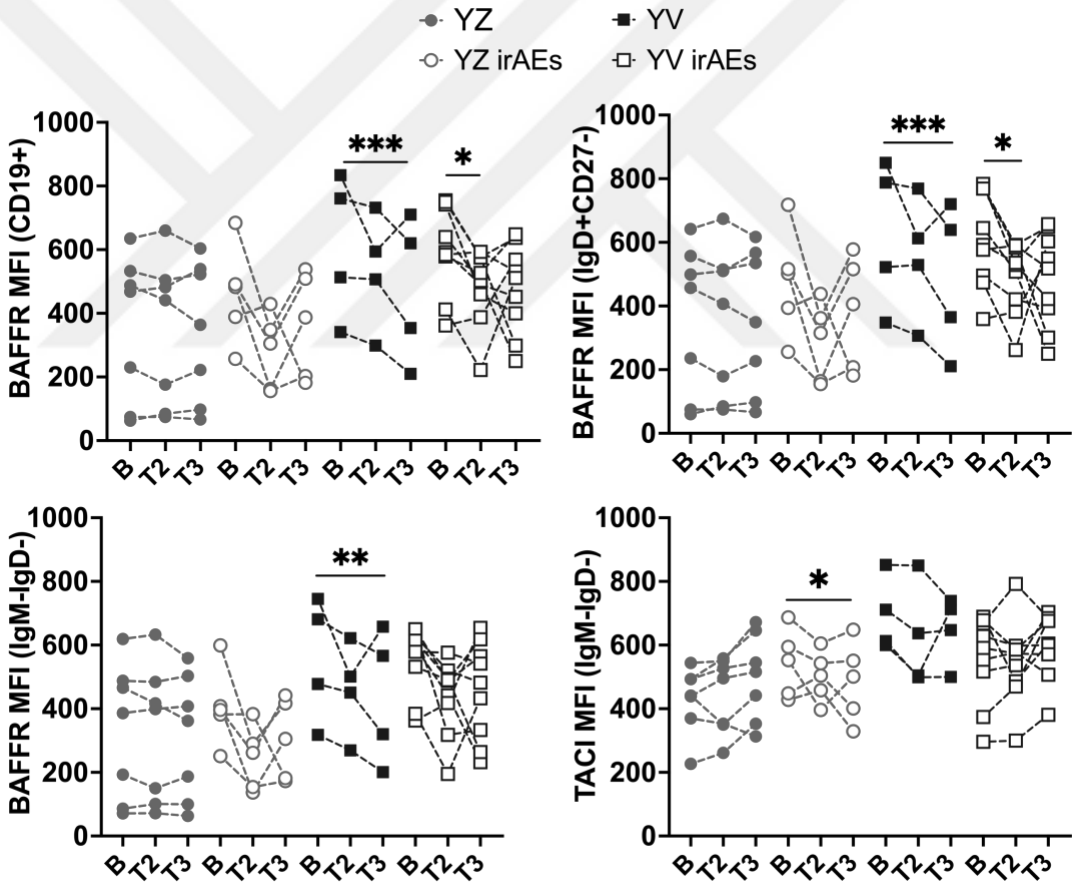


Şekil 14. BAFF reseptörlerinin ICI tedavi sürecindeki değişimi. Kontroller, ICI tedavisine yanıt veren ve yanıtsız olguların ICI tedavisi sürecindeki total B, naif B ve dönüşmüş B hücre yüzeyindeki BAFF-R ekspresyonlarının değişimleri MFI değeri ile, BCMA reseptör değişimleri ise frekans değeri verilerek gösterilmektedir. Baklava sembolü sağlıklı kontrolleri, daire sembolleri yanıt vermeyen, kare semboller ise yanıt veren olguları temsil etmektedir. Yanıt veren ve yanıtsız olguların tedavi sürecindeki reseptör değişimleri istatistiksel olarak anlamlı $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: K, kontrol; B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; MFI, *mean fluorescence intensity.*

ICI tedavisinin ilk doz uygulamasından sonra, YV olgularda dönüşmüş B hücrelerin BAFF-R ekspresyonlarının ve BCMA+ hücre frekansının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, total CD19+ ve naif B hücrelerin BAFF-R ekspresyonlarını azalma eğiliminde (p=0,052; p=0,07) oldukları görüldü (Şekil 14). ICI tedavisi başlangıcından geç vizit tedavi yanıtına bakıldığında ise; CD19+ total B hücre popülasyonunun BAFF-R ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı gözlendi. (Şekil 14). Yanıtsız olgularda ise CD19+, naif B ve dönüşmüş B hücre popülasyonlarında BAFFR ekspresyon seviyelerinin tedavinin erken döneminde azalma eğiliminde olduğu görüldü (p=0,06; p=0,057; p=0,054). TACI reseptör ifadesinde herhangi bir değişim saptanmadı.

4.2.2.2 ICI tedavi sürecinde B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçlerinin hastalarda irAEs'e göre değerlendirilmesi

Hasta grupları kendi aralarında ICI tedavisine immün ilişkili toksisite geliştiren ve geliştirmeyenler olarak gruplandırılıp BAFFR, TACI, BCMA yüzey belirteçlerinin tedavi sürecindeki değişimleri incelendi. YV olguların irAEs geliştirmeyen grupların B hücre yanıtlarına bakıldığında, BAFFR ekspresyonlarının total CD19+, naif ve dönüşmüş B hücrelerde, tedavi başlangıcından geç vizite kadar anlamlı derecede azaldığı gözlendi (Şekil 15).

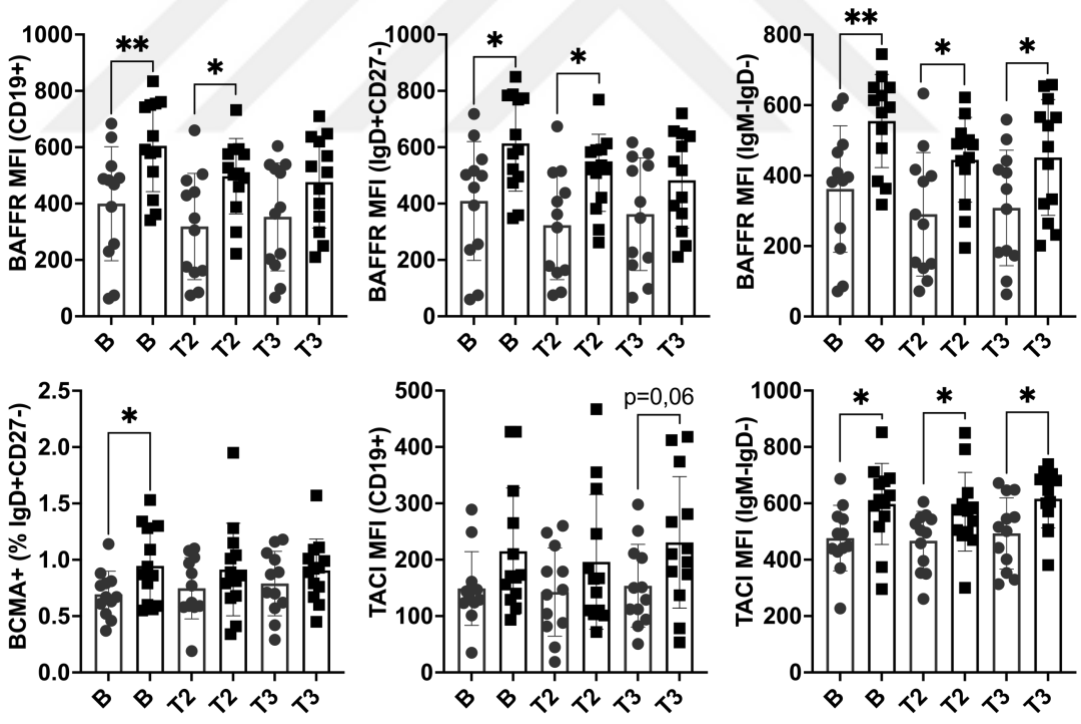


Şekil 15. BAFF reseptör ekspresyonun tedavi süresince toksisite üzerinden değişimi. ICI tedavisine yanıtsız ve yanıt veren olgular immünoterapi sırasında immün ilişkili toksisite geliştirenler ve geliştirmeyenler olarak gruplandırılıp, ICI tedavisi sürecinde total B, naif B ve dönüşmüş B hücre yüzeyindeki BAFF-R ve TACI ekspresyon değişimleri, MFI değerleri ile saçılım grafikleri ve standart sapma barları verilerek gösterilmektedir. Daire sembolleri yanıt vermeyen, kareler yanıt veren olguları temsil etmektedir. İçi dolu daire ve kareler toksisite geliştirmeyen, içi boş daire ve kareler tedavi sürecinde irAEs geliştiren olguları temsil etmektedir. Hasta grupları içerisindeki istatistiksel olarak anlamlı bulunan değişimler $p<0,05$ ise *, $0,001<p<0,01$ ise **, $p<0,001$ ise *** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; irAEs, immün-ilişkili yan etkiler; MFI, *mean fluorescence intensity*.

Aynı dönemde YZ olguların irAEs geliştiren grubunda ise TACI ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı saptandı (şekil 15). YV olguların irAEs geliştiren grubunda erken vizitte, CD19+ ve naif B hücre popülasyonlarının BAFF-R ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlendi (Şekil 15). BCMA reseptöründe üç ana B hücre grubunda da istatistiksel anlamlı bir değişim saptanmadı.

4.2.2.3 ICI tedavi sürecinde aynı vizitteki B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi

ICI tedavi başlangıcı ve erken vizite bakıldığında, CD19+ ve naif B hücrelerde BAFFR ekspresyonu tedaviye YV olgularda, YZ olgulara nazaran anlamlı derecede daha yüksek bulundu (Şekil 16). Dönüşmüş B hücre popülasyonunda BAFFR ve TACI ekspresyonları tüm vizitlerde YV grupta anlamlı derecede daha yüksek tespit edildi (Şekil 16).

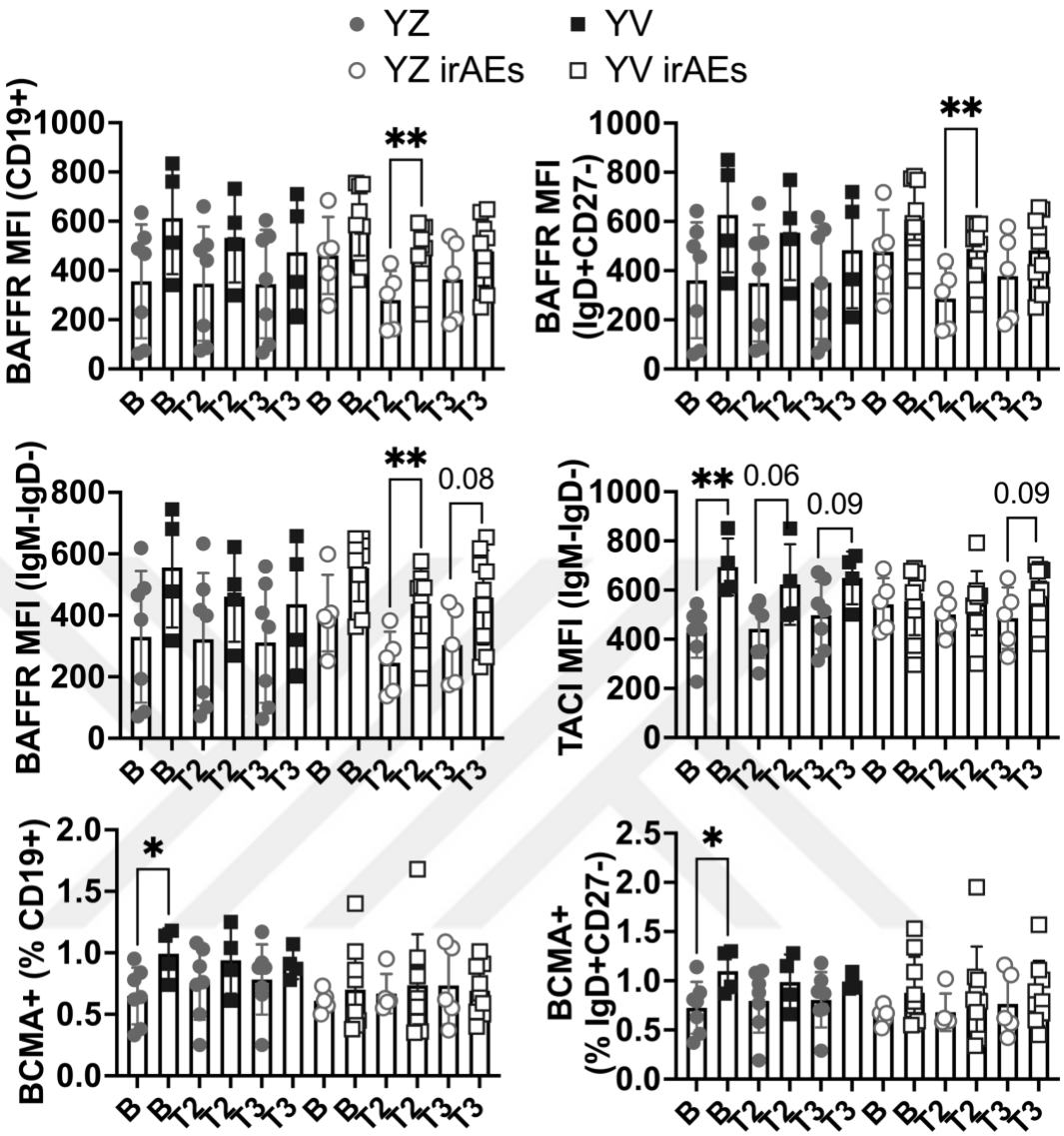


Şekil 16. Yüzey BAFF reseptörlerinin aynı zaman dilimlerindeki hasta grupları arasındaki farkları. Tedavi sürecinde aynı vizitelerdeki total B, naif B ve dönüşmüş B hücre yüzeyindeki BAFF-R ve TACI ekspresyonları MFI değeri, BCMA reseptörü frekans değeri ile saçılım grafikleri ile standart sapma barları verilerek gösterilmektedir. Daire sembolleri immünoterapiye yanıt vermeyen, kare semboller yanıt veren olguları temsil etmektedir. Aynı vizitler arasındaki istatistiksel anlamlı değişimler $p<0,05$ ise *, $0,001<p<0,01$ ise ** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; MFI, *mean fluorescence intensity*.

Total B hücre TACI ekspresyonu anlamlı olmamakla beraber geç vizitte YV olgularda yüksek bulunma eğilimindeydi (p=0,06). Diğer bir BAFF reseptörü BCMA sadece naif B hücrelerinde ve tedavi başlangıcında YV olgularda anlamlı derece daha yüksek frekanslarda olduğu görüldü (Şekil 16).

4.2.2.4 ICI tedavi sürecinde aynı vizitte ki B hücre popülasyonlarının yüzey belirteçlerinin irAEs'e göre değerlendirilmesi

ICI tedavisi sürecinde irAEs geliştirmiş ve YV olgularda, BAFFR ekspresyonunun 3 ana B hücre popülasyonunda erken vizitte anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 17). Tedavi süresinde irAEs geliştirmemiş olgulara bakıldığı zaman, total BCMA+ B hücre ve BCMA+ naif B hücre frekanslarıyla beraber, dönüşmüş B hücre yüzey TACI ekspresyonunun tedavi başlangıcında YV olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 17).

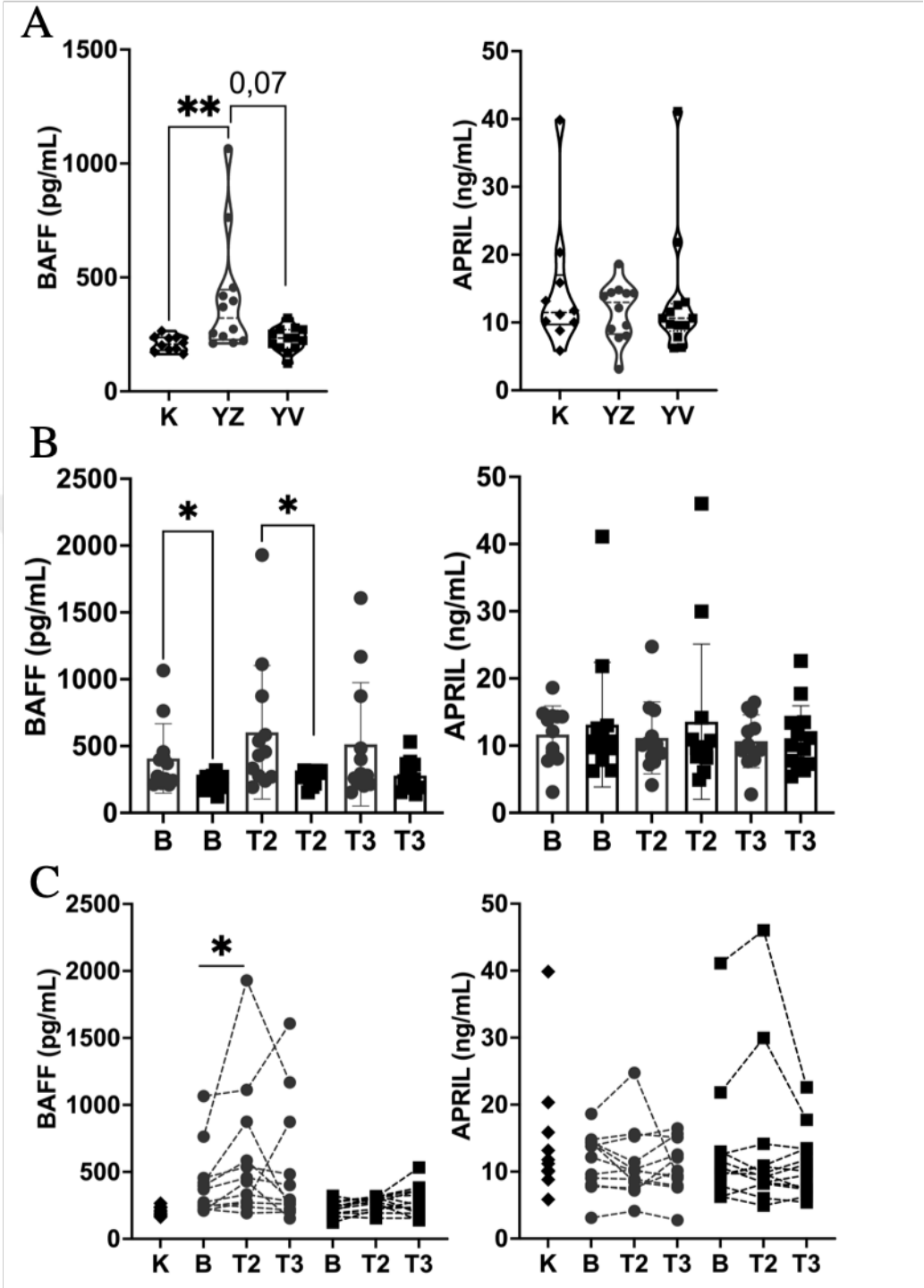


Şekil 17. Yüzey BAFF reseptörlerinin aynı zaman dilimlerindeki immün ilişkili toksisite olan ve olmayan yanıta göre farkları. ICI tedavisine yanıtsız ve yanıt veren olgular immünoterapi sırasında immün ilişkili toksisite geliştirenler ve geliştirmeyenler olarak gruplandırılarak, tedavi sürecinde aynı vizitelerdeki total B, naif B ve dönüşmüş B hücre yüzeyindeki BAFF-R ve TACI ekspresyonları MFI değeri, BCMA reseptörü frekans değeri saçılım grafikleri ile standart sapma barları verilerek gösterilmektedir. Daire yanıt vermeyen, kareler yanıt veren olguları temsil etmektedir. İçi dolu daire ve kareler toksisite geliştirmeyen, içi boş daire ve kareler tedavi sürecinde toksisite geliştiren olguları temsil etmektedir. Aynı vizitelerdeki gruplar arası istatistiksel farklar $0,01<p<0,05$ ise * olarak gösterilmektedir Kısaltmalar: B, başlangıç; K, kontrol; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; irAEs, immün-ilişkili yan etkiler; MFI, *mean fluorescence intensity*.

4.3 Serum BAFF ve APRIL protein konsantrasyonlarının değerlendirilmesi

4.3.1 Hasta örneklerinin, ICI tedavi sürecinde ve tedavi öncesinde kontrol grubu ile değerlendirilmeleri

Serumdaki BAFF seviyelerinin ortanca değeri kontrol grubunda 207,7 (min-max:163,5-265,0); tedavi başlangıcında YZ olgularda 321,8 (min-max: 210,4-1066); YV olgularda 227,8 (min-max:121,6-320,6) pg/mL olarak ölçüldü. Tedaviye yanıtsız olgularda sağlıklı kontrol grubuna nazaran BAFF seviyeleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 18. A). Tedavi sırasında ise serum BAFF seviyeleri, YZ olgularda başlangıçta ve erken vizitte YV olgulara nazaran anlamlı derecede daha yüksek gözlendi (Şekil 18. B). Tedavi sürecinde YZ olgularda erken vizite (Ortanca: 443,0; min-max:191,7-1930) BAFF seviyelerinin anlamlı derecede serumda arttığı gözlendi (Şekil 18. C). Tablo 14'te BAFF serum seviyelerinin sağlıklı kontroller ve MM'li olguların erken ve geç dönem vizitleri arasındaki istatistiksel farkları yer almaktadır.



Şekil 18. Serum BAFF ve APRIL proteinlerinin olgular ve kontrollerde değerlendirilmesi. A. Tedavi başlangıcında YV ve YZ olgular ile beraber kontrol grubunun serum BAFF ve APRIL konsantrasyonları violin grafiği ile gösterilmektedir. **B.** Tedavi sürecinde aynı vizitlerde ölçülen BAFF ve APRIL konsantrasyonları saçılım grafikleri ile beraber standart sapma barları verilerek gösterilmektedir. **C.** Kontrol grubu, ICI tedavisine YV ve YZ olguların tedavi sürecindeki değişimleri verilmektedir. Karo semboller sağlıklı kontrolleri, daire sembolleri immünoterapiye YZ, kare semboller YV olguları temsil etmektedir. İstatistiksel farklar $p<0,05$ ise *, $0,001<p<0,01$ ise ** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; K, kontrol; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YV, yanıt veren; YZ, yanıtsız.

Serumdaki APRIL seviyelerinin ortanca değeri kontrol grubunda 11,47 (min-max: 5,84-39,85) YZ olgularda 12,97 (min-max:3,10-18,61); YV olgularda 10,63 (min-max: 6,24-41,11) ng/mL ölçüldü. Şekil 18'de görüldüğü gibi, olgular ve kontroller arasında tedavi başlangıcında anlamlı bir fark saptanmadı. Tedavi sürecinde de hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 14. Serum BAFF seviyelerinin tüm gruplardaki dağılımı ve betimleyici istatistikleri. Sağlıklı kontroller ile sırasıyla tedaviye yanıtsız ve yanıt veren hasta grupları BAFF serum seviyeleri açısından t-testler aracılığıyla değerlendirildi. İstatistiksel farklar p<0,05 ise *, 0,001<p<0,01 ise **, p<0,001 ise *** olarak gösterilmektedir.

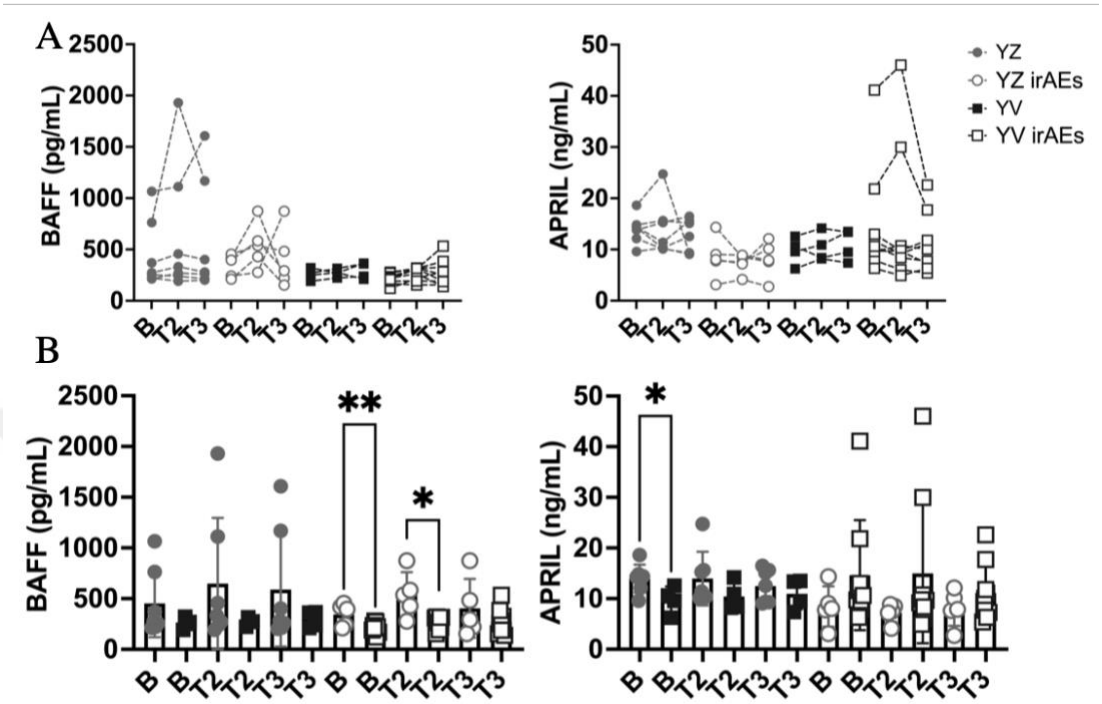
ICI tedavisi		Sağlıklı pg/mL	Yanıtsız pg/mL	Yanıt veren pg/mL
Başlangıç	Ortalama (mean)	209,4	407,2	227,8
	Ortanca (median)	207,7	321,8	233,4
	Min-Max	163,5-265,0	210,4-1066	121,6-320,6
	P değeri		0,0020	0,3470
Erken vizit	Ortalama (mean)		603,1	268,5
	Ortanca (median)		443,0	274,4
	Min-Max		191,7-1930	153,9-319,4
	P değeri		0,0001***	0,0099**
Geç vizit	Ortalama (mean)		513,2	278,9
	Ortanca (median)		286,9	252,1
	Min-Max		153,4-1608	138,4-532,3
	P değeri		0,0206*	0,0512

4.3.2 ICI tedavisi sürecinde serum proteinlerinin hastalarda irAEs'e göre değerlendirilmesi

ICI tedavisinin başlangıcında irAEs geliştiren olgulara bakıldığında, serum BAFF proteinin YZ grupta ortanca değeri 397,0 pg/mL (min-max: 210,4-455,3), YV grupta ise ortanca değer 222,0 pg/mL (min-max:121,6-278,4) olarak ölçüldü ve iki grubun BAFF seviyeleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olduğu saptandı. (Şekil 19. B). Tedavinin erken vizitinde de YZ grubun (ortanca 538; min-max: 277,2-873,9 pg/mL) YV gruba (ortanca 309,1; min-max: 153,9-309,1 pg/mL) göre BAFF seviyeleri anlamlı derecede yüksek ölçüldü (Şekil 19. B).

Serum APRIL seviyeleri irAEs geliştirmeyen olgularda, tedavi başlangıcında YZ grupta (ortanca 14,31; min-max: 9,58-18,61 ng/mL) YV gruptan (ortanca 10,11;

min-max: 6,24-12,57 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 19. B).



Şekil 19. Serum BAFF ve APRIL proteinlerinin toksisite üzerinden değişimi. ICI tedavisine yanıtsız ve yanıt veren olgular immünoterapi sırasında immün ilişkili toksisite geliştirenler ve geliştirmeyenler olarak gruplandırıldı. A. Hasta gruplarının ICI tedavisi sürecinde BAFF ve APRIL konsantrasyon değişimleri gösterilmektedir. B. Tedavi sürecinde aynı vizitlerde ölçülen BAFF ve APRIL konsantrasyonlarının saçılım grafikleri ile beraber standart sapma barları verilerek gösterilmektedir. Daireler yanıt vermeyen, kareler yanıt veren olguları temsil etmektedir. İçi dolu daire ve kareler toksisite geliştirmeyen, içi boş daire ve kareler tedavi sürecinde toksisite geliştiren olguları temsil etmektedir. İstatiksel fark $0,01<p<0,05$ ise *, $0,001<p<0,01$ ise ** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: B, başlangıç; T2, erken vizit; T3, geç vizit; YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; irAEs, immün-ilişkili yan etkiler.

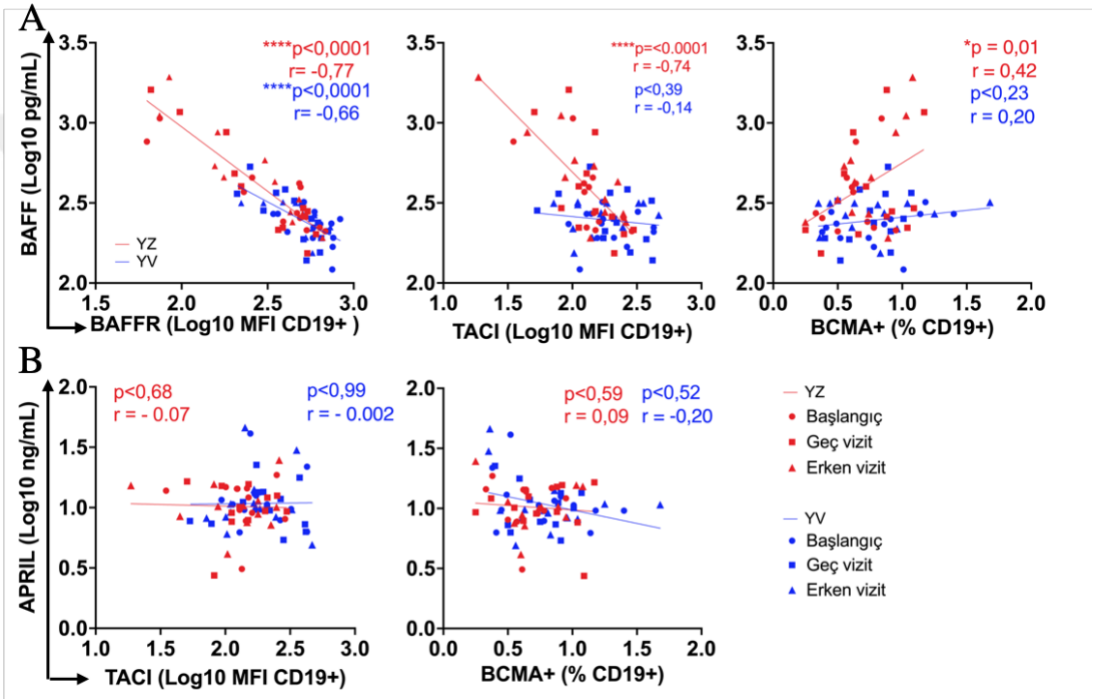
4.4 Serum proteinleri ve B hücre popülasyonları arasındaki ilişki

Değişkenler arasındaki ilişkinin anlamlı olup olmadığı Pearson's ve Spearman korelasyon testleri ile değerlendirildi.

4.4.1 APRIL ve BAFF proteinleri ve B hücre yüzey belirteçleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Öncelikle, iki ana hasta grubunda ölçülen bütün değerler alınarak, hasta gruplarının tedavi sürecindeki serum proteinleri ve BAFF reseptörleri ile olan ilişkisi

incelendi. BAFF serum protein seviyelerinin reseptörleriyle olan ilişkisi incelendiğinde, BAFF-R ekspresyonu ile YZ ve YV hastalarda güçlü ve orta şiddetli (sırasıyla) negatif bir ilişki içerisinde olduğu saptanırken, sadece YZ hastalarda TACI ve BCMA+ B hücre frekansı ile BAFF serum konsantrasyonu arasında sırasıyla güçlü-negatif ve orta şiddetli-pozitif anlamlı bir ilişki tespit edildi (Şekil 20. A). Serum APRIL protein seviyeleri ile reseptörleri (TACI, BCMA) arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Şekil 20. B).



Şekil 20. BAFF reseptörleri ile BAFF ve APRIL proteinleri arasındaki ilişki. A. Serum BAFF konsantrasyonu ile BAFF reseptörleri BAFF-R, TACI MFI değerleri ve BCMA+ B hücre oranları arasındaki ilişki analizi. **B.** Serum APRIL konsantrasyonu ile reseptörleri TACI'nin total B hücre üzerindeki MFI değeri ve BCMA+ total B hücre oranları arasındaki ilişki analizi. Kırmızı renk yanıt vermeyen grubu, mavi renk ise yanıt veren grubu temsil etmektedir. Semboller üç ayrı viziti temsil etmektedir: daire, tedavi başlangıcı; kare, erken dönem; üçgen, geç dönem. Verilerin logaritmik dönüşümlerini takiben uygulanan Pearson's korelasyonu ile değerlendirilen istatiksel farklar, basit lineer regresyon doğrusu ile birlikte, korelasyon katsayısı (r) ile beraber 0,01<p<0,05 ise *, 0,001<p<0,01 ise **, p<0,001 ise *** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren; MFI, *mean fluorescence intensity*.

Tedavi sürecindeki tespit edilen anlamlı ilişkileri takiben, hasta gruplarının tedavinin farklı zaman dilimlerinde serum proteinleri ve B hücre yüzeyindeki reseptörleri ile olan ilişkisi incelendi (Tablo 15). YZ olgularda, B hücre BAFF-R ve TACI ekspresyonlarının tedavinin her vizitinde serum BAFF seviyeleri ile negatif bir ilişkide olduğu, BCMA+ B hücre frekansıyla sadece tedavinin erken vizitinde pozitif bir ilişki içerisinde olduğu tespit edildi.

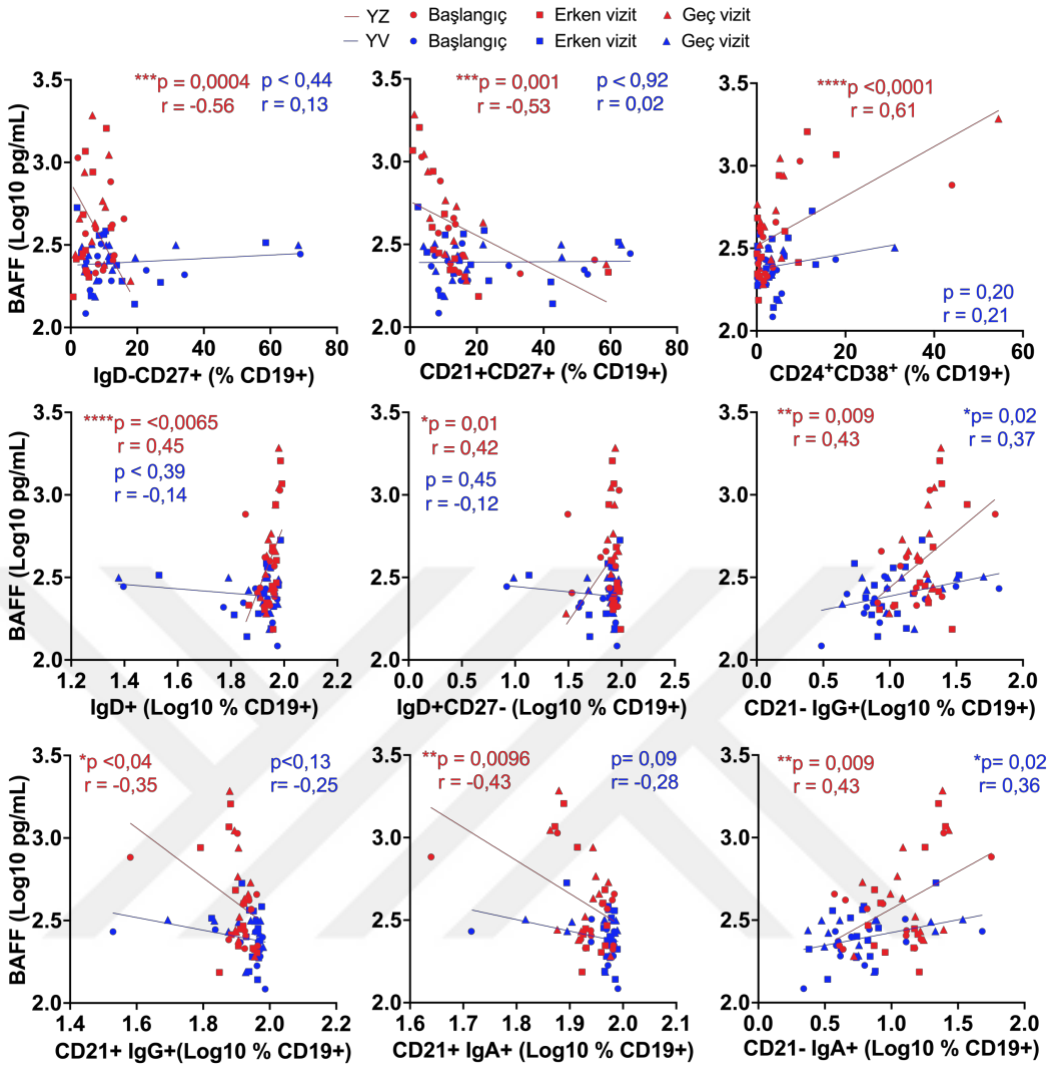
Tablo 15. Tedavinin farklı vizitlerinde BAFF reseptörlerinin serumdaki ligandları ile olan ilişkileri. Bu tabloda ilk kolonda belirtilen B hücre yüzey belirteçlerinin MFI ve oranları ile gerçekleştirilen korelasyon analizleri, p değeri ve korelasyon katsayısı (r) sonuçları ile birlikte verilmektedir. İstatiksel farklar, anlamlı ise kalın yazı stili ve yıldız ile gösterilmektedir.

Korelasyon		**Başlangıç**		**Erken Vizit**		**Geç Vizit**	
BAFF pg/mL	Sağlıklı Kontrol	Yanıtsız	Yanıt veren	Yanıtsız	Yanıt veren	Yanıtsız	Yanıt veren
BAFFR MFI CD19+	p = 0,97 r = 0,02	**p = 0,0025* r = - 0,80**	p = 0,15 r = -0,43	**p<0,0001* r = - 0,92**	**p =0,006* r = -0,73**	**p =0,001* r = - 0,84**	**p =0,007* r = -0,76**
TACI MFI CD19+	p =0,73 r = - 0,13	**p = 0,01* r = - 0,71**	p =0,88 r = 0,05	**p =0,0003* r = - 0,86**	p = 0,47 r = 0,22	**p = 0,02 * r = - 0,66**	p =0,15 r = - 0,42
BCMA+ CD19+	p = 0,66 r = - 0,16	p = 0,58 r = 0,18	p = 0,51 r = 0,20	**p = 0,03* r = 0,64**	p = 0,74 r = 0,10	p = 0,26 r = 0,36	p = 0,25 r = 0,34
APRIL ng/mL		Yanıtsız	Yanıt veren	Yanıtsız	Yanıt veren	Yanıtsız	Yanıt veren
TACI MFI CD19+	p = 0,61 r = -0,22	p = 0,49 r = -0,22	p = 0,87 r = -0,05	p = 0,92 r = -0,04	p = 0,52 r = 0,20	p = 0,86 r = 0,06	p = 0,36 r = -0,28
BCMA+ CD19+	p =0,17 r = 0,48	p = 0,93 r = -0,03	p = 0,20 r = -0,38	p = 0,60 r = 0,17	p =0,27 r = -0,33	p =0,83 r = 0,07	p =0,56 r = -0,18

4.4.2 BAFF protein seviyeleri ve B hücre popülasyonları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Öncelikle, iki ana hasta grubunda ölçülen bütün değerler alınarak, hasta gruplarının tedavi sürecindeki serum BAFF protein seviyeleri ve B hücre popülasyonlarının frekansları ile olan ilişkileri incelendi.

Tedaviye yanıt vermeyen olgulara bakıldığında, serum BAFF seviyelerinin, bellek (IgD-CD27+) ve klasik bellek (CD21+CD27+) B hücre popülasyonları ile orta şiddette negatif anlamlı bir ilişki (p=0,0004, r=-0,56; p = 0,001, r=-0,53) içerisinde olduğu saptandı (Şekil 21). Aksine, tranzisyonel B hücrelerin, naif IgD+ ve IgD+CD27- B hücrelerin orta şiddette pozitif anlamlı ilişkide (p<0,0001, r=0,61; p=0,0065, r=0,45; p=0,01, r=0,42) oldukları tespit edildi (Şekil 21).



Şekil 21. B hücre popülasyonları ile BAFF protein seviyeleri arasındaki ilişki. Serum BAFF konsantrasyonu ile B hücre alt gruplarının frekansları arasındaki ilişki analizi korelasyon grafiklerinde gösterilmektedir. Kırmızı renk yanıt vermeyen grubu, mavi renk ise yanıt veren grubu temsil etmektedir. Semboller viziti temsil etmektedir: daire, tedavi başlangıcı; kare, erken dönem; üçgen, geç dönem. Verilerin logaritmik dönüşümlerini takiben uygulanan Pearson's korelasyonu ile değerlendirilen istatiksel farklar, r değerleri ile beraber 0,01<p<0,05 ise *, 0,001<p<0,01 ise **, p<0,001 ise *** olarak gösterilmektedir. Kısaltmalar: YZ, yanıtsız; YV, yanıt veren.

IgG ve IgA izotipindeki $CD21^{-/dü}$ B hücrelerin, ICI tedavisine yanıt vermeyen hasta grubunda BAFF seviyeleri ile pozitif orta şiddetli (p=0,009, r=0,43; p=0,009, r=0,43), yanıt verenlerde ise zayıf pozitif yönlü ilişkileri (p=0,02, r=0,37; p=0,02, r=0,36) tespit edildi (Şekil 21). Sadece yanıtsız olgularda CD21+ popülasyonun IgG izotipindeki B hücrelerde zayıf negatif yönlü bir ilişki (p<0,04, r=-0,35), IgA+ izotipindekilerin BAFF seviyeleri ile orta şiddetli negatif ilişkisi (p=0,0096, r=-0,43) olduğu tespit edildi (Şekil 21). İlaveten, diğer B hücre popülasyonlarının BAFF seviyeleri ile olan korelasyon analizi sonuçları ise tablo 16'da verilmektedir.

Tablo 16. Tedavi sürecinde serum BAFF seviyeleri ve B hücre popülasyonları arasındaki ilişki. Tabloda ilk kolonda belirtilen B hücre popülasyonlarının, frekansları ile gerçekleştirilen korelasyon analizleri, p değeri ve korelasyon katsayısı (r) sonuçları ile birlikte verilmektedir. İstatiksel farklar, anlamlı ise kalın yazı stili ve yıldız ile gösterilmektedir.

KORELASYON	**Çalışma grupları**		
BAFF pg/mL	Sağlıklı Kontrol	Yanıtsız	Yanıt veren
CD21+ IgD+ (Log10 % CD19+)	p = 0,31 r = -0,37	p = 0,12 r = -0,27	p = 0,40 r = -0,24
CD21-/dü IgD+ (Log10 % CD19+)	p = 0,30 r = 0,37	p = 0,14 r = 0,25	p = 0,12 r = 0,26
CD27+CD38yüCD24yü (CD19+)	p < 0,94 r = 0,03	**p = 0,04*** **r = -0,35**	p = 0,14 r = 0,14

Tedavi sürecinde tespit edilen anlamlı ilişkileri takiben, hasta gruplarının tedavinin farklı zaman dilimlerinde serum BAFF seviyesi ve B hücre popülasyonları ile olan ilişkisi incelendi (Tablo 17).

ICI tedavisine yanıtsız olgular incelendiğinde, BAFF serum seviyeleri ile tranzisyonel hücre oranları arasında tedavinin 3 döneminde de pozitif ilişki saptandı (p=0,04, r=0,60; p=0,01, r=0,69; p=0,007, r=0,73).

Tablo 17. Tedavinin farklı vizitlerinde serum BAFF seviyesinin B hücre popülasyonları ile olan ilişkileri. Bu tabloda ilk kolonda belirtilen B hücre popülasyonlarının frekansları ve BAFF konsantrasyonları arasındaki korelasyon analizleri sonuçları, p değeri ve korelasyon katsayısı (r) ile birlikte verilmektedir. İstatiksel farklar, anlamlı ise kalın yazı stili ve yıldız ile gösterilmektedir.

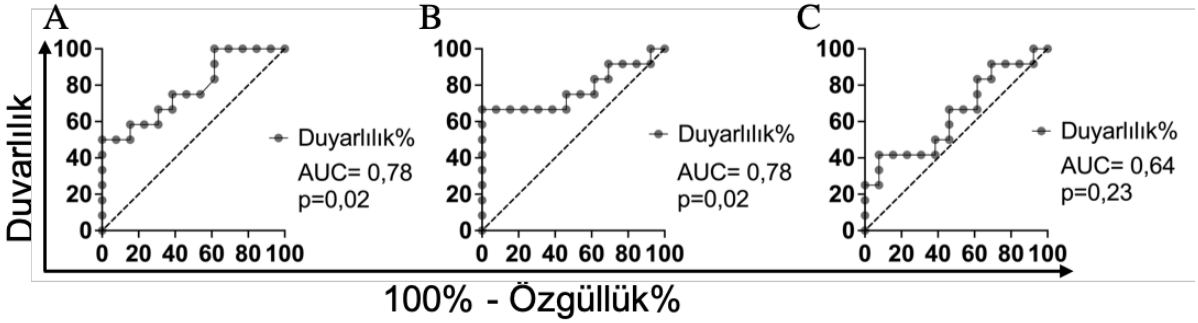
KORELASYON	**Başlangıç**		**Erken Vizit**		**Geç Vizit**	
BAFF pg/mL	Yanıtsız	Yanıt veren	Yanıtsız	Yanıt veren	Yanıtsız	Yanıt veren
IgD-CD27+ (% CD19+)	p = 0,72 r = - 0,12	p = 0,36 r = 0,28	p = 0,70 r = - 0,13	p = 0,27 r = 0,33	p = 0,07 r = 0,54	p = 0,78 r = -0,09
CD21+CD27+ (% CD19+)	p = 0,10 r = - 0,49	P =0,48 r = 0,22	p= 0,052 r = - 0,57	p =0,28 r = 0,33	P =0,08 r = - 0,52	p= 0,35 r = - 0,28
CD24+CD38+ (% CD19+)	**p = 0,04*** **r = 0,60**	p =0,74 r = 0,10	**p = 0,01*** **r = 0,69**	p = 0,56 r = 0,18	**p = 0,007*** **r = 0,73**	p = 0,23 r = 0,36
IgD+ (Log10 % CD19+)	p = 0,98 r = 0,009	p = 0,31 r = -0,31	**p = 0,006*** **r = 0,74**	p = 0,30 r = -0,31	**p = 0,03*** **r = 0,62**	p =0,82 r = 0,07
IgD+CD27- (Log10 %CD19+)	p = 0,53 r = -0,20	p = 0,34 r = -0,29	p = 0,23 r = 0,37	p =0,30 r = -0,31	p = 0,07 r = -0,54	p = 0,81 r = 0,07
CD21-/dü IgG+ (Log10% CD19+)	p = 0,12 r = 0,48	**p = 0,046*** **r = 0,56**	p = 0,13 r = 0,47	p = 0,31 r = 0,30	p = 0,13 r = 0,47	p = 0,37 r = 0,27
CD21+IgG+ (Log10% CD19+)	p = 0,11 r = -0,49	p = 0,23 r = -0,36	p = 0,1 r = -0,50	p =0,25 r = -0,34	p = 0,15 r = -0,45	p = 0,33 r = -0,29
CD21+IgA+ (Log10% CD19+)	p = 0,057 r = -0,56	p =0,26 r = -0,34	p = 0,20 r = -0,40	p = 0,33 r = -0,30	**p = 0,03*** **r = -0,64**	p =0,06 r = -0,53
CD21-/dü IgA+ (Log10% CD19+)	p = 0,13 r = 0,46	p = 0,053 r = 0,55	p = 0,24 r = 0,37	p = 0,52 r = 0,20	p = 0,09 r = 0,52	p = 0,10 r = 0,47

Tedavi başlangıcında YV olguların $CD21^{-/dü}$ IgG+ B hücreleri ve serum BAFF seviyeleri arasında orta şiddetli pozitif yönlü ilişki (p=0,046, r=0,56) saptandı. İlaveten, YZ olgularda CD21+ IgA izotipindeki B hücreler ve BAFF seviyeleri

arasında tedavi başlangıcında istatiksel olarak anlamsız, geç vizitte orta şiddetli anlamlı negatif yönlü bir ilişki (sırasıyla; p= 0,057, r=-0,56; p=0,03, r=-0,64) saptandı.

4.5 Serum proteini BAFF'ın ROC analizi ile değerlendirilmesi

Teşhis testi tarafından doğru tespit edilen hastaların yüzdesi duyarlılık, test tarafından doğru tespit edilen sağlıklı kişilerin yüzdesi seçicilik kavramlarıdır. Bu çalışmanın amaçlarından biri olan ICI tedavisine yanıt verecek metastatik melanoma hastalarının tedaviye başlanmadan veya tedavinin erken döneminde belirlenebilmesini sağlayabilecek biyo-belirteç veya B hücre alt grubu saptayabilmektir. Bu bağlamda serum BAFF seviyelerinin metastatik melanoma hastalarının ICI tedavi yanıtını tahmin etmedeki başarısı ROC analizi ile değerlendirildi. Şekil 22'de tedaviye YV olguların kontrol olarak kullanıldığı, YZ olguların ise hasta grubu olarak değerlendirmeye alındığı ROC eğri grafikleri gösterilmektedir. Tedaviye olası yanıtı ön görebilmesi açısından BAFF değerinin duyarlılığı ve özgüllüğü ROC analizi ile değerlendirildi. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC, *area under curve*) tedavi başlangıcında 0,78 (0,60-0,96), ilk ICI uygulanmasını takiben 0,78(0,57-0,98) olarak gözlendi ve yanıt vermeyen olguları tahmin etmede başarılı bulundu (sırasıyla, p=0,02; p=0,02) Tablo 18'de tedavinin tüm dönemlerindeki (başlangıç, erken vizit, geç vizit) ROC analiz sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 22. BAFF biyo-belirtecine ait ROC eğrileri. A. Tedavi başlangıcı. **B.** Tedavinin erken dönemi. **C.** Tedavinin geç dönemi

Tedavi başlangıcı ve erken dönemde AUC değerleri (0,78) aynı iken, tedavinin geç döneminde azalarak 0,64 olarak belirlendi.

Tablo 18. Melanoma olguları ve sağlıklı kontrollerden elde edilen ROC eğrileri ve AUC, standart hata ve %95 güven aralıkları.

Sağlıklı Kontrol – Hasta	AUC	Standart Hata	%95 Güven aralığı	P değeri
Başlangıç	0,75	0,08	0,59-0,92	0,021
Erken dönem	0,88	0,06	0,76-0,99	0,0006
Geç dönem	0,74	0,08	0,58-0,90	0,027
Yanıt veren (kontrol) – Yanıtsız				
Başlangıç	0,778	0,09	0,60-0,96	0,018
Erken dönem	0,776	0,10	0,57-0,98	0,019
Geç dönem	0,64	0,11	0,42-0,86	0,231

Şekil 22'de gösterilen grafiklerde, yanıt veren olguların kontrol olarak kullanıldığı testte, yanıtsız olguları tespit etmede belirlenen tanısal kesim noktalarının ayrı ayrı incelendiği ROC analizi sonuçları tablo 19'da verilmektedir.

Tablo 19. MM olgularının ROC eğrisine ait duyarlılık ve özgüllük sonuçları

BAFF kesim değeri (cut-off) pg/mL	Duyarlılık %	Özgüllük %	Güven aralığı %	
Tedavi Başlangıcı			**Duyarlılık**	**Özgüllük**
> 252,8	66,67	69,23	39,06-86,19	42,37-87,32
> 271,9	58,33	84,62	31,95-80,67	57,77-97,27
> 275,8	50,00	84,62	25,38-74,62	57,77-97,27
> 299,5	50,00	92,31	25,38-74,62	66,69-99,61
> 345,6	50	100	25,38-74,62	77,19-100,0
Tedavi Erken Dönemi				
>275,8	75,00	53,85	46,77-91,11	29,14-76,79
>312,1	66,67	61,54	39,06-86,19	35,52-82,29
>315,8	66,67	84,62	39,06-86,19	57,77-97,27
>317,7	66,67	92,31	39,06-86,19	66,69-99,61
>326,1	66,67	100,0	39,06-86,19	77,19-100,0

Tablo 19'da verilen veriler, en iyi kesim noktasına karar vermek için farklı kesim noktalarının %duyarlılık ve %100-%özgüllük değerleri karşılaştırıldı. Testin duyarlılık değeri, yanıtsız hasta grubunda gerçek pozitif test sonucu veren olguların bulunmasında, özgüllük değeri ise, gerçek negatif değerlerin belirlenmesinde kullanıldı. Bu şekilde Tablo 20'de görülen iki yönlü frekans tablosu oluşturuldu. Her bir cut-off değeri için bu tablolar oluşturulduktan sonra, belirlenen cut-off değerleri ile PPD (pozitif prediktif değer) ve NPD (negatif prediktif değer) değerleri şu şekilde hesaplandı.

- PPD: Gerçek pozitifler/Gerçek pozitifler+ yalancı pozitifler
- NPD: Gerçek negatifler/Gerçek negatifler+ yalancı negatifler

Tablo 20. Kesim noktası (cut-off) değeri ve hasta kohortu ile iki yönlü tablo oluşturulması. Kısaltmalar: Gerçek pozitif, GP; gerçek negatif, GN; yalancı pozitif, YP; yalancı negatif, YN

BAFF >271,9pg/mL	Yanıtsız	Yanıt-veren (kontrol)	Toplam
Pozitif test	**7 (GP)**	**2 (YP)**	**9**
Negatif test	**5 (YN)**	**11 (GN)**	**16**
Toplam	**12**	**13**	**25**

İki-yönlü frekans tabloları kullanılarak ve farklı kesim noktaları dikkate alınarak belirlenen tedavi yanıtlarına göre sınıflandırılan hasta gruplarına ait PPD ve NPD değerleri Tablo 21'de görülmektedir.

Tablo 21. BAFF farklı kesim noktalarına pozitif ve negatif prediktif değerleri. Kısaltmalar: PPD, pozitif prediktif değer; NPD, negatif prediktif değer.

BAFF kesim değeri (pg/mL)	PPD	NPD
	Tedavi başlangıcı	
> 252,8	%67	%69
> 271,9	%78	%69
> 275,8	%75	%65
> 299,5	%86	%67
> 345,6	**%100**	**%68**
	Tedavinin Erken Dönemi	
>275,8	%60	%70
>312,1	%62	%67
>315,6	%73	%71
>315,8	%80	%73
>317,7	%89	%75
>326,1	**%100**	**%77**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Metastatik melanomada ICI'nin ana hedefi T hücre efektör fonksiyonları olmasına rağmen, olgun ve farklılaşmış B hücre fenotiplerinin de ICI yanıtları ile pozitif bir ilişkide olduğu literatür bilgileri arasında yer almaktadır (Helmink ve ark., 2020). Özellikle TIB hücrelerin varlığı ICI tedavi yanıtlarında pozitif prognostik bir etkiye sahiptir (Willsmore ve ark., 2020). Ancak, B hücre immünitesinin farklı rollerinin aydınlatılması yeni tedavi stratejileri ve biyo-belirteçlerin belirlenmesi ve bunların kliniğe uygulanarak kontrol noktası immünoterapisinin optimize edilmesi açısından önem teşkil etmektedir.

Ana B hücre popülasyonları

Olgun ve farklılaşmış B hücre fenotipleri ICI yanıtıyla pozitif bir ilişki içerisindedir. Bunun yanı sıra ICI tedavisinde irAEs'lerin gelişmesi ile de ilişkileri olduğu öne sürülmüştür (Willsmore ve ark., 2020). Neoadjuvant ICI tedavisi alan ileri evre III/IV (*advanced*) melanoma hastalarıyla yapılan bir çalışma, mass sitometri analizi yapılarak, tedaviye yanıt vermeyen hastalarda periferde ve tümör dokusunda toplam bellek B hücrelerin ve plazma hücre oranlarının YV hastalara nazaran daha az olduğunu, naif B hücre (IgD+CD27-) ve dönüşmemiş bellek B hücre (IgD+CD27+) popülasyonunun ise daha fazla olduğunu rapor etmiştir (Helmink ve ark., 2020). Çalışmamızda benzer olarak, ICI tedavi sürecinde izotip dönüşümü gerçekleşmiş IgM-IgD- B hücrelerin (erken ve geç vizit), dönüşmüş bellek IgD-CD27+ B hücrelerin (geç vizit) ve IgA+ total B hücre frekanslarının (geç vizit), YV MM'li olgularda YZ olgulara nazaran daha yüksek olduğu saptandı. Ayrıca, ICI tedavisinin naif B hücre frekanslarını periferde arttırırken, dönüşmüş bellek B hücre (IgD-CD27+), klasik B hücre (CD21+CD27+), dönüşmemiş bellek B hücre ve IgA+ B hücre frekanslarını YZ olgularda azalttığı (başlangıçtan geç vizite) gözlendi. ICI tedavisinin YV'lerin erken vizitlerinde sadece dönüşmemiş bellek B hücre frekansını azalttığı saptandı. Tüm bu

sonuçlar ICI tedavisinden fayda sağlanması açısından izotip dönüşümü geçirmiş ve bellek özelliğe sahip B hücre yanıtlarının önemini desteklemektedir.

YV ve YZ olgulardaki azalan dönüşmemiş bellek B hücre paterni irAEs geliştiren hastalarda da mevcuttu. Benzer olarak, YZ olgularda gözlenen tüm dönüşmüş bellek (IgD-CD27+), izotip dönüşümü geçirmiş IgM-IgD- B hücreler, IgA+ CD19+ B hücre, klasik B hücre oranlarındaki anlamlı azalmaların, irAEs geliştiren hasta grubunda olduğu saptandı. YV ve YZ MM'lu olgularda irAEs geliştiren hastalarda naif B hücre frekansları tedavi başlangıcından tedavinin geç vizitine kadar artış göstermekteydi. Bu artışın tedavi ilişkili otoimmün yanıtların oluşumunu desteklediği düşünülebilir. Bu gözlemler ICI tedavisinin, otoimmün yanıtı indüklediği MM'li olgularda özellikle dönüşmemiş B hücre popülasyonunun frekanslarının azalmasına neden olduğu, B hücre aracılı anti-tümör yanıtı azalttığı ve büyük ihtimal bu hastaların klinik fayda sağlayamadıklarına sebep olduğunu düşündürmektedir.

CD21, CD23, BAFFR

Neoadjuvant ICI tedavisi altındaki evre III/IV (*advanced*) melanoma hastalarının periferik kandaki total B hücre (CD45+CD19+) CD21, CD23 belirteçleri tümör dokusuna göre anlamlı derecede yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (Helmink ve ark., 2020). Çalışmamızda hastalar tedavi yanıtlarına göre ayrıldıktan sonra gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, CD21+ B hücrelerin IgG izotiplerinin tedavinin geç vizitinde YV olgularda YZ'lara nazaran yüksek frekanslarda olduğu gözlendi. CD21+IgA+ popülasyonu ise hem erken hem de geç vizitte YV'lerde daha yüksek bulunmaktaydı. CD23 belirteci açısından aynı zaman diliminde gruplar arası bir fark yoktu. Ancak, ICI tedavisi sürecinde YV olguların tedavinin erken döneminden geç dönemine CD23+ B hücre frekanslarının periferde anlamlı derecede azaldığı görüldü. CD23 KO fare modelinde protein antijenlerine karşı antijen-spesifik IgE ve IgG antikorlarının büyük ölçüde yükseldiği (Fujiwara ve ark., 1994), CD23'ü aşırı eksprese eden transgenik fare modelinde ise bu yanıtların önemli derecede azaldığı bilgileri literatürde yer almaktadır (C. Liu ve ark., 2016). Dahası, CD23'ten yoksun IgG+ B hücrelerin çok daha etkili bir şekilde IgG salgılayan plazma B hücrelere

dönüştüğü gösterilmiştir. ICI tedavisi alan ve yanıt veren MM olgularda yapılan çalışmalarda, melanoma-türevli antijenlere spesifik IgG1 ve IgG2 tip antikorların immünoterapiye yanıt veren hastalarda daha yüksek bulunduğu (Fässler ve ark., 2019) rapor edilmiştir. Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, ICI tedavisinin, MM'lu olgularda CD23+ total ve naif B hücre oranlarının azalmasını sağlayarak, CD23 molekülünün negatif regülatör etkisinin azalmasına yol açarak B-hücre proliferatif yanıtlarını desteklediği düşünülebilir.

$CD21^{-/dü}$ naif B hücrelerin çoğunun otoreaktif yanıt vermeyen (anerjik) klonlar oldukları, kronik otoimmün hastalık olan romatoid artritte, sistemik otoimmün hastalık sistemik lupus ve sjögren sendrom hastalarında, primer immün yetmezlikte (CVID, *common variable immunodeficiency*) $CD21^{-/dü}$ CD19+ B hücre frekanslarının periferik kanda arttığı (Thorarinsdottir, Camponeschi, Gjertsson, & Mårtensson, 2015) ve sağlıklı bireylerde bu hücrelerin çoğunluğunun bellek B hücreler (IgA+/IgG+) olduğu bilgileri literatürde yer almaktadır (Thorarinsdottir ve ark., 2016). Hasta kohortumuza benzer olarak, anti-CTLA-4 veya kombinasyonel tedavi uygulanan MM'li hastalarda tedavi öncesi (başlangıcı) ve ilk doz ICI uygulamasından sonra dolaşan $CD21^{-/dü}$ B hücre'lerin arttığı tüm hastalarda gösterilmiş ancak tedavinin daha geç döneminde değerlendirilmemiştir (Das ve ark., 2018). Çalışmamızda ICI tedavisinin erken ve geç döneminde $CD21^{-/dü}$ B hücre yanıtı YV ve YZ olgularda değerlendirildi. YZ olgularda, ICI tedavi başlangıcındaki $CD21^{-/dü}$ fenotipe bakıldığında, IgA+ izotipindekilerin erken vizitte arttığı, IgG+ $CD21^{-/dü}$ B hücrelerin ise tedavi sürecinde geç vizitte periferde arttığı tespit edildi. Bu çalışma, Das ve ark., 2018 ICI tedavisi alan MM'li olguların $CD21^{-/dü}$ kompartmandaki gözlediği bu artışın, MM'li olguların sadece ICI tedavisine yanıtsız hasta grubunda, aynı zamanda izotip dönüşümü geçirmiş B hücrelerinde olduğunu gösterdi.

İlaveten, $CD21^{-/dü}$ popülasyon frekansını hasta gruplarında aynı vizitlerde değerlendirdiğimizde, $CD21^{-/dü}$ IgG+ hücre oranlarının YZ olgularda tedavi başlangıcı ve geç vizitte de anlamlı oranda yükseklikleriyle beraber ilk doz uygulamadan sonra da YZ olgularda daha yüksek bulunma eğilimleri ($p=0,087$) mevcuttu. IgA izotipindekilerin oranı ise tedavinin erken ve geç vizitlerinde YZ olgularda anlamlı

derecede yüksekti. Anerjik B hücre grubu değişimlerinin tedavi sırasında sadece YZ olgularda bulunması ve bu popülasyonun ICI tedavisi sırasındaki artışı, tedavi sürecinde YV olgulara nazaran periferde daha bol bulunmaları, $CD21^{-/dü}$ dönüşmüş B hücrelerin MM'li hastaların tedaviden klinik fayda sağlayamamalarında rol oynayabileceklerini düşündürmektedir.

CD21 ve irAEs

Das ve ark., 2018, aynı çalışmalarında ICI tedavisinin ilk doz uygulanmasından sonra $CD21^{-/dü}$ PD1+ bellek B (IgD-) hücrelerin periferde çoğaldıklarını ve bu değişimin yüksek-dereceli irAEs geliştirmeleriyle ilişkili olduğunu ancak değişen T hücre frekansı ile toksisite gelişimi arasında bir korelasyon saptayamadıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda $CD21^{-/dü}$ B hücre popülasyon yanıtlarını irAEs açısından değerlendirdiğimizde, ICI tedavisi sırasında irAEs geliştirmeyen olgularda $CD21^{-/dü}$ IgG+, IgA+ ve IgD+ (naif) B hücre frekanslarının tedavinin geç vizitinde yanıt verenlere nazaran YZ olgularda daha yüksek bulunması, $CD21^{-/dü}$ B hücre popülasyonunun farklı izotiplerinin özellikle irAEs geliştirmeyen olguların immünoterapi yanıtlarında önemli olduklarını göstermektedir. Isnardi ve ark., 2010, $CD21^{-/dü}$ B hücrelerin bazı romatoid artritli hastaların periferinde arttığını ve bu hastalardan ve CVID hastalarından izole edilen naif $CD21^{-/dü}$ B hücrelerin germline otoreaktif antikor ürettiklerini rapor etmiştir.

Çalışmamızda irAEs geliştiren olgularda yanıtsız hasta grubunda sadece IgG izotipindeki $CD21^{-/dü}$ B hücre frekanslarının tedavinin geç vizitinde YV'lere nazaran daha yüksek olduğu tespit edildi. ICI tedavisinin geç döneminde irAEs varlığı ve yokluğu da göz önüne alındığında, bu bulgular $CD21^{-/dü}$ IgG+ B hücre popülasyonun MM'lu olguların ICI tedavisinden fayda sağlanması açısından önemli bir role sahip olduğunu, ayrıca immünoterapi ilişkili otoimmün toksisitede görev aldıklarını düşündürmektedir.

BAFF reseptörleri

BAFF reseptörleri BAFF-R, TACI ve BCMA B hücre gelişimi ve farklılaşmasının regülasyonunda rol oynamaktadır (Darce, Arendt, Wu, & Jelinek, 2007). Literatürde BAFF-R (NSCLC), TACI (NSCLC, agresif bazal meme kanseri) ve BCMA (NSCLC, bazal meme kanseri) ekspresyonlarının immünohistokimya yöntemi ile sağlıklı dokulara nazaran, tümör dokularındaki artmış seviyeleri gösterilse de (Dimitrakopoulos ve ark., 2019; Dou, Yan, Zhang, & Xu, 2016; García-Castro ve ark., 2015) periferik kandaki ekspresyonları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Yakın zamanda (Khlaiphuengsin ve ark., 2020) hepatoselüler karsinomada B hücre yüzeyindeki BAFF-R ekspresyonunun ileri evre tümörlerde erken evrelere göre B hücre yüzeyinde daha az eksprese olduğunu ve azalmış BAFF-R ekspresyonun tümör büyüklüğüyle ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada ise neoadjuvant ICI tedavisi altındaki evre III/IV melanoma hastalarının periferik kandaki total B hücre BAFF-R belirteçlerinin tümör dokusuna göre anlamlı derecede yüksek bulunduğunu rapor etmiştir (Helmink ve ark., 2020) Çalışmamızda MM'li olgularda periferik kan ana B hücre alt gruplarının BAFF-R ekspresyonlarında ICI tedavisi sırasında ve tedavinin 3 döneminde de anlamlı değişiklikler saptandı. Hasta grupları aynı vizitlerde incelendiğinde, total ve naif B hücrelerin BAFF-R ekspresyonunun tedavi başlangıcı ve erken vizitte YV olgularda daha yüksek olması, ilaveten dönüşmüş B hücrelerde de tedavinin tüm vizitelerinde YV olgularda BAFF reseptörleri BAFF-R ve TACI'nin daha yüksek eksprese edilmesi, ICI tedavisinden fayda sağlanmasında BAFF ilişkili reseptör ekspresyon yüksekliğinin rol oynadığını göstermektedir. Kanser genom atlasında yer alan veri setleriyle yapılan prognostik meta-analiz çalışmalarında, NSCLC alt tipi akciğer adenokarsinomlu olgularda *BAFF-R*, *BCMA* ve *TACI* gen ekspresyonlarındaki artışın ölüm riskini azalttığı (Zhang ve ark., 2020), servikal kanser olgularında *TACI*, *BAFF-R* genlerinin yüksek ekspresyonlarının artan 5-yıllık sağ kalım süresi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Budhwani ve ark., 2021).

MM'li olguların aynı vizitlerde irAEs bakımından değerlendirildiğinde, YV ve irAEs geliştiren hastaların, 3 ana B hücre popülasyonunda BAFF-R ekspresyonlarının

tedavinin erken vizitinde YZ'lara nazaran daha yüksek olduğu gözlendi. Diğer BAFF reseptörleri TACI ve BCMA ise irAEs geliştirmeyen olguların YV grubunda tedavi başlangıcında yüksekti. Bu sonuçlar, BAFF-R'ünün irAEs geliştiren olgularda TACI ve BCMA reseptörlerinin ise irAEs geliştirmeyen olgularda tedavi başlangıcında farklı frekans ve ekspresyonlara sahip olduklarını ve tedavi yanıtını tahmin etmede rol oynayabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca, ICI tedavisi yanıt veren ve irAEs geliştirmeyen olgularda tedavi başlangıcından geç vizite, irAEs geliştirenlerde ise erken vizite BAFF-R'ünün anlamlı derecede azalmasına yol açmaktadır.

ICI tedavi sürecinin 9-12 haftalık zaman dilimi değerlendirildiğinde, ICI tedavisinin YV olgularda total B hücreler üzerindeki BAFF-R ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı ve ilk dozdan sonra da hem YV hem de YZ olgularda azaltma eğiliminde olduğu (p=0,052; p=0,06) saptandı. Dönüşmüş B hücre (IgM-IgD-) popülasyonunda ise tedavinin erken vizitinde YZ olgularda azalma eğilimi görülürken (p=0,054), YV olgularda BAFF reseptörlerinden hem BAFF-R ekspresyonunun hem de BCMA+ hücre frekansının anlamlı derecede azaldığının gözlenmesi, MM olgularında ICI tedavisinin BAFF reseptörü üzerinden B hücre yanıtlarını etkilediğini düşündürmektedir. Bu etkinin tedaviye yanıt veren grupta anlamlı olması, BAFF-R'ünün tedavi yanıtındaki rolünü göstermektedir.

Tedavi sürecinde başlangıçtan geç döneme total B hücre yüzeyindeki BAFF-R ekspresyon seviyelerinin YV olgulardaki bu anlamlı azalışı, irAEs geliştirmeyen hastalardan (n=4) kaynaklı olmakla beraber naif ve dönüşmüş B hücre popülasyonlarında da tespit edildi. ICI tedavisinin ilk uygulamasından sonra gözlenen BAFF-R ekspresyonundaki azalma ise irAEs geliştiren (n=9) hastalardan kaynaklanmaktaydı. Tedaviden fayda sağlayan hastaların farklı vizitlerinde saptanan bu anlamlı azalmaların, irAEs varlığı ve yokluğunda olması, BAFF-R ekspresyon değişikliğinin otoimmüniteyle beraber tedavi yanıtında önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Olgun bellek B hücreleri hayatlarını sürdürebilmeleri açısından BHR sinyalizasyonuna ve BAFF-R ekspresyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. ICI tedavisinin

erken ve geç vizitlerinde dönüşmüş (IgM-IgD-) ve dönüşmüş bellek (IgD-CD27+) B hücrelerin YV'lerde yüksek olması; BAFF-R ekspresyonunun her ne kadar YV'lerde tedavi sürecinde azalsa da YZ hastalara nazaran her vizitte yüksek bulunması, periferik bellek B hücre frekanslarının ve BAFF-R ekspresyon yüksekliklerinin MM'li olguların ICI tedavisinden fayda sağlamaları açısından önemli olduğunu göstermektedir. İnsanlarda homozigot BAFF-R gen delesyonu, B hücrelerin gelişim aşamasında (özellikle transizyonel B hücre seviyesinde) kalmalarına yol açmakta ve bellek B hücrelere farklılaşmasında noksanlığa neden olmaktadır (Warnatz ve ark., 2009). Çalışmamızın sonuçları YV'lere nazaran YZ olgularda gözlenen BAFF-R ekspresyon düşüklüğünün, YZ hastalardaki azalmış bellek ve dönüşmüş B hücre frekansları ile ilişkili olabileceğini önermektedir.

BAFF ve BAFF-R ilişkisi

Homozigot BAFF-R delesyonu olan hastalarda BAFF seviyelerinin sağlıklı bireylere nazaran yüksek (150 kat) olduğu, transgenik fare çalışmaları ile de desteklenmiştir (Kreuzaler ve ark., 2012). BAFF proteini B hücreler tarafından BAFF reseptör aracılığı ile tüketilmektedir. Monositler, makrofajlar, DH'ler, Kİ stroma hücreleri ve T hücreler tarafından eksprese edilen BAFF ve APRIL'in pro-inflamatuvar durumlarda seviyeleri artarken BAFF-R ve TACI ekspresyonları ile de ters orantılı olduğu rapor edilmiştir (Kreuzaler ve ark., 2012). Ayrıca CVID hastalarında da BAFF ve periferik B hücre frekansı arasında negatif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (Kreuzaler ve ark., 2012). Benzer olarak, bizim çalışmamızda da korelasyon analizleri aracılığıyla, ICI tedavisi sürecinde MM'li olgulardan izole edilen periferik total B hücrelerin BAFF reseptör ekspresyonlarının, hasta gruplarında serum BAFF seviyeleri ile negatif bir ilişki içerişinde olduğu tespit edildi. Ancak, TACI+ B hücre frekansı sadece YZ olgularda BAFF seviyeleri ile negatif korelasyona sahipti. Sağlıklı kontrollerde BAFF-BAFF-R ekseninde herhangi bir ilişki gözlenmedi. İlaveten, APRIL sitokini ve reseptörleri ile de hiçbir grupta anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu sonuçlar metastatik melanomada BAFF-BAFFR ekseninde bir değişiklik olduğu ve BAFF reseptörü TACI'nin ICI tedavi yanıtsızlığında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. CVID hastalarının TACI ve BAFF-R genlerinde

mutasyonlar taşıdıkları (Ameratunga ve ark., 2018) düşünülecek olursa, metastatik melanomada da bu reseptörlerde epigenetik değişikliklerin olabileceği ve bu değişikliklerin ICI tedavisine yanıtta olumlu veya olumsuz rol oynayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

BAFF ve B hücre grupları ilişkisi

Farelerle gerçekleştirilen bir çalışmada *in vivo* rekombinant BAFF tedavisinin CD27 eksprese eden T hücreleri azaltırken PD-L1 ekspresyonlarını arttırdığı; FoxP3+ Treg hücre sıklığını ve yüzey PD-1 ekspresyonlarını da arttırdığı gösterilmiştir (Yarchoan ve ark., 2020). Çalışmamızda, ICI tedavisine yanıt vermeyen olgulardaki serum BAFF seviyesi arttıkça, CD27+IgD- (bellek) ve CD21+CD27+ (klasik bellek) B hücre frekansları azalması, yüksek BAFF seviyelerinin efektör hücre kompartmanını zayıflattığını düşündürmektedir. Ayrıca, direkt Breg hücre popülasyonuna bakılmamış olsa da Breg'lerin içinde bulunduğu CD19+CD24yüCD38yü tranzisyonel B hücrelerin sadece YZ olgularda BAFF ile pozitif korelasyonu saptandı. Tedavi sürecinin her 3 döneminde de BAFF seviyeleri artarken tranzisyonel hücre frekansının da arttığı gözlendi. Bu sonuçlar, tedaviye yanıtsız MM'li olgularda BAFF sitokinin süpresif özellikteki alt grupları desteklerken, anti-tümör immün yanıtta önemli olan bellek ve dönüşmüş B hücre frekansını azaltarak B hücre alt-grupları arasındaki dengenin bozulduğunu göstermektedir.

BAFF ve CD21 ilişkisi

BAFF sitokini B hücre sağkalım fonksiyonundan bağımsız olarak CD21 yüzey proteinlerinin regülasyonunda da rol oynamaktadır (Gorelik ve ark., 2004). Çalışmamızda MM'li olguların tedaviye yanıtsız grubunda serum BAFF seviyelerinin $CD21^{-/dü}$ IgG ve IgA izotipindeki B hücreler ile pozitif yönlü orta şiddetli ve YV olgular ile zayıf ilişkide oldukları ICI tedavisi sürecinde belirlendi. Tedavi başlangıcında ise BAFF seviyeleri $CD21^{-/dü}$ IgA+/IgG+ popülasyon ile sadece YZ olgularda pozitif bir korelasyon göstermekte olması, yüksek BAFF seviyelerinin MM'li hastalarda (YZ) anerjik B hücreleri desteklediğini ve bu hastaların ICI

tedavisinden fayda sağlayamamalarının bir sebebi olabileceğini düşündürmektedir. Sağlıklı kontrollerde aynı ilişkinin görülmemesi, ICI tedavisinin BAFF sitokini vasıtasıyla CD21 üzerinden MM'lu hastalarda B hücreleri düzenlediğini düşündürmektedir.

Serum BAFF düzeyleri

BAFF serum konsantrasyonlarının pro-inflamatuvar yanıtlar, viral infeksiyonlar ve çeşitli otoimmünite durumları ile yükseldiği bilinmektedir. Uveal melanomalı olgularda serum BAFF seviyelerinin metastatik hastalarda (evre II, III, ve IV) metastaz olmayanlara (evre I) ve sağlıklı kontrollere nazaran yüksek bulunduğu rapor edilmiş ve bu olgularda metastaz teşhisinde rolü olduğu öne sürülmüştür (Lin & Süsskind, 2021). Çalışmamızda benzer olarak sağlıklı kontrollere nazaran tedavi başlangıcında ve erken vizitte YV ve YZ olgularda da serum BAFF seviyeleri yüksek bulunmuştur. Tedavinin geç vizitinde ise YZ olgularda sağlıklı kontrollere nazaran BAFF seviyeleri anlamlı derecede yüksek iken, YV olgularda yüksek olma eğiliminde oldukları saptanmıştır (p= 0,052). anti-PD1 tedavisi başlangıcında yanıt vermeyen hastalarda BAFF seviyelerinin yüksek ölçüldüğü rapor edilmiştir (W. Liu ve ark., 2021). Ancak, YV ve YZ metastatik melanoma hasta tanımı çalışmamız ile farklılık göstermekteydi. Çalışmamızda *stable disease* (durağan hastalık) kriteri, YV grup yerine YZ grubuna dahil edilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda monoterapi ve kombinasyonel terapi mevcut iken, (W. Liu ve ark., 2021) çalışmalarındaki kohort sadece anti-PD1 monoterapisi altındaydı. Çalışmamızda W. Liu ve ark., 2021'den farklı olarak, BAFF serum seviyeleri ilk doz ICI tedavisinden sonra da ölçüldü ve hem başlangıçta hem de tedavinin erken vizitinde YZ olgularda YV olgulara nazaran daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu tespit edildi. Ancak, tedavinin geç vizitinde hasta grupları açısından bir fark gözlenmedi. Bu anlamlı farklılıklar irAEs geliştiren YV ve YZ olgulardan kaynaklanmaktaydı. Tedavi sürecinde ise ilk doz ICI uygulamasının sadece YZ olgularda BAFF sitokinini serumda anlamlı derecede arttırdığı görüldü. Tedavinin her vizitinde YZ olgular sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek BAFF seviyelerine sahipti. Benzer şekilde YV olgularda başlangıç ve erken vizitte BAFF sitokin seviyeleri sağlıklı kontrollere nazaran anlamlı derecede yüksek tespit edilirken,

tedavinin geç vizitinde yüksek olma eğilimindeydi (p=0,0512). Bu sonuçlar serum BAFF seviyelerinin prognostik özellikte olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda BAFF serum seviyelerinin ICI yanıtındaki prognostik etkinliği ROC analizine göre değerlendirildiğinde, tedavi başlangıcı ve erken vizitte serum BAFF düzeyinin tanı testi ayırma yeteneğinin orta derece ve anlamlı olduğu (AUC=0,78) bulundu. YZ hastalar ICI tedavisine yanıt vereceklerden %78 oranında ayrılabilmektedir. Klinikte önemli olan yanlış pozitifleri (tedaviden fayda sağlayacak hastaları) ayırmaktır. Bu sebepten ötürü testin özgüllüğü maksimumda tutuldu. Tedavi başlangıcında 345,6 pg/mL seviyesinin üstündeki hastalarda testin rastgele seçilen YZ olguları 50% duyarlılıkla ve %100 özgüllükle ayrıldığı belirlendi. İlk doz ICI uygulanmasından sonra ise 326,1 pg/mL seviyesinde duyarlılık %66,67 ve özgüllük %100 olarak saptandı. İki vizitte de ICI tedavisinden fayda sağlayacak (YV) hastalar 100% özgüllükle ayrılabilmektedir. 345,6 pg/mL'in üzerindeki BAFF değerlere sahip MM'li ve ICI tedavisine yanıt vermeyen olguların %50'si ayırt edilebilmektedir. Kalan %50'si ise cut-off'un altında kalacağından ICI tedavisine başlatılacaktır. Ancak bu durumda en kötü ihtimalle hasta gereksiz ICI tedavisi alacaktır ve tedaviye yanıt verecek hastaların hiçbiri kaçırılmayacaktır. Çalışmamıza dahil edilen MM'li olguların ICI tedavisine verdikleri yanıtların dahil edilmesiyle beraber elde edilen testin hata yargılarına bakıldığında, BAFF seviyelerinin 345.6 pg/mL'den yüksek olması durumunda, YZ'ların bulunma olasılığı %100 (PPD) iken test sonucuna göre belirlenen negatiflerin içerisindeki doğru negatiflerin oranı NPD %68'dir. Cut-off'un altında kalanların %32'si tedaviye yanıt vermeyecek hastalar olarak saptanmıştır. İlk doz ICI uygulanması sonrasında ise (erken vizit) ise PPD 326,1 pg/mL'in üzerinde %100 ve NPD ise %77 olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, hangi hastaların ICI tedavisinden fayda sağlayamayacağının belirlenmesi açısından önemli olmakla birlikte, ICI tedavi başlangıcında ve ilk doz ICI uygulanması sonrasında ölçülecek serum BAFF düzeyinin klinikte kullanılabileceğini düşündürmektedir. Daha yüksek sayıdaki hasta kohortlarıyla yapılacak çalışmalar, BAFF seviyelerinin cut-off değerinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Tedavi başlangıcındaki serum BAFF seviyeleri ile ilk anti-PD1 uygulanmasından sonra ölçülen ve hücre içi kalsiyum sensörü olarak bilenen S100 proteininin serum

seviyelerinin birlikte değerlendirilmesinin daha etkili bir biyo-belirteç olacağı ileri sürülmektedir (W. Liu ve ark., 2021).

Bu tez çalışması, B-hücre aracılı immün yanıtların metastatik melanomadaki rollerinin ve B hücre alt gruplarının değerlendirilmesi açısından bir ön çalışmadır. ICI tedavisi metastatik melanomada periferik kan B hücre frekanslarını değiştirmektedir. Çalışmamız serum BAFF seviyelerinin, BAFF-R ve TACI reseptör ekspresyonlarının ve $CD21^{-/dü}$ B hücre frekanslarının ICI tedavisi altındaki MM'li hastaların efektif anti-tümör yanıtlarında rolü olduğunu ileri sürmektedir. Özellikle BAFF proteinin solid tümörlerdeki fonksiyonel rolü henüz açıklanamamış olsa da tümöre spesifik immün yanıtlarda önemli bir sitokin olduğu aşikardır. Çalışmamızdaki en büyük kısıtlayıcı faktör örnek sayısının sadece 25 ile sınırlı kalmasıdır. Daha büyük bir kohort ile yürütülecek çalışmalar, BAFF ve BAFF reseptörlerinin hasta sağ kalım ve ölüm riskinin değerlendirilmesi, aynı zamanda tedavi yanıtını öngörebilecek bir veya birden fazla biyo-belirtecin belirlenmesi için gereklidir.

6. KAYNAKLAR

Acar, A., Yoldaş, A. H., Yaman, B., Ceylan, C., Karaca Şaziye, B., Esassolak, M., . . . Karaarslan, I. (2020). Epidemiological and overall survival properties of cutaneous melanomas at Ege University Hospital. *Ege Journal of Medicine, 59*(October 2020), 89-96.

Acer, E., & Kaya Erdoğan, H. (2019). Epidemiology of common skin cancers. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi, 4*(Özel Sayısı), 52-60. doi:doi.org/10.35232/estudamhsd.499257

Ameratunga, R., Lehnert, K., Woon, S. T., Gillis, D., Bryant, V. L., Slade, C. A., & Steele, R. (2018). Review: Diagnosing Common Variable Immunodeficiency Disorder in the Era of Genome Sequencing. *Clin Rev Allergy Immunol, 54*(2), 261-268. doi:10.1007/s12016-017-8645-0

Amin, B. M., Edge, S., Greene, F., Byrd, R. D., Brookland, K. R., Washington, K., . . . Meyer, R. L. (2018). *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition ed.): Springer International Publishing AG.

Ascierto, P. A., McArthur, G. A., Dréno, B., Atkinson, V., Liszkay, G., Di Giacomo, A. M., . . . Larkin, J. (2016). Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol, 17*(9), 1248-1260. doi:10.1016/S1470-2045(16)30122-X

Azimi, F., Scolyer, R. A., Rumcheva, P., Moncrieff, M., Murali, R., McCarthy, S. W., . . . Thompson, J. F. (2012). Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol, 30*(21), 2678-2683. doi:10.1200/JCO.2011.37.8539

Balch, C. M., Soong, S., Ross, M. I., Urist, M. M., Karakousis, C. P., Temple, W. J., . . . Harrison, R. (2000). Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. *Ann Surg Oncol, 7*(2), 87-97. doi:10.1007/s10434-000-0087-9

Barone, A., Hazarika, M., Theoret, M. R., Mishra-Kalyani, P., Chen, H., He, K., . . . Pazdur, R. (2017). FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients with Unresectable or Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res, 23*(19), 5661-5665. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0664

Bedikian, A. Y., Johnson, M. M., Warneke, C. L., Papadopoulos, N. E., Kim, K., Hwu, W. J., . . . Hwu, P. (2008). Prognostic factors that determine the long-term survival of patients with unresectable metastatic melanoma. *Cancer Invest, 26*(6), 624-633. doi:10.1080/07357900802027073

Berkowska, M. A., Driessen, G. J., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., . . . van Zelm, M. C. (2011). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -

independent maturation pathways. *Blood, 118*(8), 2150-2158. doi:10.1182/blood-2011-04-345579

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., & Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med, 192*(11), 1545-1552. doi:10.1084/jem.192.11.1545

Budhwani, M., Turrell, G., Yu, M., Frazer, I. H., Mehdi, A. M., & Chandra, J. (2021). Immune-Inhibitory Gene Expression is Positively Correlated with Overall Immune Activity and Predicts Increased Survival Probability of Cervical and Head and Neck Cancer Patients. *Front Mol Biosci, 8*, 622643. doi:10.3389/fmolb.2021.622643

Buzaid, A. C., Ross, M. I., Balch, C. M., Soong, S., McCarthy, W. H., Tinoco, L., . . . Benjamin, R. S. (1997). Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol, 15*(3), 1039-1051. doi:10.1200/JCO.1997.15.3.1039

Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., . . . Jönsson, G. (2020). Author Correction: Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature, 580*(7801), E1. doi:10.1038/s41586-020-2155-6

Carr, S., Smith, C., & Wernberg, J. (2020). Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am, 100*(1), 1-12. doi:10.1016/j.suc.2019.09.005

Carthon, B. C., Wolchok, J. D., Yuan, J., Kamat, A., Ng Tang, D. S., Sun, J., . . . Sharma, P. (2010). Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. *Clin Cancer Res, 16*(10), 2861-2871. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0569

Chaput, N., Lepage, P., Coutzac, C., Soularue, E., Le Roux, K., Monot, C., . . . Carbonnel, F. (2017). Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol, 28*(6), 1368-1379. doi:10.1093/annonc/mdx108

Choi, J., & Lee, S. Y. (2020). Clinical Characteristics and Treatment of Immune-Related Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors. *Immune Netw, 20*(1), e9. doi:10.4110/in.2020.20.e9

Christofi, T., Baritaki, S., Falzone, L., Libra, M., & Zaravinos, A. (2019). Current Perspectives in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel), 11*(10). doi:10.3390/cancers11101472

Coit, D. G., Thompson, J. A., Albertini, M. R., Barker, C., Carson, W. E., Contreras, C., . . . Engh, A. M. (2019). Cutaneous Melanoma, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw, 17*(4), 367-402. doi:10.6004/jnccn.2019.0018

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 4.03. (2010). Retrieved from https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/ctc.htm

Craxton, A., Draves, K. E., Gruppi, A., & Clark, E. A. (2005). BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med, 202*(10), 1363-1374. doi:10.1084/jem.20051283

Cummins, D. L., Cummins, J. M., Pantle, H., Silverman, M. A., Leonard, A. L., & Chanmugam, A. (2006). Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc, 81*(4), 500-507. doi:10.4065/81.4.500

Da Gama Duarte, J., Parakh, S., Andrews, M. C., Woods, K., Pasam, A., Tutuka, C., . . . Cebon, J. (2018). Autoantibodies May Predict Immune-Related Toxicity: Results from a Phase I Study of Intralesional. *Front Immunol, 9*, 411. doi:10.3389/fimmu.2018.00411

Darce, J. R., Arendt, B. K., Wu, X., & Jelinek, D. F. (2007). Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol, 179*(11), 7276-7286. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7276

Das, R., Bar, N., Ferreira, M., Newman, A. M., Zhang, L., Bailur, J. K., . . . Dhodapkar, K. M. (2018). Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade. *J Clin Invest, 128*(2), 715-720. doi:10.1172/JCI96798

Daud, A. I., Wolchok, J. D., Robert, C., Hwu, W. J., Weber, J. S., Ribas, A., . . . Hamid, O. (2016). Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J Clin Oncol, 34*(34), 4102-4109. doi:10.1200/JCO.2016.67.2477

Davies, M. A., Liu, P., McIntyre, S., Kim, K. B., Papadopoulos, N., Hwu, W. J., . . . Bedikian, A. (2011). Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer, 117*(8), 1687-1696. doi:10.1002/cncr.25634

Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther, 20*(11), 1366-1379. doi:10.1080/15384047.2019.1640032

de Moel, E. C., Rozeman, E. A., Kapiteijn, E. H., Verdegaal, E. M. E., Grummels, A., Bakker, J. A., . . . van der Woude, D. (2019). Autoantibody Development under Treatment with Immune-Checkpoint Inhibitors. *Cancer Immunol Res, 7*(1), 6-11. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0245

De Vellis, C., Pietrobono, S., & Stecca, B. (2021). The Role of Glycosylation in Melanoma Progression. *Cells, 10*(8). doi:10.3390/cells10082136

DeFalco, J., Harbell, M., Manning-Bog, A., Baia, G., Scholz, A., Millare, B., . . . Robinson, W. H. (2018). Non-progressing cancer patients have persistent B cell responses expressing shared antibody paratopes that target public tumor antigens. *Clin Immunol, 187*, 37-45. doi:10.1016/j.clim.2017.10.002

Delyon, J., Mateus, C., Lefeuvre, D., Lanoy, E., Zitvogel, L., Chaput, N., . . . Robert, C. (2013). Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol, 24*(6), 1697-1703. doi:10.1093/annonc/mdt027

Diem, S., Fässler, M., Bomze, D., Ali, O. H., Berner, F., Niederer, R., . . . Flatz, L. (2019). Immunoglobulin G and Subclasses as Potential Biomarkers in Metastatic Melanoma Patients Starting Checkpoint Inhibitor Treatment. *J Immunother, 42*(3), 89-93. doi:10.1097/CJI.0000000000000255

Dimitrakopoulos, F. D., Kottorou, A. E., Antonacopoulou, A. G., Panagopoulos, N., Scopa, C., Kalofonou, M., . . . Kalofonos, H. P. (2019). Expression of Immune System-Related Membrane Receptors CD40, RANK, BAFFR and LTβR is Associated with Clinical Outcome of Operated Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *J Clin Med, 8*(5). doi:10.3390/jcm8050741

Dou, H., Yan, Z., Zhang, M., & Xu, X. (2016). APRIL, BCMA and TACI proteins are abnormally expressed in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett, 12*(5), 3351-3355. doi:10.3892/ol.2016.5095

Dubin, K., Callahan, M. K., Ren, B., Khanin, R., Viale, A., Ling, L., . . . Wolchok, J. D. (2016). Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun, 7*, 10391. doi:10.1038/ncomms10391

Egbuniwe, I. U., Karagiannis, S. N., Nestle, F. O., & Lacy, K. E. (2015). Revisiting the role of B cells in skin immune surveillance. *Trends Immunol, 36*(2), 102-111. doi:10.1016/j.it.2014.12.006

Eggermont, A. M. M., Blank, C. U., Mandala, M., Long, G. V., Atkinson, V., Dalle, S., . . . Robert, C. (2018). Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med, 378*(19), 1789-1801. doi:10.1056/NEJMoa1802357

Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., . . . Mooney, M. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer, 45*(2), 228-247.

Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schüz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E. W., & Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer, 132*(2), 385-400. doi:10.1002/ijc.27616

Fujimura, T., Sato, Y., Tanita, K., Kambayashi, Y., Otsuka, A., Fujisawa, Y., . . . Aiba, S. (2018). Serum levels of soluble CD163 and CXCL5 may be predictive markers for immune-related adverse events in patients with advanced melanoma treated with nivolumab: a pilot study. *Oncotarget, 9*(21), 15542-15551. doi:10.18632/oncotarget.24509

Fujimura, T., Sato, Y., Tanita, K., Kambayashi, Y., Otsuka, A., Fujisawa, Y., . . . Aiba, S. (2018). Serum Level of Soluble CD163 May Be a Predictive Marker of the Effectiveness of Nivolumab in Patients With Advanced Cutaneous Melanoma. *Front Oncol, 8*, 530. doi:10.3389/fonc.2018.00530

Fujisawa, Y., Yoshino, K., Otsuka, A., Funakoshi, T., Fujimura, T., Yamamoto, Y., . . . Matsushita, S. (2017). Fluctuations in routine blood count might signal severe immune-related adverse events in melanoma patients treated with nivolumab. *J Dermatol Sci, 88*(2), 225-231. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.07.007

Fujiwara, H., Kikutani, H., Suematsu, S., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., . . . Kojima, S. (1994). The absence of IgE antibody-mediated augmentation of immune responses in CD23-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A, 91*(15), 6835-6839. doi:10.1073/pnas.91.15.6835

Fässler, M., Diem, S., Mangana, J., Hasan Ali, O., Berner, F., Bomze, D., . . . Flatz, L. (2019). Antibodies as biomarker candidates for response and survival to checkpoint inhibitors in melanoma patients. *J Immunother Cancer, 7*(1), 50. doi:10.1186/s40425-019-0523-2

García-Castro, A., Zonca, M., Florindo-Pinheiro, D., Carvalho-Pinto, C. E., Cordero, A., Gutiérrez del Fernando, B., . . . Planelles, L. (2015). APRIL promotes breast tumor growth and metastasis and is associated with aggressive basal breast cancer. *Carcinogenesis, 36*(5), 574-584. doi:10.1093/carcin/bgv020

Gorelik, L., Cutler, A. H., Thill, G., Miklasz, S. D., Shea, D. E., Ambrose, C., . . . Kalled, S. L. (2004). Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. *J Immunol, 172*(2), 762-766. doi:10.4049/jimmunol.172.2.762

Greco, A., Safi, D., Swami, U., Ginader, T., Milhem, M., & Zakharia, Y. (2019). Efficacy and Adverse Events in Metastatic Melanoma Patients Treated with Combination BRAF Plus MEK Inhibitors Versus BRAF Inhibitors: A Systematic Review. *Cancers (Basel), 11*(12). doi:10.3390/cancers11121950

Grimaldi, A. M., Simeone, E., Festino, L., Vanella, V., Strudel, M., & Ascierto, P. A. (2017). MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors. *Am J Clin Dermatol, 18*(6), 745-754. doi:10.1007/s40257-017-0292-y

Griss, J., Bauer, W., Wagner, C., Simon, M., Chen, M., Grabmeier-Pfistershammer, K., . . . Wagner, S. N. (2019). B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nat Commun, 10*(1), 4186. doi:10.1038/s41467-019-12160-2

Haynes, B. F., Kelsoe, G., Harrison, S. C., & Kepler, T. B. (2012). B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nat Biotechnol, 30*(5), 423-433. doi:10.1038/nbt.2197

Hazarika, M., Chuk, M. K., Theoret, M. R., Mushti, S., He, K., Weis, S. L., . . . Pazdur, R. (2017). U.S. FDA Approval Summary: Nivolumab for Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma Following Progression on Ipilimumab. *Clin Cancer Res, 23*(14), 3484-3488. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0712

Heitzer, E., Ulz, P., & Geigl, J. B. (2015). Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem, 61*(1), 112-123. doi:10.1373/clinchem.2014.222679

Helmink, B. A., Reddy, S. M., Gao, J., Zhang, S., Basar, R., Thakur, R., . . . Wargo, J. A. (2020). B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature, 577*(7791), 549-555. doi:10.1038/s41586-019-1922-8

Hoffmann, F. S., Kuhn, P. H., Laurent, S. A., Hauck, S. M., Berer, K., Wendlinger, S. A., . . . Meinl, E. (2015). The immunoregulator soluble TACI is released by ADAM10 and reflects B cell activation in autoimmunity. *J Immunol, 194*(2), 542-552. doi:10.4049/jimmunol.1402070

Huang, A. C., Postow, M. A., Orlowski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., . . . Wherry, E. J. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature, 545*(7652), 60-65. doi:10.1038/nature22079

Hughes, J., Vudattu, N., Sznol, M., Gettinger, S., Kluger, H., Lupsa, B., & Herold, K. C. (2015). Precipitation of autoimmune diabetes with anti-PD-1 immunotherapy. *Diabetes Care, 38*(4), e55-57. doi:10.2337/dc14-2349

Hugo, W., Zaretsky, J. M., Sun, L., Song, C., Moreno, B. H., Hu-Lieskovan, S., . . . Lo, R. S. (2016). Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell, 165*(1), 35-44. doi:10.1016/j.cell.2016.02.065

Hussaini, S., Chehade, R., Boldt, R. G., Raphael, J., Blanchette, P., Maleki Vareki, S., & Fernandes, R. (2021). Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors - A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev, 92*, 102134. doi:10.1016/j.ctrv.2020.102134

Isnardi, I., Ng, Y. S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., . . . Meffre, E. (2010). Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood, 115*(24), 5026-5036. doi:10.1182/blood-2009-09-243071

Kampa, M., Notas, G., Stathopoulos, E. N., Tsapis, A., & Castanas, E. (2020). The TNFSF Members APRIL and BAFF and Their Receptors TACI, BCMA, and BAFFR in Oncology, With a Special Focus in Breast Cancer. *Front Oncol, 10*, 827. doi:10.3389/fonc.2020.00827

Karagiannis, P., Villanova, F., Josephs, D. H., Correa, I., Van Hemelrijck, M., Hobbs, C., . . . Karagiannis, S. N. (2015). Elevated IgG4 in patient circulation is associated with the risk of disease progression in melanoma. *Oncoimmunology, 4*(11), e1032492. doi:10.1080/2162402X.2015.1032492

Khan, A. Q., Travers, J. B., & Kemp, M. G. (2018). Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environ Mol Mutagen, 59*(5), 438-460. doi:10.1002/em.22176

Khlaiphuengsin, A., Chuaypen, N., Sodsai, P., Buranapraditkun, S., Boonpiyathad, T., Hirankarn, N., & Tangkijvanich, P. (2020). Decreased of BAFF-R expression and B cells maturation in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol, 26*(20), 2645-2656. doi:10.3748/wjg.v26.i20.2645

Khoja, L., Day, D., Wei-Wu Chen, T., Siu, L. L., & Hansen, A. R. (2017). Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann Oncol, 28*(10), 2377-2385. doi:10.1093/annonc/mdx286

Kobayashi, T., Iwama, S., Yasuda, Y., Okada, N., Tsunekawa, T., Onoue, T., . . . Arima, H. (2018). Patients With Antithyroid Antibodies Are Prone To Develop Destructive Thyroiditis by Nivolumab: A Prospective Study. *J Endocr Soc, 2*(3), 241-251. doi:10.1210/js.2017-00432

Kreuzaler, M., Rauch, M., Salzer, U., Birmelin, J., Rizzi, M., Grimbacher, B., . . . Eibel, H. (2012). Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol, 188*(1), 497-503. doi:10.4049/jimmunol.1102321

Kugel, C. H., Douglass, S. M., Webster, M. R., Kaur, A., Liu, Q., Yin, X., . . . Weeraratna, A. T. (2018). Age Correlates with Response to Anti-PD1, Reflecting Age-Related Differences in Intratumoral Effector and Regulatory T-Cell Populations. *Clin Cancer Res, 24*(21), 5347-5356. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1116

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., . . . Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med, 373*(1), 23-34. doi:10.1056/NEJMoa1504030

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Lao, C. D., . . . Wolchok, J. D. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med, 381*(16), 1535-1546. doi:10.1056/NEJMoa1910836

Laurent, S. A., Hoffmann, F. S., Kuhn, P. H., Cheng, Q., Chu, Y., Schmidt-Supprian, M., . . . Meinl, E. (2015). γ-Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nat Commun, 6*, 7333. doi:10.1038/ncomms8333

Lee, J. H., Long, G. V., Boyd, S., Lo, S., Menzies, A. M., Tembe, V., . . . Rizos, H. (2017). Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol, 28*(5), 1130-1136. doi:10.1093/annonc/mdx026

Leiter, U., Keim, U., & Garbe, C. (2020). Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. *Adv Exp Med Biol, 1268*, 123-139. doi:10.1007/978-3-030-46227-7_6

Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., . . . Libra, M. (2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol, 52*(4), 1071-1080. doi:10.3892/ijo.2018.4287

Lewis, M. G., Ikonopisov, R. L., Nairn, R. C., Phillips, T. M., Fairley, G. H., Bodenham, D. C., & Alexander, P. (1969). Tumour-specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of the disease. *Br Med J, 3*(5670), 547-552. doi:10.1136/bmj.3.5670.547

Lin, Z., & Süsskind, D. (2021). Exploring the role of BAFF as biomarker in the detection of uveal melanoma metastases. *J Cancer Res Clin Oncol, 147*(5), 1389-1405. doi:10.1007/s00432-021-03555-0

Liu, C., Richard, K., Wiggins, M., Zhu, X., Conrad, D. H., & Song, W. (2016). CD23 can negatively regulate B-cell receptor signaling. *Sci Rep, 6*, 25629. doi:10.1038/srep25629

Liu, W., Stachura, P., Xu, H. C., Váraljai, R., Shinde, P., Umesh Ganesh, N., . . . Pandyra, A. A. (2021). BAFF attenuates immunosuppressive monocytes in the melanoma tumor microenvironment. *Cancer Res*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-1171

Long, G. V., Flaherty, K. T., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., . . . Grob, J. J. (2017). Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol, 28*(7), 1631-1639. doi:10.1093/annonc/mdx176

Lynch, K. T., Young, S. J., Meneveau, M. O., Wages, N. A., Engelhard, V. H., Slingluff, C. L., & Mauldin, I. S. (2021). Heterogeneity in tertiary lymphoid structure B-cells correlates with patient survival in metastatic melanoma. *J Immunother Cancer, 9*(6). doi:10.1136/jitc-2020-002273

Mammen, A. L., Rajan, A., Pak, K., Lehky, T., Casciola-Rosen, L., Donahue, R. N., . . . Gulley, J. L. (2019). Pre-existing antiacetylcholine receptor autoantibodies and B cell lymphopaenia are associated with the development of myositis in patients with thymoma treated with avelumab, an immune checkpoint inhibitor targeting programmed death-ligand 1. *Ann Rheum Dis, 78*(1), 150-152. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213777

Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., Weenig, R. H., Pockaj, B. A., Bardia, A., . . . Center, M. S. G. o. t. M. C. C. (2007). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc, 82*(3), 364-380. doi:10.4065/82.3.364

Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Geukes Foppen, M., Yuan, J., Postow, M. A., Wong, P., . . . Weide, B. (2016). Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res, 22*(12), 2908-2918. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2412

Mays, S. R., & Nelson, B. R. (1999). Current therapy of cutaneous melanoma. *Cutis, 63*(5), 293-298.

Memon, A., Bannister, P., Rogers, I., Sundin, J., Al-Ayadhy, B., W. James, P., & McNally, R. J. Q. (2021). Changing epidemiology and age-specific incidence of cutaneous malignant melanoma in England: An analysis of the national cancer registration data by age, gender and anatomical site, 1981-2018. *2*, 100024. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100024

Moreira, R. S., Bicker, J., Musicco, F., Persichetti, A., & Pereira, A. M. P. T. (2020). Anti-PD-1 immunotherapy in advanced metastatic melanoma: State of the art and future challenges. *Life Sci, 240*, 117093. doi:10.1016/j.lfs.2019.117093

Müller-Winkler, J., Mitter, R., Rappe, J. C. F., Vanes, L., Schweighoffer, E., Mohammadi, H., . . . Tybulewicz, V. L. J. (2021). Critical requirement for BCR, BAFF, and BAFFR in memory B cell survival. *J Exp Med, 218*(2). doi:10.1084/jem.20191393

Nakamura, Y., Kitano, S., Takahashi, A., Tsutsumida, A., Namikawa, K., Tanese, K., . . . Yamazaki, N. (2016). Nivolumab for advanced melanoma: pretreatment prognostic factors and early outcome markers during therapy. *Oncotarget, 7*(47), 77404-77415. doi:10.18632/oncotarget.12677

Nakamura, Y., Tanaka, R., Maruyama, H., Ishitsuka, Y., Okiyama, N., Watanabe, R., . . . Fujisawa, Y. (2019). Correlation between blood cell count and outcome of melanoma patients treated with anti-PD-1 antibodies. *Jpn J Clin Oncol, 49*(5), 431-437. doi:10.1093/jjco/hyy201

Nosrati, A., Tsai, K. K., Goldinger, S. M., Tumeh, P., Grimes, B., Loo, K., . . . Daud, A. (2017). Evaluation of clinicopathological factors in PD-1 response: derivation and validation of a prediction scale for response to PD-1 monotherapy. *Br J Cancer, 116*(9), 1141-1147. doi:10.1038/bjc.2017.70

O'Connor, B. P., Raman, V. S., Erickson, L. D., Cook, W. J., Weaver, L. K., Ahonen, C., . . . Noelle, R. J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med, 199*(1), 91-98. doi:10.1084/jem.20031330

Olsen, C. M., Green, A. C., Pandeya, N., & Whiteman, D. C. (2019). Trends in Melanoma Incidence Rates in Eight Susceptible Populations through 2015. *J Invest Dermatol, 139*(6), 1392-1395. doi:10.1016/j.jid.2018.12.006

Orlov, S., Salari, F., Kashat, L., & Walfish, P. G. (2015). Induction of painless thyroiditis in patients receiving programmed death 1 receptor immunotherapy for metastatic malignancies. *J Clin Endocrinol Metab, 100*(5), 1738-1741. doi:10.1210/jc.2014-4560

Ou, X., Xu, S., & Lam, K. P. (2012). Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A, 109*(38), 15401-15406. doi:10.1073/pnas.1200386109

Pistillo, M. P., Fontana, V., Morabito, A., Dozin, B., Laurent, S., Carosio, R., . . . (IMI), I. M. I. (2019). Soluble CTLA-4 as a favorable predictive biomarker in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab: an Italian melanoma intergroup study. *Cancer Immunol Immunother, 68*(1), 97-107. doi:10.1007/s00262-018-2258-1

Ramos-Casals, M., Brahmer, J. R., Callahan, M. K., Flores-Chávez, A., Keegan, N., Khamashta, M. A., . . . Suárez-Almazor, M. E. (2020). Immune-related adverse

events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers, 6*(1), 38. doi:10.1038/s41572-020-0160-6

Rashid, S., & Tsao, H. (2021). Recognition, Staging, and Management of Melanoma. *Med Clin North Am, 105*(4), 643-661. doi:10.1016/j.mcna.2021.04.005

Reinhardt, M. J., Joe, A. Y., Jaeger, U., Huber, A., Matthies, A., Bucerius, J., . . . Tüting, T. (2006). Diagnostic performance of whole body dual modality 18F-FDG PET/CT imaging for N- and M-staging of malignant melanoma: experience with 250 consecutive patients. *J Clin Oncol, 24*(7), 1178-1187. doi:10.1200/JCO.2005.03.5634

Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Dudley, M. E., . . . Rosenberg, S. A. (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol, 29*(7), 917-924. doi:10.1200/JCO.2010.32.2537

Rothermel, L. D., Sarnaik, A. A., Khushalani, N. I., & Sondak, V. K. (2019). Current Immunotherapy Practices in Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am, 28*(3), 403-418. doi:10.1016/j.soc.2019.02.001

Sabel, M. S., & Wong, S. L. (2009). Review of evidence-based support for pretreatment imaging in melanoma. *J Natl Compr Canc Netw, 7*(3), 281-289. doi:10.6004/jnccn.2009.0021

Sakakida, T., Ishikawa, T., Chihara, Y., Harita, S., Uchino, J., Tabuchi, Y., . . . Takayama, K. (2020). Safety and efficacy of PD-1/PD-L1 blockade in patients with preexisting antinuclear antibodies. *Clin Transl Oncol, 22*(6), 919-927. doi:10.1007/s12094-019-02214-8

Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., . . . Lee, F. E. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol, 10*, 2458. doi:10.3389/fimmu.2019.02458

Satoguina, J. S., Weyand, E., Larbi, J., & Hoerauf, A. (2005). T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol, 174*(8), 4718-4726. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4718

Schachter, J., Ribas, A., Long, G. V., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., . . . Robert, C. (2017). Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet, 390*(10105), 1853-1862. doi:10.1016/S0140-6736(17)31601-X

Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J. J., Halpern, A., . . . Hauschild, A. (2015). Melanoma. *Nat Rev Dis Primers, 1*, 15003. doi:10.1038/nrdp.2015.3

Schadendorf, D., Hodi, F. S., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., . . . Wolchok, J. D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol, 33*(17), 1889-1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736

Selby, M. J., Engelhardt, J. J., Quigley, M., Henning, K. A., Chen, T., Srinivasan, M., & Korman, A. J. (2013). Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res, 1*(1), 32-42. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0013

Selitsky, S. R., Mose, L. E., Smith, C. C., Chai, S., Hoadley, K. A., Dittmer, D. P., . . . Vincent, B. G. (2019). Prognostic value of B cells in cutaneous melanoma. *Genome Med, 11*(1), 36. doi:10.1186/s13073-019-0647-5

Shah, N., Chari, A., Scott, E., Mezzi, K., & Usmani, S. Z. (2020). B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia, 34*(4), 985-1005. doi:10.1038/s41375-020-0734-z

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin, 71*(1), 7-33. doi:10.3322/caac.21654

Smulski, C. R., & Eibel, H. (2018). BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front Immunol, 9*, 2285. doi:10.3389/fimmu.2018.02285

Spatz, A., Cook, M. G., Elder, D. E., Piepkorn, M., Ruiter, D. J., & Barnhill, R. L. (2003). Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. *Eur J Cancer, 39*(13), 1861-1865. doi:10.1016/s0959-8049(03)00325-3

Stowman, A. M., Hickman, A. W., Mauldin, I. S., Mahmutovic, A., Gru, A. A., & Slingluff, C. L. (2018). Lymphoid aggregates in desmoplastic melanoma have features of tertiary lymphoid structures. *Melanoma Res, 28*(3), 237-245. doi:10.1097/CMR.0000000000000439

Sznol, M., Postow, M. A., Davies, M. J., Pavlick, A. C., Plimack, E. R., Shaheen, M., . . . Robert, C. (2017). Endocrine-related adverse events associated with immune checkpoint blockade and expert insights on their management. *Cancer Treat Rev, 58*, 70-76. doi:10.1016/j.ctrv.2017.06.002

Tanaka, R., Okiyama, N., Okune, M., Ishitsuka, Y., Watanabe, R., Furuta, J., . . . Fujimoto, M. (2017). Serum level of interleukin-6 is increased in nivolumab-associated psoriasiform dermatitis and tumor necrosis factor-α is a biomarker of nivolumab recativity. *J Dermatol Sci, 86*(1), 71-73. doi:10.1016/j.jdermsci.2016.12.019

Tarhini, A. A., Zahoor, H., Lin, Y., Malhotra, U., Sander, C., Butterfield, L. H., & Kirkwood, J. M. (2015). Baseline circulating IL-17 predicts toxicity while TGF-β1 and IL-10 are prognostic of relapse in ipilimumab neoadjuvant therapy of melanoma. *J Immunother Cancer, 3*, 39. doi:10.1186/s40425-015-0081-1

Taylor, R. C., Patel, A., Panageas, K. S., Busam, K. J., & Brady, M. S. (2007). Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol, 25*(7), 869-875. doi:10.1200/JCO.2006.08.9755

Teulings, H. E., Limpens, J., Jansen, S. N., Zwinderman, A. H., Reitsma, J. B., Spuls, P. I., & Luiten, R. M. (2015). Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol, 33*(7), 773-781. doi:10.1200/JCO.2014.57.4756

Thorarinsdottir, K., Camponeschi, A., Cavallini, N., Grimsholm, O., Jacobsson, L., Gjertsson, I., & Mårtensson, I. L. (2016). CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. *Clin Exp Immunol, 185*(2), 252-262. doi:10.1111/cei.12795

Thorarinsdottir, K., Camponeschi, A., Gjertsson, I., & Mårtensson, I. L. (2015). CD21 -/low B cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease. *Scand J Immunol, 82*(3), 254-261. doi:10.1111/sji.12339

Tsao, H., Bevona, C., Goggins, W., & Quinn, T. (2003). The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol, 139*(3), 282-288. doi:10.1001/archderm.139.3.282

Tucker, M. A. (2009). Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am, 23*(3), 383-395, vii. doi:10.1016/j.hoc.2009.03.010

Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J., Robert, L., . . . Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature, 515*(7528), 568-571. doi:10.1038/nature13954

Valpione, S., Pasquali, S., Campana, L. G., Piccin, L., Mocellin, S., Pigozzo, J., & Chiarion-Sileni, V. (2018). Sex and interleukin-6 are prognostic factors for autoimmune toxicity following treatment with anti-CTLA4 blockade. *J Transl Med, 16*(1), 94. doi:10.1186/s12967-018-1467-x

Van Allen, E. M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S. A., Blank, C., Zimmer, L., . . . Garraway, L. A. (2015). Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science, 350*(6257), 207-211. doi:10.1126/science.aad0095

van de Veen, W., Globinska, A., Jansen, K., Straumann, A., Kubo, T., Verschoor, D., . . . Akdis, M. (2020). A novel proangiogenic B cell subset is increased in cancer and chronic inflammation. *Sci Adv, 6*(20), eaaz3559. doi:10.1126/sciadv.aaz3559

Warnatz, K., Salzer, U., Rizzi, M., Fischer, B., Gutenberger, S., Böhm, J., . . . Eibel, H. (2009). B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A, 106*(33), 13945-13950. doi:10.1073/pnas.0903543106

Weber, J., Gibney, G., Kudchadkar, R., Yu, B., Cheng, P., Martinez, A. J., . . . Chen, Y. A. (2016). Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab. *Cancer Immunol Res, 4*(4), 345-353. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0193

Weber, J. S., D'Angelo, S. P., Minor, D., Hodi, F. S., Gutzmer, R., Neyns, B., . . . Larkin, J. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol, 16*(4), 375-384. doi:10.1016/S1470-2045(15)70076-8

Weide, B., Martens, A., Hassel, J. C., Berking, C., Postow, M. A., Bisschop, K., . . . Wolchok, J. D. (2016). Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clin Cancer Res, 22*(22), 5487-5496. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0127

Weinmann, S. C., & Pisetsky, D. S. (2019). Mechanisms of immune-related adverse events during the treatment of cancer with immune checkpoint inhibitors. *Rheumatology (Oxford), 58*(Suppl 7), vii59-vii67. doi:10.1093/rheumatology/kez308

Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. (2016). The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol, 136*(6), 1161-1171. doi:10.1016/j.jid.2016.01.035

Wilgenhof, S., Du Four, S., Vandenbroucke, F., Everaert, H., Salmon, I., Liénard, D., . . . Neyns, B. (2013). Single-center experience with ipilimumab in an

expanded access program for patients with pretreated advanced melanoma. *J Immunother, 36*(3), 215-222. doi:10.1097/CJI.0b013e31828eed39

Willsmore, Z. N., Harris, R. J., Crescioli, S., Hussein, K., Kakkassery, H., Thapa, D., . . . Karagiannis, S. N. (2020). B Cells in Patients With Melanoma: Implications for Treatment With Checkpoint Inhibitor Antibodies. *Front Immunol, 11*, 622442. doi:10.3389/fimmu.2020.622442

Wolchok, J. D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J. J., Cowey, C. L., . . . Larkin, J. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med, 377*(14), 1345-1356. doi:10.1056/NEJMoa1709684

Yamazaki, N., Kiyohara, Y., Uhara, H., Iizuka, H., Uehara, J., Otsuka, F., . . . Tahara, H. (2017). Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci, 108*(5), 1022-1031. doi:10.1111/cas.13226

Yarchoan, M., Ho, W. J., Mohan, A., Shah, Y., Vithayathil, T., Leatherman, J., . . . Jaffee, E. M. (2020). Effects of B cell-activating factor on tumor immunity. *JCI Insight, 5*(10). doi:10.1172/jci.insight.136417

Yiwen, Z., Shilin, G., Yingshi, C., Lishi, S., Baohong, L., Chao, L., . . . Hui, Z. (2016). Efficient generation of antigen-specific CTLs by the BAFF-activated human B Lymphocytes as APCs: a novel approach for immunotherapy. *Oncotarget, 7*(47), 77732-77748. doi:10.18632/oncotarget.12792

Yuan, T. A., Lu, Y., Edwards, K., Jakowatz, J., Meyskens, F. L., & Liu-Smith, F. (2019). Race-, Age-, and Anatomic Site-Specific Gender Differences in Cutaneous Melanoma Suggest Differential Mechanisms of Early- and Late-Onset Melanoma. *Int J Environ Res Public Health, 16*(6). doi:10.3390/ijerph16060908

Yuan, T. A., Yourk, V., Farhat, A., Guo, K. L., Garcia, A., Meyskens, F. L., & Liu-Smith, F. (2020). A Possible Link of Genetic Variations in ER/IGF1R Pathway and Risk of Melanoma. *Int J Mol Sci, 21*(5). doi:10.3390/ijms21051776

Zhang, C., Zhang, G., Sun, N., Zhang, Z., Luo, Y., Che, Y., . . . He, J. (2020). Comprehensive molecular analyses of a TNF family-based signature with regard to prognosis, immune features, and biomarkers for immunotherapy in lung adenocarcinoma. *EBioMedicine, 59*, 102959. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102959

Zhou, J., Mahoney, K. M., Giobbie-Hurder, A., Zhao, F., Lee, S., Liao, X., . . . Hodi, F. S. (2017). Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res, 5*(6), 480-492. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0329

Zuazo, M., Gato-Cañas, M., Llorente, N., Ibañez-Vea, M., Arasanz, H., Kochan, G., & Escors, D. (2017). Molecular mechanisms of programmed cell death-1 dependent T cell suppression: relevance for immunotherapy. *Ann Transl Med, 5*(19), 385. doi:10.21037/atm.2017.06.11

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AJCC: American Joint Committee of Cancer
APRIL: A proliferation-inducing ligand
ASIP: Agouti signalling protein
ASH: Antijen-sunan hücre
BAFF: B cell-activating factor
BCMA: B cell maturation antigen
BHR: B hücre reseptörü
BT: Bilgisayarlı tomografi
CDKN2A: Cyclindependent kinase inhibitor 2A
CDK4: Cyclin-dependent kinase 4
CT: Kanser-testis antijenleri
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
CR: Complete remission
EDNRB: Endothelin receptor type B
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENU: Ekstra nodal uzantı
FDA: Food and drug administration
GC: Germinal merkez
gp100: Melanoma-associated glycoprotein antigen family
ICI: Immune checkpoint inhibitor
ICOS: Inducible T cell co-stimulator
IG1R: insülin-benzeri büyüme faktör 1 reseptörü
IL: Interleukin
irAEs: İmmün-ilişkili yan etkiler
LDH: Laktat dehidrogenaz
N: Lenf nodları
M: Uzak metastaz
MAPK: melanomalar mitogen-activated protein kinase
MC1R: Melanocortin-1 receptor
MİA: Melanoma-ilişkili antijenler
MM: Malign Melanoma
MR: Manyetik resonans
MSH: Melanocyte stimulating hormone)
MSS: Merkezi sinir sistemi
OCA2: Oculocutaneous albinism II
ORR: Objektif yanıt oranı
OS: genel sağ kalım
PAX3: paired box 3
PD: progressive disease
PD-1: Programmed Cell Death 1

PET: Pozitron emisyon tomografisi
PFS: Progresyonsuz sağ kalım
PKMH: Periferik kan mononükleer hücre
PR: Partial remission
RGP: Radyal büyüme fazı
SD: Stable disease
SLC45A2: Solute carrier family 45 member 2
SLN: Sentinel lenf nodu
stDNA: Dolaşan tümör DNA'sı
STL: Sitotoksik T lenfosit
T: Primer tümör
TACI*:* Transmembrane activator and CAML interactor
Th17: Tip 17 yardımcı
THR: T hücre reseptörü
TIB*:* tümör infiltre B
TIL: Tümör-infiltre lenfositler
TME Tümör mikroçevresi
TNF: Tümör nekroz faktör
Treg: Regulatory T-cell
TYR: Tyrosinase)
TYRP1: Tyrosinase-related protein 1
UV: Ultraviyole radyasyona
VGP: vertikal büyüme fazı
YV: Yanıt veren
YZ: Yanıtsız

8. EKLER

EK 1

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Malign melanoma olgularında yeni B hücre alt gruplarının araştırılması

Karar No: 2018-13/ 26 **Tarih: 10 Temmuz 2018**

KARAR BİLGİLERİ

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak değerlendirildi.
1-Araştırmanın yapılmasının uygun olduğuna,
2- Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formunun kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına,
3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,
4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine oybirliği ile karar verildi.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒
Prof.Dr.Mehmet CANSEV Üye	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	U.Ü.T.F. Halk Sağlığı AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç.Dr.Pınar VURAL Üye	Psikiyatri	U.Ü.T.F. Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doktor Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	U.Ü.T.F. Biyofizik AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	UÜ.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Selen MİĞAL Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐

*:Toplantıda Bulunma

Sayfa 2

EKOS
Ethikkommission
Ostschweiz

Ethikkommission, Kantonsspital, Haus 37, 9007 St.Gallen

Intern
Prof. Dr. med. Lukas Flatz
Kantonsspital St. Gallen
Klinik für Dermatologie/ Allergologie
Rorschacher Strasse 95
9007 St. Gallen

Dr. med. Susanne Driessen
Präsidentin

Ethikkommission Ostschweiz
Kantonsspital
Haus 37
9007 St. Gallen
T 071 494 24 91
T 071 494 24 92 Sekretariat
T 071 494 25 13 wissenschaftl. Sekretariat
F 071 494 63 44
susanne.driessen@kssg.ch
sekretariat.ekos@kssg.ch
www.sg.ch/home/gesundheit/ethikkommission.html

St. Gallen, 04. Juli 2016 SD/mz

Verfügung der Ethikkommission Ostschweiz

Titel des Forschungsprojektes Studiencode: **BASEC Nr.** 2016-00998 *
EKOS 16/079

BASEC Nr. 2016-00998
Immunomonitoring of patients before, during and after immunotherapy to predict anti-tumor response in melanoma and non-small cell lung cancer
*** Bitte BASEC Nr. in allen zukünftigen Korrespondenzen erwähnen**

Projektleiter (verantwortliche/r Studienleiter/in am Versuchsstandort)

Name, Vorname, Titel:	Flatz, Lukas, Prof. Dr. med.
Funktion:	Oberarzt mbF
Adresse:	Rorschacher Strasse 95, 9007 St.Gallen

Sponsor

Name	s. oben
Adresse:	s. oben

Die Ethikkommission stützt ihre Beurteilung auf die Unterlagen, wie sie aufgeführt sind:

☐ im beiliegenden Begleitbrief vom ☐
☒ Eingereichte Unterlagen: gemäss Research Project Application Form vom 20.6.16 via BASEC
☐ interne Stellungnahme der KEK vom ☐

Die Verfügung wurde am 21.06.2016 eröffnet.

9. TEŞEKKÜR

Desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, doktora sürecimde beni her zaman yüreklendiren, motivasyonumu üst düzeyde tutmamı ve yurt dışı tecrübesi kazanmamı sağlayan saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Barbaros ORAL'a, beni İsviçre Allerji ve Astım Enstitüsü'ndeki araştırma grubuna kabul ederek, engin bilgilerini ve zamanını esirgemeyen tez çalışmamı gerçekleştirebilmem için gerekli ortamı bana koşulsuz sunan, bir bilim insanı olarak vizyonumu genişletmemi sağladığı için sevgili Prof. Dr. Mübeccel AKDİŞ'e en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İmmünolojiye bakış açımı ve kendimi geliştirmemde bana yol gösteren, akademik bilgi düzeyinde şu anki halime gelmemde büyük payı olan, beraber çalışma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı saydığım saygıdeğer Prof. Dr. Cezmi AKDİŞ'e, laboratuvarda keyifle çalıştığım, pek çok engeli birlikte aştığım, engin bilgisinden ve hayata bakışından ders aldığım, tecrübesinden faydalandığım, hiçbir yardımını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Dr. Willem VAN DE VEEN'e, klinik katkılarından dolayı Prof. Dr. Lukas FLATZ ve ekibine çok teşekkür ederim.

Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji laboratuvarında pek çok tanı testini öğrenme fırsatı sunan ve zorlu koşullarda mücadele etmeyi öğreten Prof. Dr. Ferah BUDAK'a ve değerli çalışanları Figen AYMAK, Deniz GÜLKAYA ve Özge AKTAŞ'a, ayrıca Dr. Haldun Bal ve Dr. İzel Yılmaz'a teşekkür ederim.

Hem bilimsel hem de sosyal hayatımızdaki sohbetlerinden çok keyif aldığım arkadaşlarım Msc. Daniel Burla, Msc. David Mirrer, Doç. Dr. İsmail Öğülür'e ve diğer arkadaşlarıma yanımda oldukları ve beni destekledikleri için teşekkür ederim.

Doktora süresi boyunca, bana anlayış ve sabır göstererek katlanan ve her an yanımda olan en büyük desteği aldığım annem ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

Laçin Cevhertaş, lise öğrenimini 2004 yılında Bursa Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. Aynı yıl üniversite eğitimine başladığı Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü 2009 yılında bitirmiştir. İmmünoloji yüksek lisansını 2015 yılında Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nde İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan almıştır. 2016 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başlamış ve bu süre zarfında konuk araştırmacı olarak İsviçre Allerji ve Astım enstitüsü'nde çeşitli projelerde çalışmıştır. Ayrıca yurt içi ve uluslararası indekslerde taranan dergilerde yer alan derleme ve araştırma makaleleri bulunmaktadır. Bursa'da ikamet etmektedir.