



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MALİGN PLEVRAL MEZOTELYOMALARDA
PD-L1, PD-L2 VE CTLA-4
EKSPRESYONLARININ İMMÜNOHİSTOKİMYA VE
REAL-TİME PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. FATMA ŞULE KUTLAR DURSUN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR-2018



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MALİGN PLEVRA MEZOTELYOMALARDA
PD-L1, PD-L2 VE CTLA-4
EKSPRESYONLARININ İMMÜNOHİSTOKİMYA VE
REAL-TİME PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. FATMA ŞULE KUTLAR DURSUN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Dr. Öğr. Üyesi ULAŞ ALABALIK

DİYARBAKIR-2018

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilimsel ve mesleki deneyimleri başta olmak üzere her konuda yol gösterici olan başta tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Dr. Ulaş ALABALIK'a, diğer hocalarım Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM, Doç. Dr. Uğur FIRAT, Doç. Dr. Selver ÖZŞENER ÖZEKİNCİ, Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur KELEŞ, Dr. Öğr. Üyesi Gül TÜRKÇÜ, Dr. Öğr. Üyesi İbrahim İBİLOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Gülay AYDOĞDU, Dr. Öğr. Üyesi Engin Deniz YILMAZ'a,

İstatistiksel değerlendirmede yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi İsmail YILDIZ'a,

Klinik verilerde ve istatistiksel değerlendirmede yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Küçüköner'e,

Genetik konularda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Halil YILDIRIM'a,

Beraber çalışmaktan ve tanışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uz. Dr. Yahya AVCI, Uz. Dr. Şeyhmus KAYA, Uz. Dr. Arif HAMİDİ, Uz. Dr. Berat SOYLU, Dr. Mansur ALA, Dr. Nursel COŞKUNSEL, Arş. Gör. Dr. Mustafa NACİR, Arş. Gör. Dr. Gülden YILDIZ KAYA, Arş. Gör. Dr. Özge YAMAN COŞKUN, Arş. Gör. Dr. Hatice SERTAKAN, Arş. Gör. Dr. Medine DİCLELİ ve Arş. Gör. Dr. Tuğçem BOLOVA'ya,

Çalışmamın kesit alma işlemi, immünohistokimya ve DNA izolasyon aşamalarında yardımcı olan arkadaşlarım teknisyen Neval TANIŞ ÖZDEMİR, Murat ÇETİNKAYA, Mesut KURTAY, Ali KARAL, biyolog Osman AKAMAN, biyolog Ali DEMİR ve kimyager Vedat YILDIRIM olmak üzere bölümümüzde çalışan tüm arkadaşlarıma,

Bu tezin hazırlanmasında maddi destek sağlayan “Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü (DÜBAP)”ne (TIP.17.004 no'lu proje),

Hayatımda olduğu gibi çalışmamda da bana rehberlik yapan, varlığıyla g bulduğum eşim İbrahim Hakkı'ya, prensesim Pamuk'a,

Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgilerini her daim hissettiğim anneme, babama ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.



ÖZET

Malign mezotelyoma %90 plevra olmak üzere, periton, perikardın seröz yüzeylerinden ve nadiren tunika vajinalisten gelişen bir tümördür. Malign plevral mezotelyoma etyolojisinde bilinen en önemli faktörler; asbest veya erionit lifleri ile temastır. Malign mezotelyoma üç temel histolojik formda görülür: epiteloid, sarkomatoid veya mikst (bifazik). Malign mezotelyoma hastalarının uzun süreli sağkalım oranı kötüdür. Bu durum immün kontrol noktalarını bloke eden antikörler gibi yeni tedavi yöntemlerini araştırmaya yönlendirmiştir.

İmmün kontrol noktaları, otoimmüniteden kaçınmak ve doku hasarını önlemek için bağışıklık sistemini kontrolden sorumludur. CTLA-4 (CD152), esas olarak T-hücrelerinde ve daha düşük oranda aktive edilmiş B-hücreleri, monositler, dendritik hücreler ve granüositlerde bulunan bir immün inhibitör reseptördür. Kanserde, ko-inhibitör yolakların baskınlığının tümörün immün sistem kontrolünden kaçınma özelliğini etkilediği gösterilmiştir. PD-1 (CD279), immünoglobülin süper ailesinin bir üyesidir. B7/CD28 kostimülatör reseptör ailesinden olan PD-1, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1; CD274) ve programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2; CD273) 'ye bağlanarak T-hücre aktivasyonunu düzenler. PD-1 bağlanması, T-hücre proliferasyonunu, interferon- γ , tümör nekroz faktörü- α ve IL-2 üretimini inhibe eder ve T-hücre sağkalımını azaltır. PD-1, B7 ailesinin özellikle PD-L1 ve PD-L2 inhibitör moleküllerine bağlanır ve böylece otoimmüniteyi önler ve doku hasarından kaçınır.

Bu çalışmada malign plevral mezotelyoma hastalarında immün kontrol noktası reseptörlerinden CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu ve bu ekspresyonun tümör tipleri ile prognostik parametrelerle ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 2010 ile 2017 yılları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında değerlendirilen plevra biyopsi, dekortikasyon ve kitle eksizyon materyalleri arasından malign plevral mezotelyoma tanısı almış 50 olgu seçildi. Olguların Dünya Sağlık Örgütü Sınıflamasına göre 44'ü epiteloid tip, 1'i sarkomatoid tip, 5'i ise bifazik tipti. Tüm olgulara immünohistokimyasal ve Real-

Time PCR yöntemleri ile PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 çalışıldı. Hastaların ortalama sağkalım süreleri belirlendi. İmmünohistokimyasal ve Real Time-PCR çalışma sonuçları yaş, cinsiyet, histolojik alt tip ve ortalama sağkalım süreleri ile karşılaştırıldı. Grupların karşılaştırmalı analizinde Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleri, kategorik verilerde Ki-kare testi uygulandı.

İmmünohistokimyasal çalışma sonucunda histolojik alt tip ile CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. CTLA-4 ve PD-L1 immün ekspresyonu ile hastaların sağkalım süreleri arasında da anlamlı fark izlenmemiştir. Ortalama sağkalım süresi ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ($p=0,045$) izlenmiştir.

Real Time-PCR yöntemi ile yapılan çalışmada CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonları ile histolojik alt tip ve ortalama sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. İmmünohistokimyasal CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu ile Real Time-PCR yöntemi ile CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 overekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,004$, $p=0,001$ ve $p=0,029$).

Literatürde malign plevral mezotelyoma hastalarında PD-L1 ekspresyon derecesinin, özellikle sarkomatoid farklılaşması olan hastalarda arttığı ve kötü sağkalım ile ilişkisi olduğu görülmektedir. Çalışmamızda sağkalım ile anlamlı ilişki bulunmamasını sarkomatoid tip malign plevral mezotelyoma hasta sayımızın yetersiz olmasına bağlı olabileceğini düşündük. Ortalama sağkalım süresi ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmiş olup, sonuçlar literatürde yer alan az sayıdaki çalışma ile benzerdir ve PD-L2 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Literatürde CTLA-4 ekspresyonunun malign plevral mezotelyomada prognostik parametreler ile ilişkisini ortaya koyan veri çok sınırlıdır. Çalışmamızda CTLA-4 gen ekspresyonu ile malign plevral mezotelyoma histolojik alt tipleri ve ortalama sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Malign Plevral Mezotelyoma, PD-L1, PD-L2, CTLA-4

ABSTRACT

Malignant mesothelioma is a tumor developing from serous surfaces of pleura, which is a 90% possibility, peritoneum, pericardium and rarely from tunica vaginalis. The most important factors known in the etiology of malignant pleural mesothelioma are contact with asbestos or erionite fibers. Malignant mesothelioma is observed in three basic histological forms: epithelioid, sarcomatoid or mixed (biphasic). The long-term survival rate of malignant mesothelioma patients is poor. This has led to the search for new treatment methods, such as antibodies that block immunocontrol points.

Immuno-control points are responsible for controlling the immune system to avoid autoimmunity and prevent tissue damage. CTLA-4 (CD152) is an immunosuppressant receptor mainly found in T-cells and in less active B-cells, monocytes, dendritic cells, and granulocytes. The predominance of co-inhibitory pathways has been shown to affect the ability of the tumor to avoid immunosystem control in cancer. PD-1 (CD279) is a member of the immunoglobulin superfamily. PD-1 from the B7 / CD28 costimulatory receptor family regulates T-cell activation by binding to the programmed death ligand 1 (PD-L1; CD274) and the programmed death ligand 2 (PD-L2; CD273). PD-1 binding inhibits T-cell proliferation, interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-2 production and decreases T-cell survival. PD-1 binds to the PD-L1 and PD-L2 inhibitor molecules of the B7 family in particular, thus preventing autoimmunity and avoiding tissue damage.

In this study, we aimed to investigate the expression of CTLA-4, PD-L1 and PD-L2 immuno-control receptors in malignant pleural mesothelioma patients and the relationship between this expression and tumor types and prognostic parameters.

In our study, 50 patients with malignant pleural mesothelioma were selected from pleural biopsy, decortication and mass excision materials evaluated at Dicle University Faculty of Medicine in the Department of Pathology between 2010 and 2017. 44 cases were epithelioid type, 1 case was sarcomatoid type and 5 of the cases were biphasic type according to the classification by World Health Organization. In all cases, PD-L1, PD-L2 and CTLA-4 were studied by immunohistochemical and

Real-Time PCR methods. Mean survival times of the patients were determined. Immunohistochemical and RT-PCR study results were compared in terms of age, gender, histological subtype and mean survival times. Kruskal Wallis and Mann Whitney U tests were used for comparative analysis of the groups, and Chi-square test was administered for categorical data.

Immunohistochemical studies showed no statistically significant difference between histologic subtype and CTLA-4, PD-L1 and PD-L2 expression. There was no significant difference between the CTLA-4 and PD-L1 immuno-expression and the survival times of the patients as well. There was a statistically significant correlation between mean survival time and immunohistochemical PD-L2 expression ($p=0.045$).

There was no significant relationship between CTLA-4, PD-L1 and PD-L2 expressions and histological subtype and mean survival time in the study conducted with Real Time-PCR method. Immunohistochemical expression of CTLA-4, PD-L1 and PD-L2 was significantly correlated with CTLA-4, PD-L1 and PD-L2 overexpression by Real Time PCR method ($p = 0,004$, $p = 0,001$ and $p = 0,029$).

It is reported in the literature that the degree of PD-L1 expressions in patients with malignant pleural mesothelioma is increased in patients with sarcomatoid differentiation and is associated with poor survival. The lack of a significant relationship with survival in our study may be associated with the insufficient number of patients with sarcomatoid type malignant pleural mesothelioma. A statistically significant relationship was found between the mean survival time and immunohistochemical PD-L2 expression, and the results are similar to the limited number of studies in the literature, indicating that PD-L2 expression may be associated with good prognosis. In the literature, the data revealing the association of CTLA-4 expression with prognostic parameters in malignant pleural mesothelioma is very limited. In our study, there was no significant relationship between CTLA-4 gene expression and histological subtypes of malignant pleural mesothelioma and mean survival.

Key words: Malignant Pleural Mesothelioma, PD-L1, PD-L2, CTLA-4

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

APC:	Antijen sunan hücre
BAP1:	BRCA1 ilişkili protein-1
BT-PİB:	Bilgisayarlı tomografi rehberliğinde plevra iğne biyopsisi
BTT:	Bilgisayarlı toraks tomografisi
CDKN2A/ARF:	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A/alternatif reading frame
CEA:	Karsinoembriyonik antijen
CTLA-4:	Sitotoksik T lenfosit antijen-4
EMA:	Epitelyal membran antijen
EPP:	Ekstraplevral pnömonektomi
FDG:	Fluorodeoxyglucose
H&E:	Hematoksilen & Eozin
HDAC:	Histon deasetilazlar
HMGB1:	High-mobility group protein B1
IFN- γ :	İnterferon- γ
Ig:	İmmünoglobülin
IL-1 β :	İnterlökin 1-beta
IL-2:	İnterlökin-2
ITIM:	İmmüno-reseptör tirozin tabanlı inhibitör motif
ITSM:	İmmüno-reseptör tirozin tabanlı anahtar motifi
KHDAK:	Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu
mAb:	Monoklonal antikor
MHC:	Major histokompatibilite kompleksi
MM:	Malign mezotelyoma
MPM:	Malign plevral mezotelyoma
MRG:	Manyetik rezonans görüntüleme
P/D:	Plörektomi/dekortikasyon
PAS:	Periyodik asit-Schiff
PD-1:	Programlanmış hücre ölüm proteini 1
PD-L1:	Programlanmış ölüm ligandı 1
PD-L2:	Programlanmış ölüm ligandı 2

PET:	Pozitron emisyon tomografisi
RT:	Radyoterapi
SV 40:	Simian virüs 40
Tag:	Büyük T antijen
tag:	Küçük T antijen
TCR:	T hücre reseptörü
Teff:	Efektör T hücreleri
TIL:	Tümör-infiltrate eden lenfositler
TNF- α :	Tümör nekroz faktör-alfa
TNM:	Tümör-nod-metastaz
Treg:	Düzenleyici T hücreleri
TTF-1:	Tiroid transkripsiyon faktörü-1
VATS:	Videotorakoskopi

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Plevranın Yapısı ve Fonksiyonu.....	2
2.2. Plevranın Embriyolojisi.....	2
2.3. Plevranın Anatomisi	2
2.4. Plevranın Histolojisi	3
2.5. Plevra Tümörleri.....	3
2.6. Diffüz Malign Mezotelyoma	4
2.6.1. Epidemiyoloji.....	4
2.6.2. Etyoloji ve patogenez.....	5
2.6.3. Malign mezotelyoma gelişiminde rol oynayan kromozomal değişiklikler	10
2.6.4. Malign mezotelyoma patogenezinde epigenetik faktörler.....	11
2.6.5. Klinik ve laboratuvar	11
2.6.6. Radyolojik görüntüleme bulguları	12
2.6.7. Tanısal yöntemler	15
2.6.8. Makroskopik bulgular.....	16
2.6.9. Histopatolojik özellikler	17
2.6.10. Histokimyasal bulgular	24
2.6.11. İmmünohistokimyasal bulgular	25
2.6.12. Ultrastrüktürel inceleme	27
2.6.13. Ayırıcı tanı	28
2.6.14. Tümör yayılımı ve evreleme.....	30
2.6.15. Prognoz ve prediktif faktörler.....	32
2.6.16. Tedavi	32
2.7. Malign Mezotelyomada İmmün Kontrol Noktaları.....	33

2.7.1. Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4)	34
2.7.2. Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) ve spesifik ligandları programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) ile programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2).....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması	44
3.2. Parafin Blok Seçimi.....	44
3.3. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Deparafinizasyon İşlemi.....	44
3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma	45
3.4.1. İmmünohistokimyada kullanılan belirteçler ve çalışma protokolü.....	45
3.4.2. İmmünohistokimyasal Skorlama	46
3.5. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve PCR Analizi.....	47
3.5.1. RNA İzolasyonu	47
3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması.....	48
3.5.3. cDNA Sentezi	49
3.5.4. RT-PCR Analizi.....	49
3.6. İstatistiksel Yöntem	51
4. BULGULAR	52
4.1. Genel Bulgular	52
4.1.1. Histolojik Alt Tip.....	53
4.1.2. Cinsiyet	53
4.1.3. Yaş	54
4.1.4. Sağkalım Süresi	55
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	56
4.2.1. PD-L1 Ekspresyonu	57
4.2.2. PD-L2 Ekspresyonu	60
4.2.3. CTLA-4 Ekspresyonu	63
4.2.4. İmmünohistokimyasal PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 Ekspresyon Korelasyonu	66
4.3. Gen ekspresyon Bulguları	68
4.3.1. PD-L1 Gen Ekspresyonu	69
4.3.2. PD-L2 Gen Ekspresyonu	73
4.3.3. CTLA-4 Gen Ekspresyonu	78

4.2.4. Real-Time PCR ile PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 Gen Ekspresyon Korelasyonu	82
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇLAR	91
7. KAYNAKLAR	92



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Malign plevral mezotelyoma (MPM), plevrayı döşeyen mezotel hücrelerinden köken alan, plevranın en sık görülen primer malign tümörüdür (1, 2). Genellikle 50-70 yaş arası bireylerde görülmektedir. Görülme sıklığı yılda milyonda 1 ile 2,2 arasındadır (2, 3). MPM etyolojisinde yer alan en önemli etkenler, asbest veya erionit lifleri ile temastır (3). MPM kötü prognozlu bir hastalıktır. Tedavi görmemiş hastalarda medyan genel sağkalım süresi yaklaşık 10 aydır (4, 5). MPM'da kanıtlanmış tek tedavi yöntemi palyatif platin-antifolat kemoterapidir ve ortalama sağkalım yaklaşık 12 ay ile sonuçlanır. Bu durum, özellikle MPM'da henüz tam olarak aydınlanmamış immün kontrol noktalarını bloke eden antikorlar gibi yeni tedavi yöntemlerini araştırmaya yönlendirmiştir (6).

İmmün kontrol noktaları, otoimmüniteden kaçınmak ve doku hasarını önlemek için bağışıklık sistemini kontrolden sorumludur (7). Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4), T-hücrelerinde bulunan bir immün inhibitör reseptördür. T hücre reseptörünün (TCR) antijenik uyarımı ile T-hücresi aktivasyonunu düzenler. CTLA-4, antijen sunan hücre (APC)'deki B7 (CD80/CD86) ligandlarına bağlanarak etki eder. Normalde CD28 bu ligandlar ile T hücre yapım ve uyarımını sağlarken, CTLA-4 CD28 ko-stimülatör molekül ile olan etkileşimini bloke ederek T hücre fonksiyonunu baskılamaktadır (8-14).

Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1), B7/CD28 kostimülatör reseptör ailesinden transmembran bir proteindir. PD-1, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) ve programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2)'ye bağlanarak T-hücre aktivasyonunu düzenler (15-17). CTLA-4 sinyalleşmesine benzer şekilde, PD-1 bağlanması da T-hücre sağkalımını azaltır (17).

Tümör mikroçevresinde kansere bağlı immün supresyonda potansiyel rolü göz önüne alındığında, PD-1/PDL ve CTLA-4 yolaklarını hedeflemek cazip bir tedavi stratejisi gibi gözükmektedir. Biz de çalışmamızda MPM hastalarında immün kontrol noktası reseptörlerinden CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunu araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plevranın Yapısı ve Fonksiyonu

Plevra, akciğerleri sararak solunum hareketleri ile birbiri üzerinde kayan bir çift seröz zardır. Kalınlığı yaklaşık 30-40 mikron olup, iki membran arasında 10-20 µm genişliğinde plevral boşluk bulunur. Plevral boşluk, sağ ve sol boşluk halinde ayrı olmakla birlikte, nadiren de olsa tek boşluk olarak da görülebilir. Plevral boşluk içinde yaklaşık 0.1-0.2 mL/kg berrak görünümde sıvı vardır. Bu sıvı 1,5 g/dL'den az protein konsantrasyonuna sahiptir. Glikoz konsantrasyonu ve pH değeri kan düzeyi ile aynıdır. Ayrıca plevral sıvı 1500 adet hücre/µL hücre içerir. Bunların çoğu monositlerdir. Az miktarda lenfosit, makrofaj, mezotel hücresi, polimorfonükleer lökosit içerir. Eritrosit bulunmaz (18-21).

2.2. Plevranın Embriyolojisi

Plevral, perikardiyal ve peritoneal boşluklar gestasyonel dönemin üçüncü haftasından itibaren mezodermden şekillenmeye başlar. Primitif mezoderm bölünerek lateral ve medial olarak iki yaprak oluşturur. Lateral yaprak da içte bulunan splanknoplevra ile dışta bulunan somatoplevraya bölünerek iki adet kavite oluşturur. Üçüncü haftanın sonunda ventral gövde duvarının kapanmasıyla birlikte, embriyonun sefalokaudal eksenini boyunca uzanan bu iki kavite birleşir ve tek boşluk meydana gelir. Aynı zamanda oluşan kavite, mezotel hücreler ile kaplanır. Dokuzuncu haftada ventral somatoplevradan gelişen septum transversum ile dorsal somatoplevradan gelişen sağ/sol plöroperitoneal ve sağ/sol plöroperikardiyal membranlar ile plevral, perikardiyal ve peritoneal boşluklar son halini alır. Bu mezodermal boşlukların tam bölünememesiyle defekt, kist ve divertikül oluşabilir. Akciğerler geliştikçe plevraya doğru invajine olur ve splanknik mezodermden köken alan visseral plevra ile göğüs duvarı da somatik mezodermden köken alan paryetal plevra ile örtülür (22-24).

2.3. Plevranın Anatomisi

Plevra, akciğerleri ve interlober fissürleri döşeyen visseral plevra ile mediasten, diyafragma ve göğüs kafesinin iç yüzünü örten paryetal plevra olmak üzere iki membrandan oluşur. Paryetal plevra arteria intercostalis, arteria toracica

interna ve arteria phrenica superior'un, visseral plevra ise arteria bronchialis'in dalları ile beslenir. Aynı isimli venlere dökülürler (19, 24, 25).

Plevranın lenfatik drenajı birbirinden farklıdır. Paryetal plevrada mezotelyal tabakada stoma olarak isimlendirilen açıklıklar vardır. Bu açıklıklarlardan lakünalar aracılığıyla submezotelyal tabakadaki lenfatiklere drenaj sağlanır. Visseral plevrada stomata ve lakünalar bulunmaz, akciğer parankimine drene olur (25, 26).

Paryetal plevrada dokunma ve ısı, ağrı oluştururken, visseral plevranın ağrı duyusu yoktur. Paryetal plevra nervus intercostalis, nervus toracoabdominalis, nervus subcostalis ve nervus phrenicus'un dalları, visseral plevra plexus pulmonalis ile innerve olur (19, 24, 25).

2.4. Plevranın Histolojisi

Plevra histolojik olarak 5 tabakadan oluşur. Bunlar; mezotel hücre tabakası, submezotelyal bağ dokusu, yüzeyel elastik tabaka, gevşek bağ dokusu ve derin fibroelastik tabakadır.

Mezotel hücre tabakası, oval nükleuslu, yassı, kübik veya silindirik şekilde tek sıralı mezotel hücrelerinden oluşur. Ultrastrüktürel olarak 1-4µm kalınlığa ve 16-40µm çapa sahiptir. Boşluğa bakan yüzlerinde çok sayıda mikrovillus bulunur. Mikrovillusların uzunluğu 3µm'ye ulaşabilir. Visseral yüzey, paryetal yüzeye oranla daha fazla mikrovillus içerir. Paryetal plevranın mezotel hücreleri arasında bulunan stomalar 2-12µm genişliğindedir. Stoma plevral sıvı, protein ve hücrelerin geçişini sağlar.

Paryetal plevrada submezotelyal bağ dokusu düz iken visseral plevrada submezotelyal bağ doku akciğer parankimine doğru, parankime destek sağlayan septalar oluşturur. Yüzeyel elastik tabaka belirgin değildir. Gevşek bağ dokuda damar, sinir ve lenfatikler bulunur. Derin fibroelastik tabaka ise akciğer, diyafragma, mediasten veya göğüs duvarına sıkı bağlanmayı sağlar (20, 23, 24).

2.5. Plevra Tümörleri

Plevra tümörleri WHO 2015 sınıflamasına (Tablo 1) göre üç ana gruba ayrılır; mezotelyal tümörler, lenfoproliferatif hastalıklar ve mezenkimal tümörler (2).

Tablo 1: Plevra Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırması (WHO 2015)

MEZOTELYAL TÜMÖRLER

- ❖ Diffüz Malign Mezotelyoma
 - Epiteloid Mezotelyoma
 - Sarkomatoid Mezotelyoma
 - ◆ Desmoplastik Mezotelyoma
 - Bifazik Mezotelyoma
- ❖ Lokalize Malign Mezotelyoma
 - Epiteloid Mezotelyoma
 - Sarkomatoid Mezotelyoma
 - Bifazik Mezotelyoma
- ❖ İyi Diferansiye Papiller Mezotelyoma
- ❖ Adenomatoid Tümör

LENFOPROLİFERATİF

HASTALIKLAR

- ❖ Primer Effüzyon Lenfoması
- ❖ Kronik İnflamasyonla İlişkili Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma

MEZENKİMAL TÜMÖRLER

- ❖ Epiteloid Hemanjioendotelyoma
- ❖ Anjiosarkom
- ❖ Sinoviyal Sarkom
- ❖ Soliter Fibröz Tümör
 - Malign Soliter Fibröz Tümör
- ❖ Desmoid Tip Fibromatozis
- ❖ Kalsifiye Fibröz Tümör
- ❖ Desmoplastik Yuvarlak Hücreli Tümör

2.6. Diffüz Malign Mezotelyoma

Malign mezotelyoma (MM) %90 plevra olmak üzere, periton, perikardın seröz yüzeylerinden ve nadiren tunika vajinalisten gelişen bir tümördür. Malign plevral mezotelyoma (MPM), plevrayı döşeyen mezotel hücrelerinden köken alan, standart bir tedavisi olmayan, kötü prognozlu, plevranın en sık görülen primer malign tümörüdür (1-3, 27). MPM, ilk kez asbest ile ilişkili olarak Wagner ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (1, 2, 28).

2.6.1. Epidemiyoloji

MPM genellikle 50-70 yaş arası bireylerde görülmekle birlikte, nadiren çocuklarda da görülür. Dünyada MPM insidansı 20. yüzyıldan itibaren, endüstriyel

gelişme nedeniyle artmaya başlamıştır (2, 3). Görülme sıklığı yılda milyonda 1 ile 2,2 arasındadır. Ortalama yıllık MM riski, asbest temasından bağımsız olarak, erkekler için 1,3/100.000 kişi-yıl, kadınlar için 0,2/100.000 kişi-yıl olarak bildirilmiştir (29-31).

Ülkemizde 2000 yılında MPM hastalarında geniş bir epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında biyopsi ile tanı alan, 464 MPM, 42 peritoneal MM olmak üzere, 506 olgu toplanmıştır. Kadın/erkek oranı 0,7 (213/293), ortalama yaş 55,6 yıl (24-88 yaş) olarak saptanmıştır. Bu hastaların asbest veya erionit ile mesleki teması olmayıp, 30 hasta (%6) erionit köyünde yaşama öyküsüne sahiptir (32).

Asbest, ısıya ve strese dayanıklı olduğundan uzun yıllar tersane, tekstil, fren balatası, izolasyon, çatı kaplama, yanmaz maddeler ve gaz maskesi imalatında kullanılmıştır. Bu alanlarda çalışan işçilerde krokidolit, amozit ve krizotil tip asbest lifleri ile temas söz konusudur (29). Bu alanda çalışanların kıyafetleri yoluyla aile bireyleri ise meslek dışı olarak asbeste maruz kalabilirler (33). Ülkemizde bazı kırsal alanlarda evlerin çatısında ve duvarlarında ısı yalıtımı amacıyla yaygın olarak kullanılan aktoprakta da tremolit tipi asbest bulunmaktadır. Asbeste maruziyetin sık görüldüğü illerimiz; Sivas, Eskişehir, Kütahya, Bilecik, Yozgat ve Diyarbakır'dır (34, 35). Nevşehir-Ürgüp civarında kırsal kesimde yaşayanlarda erionit maruziyeti bildirilmiştir (36).

Asbest maruziyetinden yaklaşık 20-40 yıl sonra MPM ortaya çıkar (29, 31, 37). Bu yüzden mesleki temas öyküsü olanlarda genellikle 60 yaş üzerinde görülür. Ancak asbest ile çevresel temas doğumdan itibaren başladığı için, çevresel temasın yaygın olduğu ülkemizde MPM görülme yaşı 50-55 yaş civarındadır (30, 33, 36-38).

2.6.2. Etiyoloji ve patogenezi

MPM etiolojisinde bilinen en önemli faktörler; asbest veya erionit lifleri ile temastır (3).

2.6.2.1. Asbest ve erionit

MPM tanılı hastaların %70-90'ında asbest maruziyeti bildirilmiştir. Asbest, uzunluk/genişlik oranı üçten fazla, çapı 1µm olan lifsi bir mineraldir. Aynı zamanda bükülebilirlik özelliğine sahip olup, gerilme kuvvetine, ısıya ve kimyasal korozyona

dirençlidir. Asbest, serpentin ve amfibol olarak iki ana gruba ayrılır. Serpentin grubunda beyaz asbest olarak bilinen krizotil tip asbest, amfibol grubunda ise tremolit, aktinolit, amozit (kahverengi asbest), krokidolit (mavi asbest) ve antofilit tip asbest lifleri bulunur. Amfibol asbest lifleri daha uzun, sert ve biyolojik yıkıma daha dayanıklıdır. Liflerin uzunluğu artıp, eni azaldıkça karsinojenite özelliği de artar. Erionit lifleri fibröz bir yapıdadır. Erionit, asbest liflerinden daha fazla karsinojenik özelliktedir (39-41).

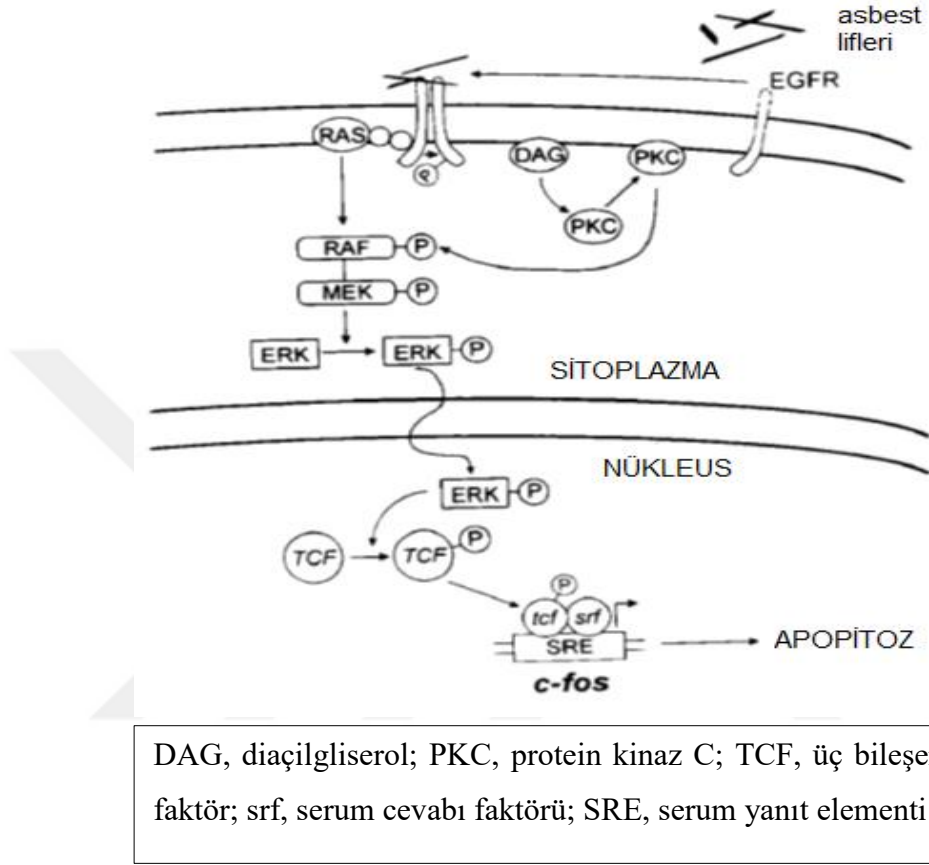
Asbest lifleri inhalasyon yoluyla alınır. Alveollere ulaşan asbest lifleri fagositoz ile atılmaya çalışılır. Burada iki senaryo devreye girer. İlki; lifin boyu alveoler makrofajın fagosit edebileceği kadar kısaysa, fagosit edilir ve mukosilier aktivite ile atılır. İkincisi; lifin boyu fagosit edilemeyecek kadar uzunsa veya lif çözünür özellikte değilse ya da lif fagosit edilebilecek kadar kısa ancak inhale edilen lif miktarı fagositoz kapasitesini aşıyorsa, fagosit edilemeyen lifler akciğerde birikmeye başlar. Biriken asbest lifleri lenfatikler aracılığıyla veya penetrasyon yoluyla plevraya ulaşır, fibrozis, plevral plak ve MPM'ya neden olabirirler (3).

Asbestin plevrada hangi mekanizma ile MPM'ya neden olduğu tam anlamıyla bilinmemektedir. Ancak 3 ana hipotez ileri sürülmektedir: (1) asbest liflerini fagosit eden makrofajlardan büyük miktarda serbest radikallerin salınmasına dayanan oksidatif stres teorisi, (2) hücre bölünmesi esnasında asbest liflerinin kromozomlara zarar verdiğini öngören kromozom bozucu bir teori ve (3) liflerin yüzeyinde yoğunlaşan karsinojenleri varsayan absorpsiyon teorisi (42).

Asbest, DNA hasarını direkt fiziksel etki ile veya inflamatuvar hücreler, mezotel hücreleri ve makrofajlardan asbeste yanıt olarak salınan reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri ile oluşturmaktadır. Asbest liflerinin hidroksil radikali ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olarak mutajenik değişikliklere, DNA zincir kırıklarına ve delesyonlara yol açtığı bildirilmektedir.

Asbest nedeniyle oluşan immün yanıt ile monositlerin makrofaja transformasyonunu sağlayan monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) sekresyonu artar. Mg^{2+} ve Fe^{3+} elementleri içeren krizotil ve krokidolit, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına girerler. Böylelikle nitrik oksit radikalleri ve peroksinitrit iyonu oluşur ve bu da, DNA zedelenmesine, guanin bazlarının timin bazlarına

dönüşmesine neden olur. Ayrıca asbest, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) fosforilasyonu ile ERK1/2 ekspresyonunu ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinazın (MEK) aktivasyonunu uyarır. Bu da, c-fos ve c-jun transkripsiyonunu ve apoptozisi tetikler (Şekil 1) (43-50).



Şekil 1: Asbest lifleri ile indüklenen sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyon olaylarının varsayımsal şeması (50)

Başka bir teoriye göre asbest, regülatör gen kaybı ile p16 ve p14ARF'yi kodlayan INK4a/IRF lokusunda silinme oluşturmaktadır veya bu lokusun sessiz kalmasına neden olmaktadır. Normalde bir siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p16 ile p14, MDM2'nin yıkımını uyarır. Böylece p53'ün MDM2 tarafından nötralize edilmesi önlenmiş olur. Sıklıkla bulunan p16 ve p14ARF delesyonu sonucunda hücre büyümesi hızlanır ve tümöral gelişim ortaya çıkar (43).

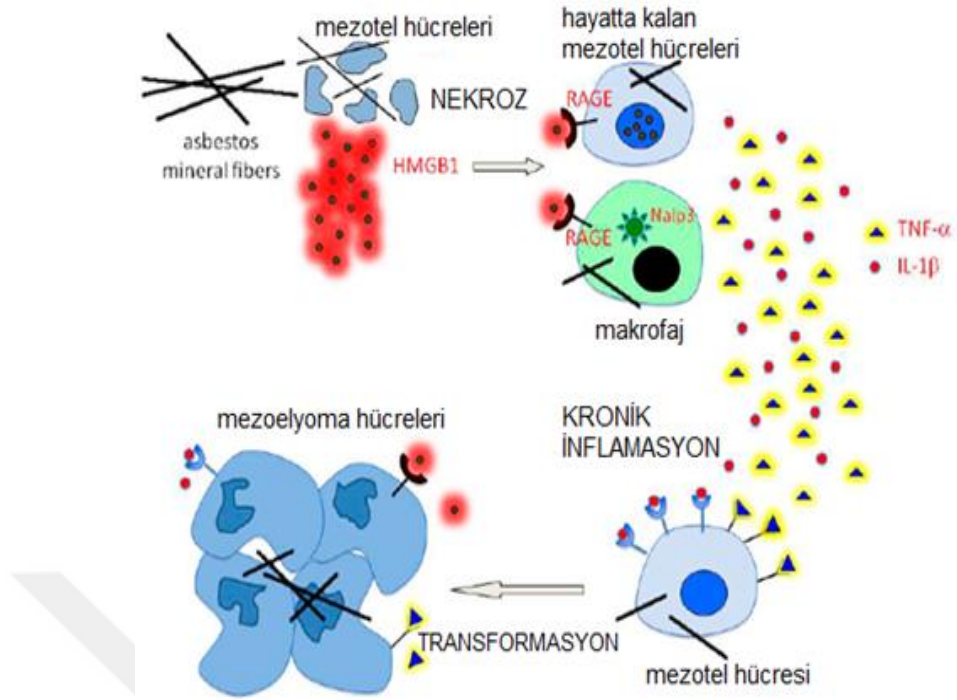
Kronik inflamasyon da MPM gelişimde önemli rol oynamaktadır. Asbest lifleri makrofajları uyararak, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin 1-beta (IL-1 β) gibi sitokinler ile reaktif oksijen ürünlerinin salınmasına neden olmaktadır.

Ayrıca asbest, mezotel hücrelerinde nekrotik hücre ölümüne neden olarak, ekstrasellüler bölgeye high-mobility group protein B1 (HMGB1) salınmasına yol açar. HMGB1, hayatta kalan mezotel hücreleri ve makrofajların reseptörü olan ileri glikasyon son ürünler için reseptör (RAGE)'e bağlanır ve burada Nalp3 inflamazomunun üretimine neden olur. Sonuç olarak, mezotel hücreleri ve makrofajlar, kronik inflamasyona neden olan TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokinleri salgılar. Kronik inflamatuvar yanıt da makrofaj akümünyasyonuna ve TNF- α salgılanmasına neden olur. TNF- α da nükleer faktör-kappaB (NF-kB) yolağını aktive ederek mezotel hücrelerinin proliferasyonunu uyarır (Şekil 2). Bunun dışında asbest liflerinin fagositozuyla makrofajlardan salınan oksiradikaller ve lenfokinlerin immün fonksiyonu baskıladıkları da bildirilmektedir (3, 41).

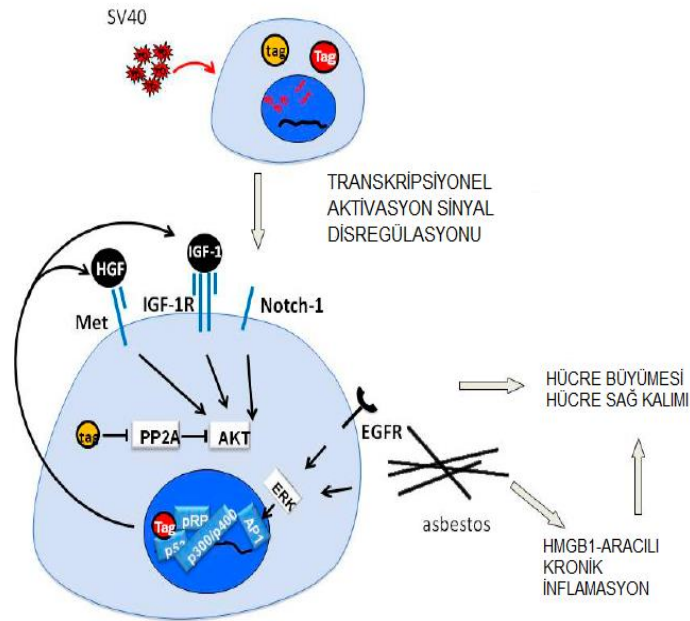
2.6.2.2. Simian virüs 40

Simian virüs 40 (SV40) da MPM etyolojik faktörlerindendir. İlk olarak 1994'de MPM ile SV40 ilişkisi bildirilmiştir. Mezotel hücreleri, kültür ortamında asbest ve SV40'a maruz bırakıldığında sinerjistik etki ile yalnız SV40'a göre daha fazla transformasyona neden olur. Kronik SV40 ve asbest, kemoterapide olması beklenen apopitozise karşı da direnç geliştirir. Aynı zamanda SV40 varlığında, daha düşük seviyede asbest maruziyeti ile MPM gelişebileceği düşünülmektedir (2, 3, 32, 44, 48, 49).

SV40 enfeksiyonu sonrasında mezotel hücrelerinde onkogeneizde rol oynayan büyük T antijen (Tag) ve küçük T antijen (tag) eksprese edilir. Tag, 90 kDa ağırlığında nükleer bir proteindir. Tag, p53, pRb, p300/400'ü bağlar ve hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), diğer büyüme faktörleri ve Notch-1 reseptörünün ekspresyonunu uyararak bir transkripsiyonel kompleks oluşturur. Bunun sonucunda ortaya çıkan otokrin devreler Akt, Erk ve diğer yollar üzerinde birleşir ve böylece hücre büyümesi ve hayatta kalma sağlanır. tag ise 17 kDa ağırlığında sitoplazmik bir proteindir. tag, fosfataz 2A'yı inhibe ederek, MAP kinaz ve AP-1 aktivitesini sağlar, ayrıca Tag'e eşlik ederek p53 ve Rb inhibisyonu ile hücre proliferasyonunu uyarır (Şekil 3) (41, 45-47).



Şekil 2: Kronik inflamasyonun MPM gelişimindeki rolü (41)



Şekil 3: MPM patogenezinde SV40'ın rolü (41)

2.6.2.3. Radyasyon

Toraks ve abdomene uygulanan radyasyona bağı gelişen MM olgusu çok azdır. Bunların da bir kısmında asbest maruziyeti tam olarak dışlanamamıştır. Ayrıca SV40 varlığı araştırılmamıştır. Bununla birlikte Wilm's tümörü tanısı ile radyoterapi almış birkaç hastada gelişen MM, başka bir faktöre bağlanamamıştır. Ratlarda yapılan çalışmalar, radyasyonun MM'ya neden olabileceğini göstermektedir. İnsanlarda da etiyolojik faktörler arasında yer aldığı düşünülmekle birlikte, olgu sayısı azdır (47, 51).

2.6.3. Malign mezotelyoma gelişiminde rol oynayan kromozomal değişiklikler

MPM'da kromozomal bölge kayıpları, bölge kazanımlarından daha sık olarak görülmektedir. Kayıplar ağırlıklı olarak 1p, 3p, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q ve 22q bölgelerinde, kazançlar ise 1q, 5p, 7p, 8q ve 17q bölgelerinde saptanmıştır. Asbest maruziyeti öyküsü olan ve olmayan hastalar genetik değişiklik gösteren bölgeler açısından karşılaştırıldığında 14q11.2-q21 bölgesinin asbest maruziyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Aynı zamanda MPM'nin farklı histolojik tiplerinde farklı kromozom kayıpları, kazanımları ve bozukluklarının görüldüğü bildirilmektedir. Sarkomatoid tip MPM'da 1p36, qp21.3, 3p21.3, 4q22, 6q25, 9p21.3, 13q ve 22q, CDKN2A ve CDKN2B'yi de içeren 9p kayıpları ve 1q ve 8q'da artış saptanmıştır. Ayrıca hastaların sağkalım süreleri ile kromozomal değişiklikler arasındaki ilişki de incelenmiştir. Kromozom kopya sayısı, 7. kromozomun kısa kolunun değişiklikleri ve CDKN2A gen delesyonu, kötü prognoz ve nüks ile ilişkilendirilmiştir (2, 3, 52, 53).

MPM'da genetik yatkınlık olduğu da düşünülmektedir. Oluşan mutasyonlar genellikle tümör baskılayıcı genlerde görülmektedir. Bu da, hücre proliferasyonunu uyaran hücre içi sinyal ileti yollarının kontrolsüz şekilde aktive olmasına neden olmaktadır. En çok BRCA1 ilişkili protein-1 (BAP1) geni olmak üzere, siklin bağımlı kinaz inhibitor 2A/alternatif reading frame (CDKN2A/ARF), nörofibromatozis tip 2 (NF2) ve telomeraz reverse transkriptaz (TERT) genleriyle ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda CDKN2A mutasyonu özellikle sarkomatoid

tip MPM’da ve bifazik tipte, BAP1 mutasyonu ise daha çok epiteloid tipte saptanmıştır (3)

2.6.4. Malign mezotelyoma patogeneğinde epigenetik faktörler

2.6.4.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, gen regülatör proteinlerin DNA’ya bağlanmasını engelleyerek genlerin susturulmasını düzenler. Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu, onkogenlerin ve genomun tekrarlayan elementlerinin ise hipometilasyonu kanser gelişiminde rol oynar. MPM gelişiminde asbest maruziyeti ile MT1A ve MT2A gen loküslerinin hipermetilasyonu arasında önemli bir ilişki vardır. DNA metilasyon profilinin normal plevrayı, MPM gelişen plevradan ayırabildiği ve kötü prognoz göstergesi olduğu ileri sürülmektedir (3).

2.6.4.2. Histon asetilasyonu

Histon asetilasyonu, histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) ile düzenlenir. Histonlar asetillendiği zaman kromatin yoğunluğu azalır, genler açılıp okunur. HDAC’ler ile kromatin yoğunlaşır, genler kapanır. Kanserlerde tümör baskılayıcı genler HDAC aktivasyonunda artış ile inhibe edilir. Sonuç olarak apoptoz, hücre siklusu kontrol mekanizmalarından kaçış ve angiogenezi etkileyerek MPM gelişimine neden olur (3).

2.6.5. Klinik ve laboratuvar

2.6.5.1. Semptomlar

Semptomlar hastalığın erken dönemlerinde siliktir. İlerleyen dönemlerde tümörün plevraya yayılmasıyla sıvı birikimi ve buna bağlı semptomlar oluşur. En sık görülen semptomlar dispne ve göğüs ağrısıdır. Bunlar dışında kilo kaybı, öksürük ve ateş de görülebilir.

Dispne, plevral sıvı birikimi ve tümöral yayılımın göğüs duvarı ile diyaframı etkilemesiyle oluşur. Göğüs ağrısı başlarda plöretik karakterde iken zamanla daha şiddetli olur ve devamlılık kazanır. Tümör göğüs duvarını invaze edip, interkostal sinir tutulumu gösterirse non-plöretik ve şiddetli bir hal alır (3, 54-56).

2.6.5.2. Fizik muayene bulguları

Tümörün yerleşimi olguların %95-97'sinde tek taraflı olup genellikle sağ taraf yerleşimlidir. Fizik muayenede plevral sıvı veya plevral kitleye bağlı bulgular saptanır. Plevral effüzyona bağlı olarak solunum seslerinde azalma, vibrasyon kaybı ve matite tespit edilir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde, kalınlaşan plevra nedeniyle tutulan hemitoraksta volüm kaybı, çökme, göğüs duvarı hareketlerinde azalma veya frozen chest (donmuş göğüs) saptanabilir. Bunun dışında çomak parmak ve metastaz geliştiğinde metastaza bağlı bulgular da görülebilir (3, 54-56).

2.6.5.3. Laboratuvar bulguları

MPM tanısına spesifik kan ve plevral sıvı parametresi mevcut değildir. Erken evrede kan sedimantasyon hızı yüksek çıkabilir. İlerleyen dönemde anemi, trombositoz ve hipoproteinemi görülebilir. Metastaza bağlı kalsiyum düzeyi yüksek saptanabilir.

Plevral sıvı eksuda karakterindedir. Hastaların yaklaşık yarısında hemorajik görümde olup, bir kısmında hyaluronik asit içeriği yüksektir. Buna bağlı olarak da plevral sıvı oldukça kıvamlı ve az akışkan olabilir (3).

2.6.6. Radyolojik görüntüleme bulguları

2.6.6.1. Konvansiyonel grafi

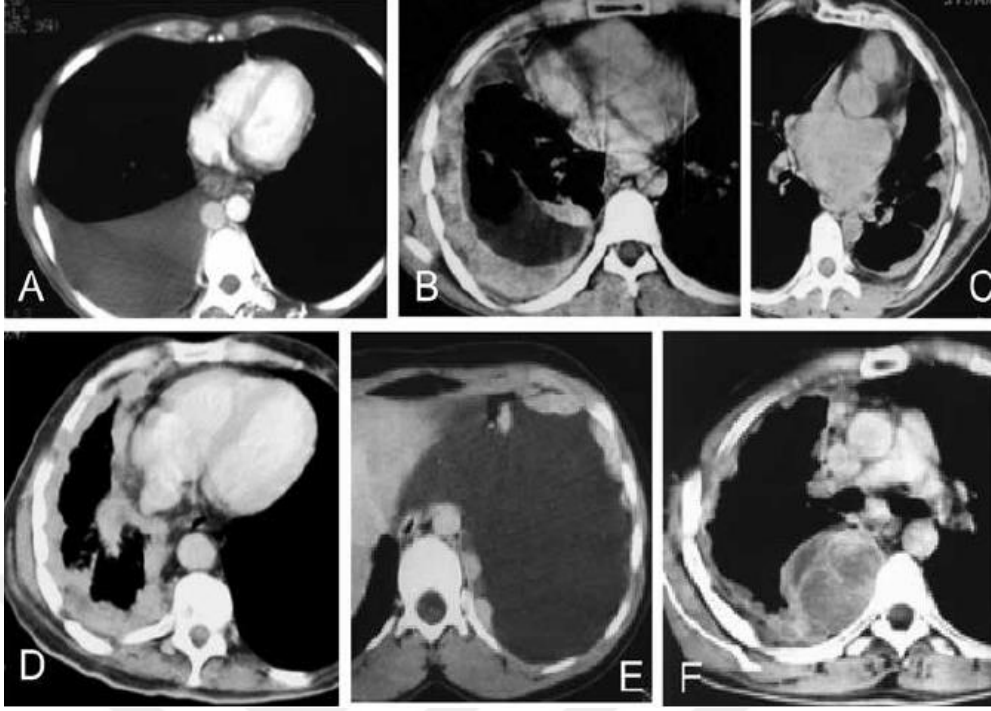
Ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu yöntemle plevral sıvı, plevral kalınlaşma, plevraya ilişik nodül veya kitle görünümüleri saptanabilir (Şekil 4). Ancak bu bulgular MPM'ya spesik değildir (3, 57).



Şekil 4: MPM tanılı hastada sol taraflı plevral efüzyonu gösteren göğüs radyografisi (58).

2.6.6.2. Bilgisayarlı toraks tomografisi

Radyografiye göre bilgisayarlı toraks tomografisi (BTT) daha güvenilirdir. Tanıdan ziyade, plevral lezyonların lokalizasyonlarının, lezyonların yaygınlığının saptanmasında ve tedaviden sonra olguların takibinde rutin olarak kontrastlı BTT kullanılmaktadır. BTT ile MPM, plevral sıvı, plevral düzgün yüzeyli kalınlaşma, düzensiz yüzeyli kalınlaşma, yaygın nodüler kalınlaşma, kalınlaşmaya eşlik eden dağınık nodüler görünüm veya plevral tabanlı kitle olarak saptanabilir (Şekil 5) (3, 59, 60).



Şekil 5: MPM’da BTT bulguları (3)

(A) Plevral sıvı, (B) Düzgün yüzeyli plevral kalınlaşma, (C) Diffüz plevral fibrozisli hastada düzensiz yüzeyli plevral kalınlaşma, (D) Plevrada yaygın nodüler kalınlaşma, (E) Plevral kalınlaşmaya eşlik eden dağınık nodüller, (F) Plevral kitle ve nodüler plevral kalınlaşma

2.6.6.3. Manyetik rezonans görüntüleme

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), BTT’ye göre daha pahalı bir tekniktir. MRG’nin malign patolojilerin göğüs duvarının kas tutulumlarını, perikardın transmural olmayan tutulumlarını göstermesi ve malign patolojilerin diyafram ve altı tutulumlarının değerlendirilmesine olanak sağlaması BTT’ye üstün olduğu özellikleridir. MRG, malign plevral patolojilerde ayırıcı tanı ve yaygınlık saptamada etkin bir yere sahiptir (3, 57).

2.6.6.4. Pozitron emisyon tomografisi

Pozitron emisyon tomografisi (PET), FDG (fluorodeoxyglucose) tutulumu prensibine dayanır. Evrelemede kullanılabilecek en iyi non-invaziv yöntemdir. Mediastinal lenf nodu metastazı varlığını değerlendirme olanağı sağlar. PET, sağ kalım ve hastalığın nüksünü değerlendirmede de kullanılabilir. Sağkalım, yüksek

FDG tutulumu gösteren tümörlerde, düşük olanlara göre daha kötü seyretmektedir. Epitelyal tip MPM'nin FDG afinitesinin, sarkomatöz ve mikst tipe göre daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır (3, 61, 62).

2.6.7. Tanısal yöntemler

MPM tanısı esas olarak tümör dokusunun histopatolojik incelemesine dayanır. Tanı için örnek elde etmek amacıyla torasentez, kapalı plevra iğne biyopsisi (perkütan plevral biyopsi), medikal torakoskopi (MT), videotorakoskopi (VATS), torakotomi, özel durumlarda endoskopik ultrasonografi rehberliğinde iğne biyopsisi ve gerektiğinde metastaz alanlarından biyopsi yöntemleri kullanılabilir.

2.6.7.1. Torasentez

Nedeni bilinmeyen plevral sıvılarda tanı-ayırıcı tanı amacıyla torasentez yapılmalıdır. Basit, ucuz ve hızla kullanılabilen bir yöntemdir. Fizik muayene ve konvansiyonel grafi rehberliğinde yapılmakla birlikte, diyafram yüksekliği gibi bazı durumlarda ultrasonografi yol gösterici olabilir. Torasentezin en sık görülen komplikasyonu pnömotorakstır. Nadiren vazovagal refleks ve plevra enfeksiyonları gelişebilir (3).

2.6.7.2. İğne biyopsi

Abrams, Cope ya da Tru-cut iğneleri ile paryetal plevradan tanı amaçlı doku örneği alınmasıdır. İşlem kör olarak yapılır. MPM tanı başarısı %40-50 oranındadır. Giriş yeri için sıvı seviyesinin en az 2 interkostal aralık altı, vertebral kolonun 8-10 cm laterali ve kosta üstü seçilmelidir. İşlem esnasında en az 3 biyopsi örneği alınmalıdır. İğne biyopsi işlemine bağlı %5-9 oranında komplikasyon gelişebilir. En sık pnömotoraks gelişmekle birlikte, ağrı, geçici ateş, hematoma, ampiyem, cilt altı amfizemi, vazovagal reaksiyon, girişim yerine tümör yayılımı, özellikle diaframı yüksek hastalarda karaciğer, dalak ve böbrek penetrasyonu görülebilir (3).

2.6.7.3. Bilgisayarlı tomografi rehberliğinde plevra iğne biyopsisi

Bilgisayarlı tomografi rehberliğinde plevra iğne biyopsisi (BT-PİB), iğne biyopsinin kör yapılması nedeniyle düşük başarı oranını yükseltme amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Göğüs duvarına bitişik lezyonlarda işlem ultrasonografi

ile de yapılabilir. BT-PİB tanı oranı %83'dür. Komplikasyonları iğne biyopsi yönteminde görülenler ile benzerdir (3).

2.6.7.4. Torakoskopi

Klinik, radyolojik ve laboratuvar çalışmaları ile tanı konulmamış, tanı için doku örnekleme-histopatolojik inceleme gereken plevral patolojilerde torakoskopi güvenli, etkin ve ucuz bir yöntemdir. Uygun alanlardan, yeterli büyüklükte biyopsiler alınmasına olanak sağladığı için tanı duyarlılığı %95, özgüllüğü %100'dür. Kapalı iğne biyopsi tekniklerine göre daha güvenilirdir. Uzamış hava kaçağı, cilt altı amfizemi, giriş yeri enfeksiyonu gibi major komplikasyon oranı %3-4, ağrı, taşikardi gibi minör komplikasyon oranı %8-14 olarak bildirilmektedir (3).

2.6.7.5. Videotorakoskopi

Videotorakoskopi (VATS), genel olarak özel durumlarda tanı, esas olarak cerrahi tedaviler amacıyla kullanılan bir yöntemdir. VATS'ın plevral patolojilerin tanısında başarısı %90'ın üzerindedir (3).

2.6.7.6. Torakotomi

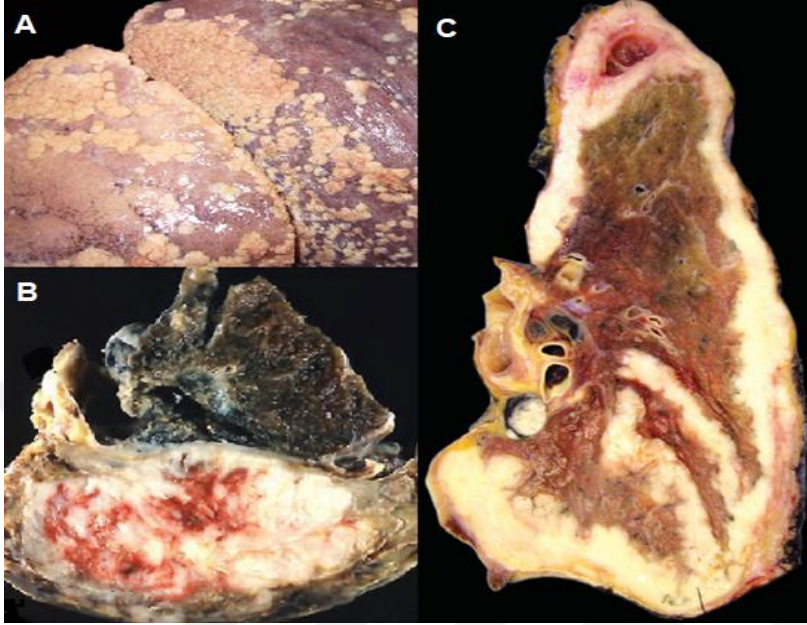
Torakoskopi ve VATS uygulamaları sonrasında kullanımı oldukça azalmıştır. Diğer yöntemlerle tanı konulamayan ve tanı ile tedavinin aynı seansta mümkün olduğu hastalarda kullanılır (3).

2.6.8. Makroskopik bulgular

MPM 3:2 oranında sağda daha sık görülür. Bunun nedeni tam olarak anlaşılamamakla birlikte, iki taraf arasındaki havayolu oryantasyonu, lif yükü, plevra yüzey alanı ve göğüs duvarı hareketi farklılıklarına bağlanmıştır (42).

Makroskopik olarak karakteristik bir görünümü vardır. Erken tanı aldığında visseral ve paryetal plevral yüzeyler üzerinde, çok sayıda küçük nodüller ve plaklar olarak görülürler (Şekil 6-A). Daha sonra, nodüllerin birleşimi ile lokalize tümör kitlesi (Şekil 6-B) veya akciğerleri saran ve baskı uygulayan zırh benzeri kitle oluştururlar (Şekil 6-C). Bazı vakalarda tümör, intrapulmoner septuma yayılım gösterebilir, nadiren akciğer parankim tutulumu olabilir. Tümör, desmoplastik varyantta sert, sarımsı ve deri benzeri görünümde, az diferansiye epitelioid tipte yumuşak ve jelatinöz nitelikte olabilir (2, 28, 63, 64).

Akciğer periferinde iyi sınırlı tümör kitlesi MPM olabileceği gibi, diffüz plevral tutulumu olan bir tümörün de adenokarsinom olabileceği akılda tutulmalıdır (63).



Şekil 6: MPM'nın makroskopik görünümü

(A)Visseral plevrada çok sayıda ve fokal olarak birleşen tümör nodülleri (65), (B) Plevrada lokalize tümör kitlesi (58), (C) Akciğeri çepeçevre saran, fissürler boyunca ilerleyen diffüz plevral tümör tutulumu ve hiler lenf nodu metastazı (65)

2.6.9. Histopatolojik özellikler

MM üç temel histolojik formda görülür: (1) epiteloid, (2) sarkomatoid veya (3) mikst (bifazik). Çoğu kez tek tümörde her üç tipin özellikleri görülür. MM'lerin yaklaşık %70'i baskın olarak epiteloid,%25 çoğunlukla bifazik ve%5 ağırlıklı olarak sarkomatoid tiptir (66).

2.6.9.1. Epiteloid mezotelyoma

Epiteloid , üç varyantın en yaygın olanıdır ve tüm MM'lerin yaklaşık %70'ini oluşturur. Epiteloid mezotelyoma, geniş, yoğun eozinofilik sitoplazma ve genellikle mitotik aktiviteden yoksun sakin nükleuslara sahip poligonal tümör hücreleriyle karakterizedir. Birkaç farklı histopatolojik büyüme paterni tanımlanmıştır. Bu

paternler arasında ayırıcı tanı zorlayıcı olabilmekle birlikte, aynı tümör içerisinde farklı histomorfolojik paternler birarada bulunabilir (28, 63, 66).

2.6.9.1.1. Tübülopapiller tip

Epiteloid mezotelyomalarda görülen en yaygın büyüme paternidir. Tümör, orta miktarda eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak nükleuslu ve belirgin nükleoluslu orta büyüklükte yuvarlak-oval hücrelerden oluşan, fibrokonnektif kor yapılarına sahip papiller büyüme paterni ile karakterizedir (Şekil 7-A). Bu sellüler proliferasyon, diğer alanlarda birbiriyle anastomozlar yapan elonge tübüler yapılar gösterir. Tümör, hafif nükleer atipi ve minimal mitotik aktivite gösteren uniform görünüme sahiptir. Kanama ve nekroz alanları sıklıkla görülmez. Primer akciğer adenokarsinomu ile ayırıcı tanısı yapılmalıdır (2, 28, 63).

2.6.9.1.2. Trabeküler tip

Küçük, uniform hücrelerle döşeli ince kordlardan oluşur. Bazen tek sıralı olabilir. Psammom cisimleri görülebilir (2).

2.6.9.1.3. Mikropapiller tip

Fibrovasküler bir koru olmayan papiller yapılar ile karakterlidir (2).

2.6.9.1.4. Berrak hücreli tip

Bu büyüme paterni, yuvarlak nükleuslu, belirgin nükleoluslu, berrak sitoplazmalı orta büyüklükte, yuvarlak-oval hücreler ile karakterlidir (Şekil 7-B). Fibrokonnektif dokuyu ayıran diffüz bir sellüler proliferasyon izlenir. Mitotik aktivite mevcut olmasına rağmen belirgin değildir ve fokal nekroz alanları görülebilir. Bu büyüme paterni, renal hücreli karsinom ve diğer metastatik berrak hücre karsinomları taklit eder (63).

2.6.9.1.5. Glandüler tip

Bu büyüme paterni, adenokarsinomda görülen glandlara benzer iyi şekilli glandların varlığı ile karakterizedir (Şekil 7-C). Glandüler proliferasyon, fibrokonnektif dokuyu ayırmış gibi görünür ve bazı vakalarda iltihabi hücre infiltrasyonu ile desmoplastik reaksiyon mevcut olabilir. Bu büyüme paterni adenokarsinom ile benzerdir (28, 63).

2.6.9.1.6. Miksoid/mukoid tip

Bu büyüme paterni, glandüler diferansiasyon veya konvansiyonel tubulopapiller büyüme paterni gösterebilen bir miksoid veya mukoid matriks içine gömülü neoplastik hücre proliferasyonundan oluşur (Şekil 7-D). Bazı durumlarda, tümör bol mukoid matriks gösterebilir; bu görünüm müsinöz adenokarsinoma ile karıştırılabilir. Bu paternde müsikarmin boyama hücre içi müsün üretimini göstermemektedir (63).

2.6.9.1.7. Adenomatoid (mikrokistik) tip

Bu büyüme paterni konvansiyonel adenomatoid tümöre çok benzemektedir. Periferik yerleşimli nükleuslu ve berrak sitoplazmalı orta boyutta hücre kordlarından oluşur. Nükleer atipi, mitotik aktivite, nekroz ve kanama yaygın değildir (Şekil 8-A) (63).

2.6.9.1.8. Desiduoid tip

Bu büyüme paterni, eozinofilik sitoplazmaya sahip orta boy hücrelerden oluşan ve endometriyumun siklik değişimlerinde görülenle benzer bir "desiduoid" görünüm sergileyen hücre proliferasyonu ile karakterizedir (Şekil 8-B) (28, 63).

2.6.9.1.9. Solid tip

Solid, monoton, nispeten non-koheziv poligonal hücre tabakalarından oluşur (Şekil 8-C). Büyük hücreli karsinom veya lenfomayı taklit eder (2).

2.6.9.1.10. Pleomorfik tip

Anaplastik ve/veya tümör dev hücreleri olan tümörler, pleomorfik olarak tanımlanabilir (2).

2.6.9.1.11. Lenfohistiyositik tip

Lenfohistiyositik mezotelyomada yoğun lenfoid infiltrat, poligonal neoplastik hücreleri gizleyebilir (Şekil 8-D). Malign lenfoma veya lenfoepitelyal karsinomu taklit eder (2).

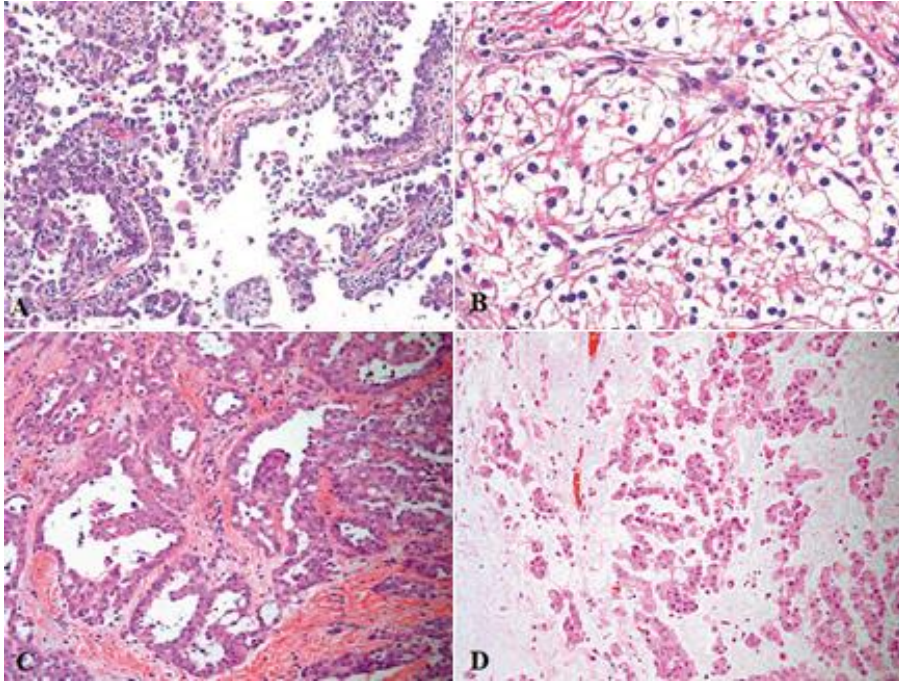
2.6.9.1.12. Küçük hücreli tip

Küçük hücreli karsinomayı taklit edebilir. Ancak küçük hücreli karsinomda izlenen karyoreksis ve damar duvarlarında hematoksifilik boyanma görülmez. Küçük

hücreli mezotelyoma teriminin, küçük hücreli karsinom ile karıştırılması korkusu raporlarda bu tanıyı verme cesaretini kısıtlar (2).

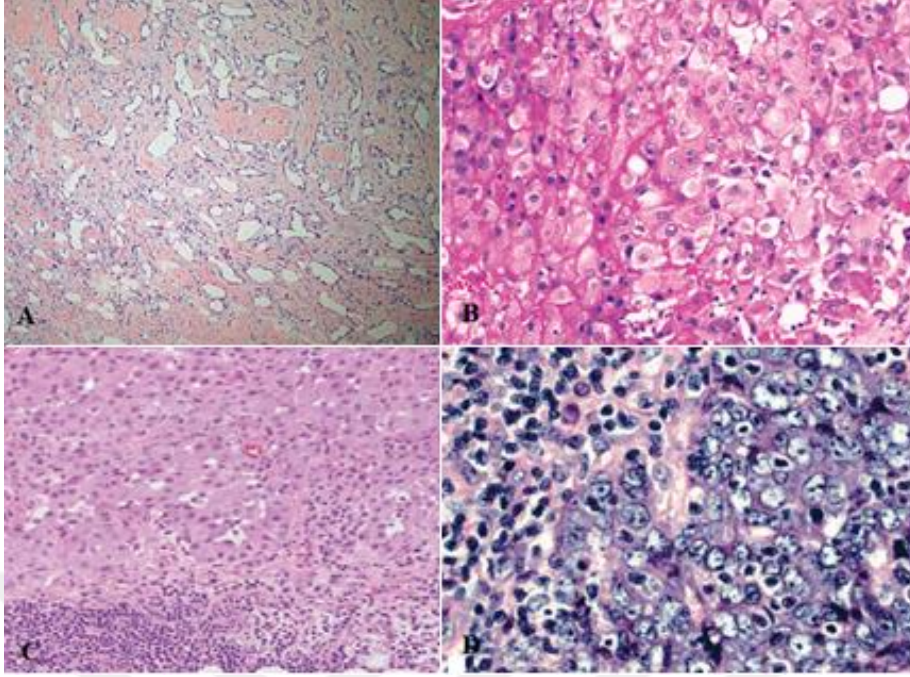
2.6.9.1.13. Transizyonel tip

Transizyonel patern terimi, koheziv ancak elonge morfolojiye sahip hücrelerin oluşturduğu tabaka benzeri büyüme paternini tanımlamak için kullanılmıştır (2).



Şekil 7: Epiteloid mezotelyomanın histopatolojik görünümü

(A)Tübülopapiller tip (58), (B) Berrak hücreli tip (58), (C) Glandüler tip (63), (D) Miksoid tip (63)



Şekil 8: Epiteloid mezotelyomanın histopatolojik görünümü

(A) Adenomatoid tip (63), (B) Desiduoid tip (65), (C) Solid tip (58), (D) Lenfohistiositik tip (58)

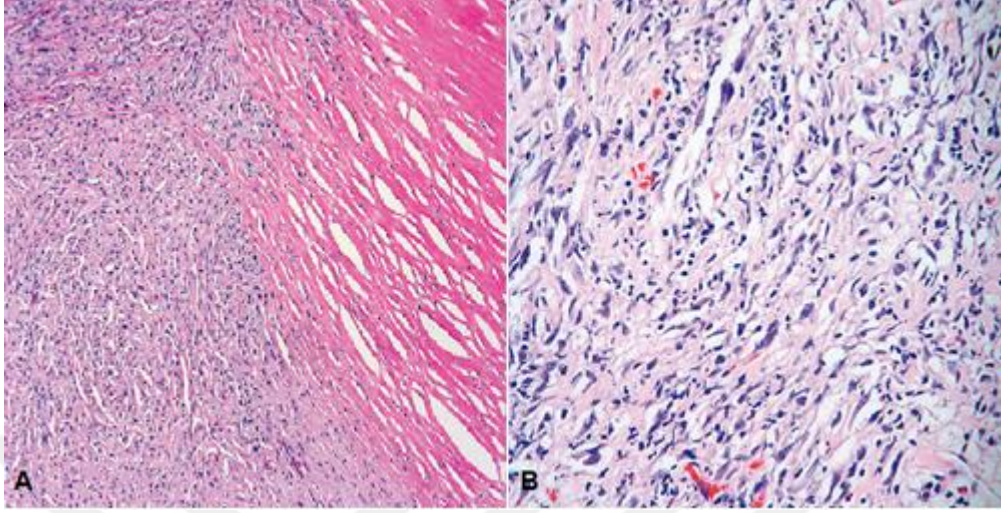
2.6.9.2. Sarkomatoid mezotelyoma

MM'nin sarkomatoid varyantı epiteloid varyantından daha az yaygındır ve MM'lerin yaklaşık %15'inden daha azını oluşturur. Sarkomatoid mezotelyoma, fasiküller halinde dizilmiş veya gelişigüzel dağılım gösteren iğsi hücrelerden oluşur ve paryetal plevra veya bitişik akciğer parankiminin yağ dokusunu içerir. Sarkomatoid mezotelyoma, tombul hücrelerden yetersiz sitoplazmaya sahip ince, uzun hücrelere kadar geniş bir morfoloji yelpazesi sunabilir (Şekil 9-A). Nükleer atipi ve mitotik aktivite minimal, orta veya belirgin olabilir. Belirgin olduğu durumlarda pleomorfizm de dikkat çekicidir (Şekil 9-B). Nekroz varlığı, atipi ve mitoz derecesi tümörün agresivitesi ile paraleldir (2, 63, 67).

Heterolog elemanlı MM terimi, MM rabdomyosarkomatöz, osteosarkomatöz veya kondrosarkomatöz elemanlar gösterdiğinde kullanılır. Bu elemanların, osteoid ve kondroid metaplaziden ayrımı yapılmalıdır (2, 58).

Bazı sarkomatoid mezotelyomalar yüksek mitotik indekse sahip ve atipik mitoz gösteren, geniş, multilobüle, bizar ve hiperkromatik nükleuslu, atipik dev

hücrelerle karakterizedir. Bu morfoloji, andiferansiye yüksek grade pleomorfik sarkomu taklit eder (2).



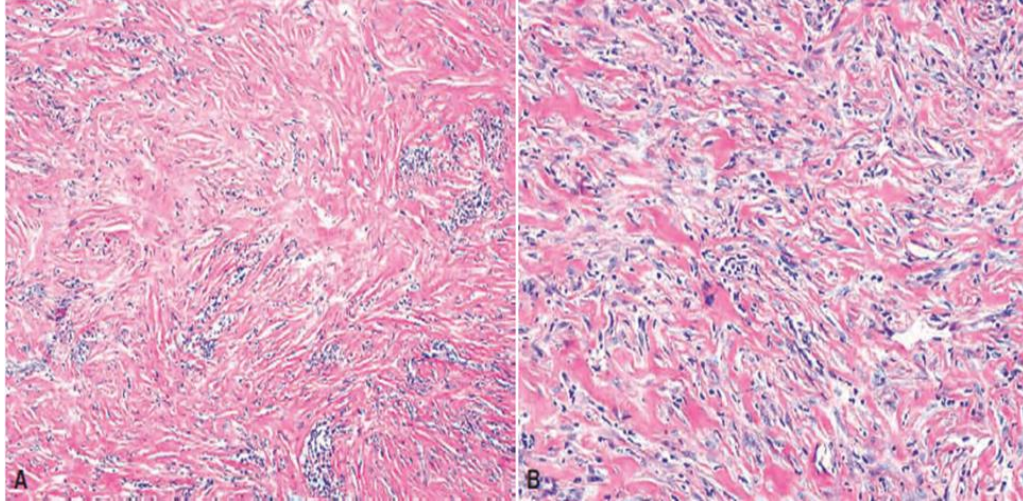
Şekil 9: Sarkomatoid mezotelyoma

(A) Lokal bir plevral plağı invaze eden sarkomatöz iğısi hücreli proliferasyon (65)

(B) Belirgin atipik özellikler gösteren sarkomatoid mezotelyoma (63)

2.6.9.2.1. Desmoplastik mezotelyoma

Desmoplastik mezotelyoma, iğısi veya yıldız şeklinde sakin görünümde sitolojik özelliklere sahip neoplastik hücrelerin görüldüğü ve birim alan başına düşük bir yoğunluğa sahip olduğu sarkomatoid MM'nın özel bir alt türüdür. Tümörün en az %50'sinde görülen, yoğun kollajenize dokuyu ayıran iğısi veya “düzensiz” patern gösteren atipik hücre dizilimleri ile karakterizedir (Şekil 10-A,B). Bu tümörler, özellikle küçük biyopsi örneklerinde benign organize plevrit ile karıştırılabilir. Kesin tanı kriteri, malignite bulgularının gösterilmesidir. Bunlar, belirgin sarkomatoid alanlar, nekroz odakları, yağ doku, iskelet kası veya akciğer invazyonu ve uzak metastazlardır (2, 58).

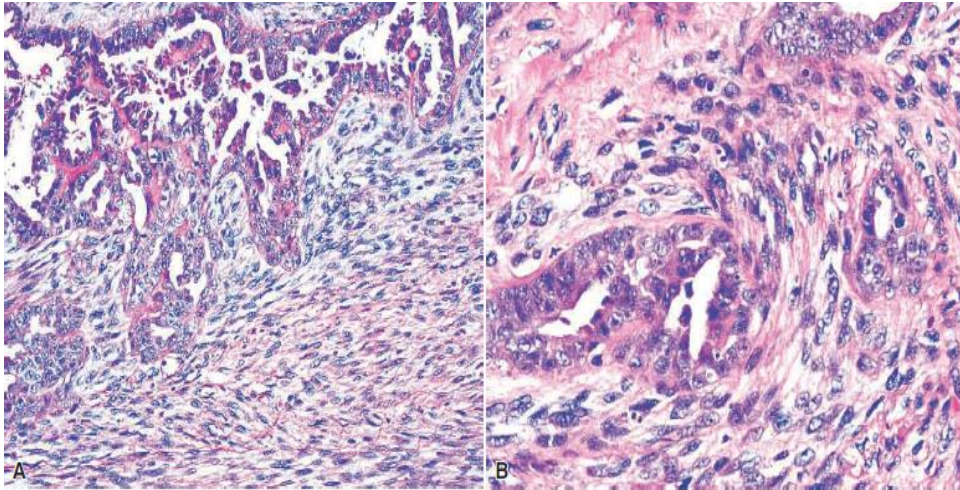


Şekil 10: Desmoplastik mezotelyoma

(A), (B) Desmoplastik plevral mezotelyoma göreceli olarak sakin, plevral plak benzeri bir morfolojik görünüm sergiler (58).

2.6.9.3. Bifazik mezotelyoma

MM, vakaların yaklaşık %30'unda hem epiteloid hem de sarkomatoid patern içerir (Şekil 11-A,B). Epiteloid ve sarkomatoid mezotelyoma tiplerinin herhangi bir kombinasyonu mevcut olabilir. Her bileşen, tümörün en az %10'unu temsil etmelidir. Daha kapsamlı bir tümör örnekleme ile bifazik olarak sınıflandırılan olguların yüzdesi artacaktır (2, 58).

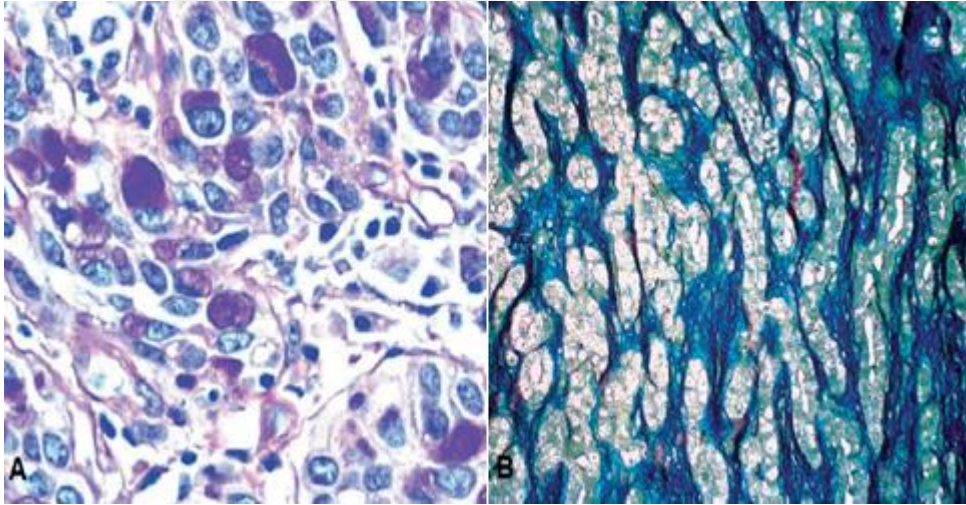


Şekil 11: Bifazik mezotelyoma

(A), (B) Fuziform ve pleomorfik elemanlara bitişik epiteloid büyüme odağı (58)

2.6.10. Histokimyasal bulgular

İmmünohistokimyadan önce, histokimyasal çalışmalar MM tanısında önemli rol oynamıştır. Periyodik asit-Schiff (PAS), diastazlı PAS (D-PAS), müsikarmin ve hiyalüronik asit, geçmişte başarı ile kullanılmıştır. Nötral müsünler ve hiyalüronik asit histokimyasal boyaları, plevraya metastaz yapmış adenokarsinom ile epiteloïd MM ayırıcı tanısında yararlı olabilir, ancak günümüzde yerini immünohistokimyasal boyalara bırakmıştır. Müsin üretimi adenokarsinomaya tipiktir ve PAS boyası ile tespit edilebilir, diastaz sindirimine dirençlidir (Şekil 12-A). Ayrıca müsikarmin, adenokarsinomalarda sıklıkla hücrel müsini göstermektedir, ancak bu boya ile MM'lerin bazı alt tiplerinde de boyanma tanımlanmıştır. Hiyalüronik asit üretimi, MM için tipiktir. Bu, Alcian Blue (AB) veya Kolloidal Demir boyaları (Şekil 12-B) ile gösterilebilir ve hyaluronidaz enzimi uygulandıktan sonra boyanma özelliğini kaybeder (58, 63, 65).



Şekil 12: Histokimyasal bulgular

(A)Plevranın psödomezotelyomatöz adenokarsinomasında PAS ile histokimyasal reaktivite (58), (B) İntersellüler stromal müsini varlığını gösteren malign epiteloïd plevral mezotelyomada kolloidal demir boyaması (58).

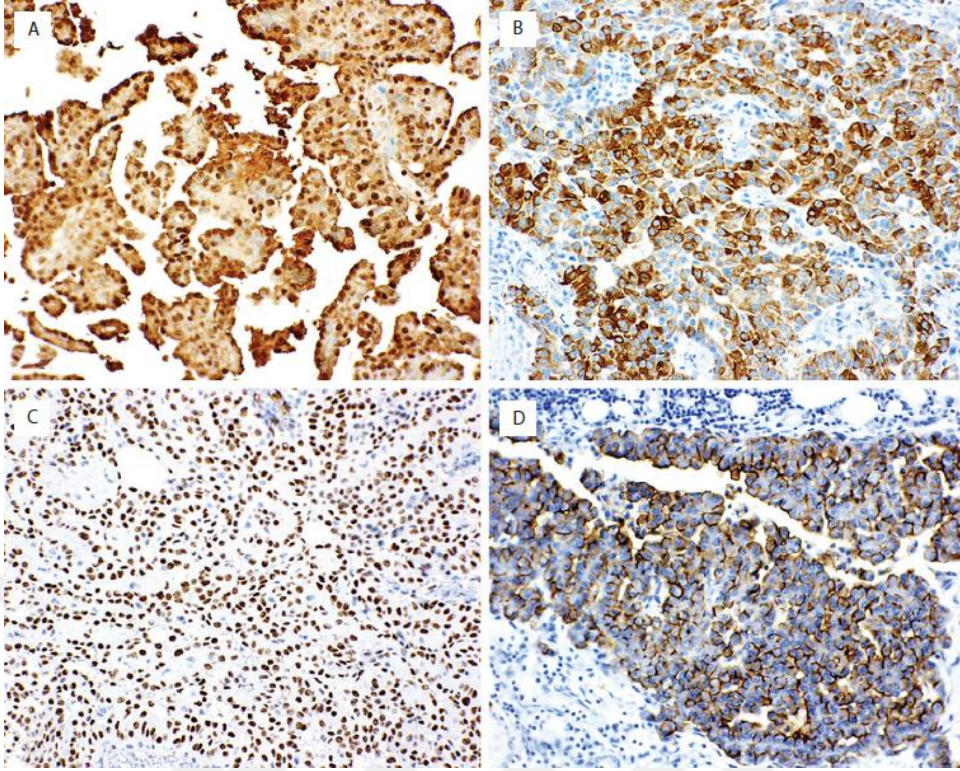
2.6.11. İmmünohistokimyasal bulgular

MM değerlendirmede immünohistokimyasal çalışmalarla ilgili çok sayıda bilgi mevcuttur. İmmünohistokimya, epiteloid mezotelyomayı adenokarsinomadan ayırmak için kullanılır. Panel genellikle MM ve adenokarsinoma için yüksek hassasiyet ve özgüllükte antikorlardan oluşur. Epiteloid mezotelyoma genel olarak kalretinin, sitokeratin 5/6, Wilms Tümör 1 (WT-1) ve D2-40 için pozitif immünreaktivite gösterir ve karsinoembriyonik antijen (CEA), tiroid transkripsiyon faktörü-1 (TTF-1) için negatif olarak boyanır (Şekil 13).

Adenokarsinoma tanısı için ise BerEp4, MOC31, B72.3, CEA ve BG8 en yaygın kullanılan belirteçlerdir. İki veya daha fazla negatif (adenokarsinoma) belirteci ile iki veya daha fazla pozitif (MM) belirtecin kombinasyonu, laboratuvarın deneyimlerine bağlı olarak büyük ölçüde fayda sağlar (Tablo 2).

Pan-keratin antikorları ile immünreaktivite, MM ve adenokarsinoma arasında ayırım yapmaz, ancak sarkomatoid ve desmoplastik mezotelyoma teşhisini desteklemek için faydalıdır. Ne yazık ki, reaktif stromal proliferasyon da pan-keratin için immün boyama gösterebilir, bu nedenle pozitif bir sonuç malignite hakkında kesin kanıt sağlayacak şekilde yorumlanmamalı ve malignite için histolojik kriterler yerine getirilmelidir. Dahası, sitokeratin immünreaktivitesi sinoviyal sarkom yanı sıra bazı anjiyosarkomlarda da gözlenmekte ve sarkomatoid veya bifazik tümörlerin değerlendirilmesinde potansiyel bir karışıklık kaynağı oluşturmaktadır.

İmmünohistokimyasal boyama sonuçları histopatolojik bulgularla birlikte yorumlanmalıdır ve plevral neoplazmların değerlendirilmesinde bir veya iki boyaya güvenmektense histopatolojik bulgular ile bir panel yaklaşımının kullanımı, daha güvenli bir değerlendirme sağlayabilir (2, 63, 65).



Şekil 13: MPM’da immünohistokimyasal bulgular

(A) Kalretinin, (B) Sitokeratin 5/6, (C) Wilms tümör-1 ve (D) D2-40 ile immünreaktivite gösterilmektedir (65).

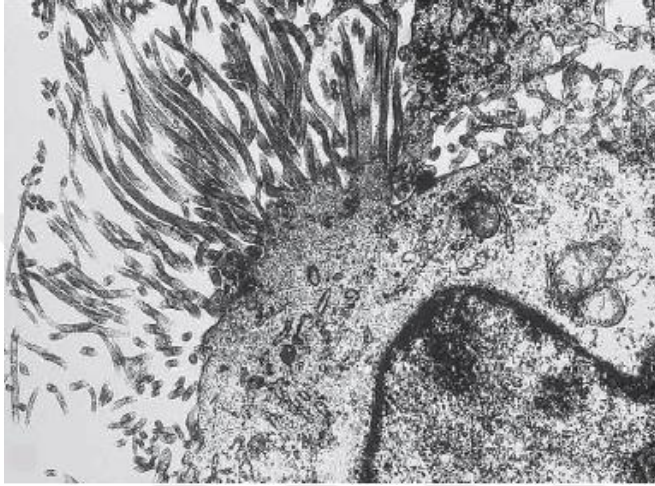
Tablo 2: MPM ile adenokarsinom ayırıcı tanısında sık kullanılan immünohistokimyasal boyalar (2)

Antikor	Adenokarsinom	MM
CEA	+	-
Leu-M1	+	-
B72.3	+	-
TTF-1	+	-
Kalretinin	-/+*	+
Sitokeratin 5/6	0	+
Geniş spektrumlu keratin	+	+
EMA	+	+
BerEp-4	+	-/+

* Bazı adenokarsinomalar, kalretinin ile pozitif boyanma gösterebilir.
EMA, epitelyal membran antijen

2.6.12. Ultrastrüktürel inceleme

Epiteloid mezotelyoma şüphesi olan olgularda adenokarsinom ile ayrımında, şüpheli histolojik veya immünohistokimyasal bulgular transmisyon elektron mikroskobu ile aydınlatılabilir (Tablo 3). MM'ye özgü tek bir ultrastrüktürel özellik olmamasına rağmen, uzun, ince yüzey mikrovillinin, bol miktarda ara filamentlerin ve tonofibriler demetlerinin bileşimi karakteristiktir (Şekil 14) (42, 58, 63, 65).



Şekil 14: Epiteloid mezotelyomada elonge ve fırçamsı plasmalemmal mikrovillilerin ultrastrüktürel olarak görünümü (58)

Tablo 3: MM ile adenokarsinom arasındaki ultrastrüktürel farklar (42)

MM	Adenokarsinom
Glikokalizik cisimciklerin olmadığı elonge, ince, fırçamsı mikrovilluslar. Kollajen fibrilleri ile karışabilir.	Glikokalizik cisimciklerin görüldüğü kısa ve kalın mikrovilluslar. Genellikle luminal yüzeye sınırlıdır ve nadiren kollajen fibriller ile karışır.
Apikal sıkı bağlantılar (tight junction)	Lümen yanında terminal bar
Uzun, iyi gelişmiş desmozomlar	Kısa, iyi gelişmemiş desmozomlar
Perinükleer tonofilamentler	İrregüler dağılmış intermediyer filamentler
Müsin granüller yoktur	Müsin granülleri içerebilir
Bol glikojen	Değişen miktarda glikojen
Az miktarda yağ damlacıkları	Yağ yoktur

2.6.13. Ayırıcı tanı

Epiteloid mezotelyomada primer ayırıcı tanı metastatik adenokarsinomla yapılmalıdır. İntrapulmoner kitle varlığı akciğer kanseri lehinedir, çünkü MM tipik olarak plevra ile sınırlıdır. Diffüz plevral yayımlı psödomezotelyomatöz adenokarsinom nadir görülür fakat klinik, makroskopik ve mikroskopik olarak epiteloid mezotelyomayı taklit eder. Ayırıcı tanıda immünohistokimyasal çalışma yardımcı olur.

Psödomezotelyomatöz görünümüne sahip diğer epiteloid tümörler; epiteloid hemanjioendotelyoma, intraplevral timoma, melanom, lenfoma ve az miktarda iğsi hücreye sahip sinoviyal sarkomdur.

Sinoviyal sarkom t(x;18) translokasyonu yokluğunda dışlanabilir. Sinoviyal sarkomda TLE1 nükleer immünboyanma da ayırıcı tanıda yardımcı olur.

Proksimal varyant epiteloid sarkom, epiteloid mezotelyoma gibi plevra ve göğüs duvarını tutabilir. Bununla birlikte, sitokeratinlerle boyanma epiteloid mezotelyomada beklenenden daha düzensizdir ve diğer mezotelyal belirteçler negatiftir. Aksine epiteloid sarkomda Fascin ve Vimentin ile güçlü boyanma izlenir.

Çok çeşitli hastalıklar, özellikle enfeksiyona bağlı reaktif mezotelyal hiperplazi aşırı derecede belirgin olabilir ve MM'yi taklit eder. Plevra dokusu örneğinde, malign tümör fragmanlarının yokluğunda, yanlış tanıyı önlemek için göğüs duvarı yumuşak dokusunda veya altında yatan akciğer parankiminde mezotel hücreleri varlığı malignite için tek sağlam kriterdir.

Sarkomatoid mezotelyomada majör ayırıcı tanı plevraya metastaz yapmış yumuşak doku sarkomu ve plevraya ulaşan primer göğüs duvarı sarkomu ile yapılmalıdır. Sarkomatoid mezotelyomadan farklı olarak çoğu sarkom keratin ile negatiftir. Plevranın primer anjiosarkomu ve monofazik sinoviyal sarkom gibi keratin-pozitif sarkomlar tanısal problem oluşturur. Aynı zamanda çoğu sarkom kendi spesifik belirtecini karakteristik genetik değişiklikleri gösterir.

Diffüz plevral kalınlaşmaya neden olan osteosarkomatöz veya kondrosarkomatöz diferansiasyonlu primer plevral tümörler büyük olasılıkla

MM'dir. Çoğu vakada pankeratin pozitifdir fakat bazen keratin ekspresyonunu göstermek zor olabilir. MM ile benzer şekilde diffüz olarak plevral kavitede büyüme gösteren osteosarkom ve kondrosarkom rapor edilmiştir. IDH1/2 mutasyonu kondrosarkomu, kondroblastik osteosarkom ve heterolog komponentli MM'den ayırabilir.

İnflamatuvar miyofibroblastik tümör plevrayı tutabilir ancak diffüz plevral kalınlaşma göstermesi oldukça olağan dışıdır. Kollajen ve inflamatuvar hücrelerle karışık miyofibroblastik iğsi hücrelerin, yoğun inflamatuvar komponentli MM'den ayrımı zordur. İğsi hücreler ALK ekspresyonu ve kromozomal ALK rearanjmanı gösterebilir (2).

Desmoplastik mezotelyomanın organize plevrit ile ayrımı yapılmalıdır. Organize plevritte, efüzyonun hemen altında daha sellüler bir infiltrasyon ve göğüs duvarına doğru artan fibrozis ile tipik bir zonasyon vardır. Desmoplastik mezotelyoma zonasyon göstermez. Organize plevritte genellikle plevral yüzeye dik küçük kapillerler izlenirken, desmoplastik mezotelyomada kapillerler belirgin değildir. Desmoplastik mezotelyoma sellüler stromal nodül şeklinindedir, organize plevritte görülmez. Desmoplastik mezotelyomada sıklıkla göğüs duvarı yağ doku tutulumu vardır, yağ dokuyu infiltre eden keratin-pozitif hücreler görülür. Organize plevritte de yağ doku yayılımı olabilir ancak yağ dokudaki hücreler keratin-pozitif değildir (2, 64)

Bifazik mezotelyoma, pleomorfik karsinom ve sinoviyal sarkomdan ayrılmalıdır. Pleomorfik karsinom genellikle göğüs duvarı tutulumu gösteren lokalize periferik akciğer kitlesi yapar ve sıklıkla konvansiyonel adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom alanları görülür. MOC31/BerEP4 veya monoklonal CEA gibi tipik geniş spektrumlu karsinom belirteçleri ile boyanır. Plevrada çoğu sinoviyal sarkom monofaziktir ancak bifazik de görülebilir. Primer plevral sinoviyal sarkomlar, epitelyal ve iğsi hücrelerin karışımından oluşur. Sinoviyal sarkomlar, karakteristik t(x;18)(p11.2;q11.2) translokasyonu gösterir (2).

2.6.14. Tümör yayılımı ve evreleme

Göğüs duvarı yağ ve kas dokuya invazyon, MPM’da karakteristiktir. Akciğer parankiminden alveolar yüzeye infiltrasyon, organize pnömoni, deskuamatif interstisyel pnömoni ve bronkioloalveolar karsinoma benzer bir görünüm oluşturur. Diyafragma invazyon ise asite neden olur. Bu da, tümörün peritona ekilmesine yol açar. MPM’da hematojen metastaz, akciğer, karaciğer, böbrek üstü bezleri, kemik, böbrek ya da beyine olabilir (2, 32, 68). MPM evrelemesi, tümör-nod-metastaz (TNM) bazlı evrelemedir (Tablo 4) (2).

Tablo 4: MPM’de TNM evreleme (2)

T	Primer Tümör	N	Rejyonel Lenf Nodu
Tx	Primer tümör değerlendirilemez	Nx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez
T0	Primer tümör bulgusu yok	N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
T1	Tümör, visseral plevranın fokal tutulumu olsun ya da olmasın, ipsilateral parietal plevra tutulumu içerir	N1	İpsilateral bronkopulmoner ve/veya hiler lenf nodlarına metastaz
T1a	Tümör aynı taraf parietal (mediastinal, diyafram) plevra içerir. Visseral plevra tutulumu yok	N2	Subkarinal lenf nodlarına ve/veya ipsilateral internal mammarian veya mediastinal lenf nodlarına metastaz
T1b	Tümör, visseral plevranın fokal tutulumu ile birlikte, ipsilateral parietal (mediastinal, diyaframatik) plevra içerir	N3	Kontralateral mediastinal, internal mammarian veya hiler nodlarına ve/veya ipsilateral veya kontralateral supraklaviküler veya skalen lenf nodlarına metastaz
T2	Tümör, en azından aşağıdakilerden biriyle aynı taraftaki pleural yüzeyleri kapsar: • Birleşen visseral pleural tümör (fissür dahil) • Diyaframatik kas invazyonu	M	Uzak Metastaz
		MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
		M0	Uzak metastaz yok
		M1	Uzak metastaz

	Akciğer parankim invazyonu		
T3*	Tümör, en azından aşağıdakilerden biriyle aynı taraftaki plevral yüzeyleri kapsar: - Endotorasik fasya invazyonu - Mediastinal yağ doku invazyonu - Göğüs duvarı yumuşak dokuya yayılan soliter tümör odağı - Perikardın transmural olmayan tutulumu		
T4**	Tümör, en azından aşağıdakilerden biriyle aynı taraftaki plevral yüzeyleri kapsar: - Göğüs duvarının yumuşak dokularında diffüz veya multifokal invazyon - Kosta tutulumu - Diyafram yoluyla peritona invazyon - Herhangi bir mediastinal organ invazyonu - Kontralateral plevraya direkt yayılım - Vertebra invazyonu - Perikardın iç yüzeyine yayılım - Pozitif sitolojili perikardiyal efüzyon - Miyokard invazyonu - Brakiyal plexus invazyonu	Evre Gruplama EvreIA T1a N0 M0 EvreIB T1b N0 M0 EvreII T2 N0 M0 EvreIII T1, T2 N1 M0 T1, T2 N2 M0 T3 N0,N1,N2 M0 EvreIV T4 Herhangi bir N M0 Herhangi bir T N3 M0 Herhangi bir T Herhangi bir N M1	

Not:

* T3, lokal olarak ilerlemiş, ancak potansiyel rezektabl tümörü tanımlamaktadır.

**T4, lokal olarak ilerlemiş, teknik olarak rezeke edilemeyen tümör.

2.6.15. Prognoz ve prediktif faktörler

MM hastalarının uzun süreli sağkalım oranı kötüdür. Tipik olarak geç bir klinik evrede MM tanısı konulduğunda medyan sağkalım süresi 12 aydır ve tümör birkaç yıl içinde tanı konmasına rağmen hemen hemen her zaman ölüme neden olur. Genç yaş, epiteloid tip ve erken TNM evre, daha uzun medyan sağkalım göstergeleridir ve terapötik stratejiyi kuvvetle etkiler. Ayrıca, geniş miksoid değişiklikler içeren MM gibi epiteloid mezotelyoma subtipleri daha iyi prognostik faktördür. Aksine, pleomorfik özelliklerin varlığı, kötü prognozun güçlü bir göstergesidir.

Sarkomatoid ve desmoplastik varyantlar, epiteloid mezotelyomadan daha kötü prognoza sahiptir. Bifazik tümörler orta sağkalım süresi gösterir. Desmoplastik mezotelyoma, çok kötü prognoza sahiptir, çoğu hasta tanı sonrasında 6 ay içinde ölür. Sarkomatoid mezotelyoma tanılı hiçbir hastada 5 yıl sağkalım görülmemiştir.

MM için histolojik dereceleme sistemi oluşturulmamıştır ancak ön veriler, nükleer derecenin (nükleer atipi dahil) ve mitotik sayının bağımsız ve kötü prognostik faktörler olduğuna işaret etmektedir (2, 65).

2.6.16. Tedavi

MPM büyüme paterninden dolayı genelde geç bir aşamada teşhis edilir. Bu nedenle, hastaların sadece az bir kısmı radikal cerrahiye müsaittir. Tam bir rezeksiyon teorik olarak mümkün değildir, bu yüzden ameliyat esas olarak multimodalite tedavileri bağlamında uygulanmıştır.

İki ana cerrahi prosedür önerilmiştir: plevranın, tüm akciğerin, perikardın ve diyafragmanın çıkarılması ile birlikte ekstraplevral pnömonektomi (EPP) ve akciğerin korunup plevranın değişken ölçüde uzaklaştırıldığı daha sınırlı rezeksiyon olan plörektomi/dekortikasyon (P/D). P/D, EPP'ye kıyasla peri-operatif mortalite ve

morbidite oranının daha düşük olduğu ve daha iyi sağkalım sonucuna sahip, daha az agresif bir prosedür olarak önerilmiştir (69-71).

Cerrahi serilerin retrospektif incelenmesinde, lokal bölgesel rekürrenslerin MPM hastalarında başarısızlığın ana nedeni olduğu açıkça ortaya çıkmıştır (70-72). Bu gözlemler, EPP veya P/D'den sonra en son kullanılan tekniği yoğunluk ayarlı radyoterapi (Intensity-Modulated RT -IMRT) olan radyoterapi (RT) çalışmalarının başlamasına neden olmuştur. Lokal kontrol ve genel sağkalımda potansiyel fayda, şiddetli akciğer toksisitesi, pulmoner fonksiyon bozukluğu ve yaşam kalitesi ile dengelenmeliyse de, akciğer koruma prosedürlerinden sonra IMRT çalışmaları devam etmektedir (73-75).

Kemoterapi, MM'li birçok hastanın bakım standardı olmaya devam etmektedir. Sisplatin ve pemetreksed'in kombinasyonu, yaklaşık 15 yıldır referans rejim olarak belirlenmiştir. Ne yazık ki, neredeyse tüm MM hastaları, birinci basamak kemoterapi sırasında veya sonrasında ilerleme gösterirler ve ikinci ve sonraki yöntem olarak standart bir seçenek veya belirlenmiş ilaç yoktur (76, 77).

Günümüzde, kemoterapi, ameliyat ve radyoterapi ile ilgili çok modlu bir tedavi rejimi en iyi uzun vadeli sonuçları vermektedir; Ancak, böylesine agresif bir yaklaşımın ardından bile, prognoz zayıf kalırken, ortalama hasta sağkalım süresi bir yılı aşmamaktadır (78).

Bu nedenle yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) ve daha yakın zamanda programlanmış ölüm-1 (PD-1) gibi immün kontrol noktası reseptörlerinin keşfi, kanser immünoterapisinde yeni, heyecan verici bir dönem başlattı (6).

2.7. Malign Mezotelyomada İmmün Kontrol Noktaları

İmmün kontrol noktaları, otoimmüniteden kaçınmak ve kollateral doku hasarını önlemek için bağışıklık sistemini kontrol etmek ve etkisiz hale getirmekle sorumludur (7).

Yeni paradigma, T hücre tükenmesine ve immün toleransa neden olan molekülleri nötralize ederek bastırılmış immün cevabı yeniden etkinleştirmekten

oluşur (7, 79-83). Bu sürecin merkezinde sitotoksik T-lenfosit-ilişkili antijen 4 (CTLA-4) ve programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1) immün kontrol noktası yolları bulunmaktadır (84). CTLA-4 ve PD-1 yollarının bir immün cevabın farklı evrelerinde çalıştığı düşünülmektedir. CTLA-4, immün kontrol noktası inhibitörlerinin "lideri" olarak düşünülür, çünkü potansiyel olarak otoreaktif T hücrelerini naif T hücre aktivasyonunun ilk aşamasında, tipik olarak lenf nodlarında durdurur (85, 86). PD-1 yolu daha önce aktive olmuş T hücrelerini öncelikle çevresel dokulardaki bir bağışıklık tepkisinin sonraki aşamalarında düzenler (85).

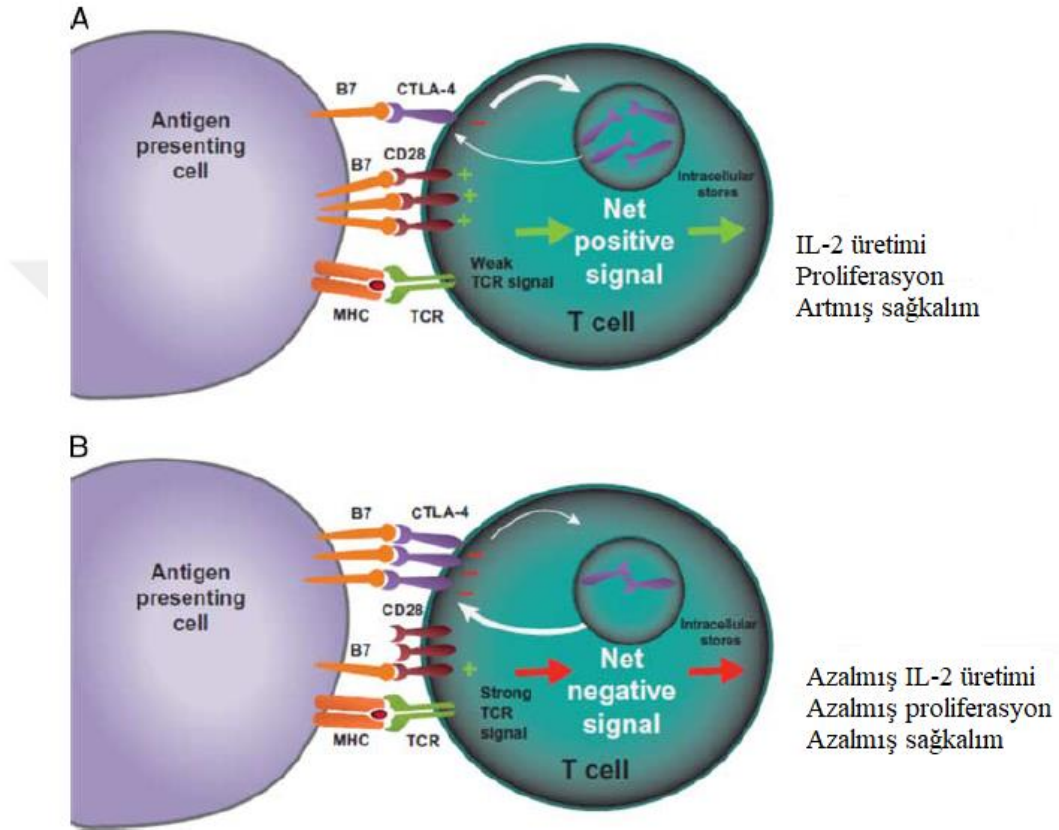
İmmün kontrol noktasını bloke eden antikolar, birçok kanser türünde umut verici sonuçlar göstermiştir. Son zamanlarda MM hastalarında immün kontrol noktalarını bloke eden antikolar araştırılmaktadır (7, 79-83).

2.7.1. Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4)

T-hücre aktivasyonu birden fazla uyarıcı sinyal gerektiren karmaşık bir süreçtir (87). T-hücre aktivasyonu, iki sinyal modeli ile açıklanabilir. Birinci sinyal, major histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülü ile kombinasyon halinde antijen sunan hücre (APC) tarafından sunulan bir antijenin, T-hücre reseptörü (TCR) ve bir CD4 veya CD8 ko-reseptörü ile etkileşime girmesi durumunda sağlanır. İkinci sinyal yolağında, T-hücre ve APC üzerindeki ko-stimülatör moleküller arasındaki etkileşimler daha sonra naif T hücrelerinin başlatılmasına ve farklılaşmasına veya işlevlerini yerine getirmek için efektör T hücrelerinin yeniden etkinleştirilmesine neden olacaktır (88). MHC'ye TCR bağlanması, T hücre aktivasyonuna spesifite sağlar, ancak ilave kostimülatör sinyaller gereklidir. T hücre üzerindeki CD28 molekülleri ile APC üzerindeki B7-1 (CD80) veya B7-2 (CD86) moleküllerinin bağlanması, T hücre içinde sinyal oluşturmaya yol açar. Yeterli düzeyde CD28: B7-1/2 bağlanması, interleukin-2 (IL-2) gibi büyüme sitokinlerinin üretimi, artmış enerji metabolizması ve hücre sağkalım genlerinde upregülasyon yoluyla T hücrelerinin çoğalmasına, artan T hücre sağkalımına ve farklılaşmasına yol açar (87).

CTLA-4 (CD152), esas olarak T-hücrelerinde ve daha düşük oranda aktive edilmiş B-hücreleri, monositler, dendritik hücreler ve granülositlerde bulunan bir immün inhibitör reseptördür. Başlıca rolü, T hücre reseptörünün (TCR) antijenik

uyarımı üzerine T-hücresi aktivasyonunu düzenlemektir (8-14). CTLA-4, B7 için çok daha yüksek bağlanma afinitesi olan bir CD28 homologudur (89, 90). Bununla birlikte, CD28'den farklı olarak, CTLA-4'ün B7'ye bağlanması uyarıcı bir sinyal oluşturmaz. Bu nedenle, bu rekabetçi bağlanma normal olarak CD28: B7 bağlaması tarafından sağlanan kostimülatör sinyali önleyebilir (Şekil 14) (89, 91, 92).



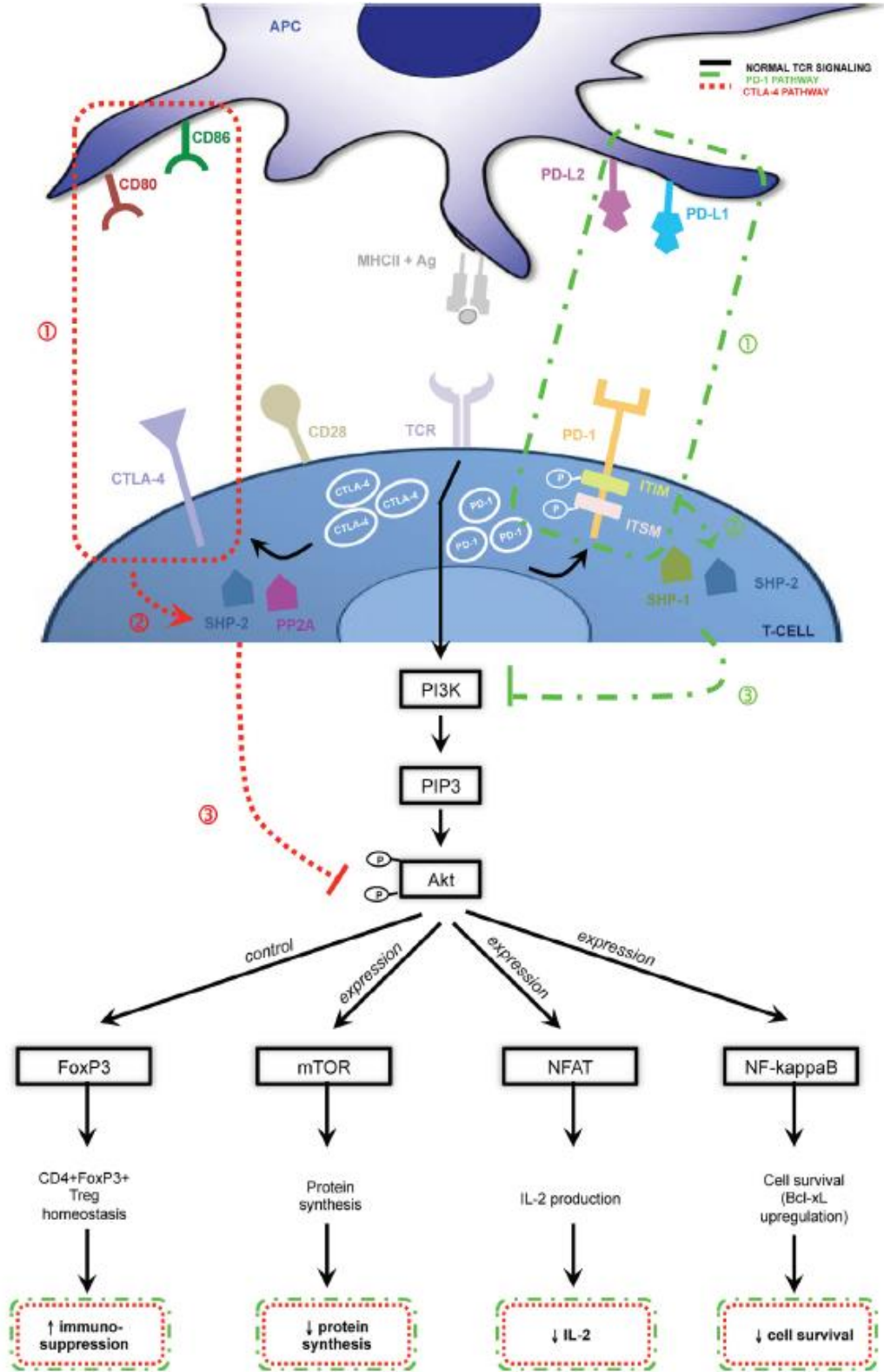
Şekil 14: CTLA-4 aracılı T hücre inhibisyonu (87)

CTLA-4, aktive efektör T hücreleri (Teff) tarafından eksprese edilen, hücre içi veziküllerde tutulan bir transmembran glikoproteindir (14, 93). Hücre içi ve yüzey ifadesi, T-hücresi aktivasyonu ile indüklenir. Hem TCR hem de CD28:B7 bağlanmasından kaynaklanan uyarıcı sinyaller, CTLA-4 içeren veziküllerin ekzositozu yoluyla, hücre yüzeyinde CTLA-4'ün upregülasyonunu indükler (94, 95). Bu işlem, daha güçlü TCR sinyallemeinin hücre yüzeyine daha fazla CTLA-4 translokasyonuna yol açtığı kademeli bir feedback döngüsüyle çalışır. CTLA-4: B7 bağlanması yoluyla net bir negatif sinyal söz konusu olduğunda, T hücrelerinin tam

aktivasyonu, IL-2 üretiminin inhibisyonu ve hücre siklus progresyonuyla engellenir (95). CTLA-4, immün kontrolünün diğer yönlerini de kapsamaktadır. Düzenleyici T hücreleri (Tregler) efektör T hücrelerinin işlevlerini kontrol eder ve böylelikle periferik toleransı korumada kilit oyuncularındır (96, 97). Teff'lerden farklı olarak, Tregler yapısal olarak CTLA-4'ü eksprese eder ve bunların immünosüpresif fonksiyonları için önemli olduğu düşünülmektedir (14, 97).

CTLA-4, APC'deki B7 (CD80/CD86) ligandlarına bağlanarak etki eder. Normalde CD28 bu ligandlar ile T hücre yapım ve uyarımını sağlarken, CTLA-4 CD28 ko-stimülatör molekül ile olan etkileşimini bloke ederek T hücre fonksiyonunu baskılamaktadır (Şekil 15) (14, 98-101). Fizyolojik koşullar altında, CTLA-4'ün immün inhibitör etkisi, çevredeki normal dokuda aşırı hasara neden olmaksızın etkili bir immün cevap oluşmasına neden olur. Bununla birlikte, tümör hücreleri, CTLA-4 aşırı ekspresyonunu indükleyen, T hücresi tükenmesine neden olan bir immünosüpresif sitokin olan transforme edici büyüme faktörü- β 'yı (TGF- β) salgılayarak CTLA-4'ün anormal ekspresyonunu uyarabilir (102-104). T hücrelerinin "tükenme"si, immünsüpresyonun bir mekanizmasını temsil eden "T hücresi disfonksiyonu" halidir (105). Tükenmiş T hücreleri çoğalamaz ve artık efektör işlevlerini uygulayamazlar. CTLA-4'ün T-hücre aktivasyonunu modüle ettiği farklı baskılayıcı mekanizmalar ve yollar arasında şunlar bulunur: (i) T hücrelerinin yüzeyinde CTLA-4 ekspresyonu, hem CD80 hem de CD86 için daha yüksek toplam afinite ile CD28 ko-stimülasyonuna üstün gelir (106); (ii) Protein fosfataz SHP2 ve PP2A'nın aktivasyonu yoluyla, CTLA-4, Akt fosforilasyonunu inhibe ederek T-hücre kinaz sinyal yolağında ko-inhibitör sinyalleri dönüştürür (107, 108); (iii) CTLA-4, CD28'e CTLA-4 bağlanması üzerine aktive olan immünsüpresif sitokin TGF- β 'nin salgılanmasına neden olan Treg'ler üzerinde yapısal olarak eksprese edilir (102, 109).

Kanserde, ko-inhibitör yolların baskınlığının tümörün immün sistem kontrolünden kaçınma özelliğini etkilediği gösterilmiştir (76, 105). Bu nedenle, bu negatif sinyalleme reseptörünün keşfi ve in vitro çalışmalar ve klinik öncesi modellerle tümör kaynaklı immün toleransın kritik rolü, immünoterapötik ilaçların yeni bir sınıfının gelişmesine izin vermiştir (106, 107).



Şekil 15: PD-1 ve CTLA-4'ün immün inhibitör yolakları (99)

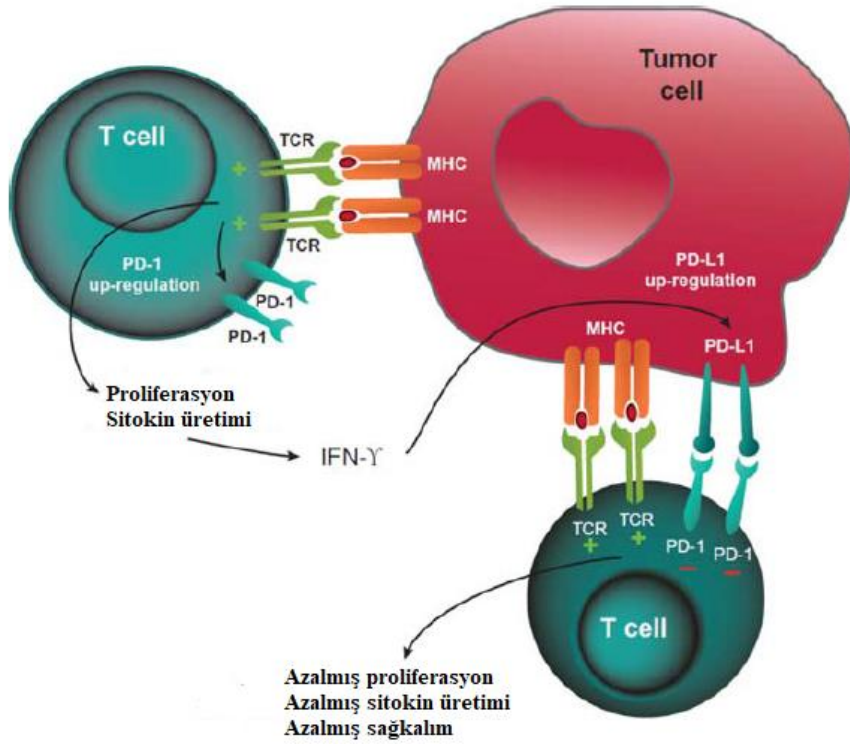
İmmünsüpresif etkileri nedeniyle, CTLA-4, T-hücrelerinin anti tümör aktivitesini arttırmak için ilginç bir hedeftir (99). CTLA-4 inhibitörleri, büyüyen immün modüle edici monoklonal antikor ailesinin prototiplerini temsil eder. Şu anda iki anti-CTLA-4 klinik gelişme mevcuttur: metastatik melanoma hastalarının tedavisinde zaten onaylanmış olan ve farklı tümör tiplerinde diğer antikanser ajanlarla kombinasyon halinde araştırılan ipilimumab ve şu an klinik olarak MM dahil olmak üzere çeşitli tümörlerdeki diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanımı araştırılan tremelimumab (110, 111).

Faz 2 MESOT-TREM-2008 çalışmasında MM hastalarına ikinci basamak tedavi olarak tremelimumab, 90 günde bir 15 mg/kg dozda intravenöz (IV) verildi. Düşük oranda objektif cevaba (ORR) (% 7) rağmen, hastaların %31'inde ve %36'sında, uzun süreli hastalık kontrolü ve 2 yıllık sağkalım oranı açısından umut verici klinik etkinlik gözlemlendi (112). Bu bulgular, tremelimumab'ın yoğun bir dozlama programında kullanıldığı MESOT-TREM-2012 araştırmasında doğrulanmıştır (113). Bu teşvik edici sonuçlara rağmen, büyük, randomize DETERMINE çalışmasında, MESOT-TREM-2012 çalışmasında kullanılan yoğunlaştırılmış program süresince tremelimumab, MM hastalarının nükseden plasebo koluna kıyasla OS (çalışmanın birincil son noktası)'yi iyileştirmemiştir (114).

2.7.2. Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) ve spesifik ligandları programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) ile programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2)

PD-1 (CD279), bir N-terminal IgV-benzeri domaine sahip olan immüoglobülin (Ig) süper ailesinin bir üyesidir. IgV-benzeri alanı plazma membranından ayıran yaklaşık 20 amino asit sapı olan transmembran bir domain ve immüno-reseptör tirozin tabanlı inhibitör motif (ITIM) ve immüno-reseptör tirozin tabanlı anahtar motifi (ITSM) olan bir sitoplazmik domaine sahiptir (115, 116). B7/CD28 kostimülatör reseptör ailesinden olan PD-1, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1; CD274) ve programlanmış ölüm ligandı 2 (PD-L2; CD273) 'ye bağlanarak T-hücre aktivasyonunu düzenler (15-17). PD-1, CTLA-4 gibi, transmembran bir proteindir ve esasen aktif T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar üzerinde eksprese

edilir (117). CTLA-4 sinyalleşmesine benzer şekilde, PD-1 bağlanması, T-hücre proliferasyonunu ve interferon- γ (IFN- γ), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve IL-2 üretimini inhibe eder ve T-hücre sağkalımını azaltır (Şekil 16) (17). PD-1, B7 ailesinin özellikle PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) inhibitör moleküllerine bağlanır ve böylece otoimmüniteyi önler ve doku hasarından kaçınır. PD-1'in homeostatik bağışıklık fonksiyonu, IFN γ aracılığıyla bir geri besleme döngüsü tarafından düzenlenir (118). T-hücresi aktivasyonu, sadece PD-1'in sentezlenmesini indüklemekle kalmaz, aynı zamanda PD-1 ile etkileşebilecek PD-L1 ve/veya PD-L2'nin upregülasyonuna neden olan IFN γ gibi birkaç sitokinin salgılanmasına neden olur. Bu şekilde, immün yanıt zayıflatılır ve immün aracılı doku hasarı kontrol edilir (99).



Şekil 16: PD-1 aracılı T hücre inhibisyonu (87)

PD-L1 esas olarak çeşitli hematopoetik hücrelerde, bazı parankim hücrelerinde ve hematopoetik maligniteler yanı sıra melanom, akciğer kanseri, meme ve over kanseri, pankreas ve özofagus adenokarsinomu, renal hücreli karsinoma ve

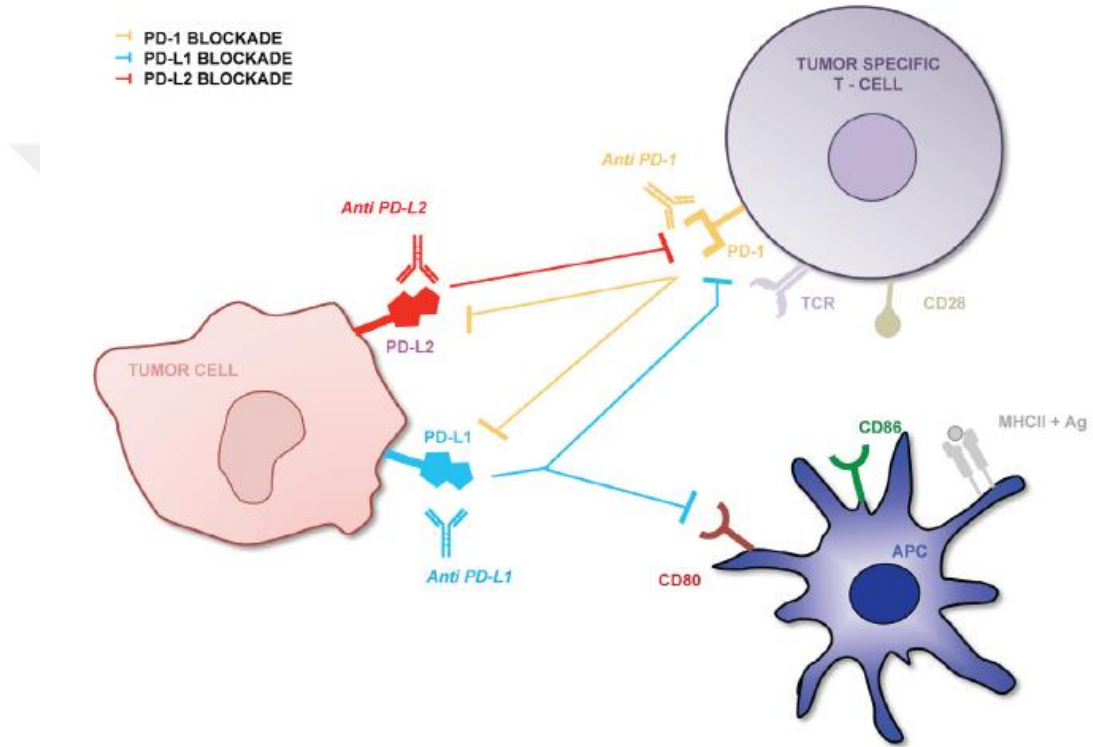
mesane kanseri gibi birçok tümör tipindeki tümör hücrelerinde eksprese edilir (119-122). Ayrıca tümör-infiltrate eden lenfositlerde (TIL) miktarı artmıştır ve ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilidir (88, 123, 124). TIL, tümör spesifik antijenleri tanıyarak anti tümör immün yanıtlarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca T hücre infiltrasyonu, over ve kolon kanseri gibi birçok kanserde zaten iyi bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir. MPM'de, yüksek sayıda CD8+ TIL varlığının prognoz için faydalı olduğu gösterilmiştir (125-127). TIL'lerin MPM'deki rolüyle ilgili mevcut veriler tartışmalıdır, ancak T lenfositlerinin anti tümör immünite için önemli olduğu ve bağışıklık kontrol noktalarını inhibe ederek aktive etmenin MPM prognozunu iyileştirmek için etkili bir strateji olabileceği açıktır (99). PD-L1, PD-1 ile bağlamanın yanı sıra, CD80'i de bağlayabilir (128).

PD-L2, makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri ve ayrıca pankreas, over ve özofagus kanseri hücreleri gibi daha sınırlı bir ekspresyon profiline sahiptir (88, 129). Bununla birlikte, PD-L1'e kıyasla, PD-1'e çok daha yüksek bir afinite ile bağlanır (130).

PD-1'in inhibitör etki mekanizması kısmen hücre içi sinyalleme yolu ile açıklanabilir. PD-L1 veya PD-L2'nin PD-1'e bağlanması, PD-1 sitoplazmik kuyrukta bulunan amino asit dizileri olan ITIM ve ITSM'nin iki sinyalleme motifinin fosforilasyonu ile sonuçlanır ve bu da hücre sinyal yolunda rol oynayan enzimlerin çalışmasından sorumlu olur. Bu fosforilasyon, TCR sinyal yolunun intrasellüler moleküllerini defosforize edecek ve dolayısıyla fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) aktivitesinin indüksiyonunu ve Akt'in aktivasyonunu engelleyecek olan protein fosfatazlar olan SHP1 ve SHP2'nin göçüne yol açacaktır (117). Bu, T-hücre aktivasyonuna neden olan IL-2 sekresyonu, protein mRNA translasyonu için gerekli başlatma, sonlandırma ve uzatma faktörleri gibi protein sentezi ve hücre sağkalımından sorumlu genlerin transkripsiyon blokajıyla sonuçlanır (Şekil 15) (131, 132).

Bu nedenle, bu ligand-reseptör etkileşimini monoklonal antikorlarla bloke etmek, faydalı bir anti tümör bağışıklık tepkisine neden olabilir. Dikkat çekici bir şekilde, PD-1, PD-L1 veya PD-L2 engelleyici antikorlar tarafından hedeflenen moleküler etkileşimler özdeş değildir (80, 81). PD-1 inhibisyonuna karşı spesifik

olarak PD-L1'in engellenmesi PD-1:PD-L2 etkileşimlerini korurken, PD-1:PD-L1 etkileşimlerini bloke edecektir. Bu, PD-1:PD-L2 etkileşimleriyle aracılık edilen selftoleransın korunması nedeniyle, daha az istenmeyen toksisiteye sahip daha hedefe yönelik bir sinyal sağlanır (118, 133). Ayrıca anti-PD-L1 antikorları PD-L1'in PD-1 ile B7 molekülü CD80 arasındaki etkileşimlerini de bloke eder (Şekil 17). Bu da PD-L1'in inhibisyon işlevini iki reseptör aracılığıyla uygulayabildiği anlamına gelir (128).



Şekil 17: PD-1, PD-L1 veya PD-L2'yi hedefleyen monoklonal antikorlar tarafından bloke edilen moleküler etkileşimler (99)

Tümör mikroçevresinde kansere bağlı immün supresyonda potansiyel rolü göz önüne alındığında, PD-1/PDL yolağını hedeflemek cazip bir tedavi stratejisi gibi gözükmemektedir (129). PD-L1 proteini çoğu kanserde değerlendirilen yeni bir terapötik biyomarkırdır (80, 82, 134). PD-1'e (nivolumab, pembrolizumab) veya PD-L1'e (atezolizumab, durvalumab, avelumab) karşı terapötik monoklonal antikorlar (mAb) ile PD-1/PD-L1 etkileşiminin engellenmesi yenilikçi ve umut verici bir terapötik yaklaşım gibi görünüyor (17). Daha yakın zamanlarda, PD-1 blokajının,

metastatik melanomalı hastalarda ve daha önce tedavi edilen metastatik skuamoz ve non-skuamoz küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu (KHDAK) hastalarda sağkalım ve progresyonsuz sağkalımı iyileştirdiği gösterildi (135-142).

MPM'de, immünohistokimya ile PD-L1 ekspresyonunu %20 ila %70 arasında değişen oranlarda bildiren çalışmalar mevcuttur (143-146). PD-L1 ekspresyonunun, daha kötü sağkalım ile anlamlı derecede ilişkili olduğu ve epiteloid olmayan histolojide aşırı ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde sadece bir yayında hem tümör hücreleri hem de TIL'ler üzerindeki PD-L1 ekspresyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada PD-L1 + tümörlerin, PD-L1 - tümörlere göre daha fazla PD-L1 + TIL ve lenfoid agregat içerdiği gösterilmiştir (99).

Faz II NivoMes çalışması (nivolumab) ve Faz IB JAVELIN denemesi (avelumab), MM'de PD-L1 ekspresyonu seçim kriteri olmadan tedavi ederek yaklaşık %50 oranında bir hastalık kontrol oranı göstermiştir. Genel yanıt oranı NivoMes çalışmasında %28, JAVELIN denemesinde %9.4 idi (147, 148). Öte yandan, PD-L1 ekspresyonu ile etkinlik arasındaki ilişki, kısmen farklı testlerin ve pozitifliğin farklı eşiklerinin kullanımı nedeniyle tartışmalı kalmaya devam etmektedir (149). İki pembrolizumab çalışması (150, 151), nivolumab çalışması (147) ve avelumab çalışması (148), PD-L1 ekspresyonu düzeyi ile tedavi etkinliği arasında net bir ilişki olmadığını göstermişlerdir. Üstelik MM, kontrol noktası blokaj inhibitörlerine verilen yanıtın önemli bir belirleyicisi olan mutasyonel yük (152) açısından yüksek sıralamaya sahip değildir. MM patogenezi aslında inflamasyon tarafından yönlendirilir gibi görünse de, mAb'yi hedefleyen PD-1/PD-L1'in immün mikro çevre ile olan etkileşimleri iyi anlaşılmamıştır. İmmünoterapinin immün ve inflamatuvar korelasyonları hakkında daha iyi bir bilgi birikimi ile muhtemelen kombinasyon terapilerinin rasyonel tasarımı gibi MM'da immünoterapinin tam potansiyeli kullanılacaktır (153).

Kanserde PD-L2'yi hedeflemekle ilgili insan verileri kısıtlıdır (129). Ohigashi ve arkadaşları (122), insan özofageal kanserinde PDL1 ve PD-L2 ekspresyonunu araştırarak ameliyat sonrası hastaların prognozundaki klinik önemini saptamışlardır. Bu çalışma, kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ve immünohistokimyaı kullanarak hem PD-L1 hem de PD-L2'nin özofagus kanseri

hastalarının frozen doku örneklerinde eksprese edildiğini ve PD-L1 pozitif hastalarda olduğu gibi, PD-L2-pozitif hastaların negatif hastalara göre daha kötü prognoza sahip olduklarını göstermiştir (122). Pankreas kanseri olan 51 hastayı içeren retrospektif bir çalışmada, analiz edilen tümörlerin %27'sinde PD-L2, %39'unda PD-L1 ekspresyonu gösterildi. PD-L2 ekspresyonu ve sağkalım arasında bir korelasyon bulunmadı, buna karşın PD-L1 ekspresyonu, azalmış sağkalıma karşılık geldi (121). Benzer şekilde, over kanseri olan 70 hastadan oluşan bir kohort çalışmasında (120) ve hepatosellüler karsinomlu 125 hastayı içeren bir çalışmada (154), PD-L2 ekspresyonunun azalmış hastalısız sağkalım ile korelasyonuna rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Birkaç çalışma, PD-L2 eksprese eden tümörlü hastalarda sağkalımda azalma bulmuşsa da, bu çalışmaların sadece birinde istatistiksel farka ulaşmıştır (122).

MM hastalarında PD-L2 ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır (99). PD-L2'nin kanser immünoterapisinde hedeflenecek ilgili bir molekül olup olmadığını gerçekten belirlemek için daha fazla çalışma gereklidir (129). Ek olarak, PD-L1 ve PD-L2'nin kombine ya da anti-CTLA4 ile birlikte anti-PDL2'nin kombine çift blokajı, indüksiyon evresi boyunca bir immün kontrol noktasını daha fazla bloke eder, potansiyel olarak daha verimli olabilir (155).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması

Çalışmamızda 2010 ile 2017 yılları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında değerlendirilen plevraya ait VATS, biyopsi, dekortikasyon ve kitle eksizyon materyallerinde MPM tanısı almış 50 olgu değerlendirilmiştir.

Olgulara ait yaş, cinsiyet, tümörün histolojik alt tipi ve sağkalım süreleri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji bölümüne ait patoloji raporlarından, Probel otomasyon sisteminden ve Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji bölümünden elde edilmiştir.

Çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi 13.02.2017 tarihinde 31 nolu karar ile yerel etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, TIP.17.004 nolu proje kod numarası ile desteklenmiştir.

3.2. Parafin Blok Seçimi

Tüm materyallere ait hematoksil-eozin (H&E) ve tanıya yönelik yapılmış olan immünohistokimyasal belirteçler ile boyalı preparatlar iki gözlemci tarafından tekrar incelenmiştir. H&E boyalı preparatlar ile materyaller WHO sınıflamasına göre histolojik alt tiplerine ayrılmıştır (2). Çalışma için tümör hücrelerinin en yoğun olduğu ve nekrozun en az olduğu bloklar seçilmiştir.

3.3. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Deparafinizasyon İşlemi

Çalışmada CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2'ye yönelik immünohistokimyasal belirteçler için her olgudan üçer adet mikrotom cihazı (Shandon, ABD), adezivli lamlara (Isotherm, Almanya) 5µm kalınlığında kesitler ve aynı esnada DNA'dan CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 gen bölgelerini PCR aracılığıyla çoğaltmak için 1,5ml reaksiyon tüplerine 5µm kalınlığında beşer adet kesit alındı. PCR çalışmak amacıyla reaksiyon tüplerine kesit alınmadan önce doku bulaşını önlemek için mikrotom cihazı ksilen ile temizlendi ve her olgu için mikrotom bıçağı değiştirilerek mikrotom cihazı yeniden silindi.

İmmünohistokimyasal çalışma için kesit alınan lamlar 65°C'de 30 dakika etüvde bekletilerek deparafinizasyonu ve lamlara dokuların yapışması sağlandı.

3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma

3.4.1. İmmünohistokimyada kullanılan belirteçler ve çalışma protokolü

İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan CTLA-4 (Santa Cruz Biotechnology, ABD, F8 klon, monoklonal fare/IgG antikoru, katalog no: sc-376016), PD-L1 (Cell Signaling Technology, ABD, E1L3N klon, monoklonal tavşan/IgG antikoru, katalog no: 13684) ve PD-L2 (Cell Signaling Technology, ABD, D7U8C klon, monoklonal tavşan/IgG antikoru, katalog no: 82723) kullanıma hazır formda primer antikorlardır.

İmmünohistokimyasal çalışmanın sağlıklı değerlendirilmesi için kontrol dokular çalışıldı. CTLA-4 ve PD-L2 antikorları için tonsil dokusu, PD-L1 antikoru için plasenta dokusuna ait parafin bloklar kontrol bloğu olarak seçildi. Bu kontrol blokları kullanılarak primer antikorların optimum çalışma dilüsyonu ve inkübasyon süresi saptandı (Tablo 5).

Tablo 5: İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar

Antikor	Klon	Sellüler lokalizasyon	Dilüsyon	İnkübasyon	Firma
CTLA-4	F8	Sitoplazmik	1/500	2 saat	Santa Cruz Biotechnology
PD-L1	E1L3N	Sitoplazmik	1/400	1 saat 32 dk	Cell Signaling Technology
PD-L2	D7U8C	Sitoplazmik	1/100	1 saat 32 dk	Cell Signaling Technology

İmmünohistokimyasal çalışma Ventana BenchMark Ultra cihazında (Roche Diagnostics, ABD) otomatik olarak, aşağıda belirtilen sıra ile yapıldı:

PD-L1 ve PD-L2 antikorları için;

- 1) Cihaza yerleştirilen lamalar, 72°C'ye kadar ısıtılarak deparafinizasyon yapıldı.
- 2) 95°C'ye kadar ısıtılarak Ventana ULTRA Conditioner 1-EDTA solüsyonu (Roche Diagnostics, ABD) ile 64 dakika inkübe edilerek hücre iyileştirmesi yapıldı.
- 3) Antikor inkübasyonu için lamalar 37°C'ye soğutuldu ve 4 dk inkübe edildi.
- 4) Bu aşamada primer antikor uygun dilüsyonda el ile lamlara uygulandı. 1 saat 32 dakika inkübe edildi.
- 5) Arka plan boyanma için bir damla hematoksilen uygulanıp 16 dk, Bluing belirteci uygulanıp 4 dk inkübe edildi.

CTLA-4 antikoru için;

- 1) Cihaza yerleştirilen lamalar, 72°C'ye kadar ısıtılarak deparafinizasyon yapıldı.
- 2) 95°C'ye kadar ısıtılarak Ventana ULTRA Conditioner 2-Sitrat solüsyonu (Roche Diagnostics, ABD) ile 68 dakika inkübe edilerek hücre iyileştirmesi yapıldı.
- 3) Antikor inkübasyonu için lamalar 37°C'ye soğutuldu ve 4 dk inkübe edildi.
- 4) Bu aşamada primer antikor uygun dilüsyonda el ile lamlara uygulandı ve 2 saat inkübe edildi.
- 5) Arka plan boyanma için bir damla hematoksilen uygulanıp 16 dk, Bluing belirteci uygulanıp 4 dk inkübe edildi.

Makineden çıkarılan lamalar saf alkolde 3 dakika boyunca bekletildi. Ardından 3 dakika boyunca ksilende bekletildi ve lamel ile kapatıldı.

3.4.2. İmmünohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal boyama uygulanan preparatlar ışık mikroskopunda, 2 patolog tarafından semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi. 3 antikor için de sitoplazmik boyanmalar pozitif kabul edildi.

Tüm olgularda pozitif boyanan alanların yüzdesi (yaygınlığı) ve boyanma şiddeti (yoğunluğu) skorlandı ve toplam skor elde edildi. Tümör hücrelerinin %0-5'inde boyanma skor 0, %6-25'inde boyanma skor 1, %26-50'sinde boyanma skor 2, %51-75'inde boyanma skor 3 ve %76-100'ünde boyanma skor 4 olarak, hücrelerin boyanma şiddeti ise boyanma yoksa skor 0, zayıf boyanma varlığında skor 1, orta

şiddette boyanma skor 2, güçlü boyanma skor 3 olarak belirlendi. Toplam skorda boyanma yoksa negatif, 1, 2 zayıf pozitif, 3, 4 orta şiddette pozitif, 5-7 güçlü pozitif olarak tespit edildi (156).

3.5. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve PCR Analizi

3.5.1. RNA İzolasyonu

DNA'dan CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 gen bölgelerini PCR aracılığıyla çoğaltmak için RNA izolasyonu işlemi, Roche High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Almanya, Ref no: 03270289001)'i, santrifüj cihazı (Beckman Coulter, Microfuge 16, ABD), vorteks (IKA, Almanya) ve dijital kurutma banyosu (Labnet AccuBlock, ABD) kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde yapıldı:

- 1) Parafin bloklardan 5µm kalınlığında beşer adet kesit alınan 1,5ml reaksiyon tüplerine 800 µl ksilen eklendi. 5 dk inkübe edildikten sonra birkaç dk vorteks ile karıştırıldı.
- 2) 400 µl etanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. 12000 devirde 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 3) 1 ml etanol eklendi, vorteks ile karıştırıldı. 12000 devirde 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 4) Etanol kalıntılarından kurtulmak için tüp kısa bir süre kağıt havlu ile kurutuldu. 55°C'de 10 dk doku pelleti kurutuldu.

Bu basamaklar ile deparafinizasyon sağlandı ve RNA izolasyon işlemine geçildi.

- 5) Her doku pelletine 116 µl Tissue Lysis Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve kurutma banyosunda +55°C'de bir gece bekletildi.
- 6) 325 µl Binding Buffer ve 325 µl etanol eklenip, pipeting yaparak nazikçe karıştırıldı.
- 7) Lizat pipet ile High Pure filtreli tüp ve toplayıcı tüp kombinasyonuna aktarıldı.
- 8) 30 sn 8000 devirde santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 9) 12000 devirde santrifüj edildi ve toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 10) 500 µl Wash Buffer I çalışma solüsyonu eklendi. 8000 devirde 15 sn santrifüj edilip toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.

- 11) 500 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklendi. 8000 devirde 15 sn santrifüj edilip toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 12) 300 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklendi. 8000 devirde 15 sn santrifüj edilip toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 13) 2 dk 12000 devirde santrifüj edildi ve toplayıcı tüp atılarak filtreli tüpün altına 1,5 ml reaksiyon tüpü yerleştirildi.
- 14) 90 µl Elution Buffer eklendi. 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi ve filtreli tüp atıldı.
- 15) Reaksiyon tüpüne 10 µl DNaz Incubation Buffer ve 1 µl DNaz I çalışma solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. +37°C'de 45 dk inkübe edildi.
- 16) 38 µl Tissue Lysis Buffer ve 40 µl Proteinaz K solüsyonları eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve +55°C'de 1 saat inkübe edildi.
- 17) 325 µl Binding Buffer ve 325 µl etanol eklenip karıştırıldı. Pipet ile High Pure filtreli tüp ve toplayıcı tüp kombinasyonuna aktarıldı.
- 18) 8000 devirde 30 sn santrifüj edildi ve toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 19) 12000 devirde 30 sn santrifüj edildi ve toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 20) 500 µl Wash Buffer I çalışma solüsyonu eklenip 8000 devirde 15 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 21) 500 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklenip 8000 devirde 15 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 22) 300 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklenip 8000 devirde 15 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı.
- 23) 2 dk 12000 devirde santrifüj edildi.
- 24) High Pure filtreli tüpün altına 1,5 ml reaksiyon tüpü yerleştirildi. 50 µl Elution Buffer eklendi, +15-+25°C'de 1 dk inkübe edildi. 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Böylelikle RNA toplanmış oldu. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması

RNA'dan cDNA sentezine başlamadan önce, spektrofotometre cihazında (BioDrop, µLite, İngiltere) 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı ölçüldü. Saflık oranları 1,8 civarı olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

3.5.3. cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezinde Roche EvoScript Universal cDNA Master Kit (Roche, Almanya, Ref no: 07912439001)'i ve termal cyclers cihazı (SensoQuest, Almanya) kullanıldı. Aşağıda belirtilen işlemler yapıldı:

1. cDNA Master Kiti içerisinde bulunan reaktifler çözündürülüp buz üzerine bırakıldı.
2. Her reaktif berrak bir görünüm alana kadar vortekslendi.
3. Öncelikle her vaka için spektrofometrede ölçülen RNA 100 nm'ye göre eşitlenerek hesaplandı, diğer reaksiyon bileşenleri de Tablo-6'da gösterildiği gibi toplam 18µl olacak şekilde hesaplandı. Buz üzerine yerleştirilen reaksiyon tüplerine reaksiyon bileşenleri bırakıldı.

Tablo-6: cDNA elde etmek için kullanılan reaktiflerin hesaplanma yöntemi

Reaktif	Hacim (µl)
Su	x
Reaction Buffer	4.0
RNA	x
Toplam hacim	18.0

3.5.4. RT-PCR Analizi

RT-PCR analizinde Roche FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, Almanya, Ref no: 06 402 682 001) kiti, primer olarak Roche CTLA-4 (Roche, Almanya, Id: 113194), Roche PD-L1 (Roche, Almanya, Id: 104030), Roche PD-L2 (Roche, Almanya, Id: 117537) ve kontrol primer olarak Roche ACTB (Roche, Almanya, Id: 143636) kullanıldı. Roche Cobas Z 480 (Roche, Almanya) cihazında, LightCycler 480 Sistemi ile çalışıldı.

PCR karışımı, reaksiyon kuyusu başına 20 µl nihai hacim olacak şekilde Roche FastStart Essential DNA Probes Master kiti ile aşağıda belirtilen prosedüre göre hazırlandı.

1. Solüsyonlar çözündürüldü ve tüm içeriğin geri kazanılmasını sağlamak için, açılmadan önce bir mikrosantrifüjde şişeler kısaca spinlendi.

Yukarı ve aşağı pipetleme yapılarak dikkatlice karıştırıldı ve solüsyonlar buz üzerinde saklandı.

2. Reaksiyon tüplerine buz üzerinde PCR karışımları hazırlandı.

Bileşenler Tablo-7’de gösterilen sırayla eklenerek her reaksiyon kuyusu için 20 µl PCR karışımı hazırlandı.

Tablo-7: LightCycler 480 Probe Master kullanarak her 20 µl reaksiyon için PCR karışımı hazırlama şablonu

Bileşen	Hacim
Su	4 µl
LightCycler 480 Probe Master	10 µl
RealTime hazır spesmen	1 µl
Toplam Hacim	15 µl

3. Yukarı ve aşağı pipetleme yaparak dikkatlice karıştırıldı.
4. LightCycler 480 Multiwell Plakasının her bir kuyucuğuna 15 µl PCR karışımı pipetlendi
Her kuyudaki PCR karışımına 5 µl örnek cDNA pipetlendi
5. MultiCell Plakası LightCycler 480 Sızdırmaz Folyo ile kapatıldı
6. Multiwell Plate'i LightCycler 480 cihazına aktarıldı
7. Tablo-8’de tarif edilen PCR protokolü kullanılarak LightCycler 480 Cihazı çalıştırıldı.

Tablo-8: LightCycler 480 Cihazı ile çalışılan PCR protokolü

Programlar			
Program ismi		Döngüler	Analiz modu
Pre-inkübasyon		1	Yok
Amplifikasyon		45	Niceleme
Soğutma		1	Yok
Sıcaklık Hedefleri			
Hedef (°C)	Edinme Modu	Bekletme (saat:dk:sn)	Pik değeri
Pre-inkübasyon			
95	Yok	00:10:00	4.4
Amplifikasyon			
95	Yok	00:00:10	4.4
60	Yok	00:00:30	2.2
72	Tek	00:00:01	4.4
Soğutma			
40	Yok	00:00:30	2.2

3.6. İstatistiksel Yöntem

Araştırma verilerimizin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS 18.0 for Windows (Statistical Package for Social Sciences) istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenlerin sıklığı, numerik verilerin ortalamaları ve standart sapmaları bulundu. Ölçümsel değişkenler ortalama±standart sapma (SS) ile, kategorik değişkenler sayı ve yüzde (%) ile sunuldu. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile ölçüldü. İstatistiksel değerlendirilmelerde normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin iki grup arasındaki ortalamalarının değerlendirilmesinde Bağımsız t testi, normal dağılıma uymayanlar ise Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Kategorik değişkenlerin istatistiksel değerlendirmesinde ise Ki-Kare testi kullanıldı. Hipotezler çift yönlü olup, $p \leq 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Diyarbakır Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na 2010-2017 yılları arasında gönderilmiş, MPM tanısı almış 50 adet materyal çalışmaya alındı.

Çalışmamızdaki hastaların prognostik parametreleri, immünohistokimyasal boyanma özellikleri ve moleküler analiz sonuçları Tablo-9'da verilmiştir.

Tablo-9: Prognostik parametreler, immünohistokimyasal ve moleküler analiz sonuçları

		Frekans	%
Histolojik Alt Tip	Epiteloid	44	88
	Sarkomatoid	1	2
	Mikst	5	10
Cinsiyet	E	37	74
	K	13	26
İHK PD-L1 Ekspresyonu	Negatif	35	70
	Zayıf Pozitif	7	14
	Orta Şiddette Pozitif	6	12
	Güçlü Pozitif	2	4
İHK PD-L2 Ekspresyonu	Negatif	46	92
	Zayıf Pozitif	4	8
	Orta Şiddette Pozitif	0	0
	Güçlü Pozitif	0	0

İHK CTLA-4 Ekspresyonu	Negatif	45	90
	Zayıf Pozitif	5	10
	Orta Şiddette Pozitif	0	0
	Güçlü Pozitif	0	0
PD-L1 Gen Ekspresyonu	Negatif	45	90
	Pozitif	5	10
PD-L2 Gen Ekspresyonu	Negatif	39	78
	Pozitif	11	22
CTLA-4 Gen Ekspresyonu	Negatif	40	80
	Pozitif	10	20
Ort±SS			
Yaş	61,52±11,4		
Ortalama Sağ Kalım	12.98± 1.33		

İHK: İmmünohistokimya, E: Erkek, K:Kadın

4.1.1. Histolojik Alt Tip

Olguların WHO Sınıflamasına göre 44'ü epitelooid tip, 1'i sarkomatoid tip, 5'i ise bifazik tip MPM olarak değerlendirildi (Tablo-9).

4.1.2. Cinsiyet

Çalışmamızdaki 50 olgunun 37'si erkek, 13'ü kadındır (Tablo-9). Cinsiyete göre PD-L1, PD-L2 ile CTLA-4'ün immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (Tablo-10).

Tablo-10: Cinsiyet ile immünohistokimyasal ve moleküler PD-L1, PD-L2 ile CTLA-4 ekspresyonlarının Mann-Whitney U analiz testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları

	İHK\ PD-L1		İHK\ PD-L2		İHK\ CTLA-4		M\ PD-L1		M\ PD-L2		M\ CTLA-4	
Cinsiyet	PD-L1		PD-L2		CTLA-4		PD-L1		PD-L2		CTLA-4	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
E	26	11	34	3	35	2	34	3	30	7	30	7
K	9	4	12	1	10	3	11	2	9	4	10	3
P	0,602*		0,725*		0,103*		0,595*		0,445*		0,707*	
Değeri												

İHK: İmmünohistokimya, M: Moleküler, E: Erkek, K:Kadın

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.1.3. Yaş

Olguların en genci 37, en yaşlısı 83 yaşında olup, yaş ortalaması 61,52±11,4 olarak hesaplanmıştır. Yaşa göre immünohistokimyasal PD-L1, PD-L2, CTLA-4 ekspresyonu ve moleküler PD-L1 ile CTLA-4 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi. Yaşa göre moleküler PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlendi (p:0,041) (Tablo-11).

Tablo-11: Yaş ile immünohistokimyasal ve moleküler PD-L1, PD-L2 ile CTLA-4 ekspresyonlarının Mann-Whitney U analiz testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları

Yaş	İHK\ PD-L1		İHK\ PD-L2		İHK\ CTLA-4		M\ PD-L1		M\ PD-L2		M\ CTLA-4	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
P değeri	0,966*		0,641*		0,638*		0,170*		0,041*		0,166*	

İHK: İmmünohistokimya, M: Moleküler

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.1.4. Sağkalım Süresi

Olguların sağkalım süresi en kısa 2,40 ay, en uzun 37,85 ay olup, ortalama $12,98 \pm 1,33$ aydır. Ortalama sağkalım süresi ile immünohistokimyasal PD-L1 ve CTLA-4 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ancak PD-L2'nin immünohistokimyasal ekspresyonu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ($p: 0,045$) (Tablo-12).

Tablo-12: Ortalama sağkalım ile immünohistokimyasal PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonlarının Kruskal Wallis analiz testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları

	PD-L1		PD-L2		CTLA-4	
	Frekans	Ortalama sağkalım süresi	Frekans	Ortalama sağkalım süresi	Frekans	Ortalama sağkalım süresi
Negatif	35	25,11	46	24,28	45	24,71
Zayıf pozitif	7	26,14	4	39,50	5	32,60
Orta şiddette pozitif	6	30,67	-	-	-	-
Güçlü pozitif	2	14,50	-	-	-	-
P Değeri	0,587*		0,045*		0,251*	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Ortalama sağkalım süresi ile moleküler PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (Tablo-13).

Tablo-13: Ortalama sağkalım ile moleküler PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonlarının Mann-Whitney U analiz testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları

	PD-L1		PD-L2		CTLA-4	
	Frekans	Ortalama sağkalım süresi	Frekans	Ortalama sağkalım süresi	Frekans	Ortalama sağkalım süresi
Negatif	45	25,13	39	25,26	40	25,03
Pozitif	5	28,80	11	26,36	10	27,40
P Değeri	0,615*		0,824*		0,658*	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Ortalama sağkalım ile MPM histolojik alt tipleri arasında da anlamlı fark izlenmedi (Tablo-14).

Tablo-14: Ortalama sağkalım ile MPM histolojik alt tiplerinin Mann-Whitney U analiz testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları

	Histolojik Alt Tipler	Frekans	Ortalama Değer	P Değeri
Ortalama	Epiteloid Tip	44	26,14	0,403*
SağKalm	Non-epiteloid Tip	6	20,83	
Süresi	Toplam	50		

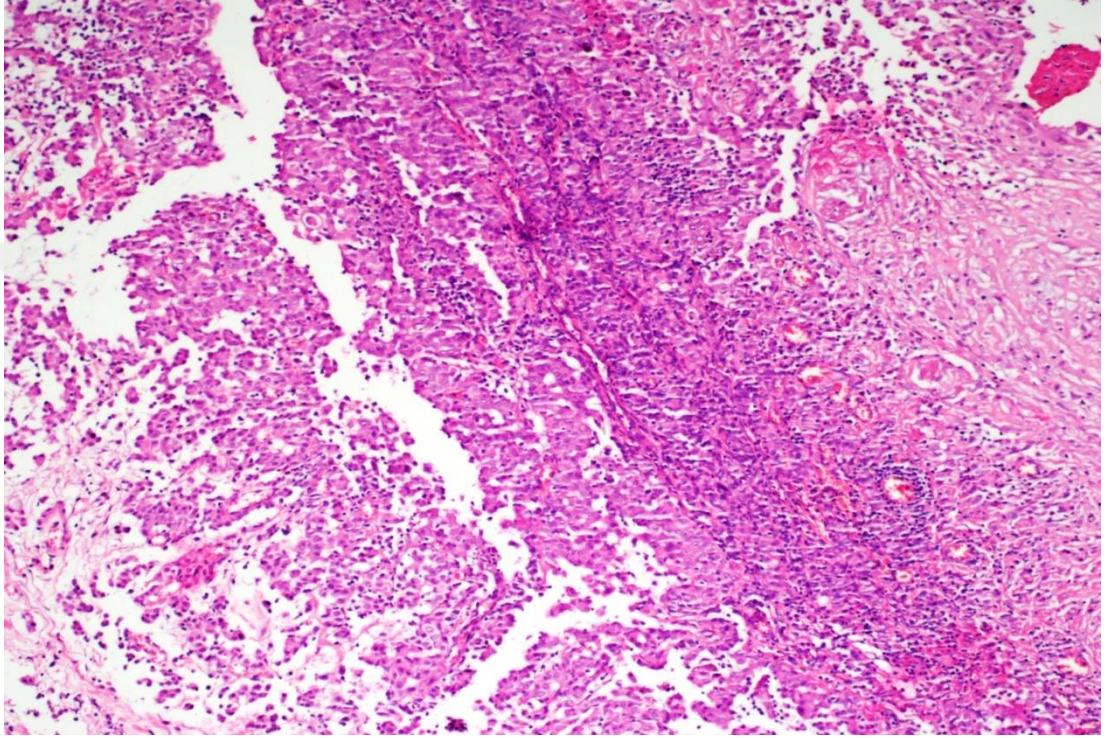
*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

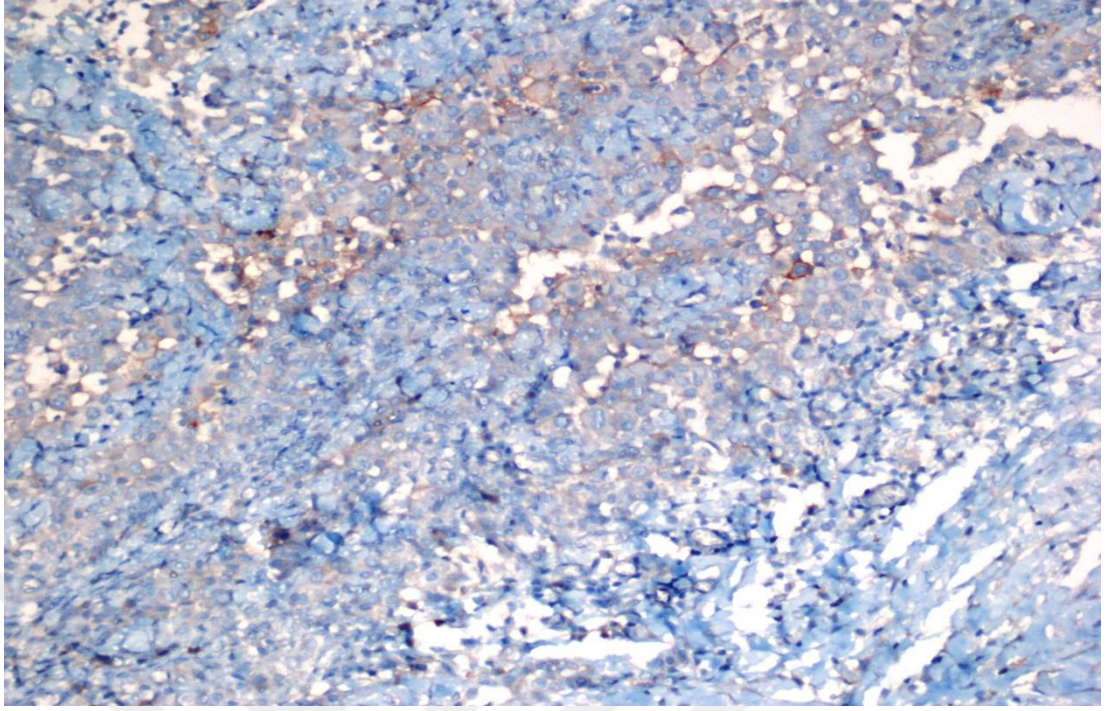
İmmunohistokimyasal çalışmada tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi. Tüm olgularda pozitif boyanan alanların yüzdesi (yaygınlığı) ve boyanma şiddeti (yoğunluğu) skorlandı ve toplam skor elde edildi. Toplam skor 0 ise negatif, 1, 2 zayıf pozitif, 3, 4 orta şiddette pozitif, 5-7 güçlü pozitif olarak tespit edildi (156).

4.2.1. PD-L1 Ekspresyonu

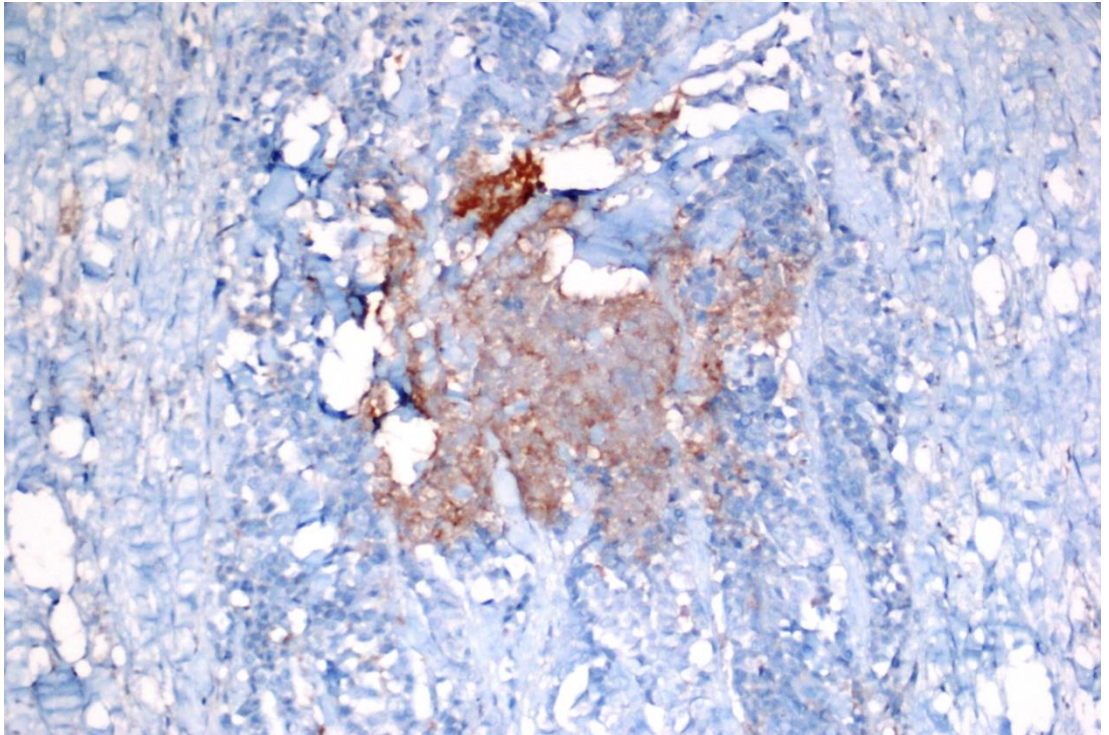
MPM olgularında PD-L1 ekspresyonu incelendiğinde 50 olgunun 7'si zayıf (%14), 6'sı orta şiddette (%12), 2'si güçlü (%4) olmak üzere toplam 15'i pozitif (%30), 35'i negatif (%70) olarak izlendi (Şekil 18-22).



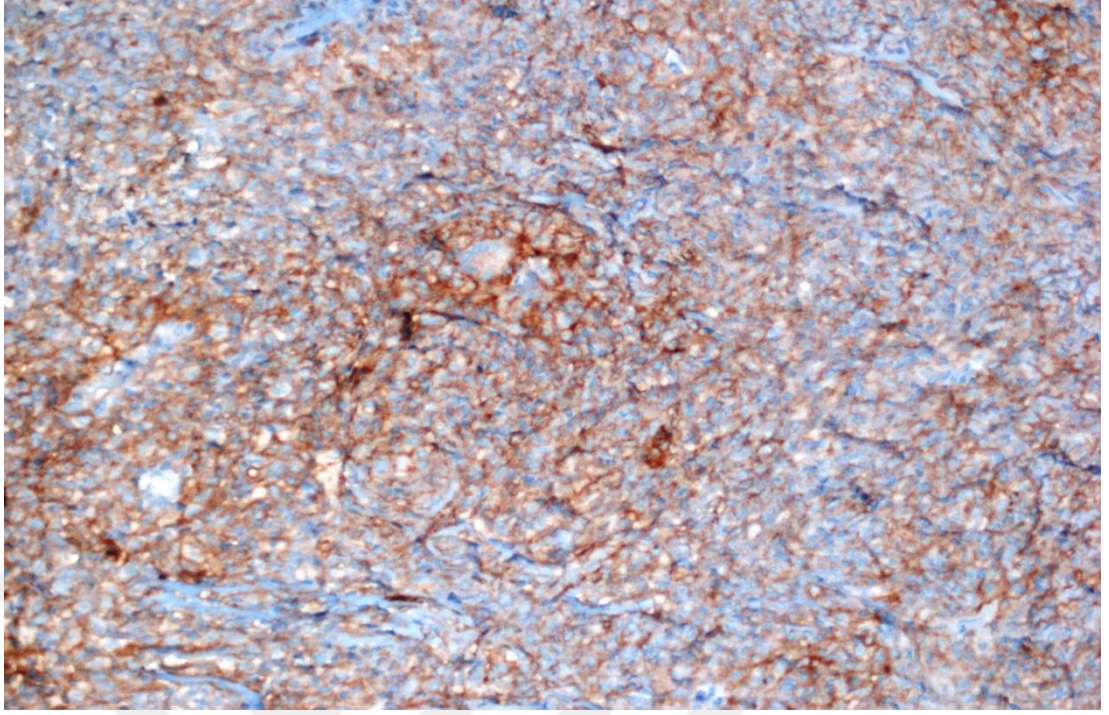
Şekil 18: Epiteloid tip MPM'nın histolojik görünümü (H&E, X100)



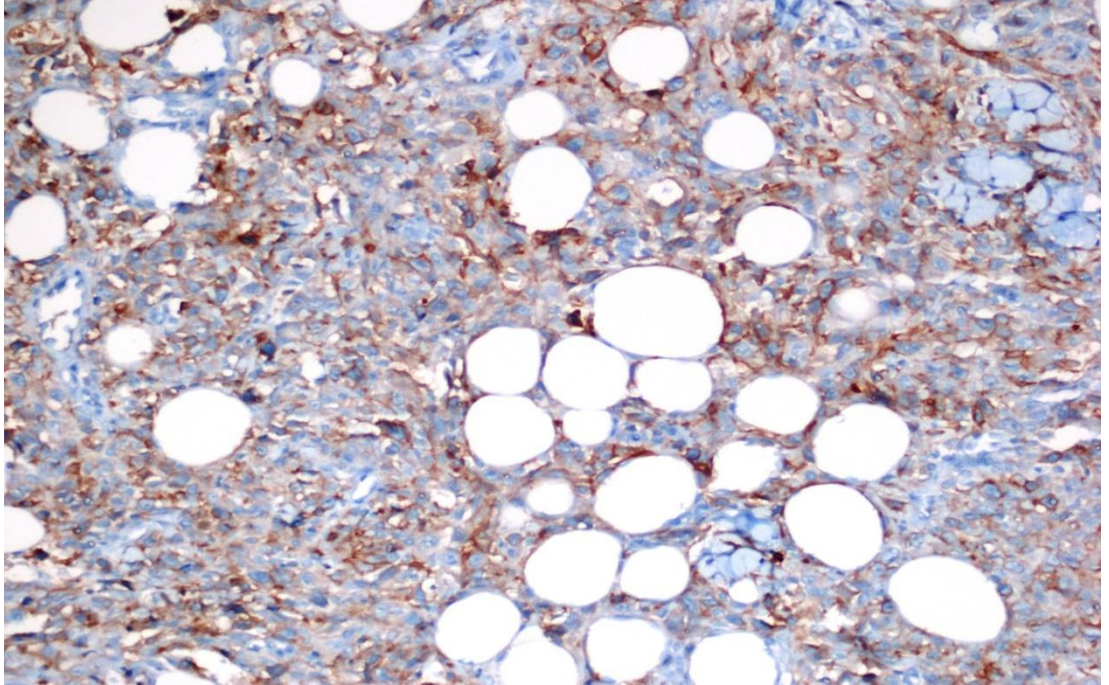
Şekil 19: Epiteloid tip MPM’da immünohistokimyasal olarak zayıf PD-L1 ekspresyonu (DAB, X200)



Şekil 20: Epiteloid tip MPM’da immünohistokimyasal olarak orta şiddette PD-L1 ekspresyonu (DAB, X200)



Şekil 21: Epiteloid tip MPM’da immünohistokimyasal olarak güçlü PD-L1 ekspresyonu (DAB, X200)



Şekil 22: Bifazik tip MPM’da immünohistokimyasal olarak güçlü PD-L1 ekspresyonu (DAB, X200)

PD-L1 ekspresyonu izlenen 15 olgunun 14'ü epiteloid tip, güçlü pozitiflik izlenen 1 olgu bifazik tip MPM tanısına sahipti. MPM olgularında PD-L1 immünreaktivitesinin değerlendirmesi Tablo-15 ve 16'da yapılmıştır. Histolojik alt tip ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi.

Tablo-15: MPM alt gruplarında PD-L1 değerlendirmesi

Histolojik Alt Tip	PD-L1		Toplam	P Değeri
	Negatif	Pozitif		
Epiteloid	30 (%68,2)	14 (%31,8)	44 (%100)	0,654*
Non-epiteloid	5 (%83,3)	1 (%16,7)	6 (%100)	
Toplam	35 (%70)	15 (%30)	50 (%100)	

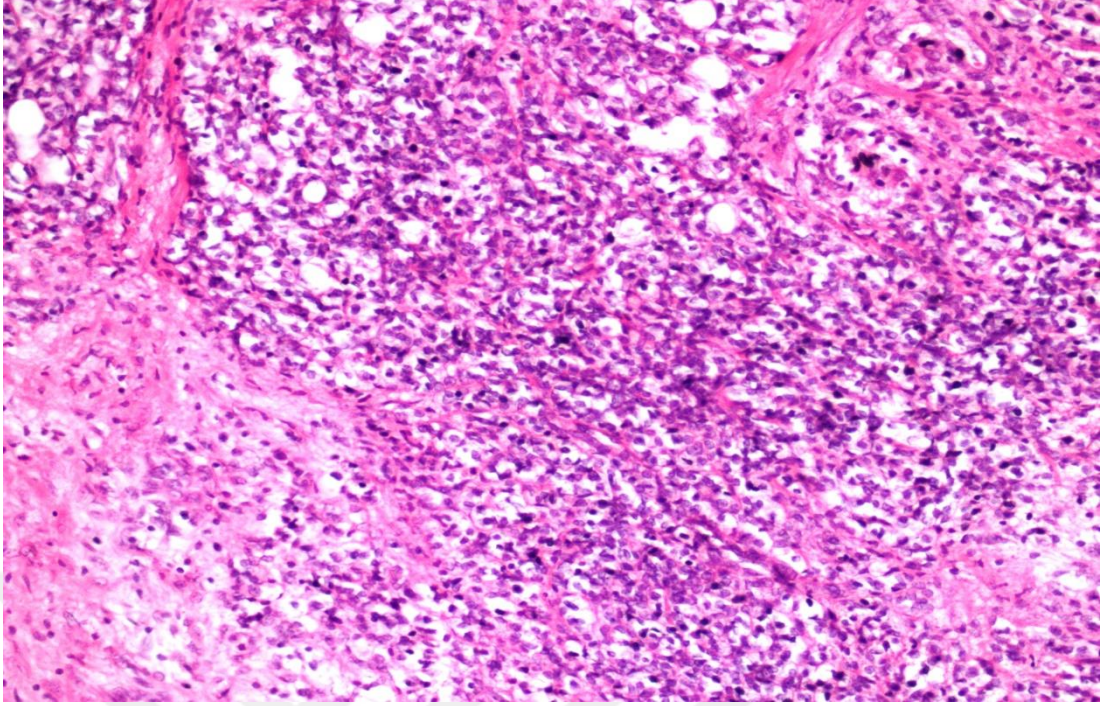
*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-16: MPM alt gruplarında PD-L1'in immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

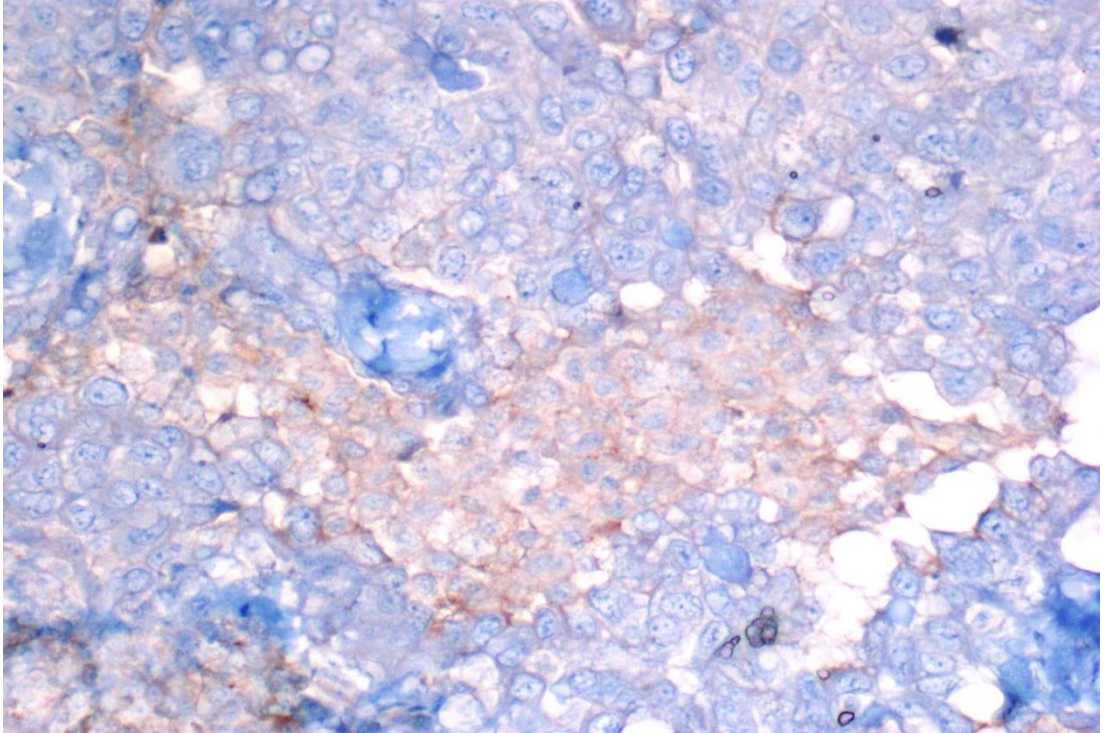
Histolojik Alt Tip	PD-L1				Toplam
	Negatif	Zayıf Pozitif	Orta Şiddette Pozitif	Güçlü Pozitif	
Epiteloid	30 (%68,2)	7 (%15,9)	6 (%13,6)	1 (%2,3)	44 (%100)
Non-epiteloid	5 (%83,3)	0	0	1 (%16,7)	6 (%100)
Toplam	35 (%70)	7 (%14)	6 (%12)	2 (%4)	50 (%100)

4.2.2. PD-L2 Ekspresyonu

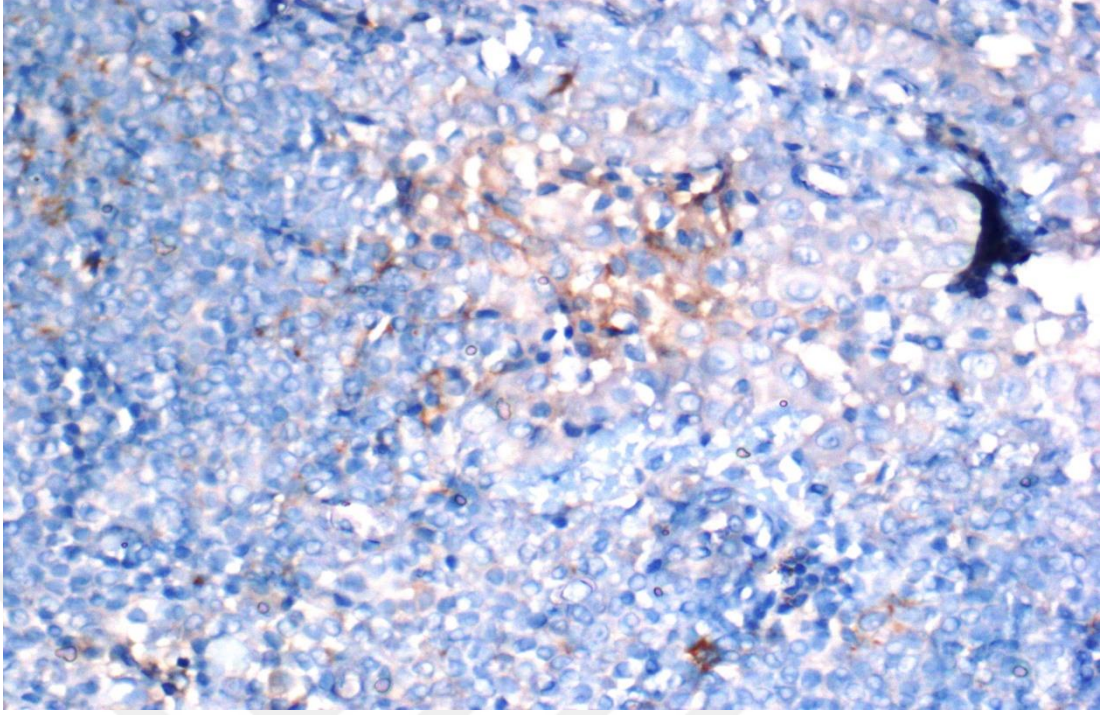
PD-L2 ekspresyonu incelendiğinde 50 MPM tanı olgunun 4'ü pozitif (%8), 46'sı negatif (%92) olarak izlendi. PD-L2 ekspresyonu izlenen 4 olgunun 4'ünde de zayıf pozitiflik saptandı (Şekil 23-26).



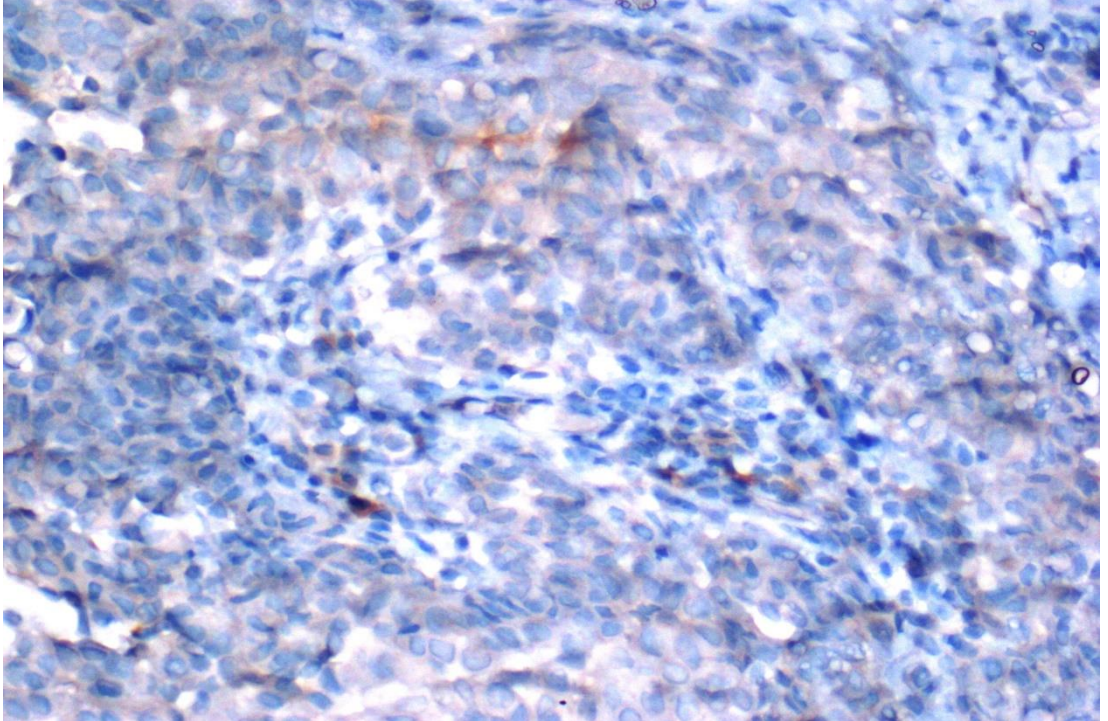
Şekil 23: Epiteloid tip MPM'nın histolojik görünümü (H&E, X200)



Şekil 24: Epiteloid tip MPM'da immünohistokimyasal olarak zayıf PD-L2 ekspresyonu (DAB, X400)



Şekil 25: Epiteloid tip MM'da immünohistokimyasal olarak zayıf PD-L2 ekspresyonu (DAB, X400)



Şekil 26: Epiteloid tip MM'da immünohistokimyasal olarak zayıf PD-L2 ekspresyonu (DAB, X400)

PD-L2 ekspresyonu izlenen 4 olgunun 3'ü epiteloid tip olup, 1'i bifazik tipti. MPM olgularında PD-L2 immünreaktivitesinin değerlendirmesi Tablo-17'de yapılmıştır. Histopatolojik alt tip ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi.

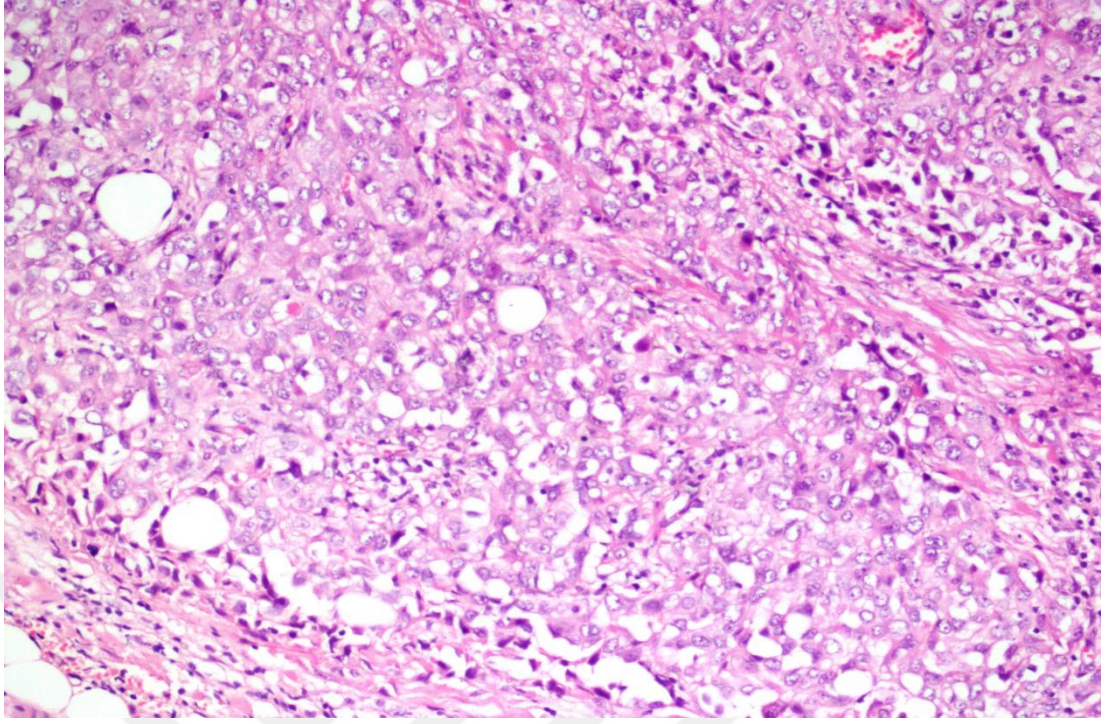
Tablo-17: MPM alt gruplarında PD-L2'nin immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

Histolojik Alt Tip	PD-L2				Toplam	P Değeri
	Negatif	Zayıf Pozitif	Orta Şiddette Pozitif	Güçlü Pozitif		
Epiteloid	41 (%93,2)	3 (%6,8)	0	0	44 (%100)	0,411*
Non-epiteloid	5 (%83,3)	1 (%16,7)	0	0	6 (%100)	
Toplam	46 (%92)	4 (%8)	0	0	50 (%100)	

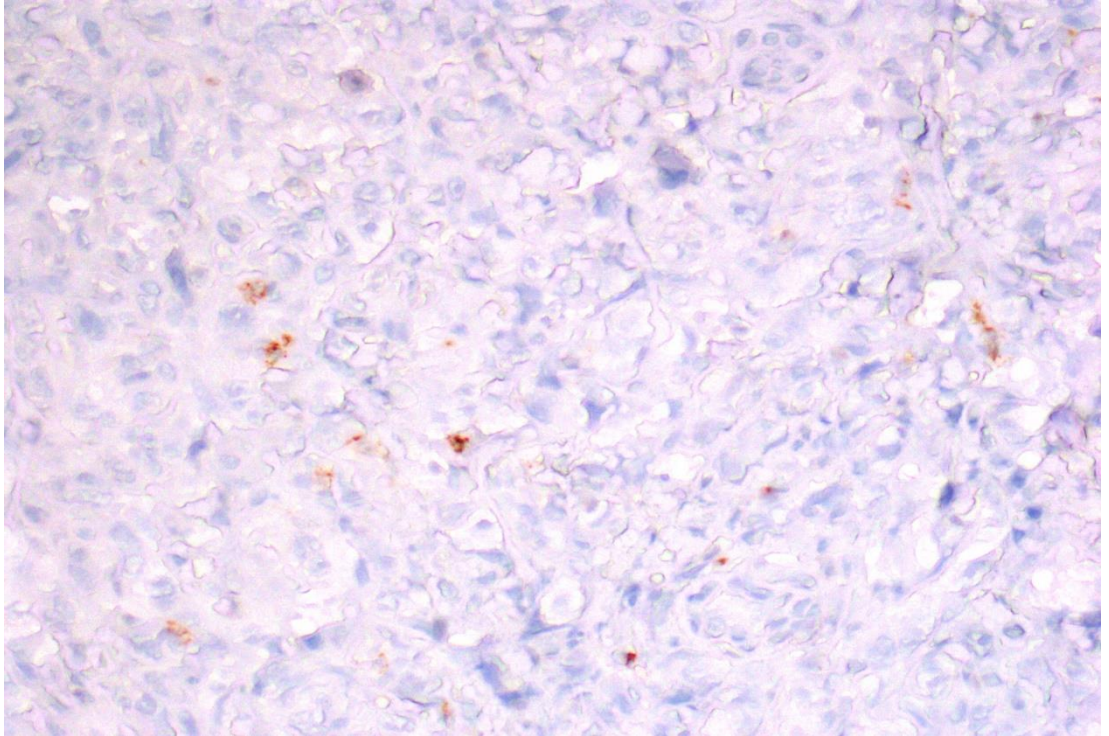
*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.2.3. CTLA-4 Ekspresyonu

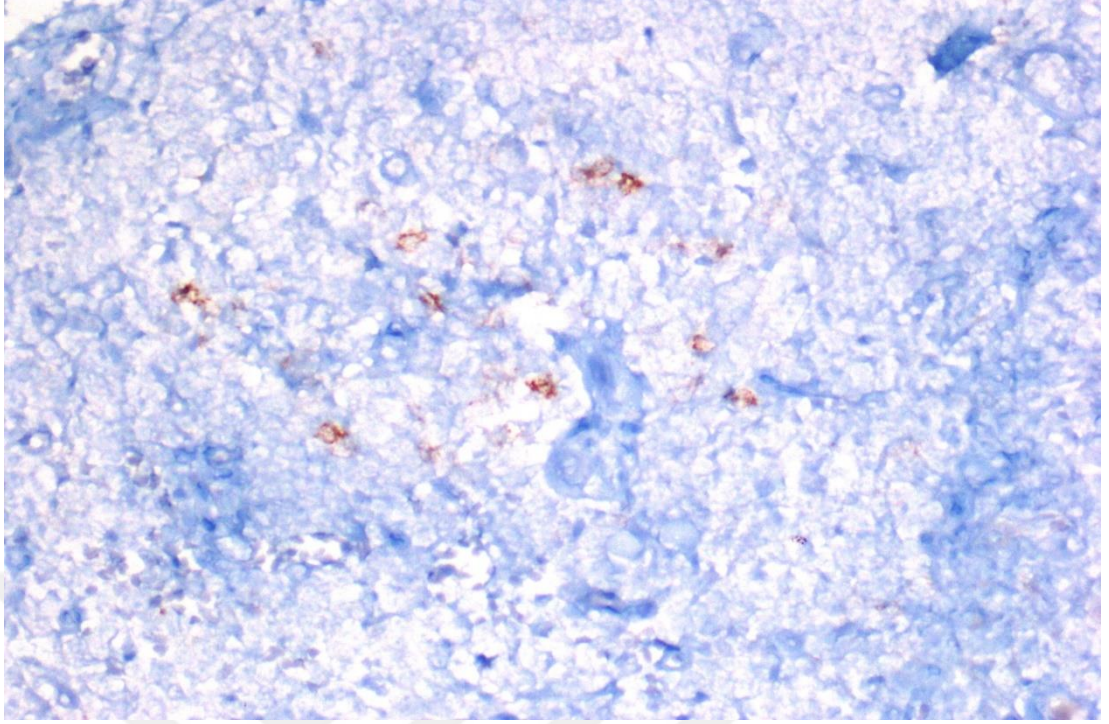
MPM olgularında CTLA-4 ekspresyonu incelendiğinde 50 olgunun 5'i pozitif (%10), 45'i negatif (%90) olarak izlendi. CTLA-4 ekspresyonu izlenen olguların tamamında zayıf pozitiflik saptandı (Şekil 27-30).



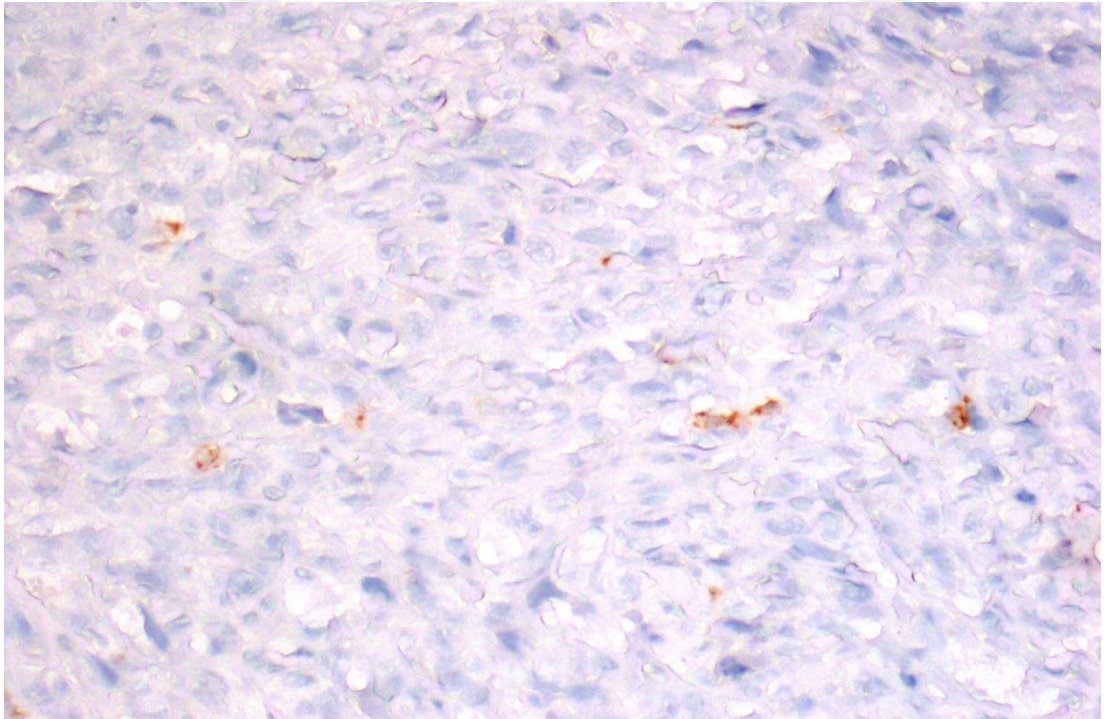
Şekil 27: Epiteloid tip MM'nin histolojik görünümü (H&E, X200)



Şekil 28: Bifazik tip MPM'da immünohistokimyasal olarak zayıf CTLA-4 ekspresyonu (DAB, X400)



Şekil 29: Epiteloid tip MPM’da immünohistokimyasal olarak zayıf CTLA-4 ekspresyonu (DAB, X400)



Şekil 30: Bifazik tip MPM’da immünohistokimyasal olarak zayıf CTLA-4 ekspresyonu (DAB, X400)

CTLA-4 ekspresyonu izlenen 5 olgunun 4'ü epiteloid tip olup, 1'i bifazik tip MPM tanısına sahipti. MPM olgularında CTLA-4 immünreaktivitesinin değerlendirmesi Tablo-18'de yapılmıştır. Histopatolojik alt tip ile immünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi.

Tablo-18: MPM alt gruplarında CTLA-4 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

Histolojik Alt Tip	CTLA-4				Toplam	P Değeri
	Negatif	Zayıf Pozitif	Orta Şiddette Pozitif	Güçlü Pozitif		
Epiteloid	40 (%90,9)	4 (%9,1)	0	0	44 (%100)	0,487*
Non-epiteloid	5 (%83,3)	1 (%16,7)	0	0	6 (%100)	
Toplam	45 (%90)	5 (%10)	0	0	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.2.4. İmmünohistokimyasal PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 Ekspresyon Korelasyonu

İstatistiksel olarak PD-L1 ile PD-L2 (p:0,006), PD-L1 ile CTLA-4 (p:0,001) ve PD-L2 ile CTLA-4 (p:0,002) immünohistokimyasal ekspresyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı ilişki izlendi. İmmünohistokimyasal PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonları arasındaki ilişki Tablo-19, Tablo-20 ve Tablo-21'de gösterilmiştir.

Tablo-19: İmmünohistokimyasal PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu korelasyonu

		PD-L2		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
PD-L1	Negatif	35 (%100)	0 (%0)	35 (%100)	0,006*
	Pozitif	11 (%73,3)	4 (%26,7)	15 (%100)	
	Toplam	46 (%92)	4 (%8)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-20: İmmünohistokimyasal PD-L1 ve CTLA-4 ekspresyonu korelasyonu

		CTLA-4		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
PD-L1	Negatif	35 (%100)	0 (%0)	35 (%100)	0,001*
	Pozitif	10 (%66,7)	5 (%33,3)	15 (%100)	
	Toplam	45 (%90)	5 (%10)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-21: İmmünohistokimyasal PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonu korelasyonu

		CTLA-4		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
PD-L2	Negatif	44 (%95,7)	2 (%4,3)	46 (%100)	0,002*
	Pozitif	1 (%25)	3 (%75)	4 (%100)	
	Toplam	45 (%90)	5 (%10)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.3. Gen ekspresyon Bulguları

Çalışmamızda 50 hasta örneği, Roche Cobas Z 480 cihazında RT-PCR çalışıldı ve LightCycler 480 Sistemi ile analiz edildi.

MPM tanılı 50 olgunun tümör dokularından önce RNA elde edildi. Olgulara ait RNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçülen konsantrasyon değerleri Tablo-22’de verilmiştir.

Tablo-22: Olgulara ait RNA konsantrasyon değerleri

Hasta No	RNA Konsantrasyonu (µl)	Hasta No	RNA Konsantrasyonu (µl)
1	27,97	26	13,85
2	17,19	27	40,10
3	9,027	28	24,68
4	17,56	29	20,26
5	284,8	30	12,77
6	17,83	31	59,02
7	17,17	32	79,90
8	17,42	33	19,90
9	24,0	34	14,41
10	16,95	35	17,93
11	63,25	36	17,76
12	69,65	37	17,12
13	40,89	38	18,26
14	36,06	39	49,04
15	17,07	40	81,30
16	12,25	41	4,29
17	15,66	42	20,04
18	10,83	43	8,50
19	44,77	44	45,37
20	24,72	45	38,16
21	62,76	46	82,26
22	66,33	47	64,74

23	18,59	48	14,93
24	56,26	49	52,15
25	16,03	50	16,28

Olgulara ait RNA örneklerinden cDNA elde edilerek RT-PCR analizleri yapıldı. Her hasta için ayrı ayrı PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 gen bölgeleri 3'er kez tekrar yapılarak çalışıldı.

4.3.1. PD-L1 Gen Ekspresyonu

50 olguya ait cDNA örneklerinden 3 kez PD-L1 gen bölgesi çalışılarak pik değerleri analiz edildi. Olgulara ait pik değerleri Tablo-23'de verilmiştir.

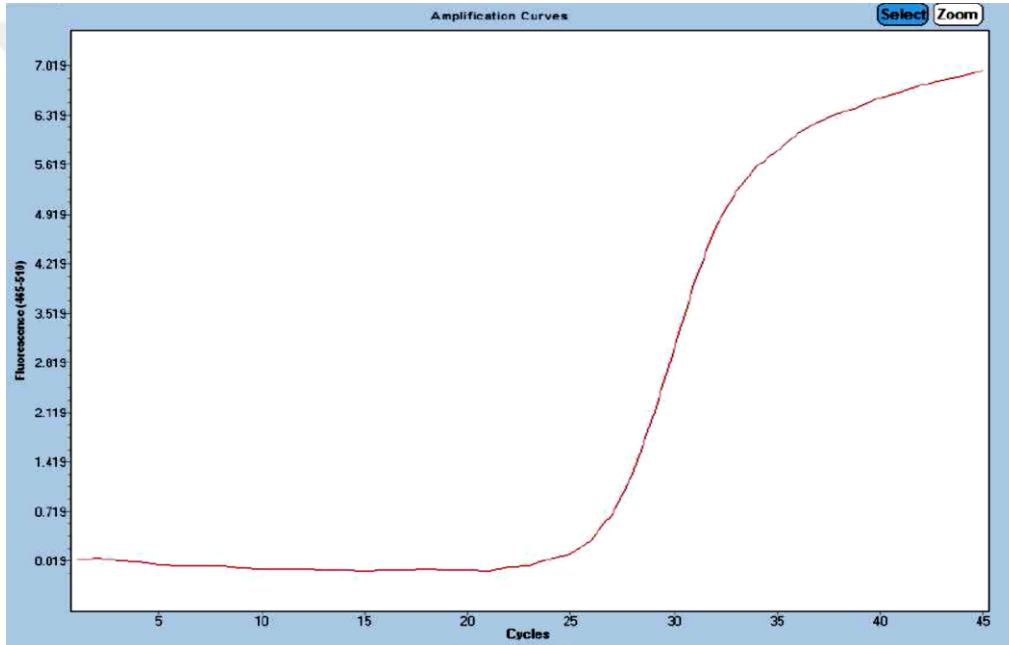
Tablo-23: PD-L1 gen ekspresyonu çalışılan olgulara ait pik değerleri

Hasta No	PD-L1 Pik Değerleri		
	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-

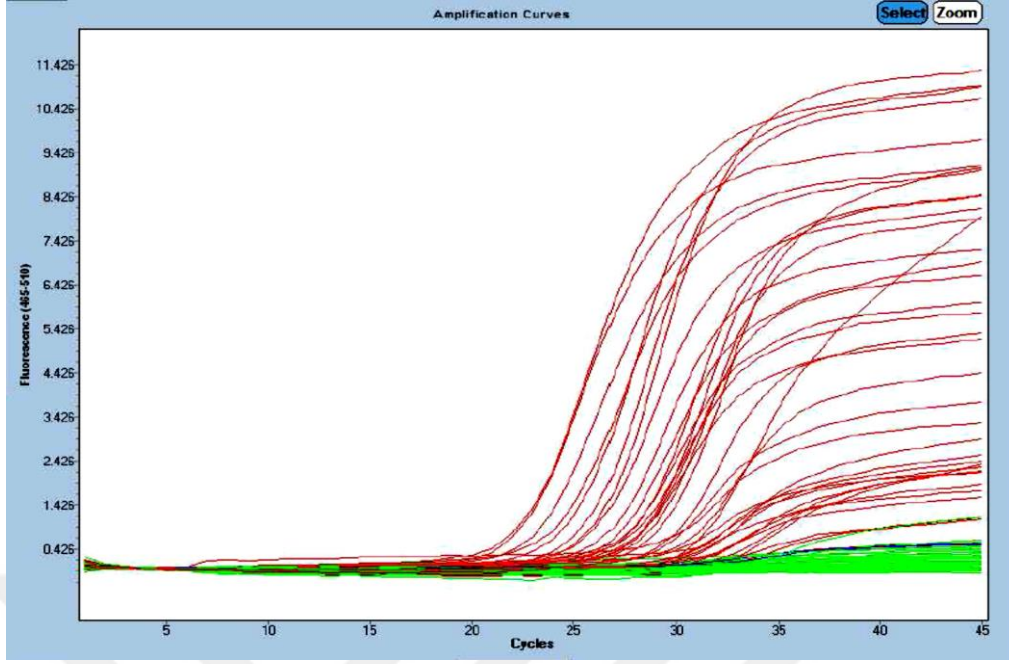
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	2,04	-	3,06
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	5,72	9,08	7,60
28	1,09	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	4,93
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-
36	2,61	-	9,82
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	1,45	-	10,32
45	-	-	-
46	-	-	-

47	3,16	1,17	7,04
48	-	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-

PCR ile elde edilen PD-L1 gen bölgesine ait ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 50 olgunun 5'inde (%10) gen ekspresyonu saptandı. Ekspresyon saptanan olgulara ait ışıma eğrileri Şekil 31 ve Şekil 32'de gösterilmektedir.



Şekil 31: 47 numaralı olguya ait PD-L1 gen bölgesi ışıma eğrisi



Şekil 32: 24-47 numaralı olgulara ait PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 gen bölgeleri ışınma eğrileri. Kırmızı renkte pik yapan eğriler ekspresyon gösteren olguları, yeşil renkte eğriler negatif olguları temsil etmektedir.

PD-L1 gen ekspresyonu izlenen olguların 4'ü epitelioid tip MPM olup, 1'i bifazik tip MPM tanılıdır. Histopatolojik alt tip ile PD-L1 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. PD-L1 gen ekspresyonu izlenen olguların 1'i zayıf, 3'ü orta şiddette ve 1'i de güçlü olmak üzere tamamı immünohistokimyasal olarak da PD-L1 ekspresyonu göstermekteydi. PD-L1 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p=0,001$). MPM alt gruplarında PD-L1 gen ekspresyonu ve PD-L1 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu arasında ilişki Tablo-24 ve Tablo-25'de gösterilmiştir.

Tablo-24: MPM alt gruplarında PD-L1 gen ekspresyonu

Histolojik Alt Tip	PD-L1		Toplam	P Değeri
	Negatif	Pozitif		
Epiteloid	40 (%90,9)	4 (%9,1)	44 (%100)	0,487*
Non-epiteloid	5 (%83,3)	1 (%16,7)	6 (%100)	
Toplam	45 (%90)	5 (%10)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-25: PD-L1 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu

		Moleküler PD-L1		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
İHK	Negatif	35 (%100)	0 (%0)	35 (%100)	0,001*
PD-L1	Pozitif	10 (%66,7)	5 (%33,3)	15 (%100)	
	Toplam	45 (%90)	5 (%10)	50 (%100)	

İHK: İmmünohistokimya

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.3.2. PD-L2 Gen Ekspresyonu

Olgulardan elde edilen cDNA örneklerinden 3 kez PD-L2 gen bölgesi çalışılarak pik değerleri analiz edildi. Olgulara ait pik değerleri Tablo-26’da verilmiştir

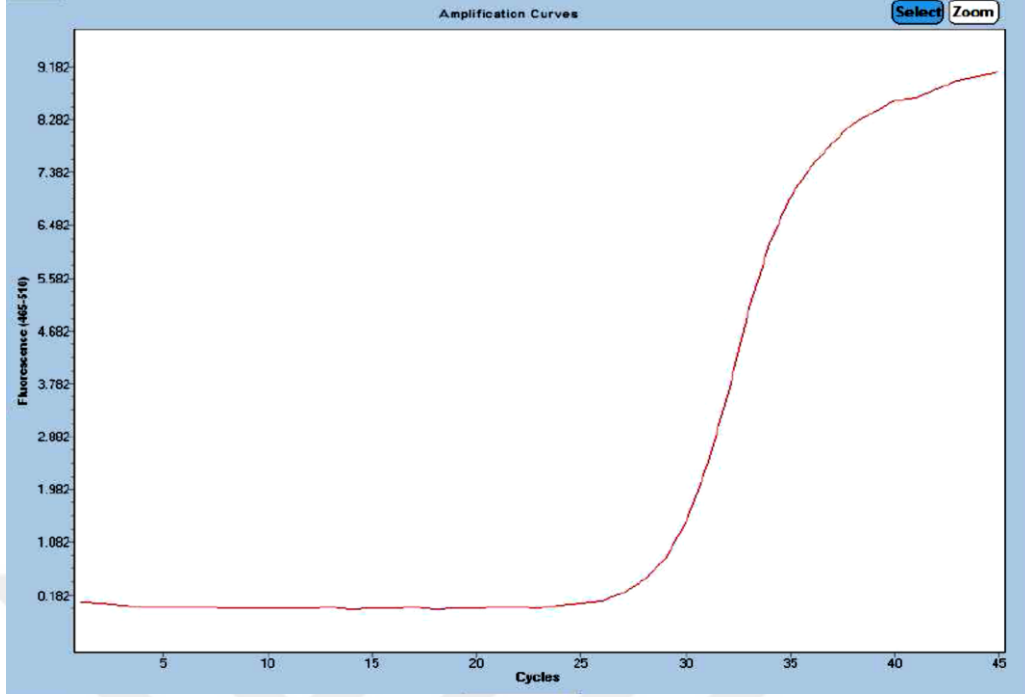
Tablo-26: PD-L2 gen ekspresyonu çalışılan olgulara ait pik değerleri

Hasta No	PD-L2 Pik Değerleri		
	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma
1	-	-	-
2	1,01	2,31	-
3	-	-	-

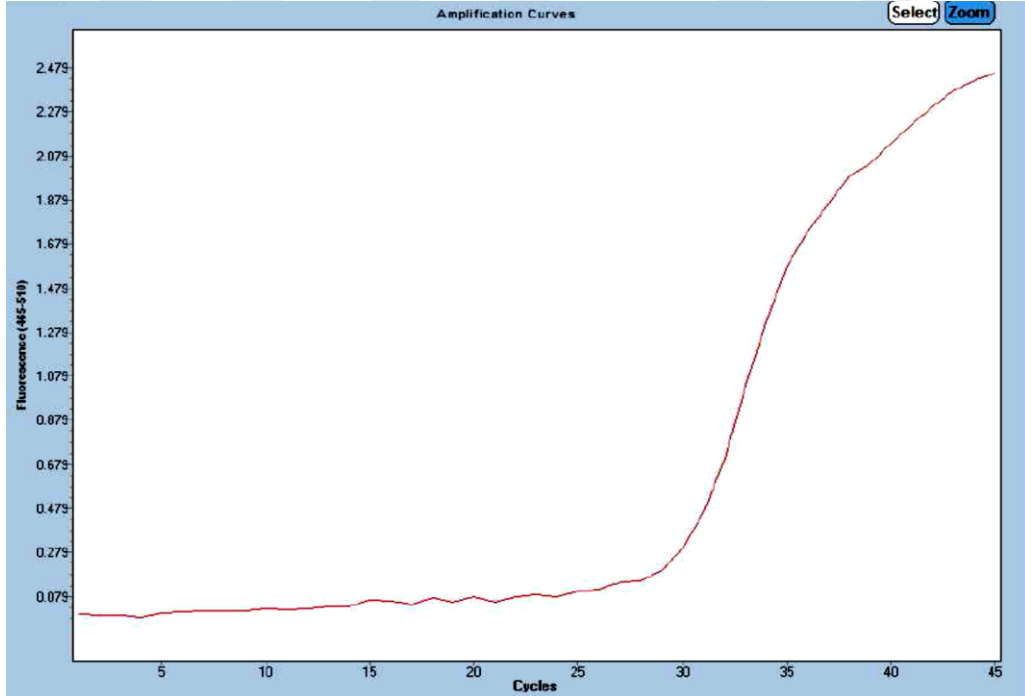
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	3,69	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	1,04	3,04	1,11
18	-	-	-
19	1,01	2,49	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	2,21	1,18	5,10
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	8,96	11,77
28	4,83	1,13	2,32
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	2,97	-
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	1,22	-	2,59

36	1,06	2,52	2,46
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	1,68
43	-	-	-
44	1,08	-	1,93
45	-	-	1,62
46	-	-	-
47	-	4,56	9,22
48	-	4,25	1,41
49	-	-	1,49
50	-	-	-

PCR ile elde edilen PD-L2 gen bölgesi ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 50 olgunun 11'inde (%22) gen ekspresyonu saptandı. Ekspresyon saptanan olgulara ait ışıma eğrileri Şekil 33 ve Şekil 34'de gösterilmektedir.



Şekil 33: 47 numaralı olguya ait PD-L2 gen bölgesi ışıma eğrisi



Şekil 34: 19 numaralı olguya ait PD-L2 gen bölgesi ışıma eğrisi

PD-L2 gen ekspresyonu izlenen olguların 9'u epiteloid tip MPM olup, 2'si bifazik tip MPM tanılıdır. Histolojik alt tip ile PD-L2 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. MPM alt gruplarında PD-L2 gen PD-L2 gen ekspresyonu izlenen olguların 3'ü immünohistokimyasal olarak zayıf PD-L2 ekspresyonu göstermekteydi. İmmünohistokimyasal olarak PD-L2 ekspresyonu gösteren 1 olguda PD-L2 gen ekspresyonu izlenmedi. PD-L2 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki isaptandı ($p=0,029$). PD-L2 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında ilişki Tablo-27 ve Tablo-28'de gösterilmiştir.

Tablo-27: MPM alt gruplarında PD-L2 gen ekspresyonu

Histolojik Alt Tip	PD-L2		Toplam	P Değeri
	Negatif	Pozitif		
Epiteloid	35 (%79,5)	9 (%20,5)	44 (%100)	0,601*
Non-epiteloid	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6 (%100)	
Toplam	39 (%78)	11 (%22)	50 (%100)	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-28: PD-L2 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu

		Moleküler PD-L2		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
İHK	Negatif	38 (%82,6)	8 (%17,4)	46 (%100)	0,029*
PD-L2	Pozitif	1 (%25)	3 (%75)	4 (%100)	
	Toplam	39 (%78)	11 (%22)	50 (%100)	

İHK: İmmünohistokimya

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.3.3. CTLA-4 Gen Ekspresyonu

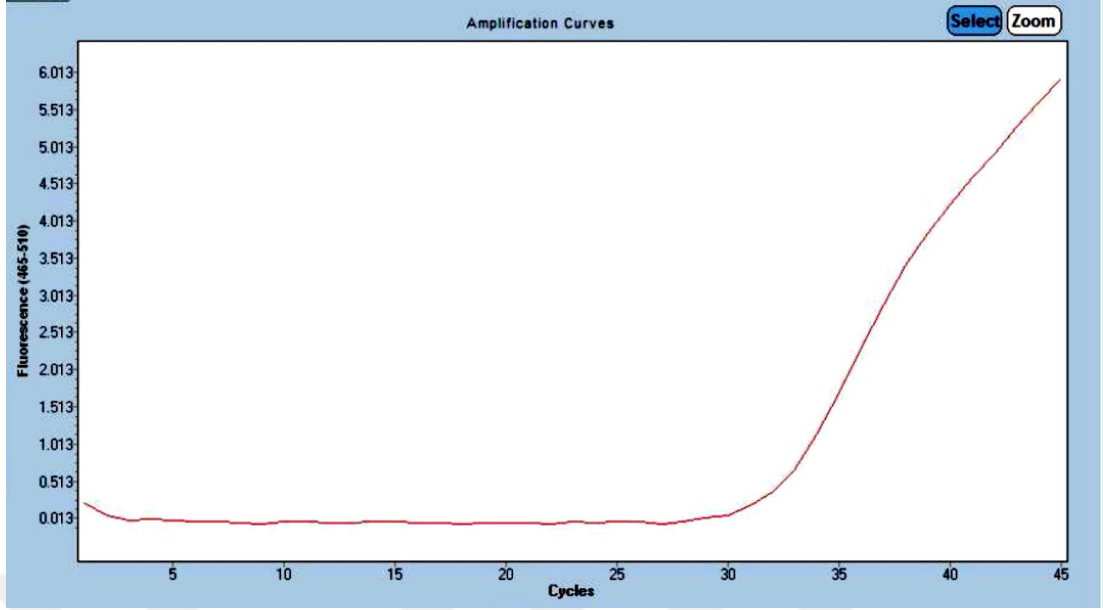
50 olguya ait cDNA örneklerinden 3 kez CTLA-4 gen bölgesi çalışılarak pik değerleri analiz edildi. Olgulara ait pik değerleri Tablo-29’da verilmiştir.

Tablo-29: CTLA-4 gen ekspresyonu çalışılan olgulara ait pik değerleri

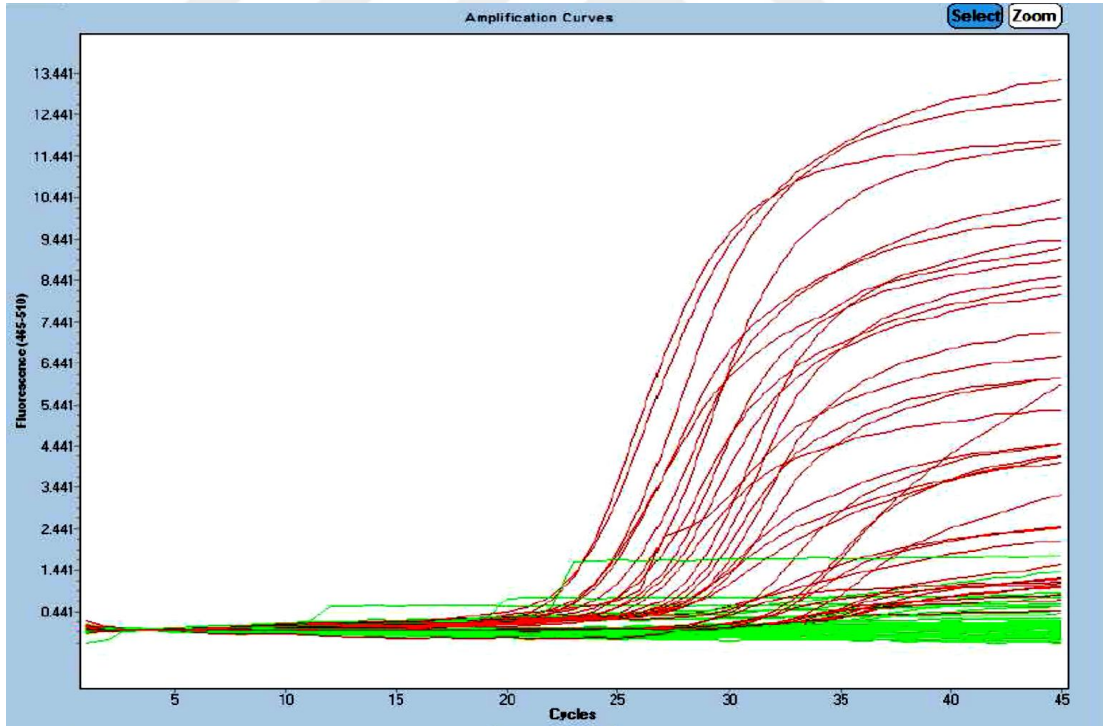
Hasta No	CTLA-4 Pik Değerleri		
	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	1,34	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	1,21	1,17
18	-	-	-
19	-	1,81	6,21
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-

25	-	-	-
26	-	-	-
27	6,38	5,20	8,63
28	2,74	1,24	1,17
29	-	-	-
30	-	-	-
31	1,06	2,23	6,18
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	1,04	1,12
36	1,74	1,61	2,21
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	2,50	6,66	2,40
45	-	-	-
46	-	-	-
47	1,40	6,01	8,10
48	-	3,32	1,83
49	-	-	-
50	-	-	-

PCR ile elde edilen CTLA-4 gen bölgesine ait ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 50 olgunun 10'unda (%20) gen ekspresyonu saptandı. Ekspresyon saptanan olgulara ait ışıma eğrileri Şekil 35 ve Şekil 36'da gösterilmektedir.



Şekil 35: 47 numaralı olguya ait CTLA-4 gen bölgesi ışıma eğrisi



Şekil 36: 25-48 numaralı olgulara ait PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 gen bölgeleri ışıma eğrileri. Kırmızı renkte pik yapan eğriler ekspresyon gösteren olguları, yeşil renkte eğriler negatif olguları temsil etmektedir.

CTLA-4 gen ekspresyonu izlenen olguların 8'i epiteloid tip MPM olup, 2'si bifazik tip MPM tanılıdır. Histolojik alt tip ile CTLA-4 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. CTLA-4 gen ekspresyonu izlenen olguların 4'ü immünohistokimyasal olarak zayıf CTLA-4 ekspresyonu göstermekteydi. İmmünohistokimyasal olarak CTLA-4 ekspresyonu gösteren 1 olguda CTLA-4 gen ekspresyonu izlenmedi. CTLA-4 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (p=0,004). MPM alt gruplarında CTLA-4 gen ekspresyonu ve CTLA-4 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu arasında ilişki Tablo-30 ve Tablo-31'de gösterilmiştir.

Tablo-30: MPM alt gruplarında CTLA-4 gen ekspresyonu

Histolojik Alt Tip	CTLA-4		Toplam	P Değeri
	Negatif	Pozitif		
Epiteloid	36 (%81,8)	8 (%18,2)	44 (%100)	0,586*
Non-epiteloid	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6 (%100)	
Toplam	40 (%80)	10 (%20)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-31: CTLA-4 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu

		Moleküler CTLA-4		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
İHK	Negatif	39 (%86,7)	6 (%13,3)	46 (%100)	0,004*
CTLA-4	Pozitif	1 (%20)	4 (%80)	5 (%100)	
	Toplam	40 (%80)	10 (%20)	50 (%100)	

İHK: İmmünohistokimya

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

4.2.4. Real-Time PCR ile PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 Gen Ekspresyonu Korelasyonu

İstatistiksel olarak PD-L1 ile PD-L2 (p:0,000), PD-L1 ile CTLA-4 (p:0,000) ve PD-L2 ile CTLA-4 (p:0,000) gen ekspresyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı ilişki izlendi. PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 gen ekspresyonları arasındaki ilişki Tablo-32, Tablo-33 ve Tablo-34’de gösterilmiştir.

Tablo-32: PD-L1 ve PD-L2 gen ekspresyonu korelasyonu

		PD-L2		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
PD-L1	Negatif	39 (%86,7)	6 (%13,3)	45 (%100)	0,000*
	Pozitif	0 (%0)	5 (%100)	5 (%100)	
	Toplam	39 (%78)	11 (%22)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-33: PD-L1 ve CTLA-4 gen ekspresyonu korelasyonu

		CTLA-4		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
PD-L1	Negatif	40 (%88,9)	5 (%11,1)	45 (%100)	0,000*
	Pozitif	0 (%0)	5 (%100)	5 (%100)	
	Toplam	4 (%80)	10 (%20)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

Tablo-34: PD-L2 ve CTLA-4 gen ekspresyonu korelasyonu

		CTLA-4		Toplam	P Değeri
		Negatif	Pozitif		
PD-L2	Negatif	38 (%97,4)	1 (%2,6)	39 (%100)	0,000*
	Pozitif	2 (%18,2)	9 (%81,8)	11 (%100)	
	Toplam	40 (%80)	10 (%20)	50 (%100)	

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

5. TARTIŞMA

MPM, özellikle asbest liflerine maruziyetle ilişkili plevral boşluğun yüzey mezotelini etkileyen agresif bir malign hastalıktır (157). MPM insidansının, asbest maruziyeti ve tanı arasındaki uzun gecikme ile gelişmekte olan ülkelere halen asbest kullanımının devam etmesi nedeniyle önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir (4).

Tedavi görmemiş hastalarda medyan genel sağkalım süresi yaklaşık 10 ay ve 5 yıllık sağkalım oranı %5'den az olduğundan MPM, kötü prognozlu bir hastalıktır (4, 5). Palyatif platin-antifolat kemoterapi, MPM'da kanıtlanmış tek tedavi olup, yaklaşık 1 yıllık bir ortalama sağkalım ile sonuçlanır. Bu nedenle yeni terapötik stratejilere ihtiyaç vardır. Son zamanlarda MM hastalarında immün kontrol noktalarını bloke eden antikorlar araştırılmaktadır (6). Biz de çalışmamızda MPM hastalarında immün kontrol noktası reseptörlerinden CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunu araştırdık.

Çalışmamızda MPM tanısı almış 50 olgudan hazırlanan parafin blok kesitlerinde immünohistokimyasal CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu ile olgulara ait dokudan elde edilen komplementer DNA'dan Real-Time PCR yöntemiyle CTLA-4, PD-L1 ve PD-L2 gen ekspresyonunu ve bunların klinikopatolojik ve prognostik parametreler açısından önemini değerlendirdik.

Literatürde MPM, genellikle 60 yaş üstü hastalarda görülmektedir ve erkek/kadın oranı yaklaşık 4/1'dir (2, 14, 144). Çalışmamızda literatür ile uyumlu biçimde hasta yaş ortalaması $61,52 \pm 11,4$ olarak bulunmuş ve erkek predominansı izlenmiştir.

Literatüre göre epiteloid tip % 60-80, sarkomatoid tip %10'dan az, bifazik tip ise %10-15 oranında görülmektedir (2). Serimizdeki 50 hastanın %88'i epiteloid tip, %2'si sarkomatoid tip, %10'u ise bifazik tiptir. Çalışmamızda MPM'nın histolojik alt tiplerinin oranı literatür ile uyumludur.

MPM, tipik olarak geç klinik bir evrede prezente olduğundan literatürde tanı anında medyan sağkalım 10-12 aydır ve tümör hemen her zaman birkaç yıl içinde

ölüme neden olur (4, 5, 65). Çalışmamızdaki hastaların ortalama sağkalım süresi 12.98 ± 1.33 ay olup literatürdeki medyan sağkalım süreleri ile benzerdir. Sarkomatoid varyant gibi belirli histolojik alt tipler daha agresif davranışlarla ilişkilendirilmiştir. Epiteloid mezotelyoma ise diğer histolojik tiplerden biraz daha iyi prognoza sahiptir (42, 65). Çalışmamızda ortalama sağkalım ile MPM histolojik alt tipleri arasında ilişki saptanmamıştır. Bu durumun, tümörün agresif karakteri ile ilişkili olan sarkomatoid tip olgu sayımızın az olması ile açıklanabileceğini düşündük.

Literatürde MPM’da immünohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonunu araştıran bazı çalışmalar mevcuttur. Cedres ve ark. (158) MPM tanılı 27 hastada immünohistokimyasal olarak PD-L1 (klon E1L3N) ekspresyonunu araştırmıştır. Yapılan çalışmada 27 hastanın 6’sında (%22,2) PD-L1 ile pozitif immünreaksiyon izlenmiş olup, 20 hastada (%77,7) PD-L1 ile immün reaksiyon izlenmemiştir. Bu çalışmada non-epiteloid histoloji tanılı hasta grubunda epiteloid histoloji tanılı gruptan daha fazla PD-L1 pozitifliği saptanmıştır. Mansfield ve ark. (146) MPM tanılı 106 hastada yaptıkları bir çalışmada 42 hastada immünohistokimyasal PD-L1 (klon 5H1-A3) ekspresyonu saptamış olup, bunların 14’ü (%33) epiteloid tip, 28’i (%67) non-epiteloid tiptir. Bu çalışmada önemli bir bulgu olarak, desmoplastik alt tipli tek bir olgu hariç sarkomatoid farklılaşmaya sahip tüm MPM vakaları PD-L1 ekspresyonu göstermiştir. Combaz-Lair ve ark. (159) MPM hastalarında hem klon E1L3N hem de klon SP142 ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyon analizi araştırmıştır. 58 hastada yapılan bu çalışmada E1L3N klonu ile 34 epiteloid tip MPM’nin 8’inde (%23,5), 11 bifazik tip MPM’nin 1’inde (%9) ve 13 sarkomatoid tip MPM’nin 8’inde (%62) ekspresyon izlenmiştir. SP142 klonu ile ise 4 (%12) epiteloid, 1 (%9) bifazik ve 5 (%38) sarkomatoid tip MPM vakasında ekspresyon izlenmiştir. Bu çalışmada genel olarak, diğer histolojik alt tiplere göre sarkomatoid tip MPM’da daha sık PD-L1 ekspresyonu saptanmıştır. Cedres ve ark. (144) 77 MPM vakasında PD-L1 ekspresyonu (klon E1L3N) araştırmış olup, 16 vakada (%20,8) ekspresyon saptamışken, 61 vakada (%79,2) ise ekspresyon saptamamıştır. Non-epiteloid hasta grubunda, epiteloid histolojili gruptan daha fazla PD-L1 pozitifliği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda 50 MPM tanılı hastanın 7’si zayıf (%14), 6’sı orta şiddette (%12), 2’si güçlü (%4) olmak üzere toplam 15 hastada

(%30) immünohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu saptanmış iken 35 hastada (%70) ekspresyon saptanmamış. PD-L1 ekspresyonu izlenen 15 olgunun 14'ü epiteloid tip, 1 olgu ise bifazik tip MPM tanısına sahiptir. Histolojik alt tip ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir. Çalışmamızda bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı saptanmamasını serimizdeki 50 hastanın sadece 1'inin (%2) sarkomatoid alt tip, 5'inin (%10) bifazik tip olması nedeniyle sarkomatoid özellik gösteren hasta sayısının az olmasına bağladık. Her histolojik alt tipi yeterli sayıda temsil eden daha geniş bir hasta grubunda çalışmanın yapılmasının daha faydalı olacağını düşündük.

Cedres ve ark.'nın (158) çalışmasında PD-L1 ekspresyonu olan hastalar, negatif hastalardan daha kısa sağkalım göstermiş. PD-L1 pozitif hastalar için medyan sağkalım 5 ay, PD-L1 negatif olanlarda 20 ay olarak saptanmıştır. Mansfield ve ark.'nın (146) çalışmasında PD-L1 ekspresyonu olan hastalarda (medyan 5 ay), PD-L1 ekspresyonu olmayanlara göre (medyan 14.5 ay) daha kısa sağkalım süresi tespit edilmiştir. Bu çalışmada sarkomatoid histoloji de daha kötü sağkalım ile anlamlı olarak ilişkili saptanmıştır. Combaz-Lair ve ark. (159) PD-L1 SP142 ekspresyonunu kötü sağkalım ile ilişkili fakat PD-L1 E1L3N klonunu sağ kalım ile ilişkisiz bulmuştur. Cedres ve ark.'nın (144) başka bir çalışmasında da PD-L1 pozitif ekspresyonu olan hastalar PD-L1 negatif hastalardan daha kısa sağkalım göstermiştir. PD-L1 pozitif hastalar için medyan sağ kalım 4,8 ay, PD-L1 negatif hastalar için 16,3 ay olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ortalama sağ kalım süresi 12.98 ± 1.33 aydır. PD-L1 immün ekspresyonu görülen 35 hasta ile negatif olanların sağkalım süreleri arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda MPM hastalarında PD-L1 ekspresyon derecesinin, özellikle sarkomatoid farklılaşması olan hastalarda arttığı ve kötü sağkalım ile ilişkisi olduğu görülmektedir. Çalışmamızda sağkalım ile anlamlı ilişki bulunmamasını sarkomatoid özellikler gösteren MPM hasta sayımızın (6/50) yetersiz olmasına bağladık.

Literatürde farklı tümörlerde RT-PCR yöntemi PD-L1 ekspresyon analizi yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ikeda ve ark. (160) küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'nde PD-L1 ekspresyonu çalışmıştır. Bu çalışmada PD-L1 ekspresyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmış olup, diğer prognostik

parametreler ile arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir. Sasaki ve ark. (161) da küçük hücreli dışı akciğer kanserinde RT-PCR yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu çalışmışlar, cerrahi olarak rezeke edilmiş KHDAK'de PD-L1'in tümör invazyonu ile korele olduğu, tümör dokusu ile normal doku arasında ve diğer prognostik parametreler ile arasında anlamlı ilişki olmadığını tespit etmişler. Kösemehmetoğlu ve ark. (162) malign mezankimal tümörlerde immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu araştırdıkları çalışmada 222 sarkomun 34'ünde immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu, bu 34 olgunun da 16'sında PD-L1 mRNA overekspresyonu izlenmiş olup, yüksek dereceli sarkomların daha sık PD-L1 ekspresyonu gösterme eğilimi olduğunu göstermişlerdir.

Literatürde MPM hastalarında PD-L1 ekspresyonu immünohistokimyasal yöntem dışında araştıran çok az çalışma mevcuttur. Thapa ve ark. (163) MPM tanılı 329 hastada PD-L1 genom kopya sayısını araştırmıştır. Bunun dışında Hsu ve ark.'nın (164) MPM'da yes-ilişkili protein inhibisyonu ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında kullandıkları birkaç yöntemden biri de RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif RT-PCR'dır. Bu çalışmada yes-ilişkili protein inhibitörü olan verteporfin tedavisi sonrası RT-PCR yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu bakılıp arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Biz de çalışmamızda MPM tanılı hastalarda immünohistokimya ve RT-PCR yöntemleri ile PD-L1 ekspresyonu çalışıp, birbirleri ve prognostik parametreler ile aralarındaki ilişkiyi araştırdık. Çalışmamızda 50 MPM olgumuzun 5'inde RT-PCR yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu saptanmıştır. PD-L1 gen ekspresyonu ile MPM histolojik alt tipleri ile ortalama sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bu durumun serimizde, ortalama sağkalım süresini etkileyecek olan kötü prognozlu sarkomatoid değişiklikler gösteren MPM tanılı hasta sayımızın (6/50) az olmasına bağlı olabileceğini düşündük. RT-PCR yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu gösteren 5 olgu aynı zamanda immünohistokimyasal olarak da PD-L1 ekspresyonu göstermiş olup, immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu ile RT-PCR yöntemi ile PD-L1 overekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,001$). İmmünohistokimyasal olarak PD-L1 protein ekspresyonu gösteren olgu sayısının, RT-PCR yöntemi ile tespit edilen PD-L1 gen ekspresyonu gösteren olgu sayısından fazla oluşunun, rutin doku takip işlemleri esnasında yüksek ısı, alkol, formalin ve

ksilola maruz kalan dokunun hassas bir yapıya sahip mRNA'sının degradasyona uğramış olmasına bağlı olabileceğini düşündük.

Literatürde MPM dışı tümörlerde PD-L2 ekspresyonunu araştıran çalışmalar mevcuttur. Yang ve ark. (165) 40 kondrosarkom olgusunun 25'inde PD-L2 immün ekspresyonu izlemiş ve çalışmada PD-L2 ekspresyonu ile genç yaş arasında anlamlı ilişki saptamıştır. Tanaka ve ark. (166) klasik Hodgkin lenfoma, primer mediastinal büyük B-hücreli lenfoma ve gri zon lenfoma tanılı toplam 64 olguda immünohistokimyasal ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri ile PD-L2 ekspresyonunu araştırmış, primer mediastinal büyük B-hücreli lenfomada PD-L2 ekspresyon artışı saptamıştır. Pinto ve ark. (167) da solid pediatrik tümörlerde PD-L2'nin immünohistokimyasal ve mRNA ekspresyonunu araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada düşük oranda ekspresyon saptanmış ve immünohistokimya ile mRNA ekspresyonu arasında korelasyon izlememiştir. Literatürde MPM'da herhangi bir yöntemle PD-L2 ekspresyonunu araştıran çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda MPM tanılı 50 hastamızın 4'ünde (%8) immünohistokimyasal olarak PD-L2 ekspresyonu izlenmiş olup 46'sında (%92) ekspresyon saptanmamıştır. PD-L2 ekspresyonu izlenen 4 olguda da ekspresyonun zayıf olduğu görülmüştür. Bu 4 olgunun 3'ü epiteloid tip olup, 1'i bifazik tiptir. Histolojik alt tip ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Panjwani ve ark. (168) çalışmalarında lenfoma subtiplerinde düşük PD-L2 ekspresyonunun daha kısa relapssız sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Chang ve ark.'nın (169) yaptığı bir araştırmada 70 malign tükürük bezi tümöründe immünohistokimyasal olarak PD-L1, PD-L2, CTLA-4, PD-1 çalışılmıştır. Malign tükürük bezi tümörlerinde, PD-L2 ekspresyonu yüksek, PD-L1 ekspresyonu ise pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesi ve boyanma yoğunluğu açısından nispeten düşük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, çok değişkenli analizlerde düşük PD-L2 ekspresyonu bağımsız olarak kısa nüksüz sağkalım ile ilişkili ($p=0.032$) saptanmıştır. Yearley ve ark. (170) da 7 tümör tipinde (renal hücreli karsinom, mesane karsinomu, melanom, KHDAK, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomu, triple-negatif meme karsinomu ve gastrik karsinom) anti-PD-1 (pembrolizumab) tedavisi ile PD-L2 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında progresyonsuz sağkalım ve genel

sağkalımın PD-L2 pozitif hastalarda, PD-L2 negatif olanlara göre, daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da immünohistokimyasal olarak PD-L2 ekspresyonu gösteren 4 olguda medyan sağkalım süresi 39,50 ay, negatif olan 46 olguda 24,28 ay olarak tespit edilmiştir. Ortalama sağkalım süresi ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ($p=0,045$) izlenmiş olup, literatürdeki araştırmalara benzer olarak düşük PD-L2 ekspresyonu gösteren olgularda kısa sağkalım süresi gözlenmiştir. Bu sonuçlar PD-L2 ekspresyonunun iyi prognozla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ancak PD-L2 ekspresyonunun sağkalım süresi ile ilişkisi daha geniş serilerde araştırılmalıdır.

Ayrıca çalışmamızda 50 MPM olgumuzun 11'inde RT-PCR yöntemi ile PD-L2 ekspresyonu saptanmıştır. PD-L2 gen ekspresyonu gözlenen olguların 9'u epiteloïd tip, 2'si bifazik tiptir. PD-L2 gen ekspresyonu ile MPM histolojik alt tipleri ve ortalama sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. PD-L2 gen ekspresyonu izlenen olguların 3'ünde immünohistokimyasal olarak da PD-L2 ekspresyonu tespit edilmiştir. PD-L2 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki ($p=0,029$) saptanmıştır. İmmünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemi ile ekspresyon saptanan olgu sayısının farklı oluşunun, PD-L1 proteini molekülüne (yaklaşık 40kDa) göre daha küçük bir yapıya (30kDa) sahip PD-L2 proteininin rutin doku takip işlemleri esnasında tespitinin daha zor ve hasara açık olmasından, meydana gelmiş olan protein denatürasyonuna bağlı olabileceğini düşündük.

Literatürde MPM'da CTLA-4 ekspresyonunu ve bunun prognostik parametrelerle ilişkisi ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Roncella ve ark. (14) 45 MPM hastasının tümör dokularında immünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonunu araştırmıştır. Bu çalışmada CTLA-4 ekspresyonu ile histolojik alt tip ve ortalama sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda 50 MPM tanıli olgunun 5'inde immünohistokimyasal olarak CTLA-4 ekspresyonu saptanmış, 45 olguda ekspresyon izlenmemiştir. İmmünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu ile histolojik alt tip ve ortalama sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Literatürde CTLA-4 ekspresyonunun MPM'da prognostik parametreler ile ilişkisini ortaya koyan veri çok sınırlıdır. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde immünohistokimyasal yöntem dışında Santoni ve ark. (171) timoma hastalarında PCR yöntemiyle mRNA ölçümü ile CTLA-4 ekspresyonunu araştırmıştır. Bu çalışmada yüksek CTLA-4 mRNA ekspresyonu ile kısa sağkalım arasında kuvvetli ilişki ($p=0.0235$) tespit edilmiştir. Literatürde MPM’da CTLA-4 ekspresyonunu immünohistokimyasal yöntem dışında araştıran çalışma mevcut değildir. Bizim çalışmamızda 50 olgunun 10’unda RT-PCR yöntemi ile CTLA-4 ekspresyonu saptanmış, 40 olguda ekspresyon izlenmemiştir. CTLA-4 gen ekspresyonu ile MPM histolojik alt tipleri ve ortalama sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Santoni ve ark. (171) timoma hastalarında CTLA-4 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiş olsa da, MPM tanılı olgularda benzer çalışma mevcut değildir. MPM hastalarında CTLA-4’ün prognoz ile ilişkisi araştıran daha yüksek hasta sayısına sahip yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

İmmünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu ile RT-PCR yöntemi ile CTLA-4 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,004$). CTLA-4 gen ekspresyonu izlenen olguların 4’ünde immünohistokimyasal olarak da CTLA-4 ekspresyonu tespit edilmiştir. PD-L2 çalışmamızdaki verilerle benzer şekilde, CTLA-4’de de immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemi ile ekspresyon saptanan olgu sayısının farklı oluşunun PD-L1 proteini molekülüne (yaklaşık 40kDa) göre daha küçük bir yapıya (24kDa) sahip CTLA-4proteininin rutin doku takip işlemleri esnasında tespitinin daha zor ve hasara açık olmasından, meydana gelmiş olan protein denatürasyonuna bağlı olabileceğini düşündük.

İmmunohistokimyasal PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında (PD-L1 ile PD-L2 ($p=0,006$), PD-L1 ile CTLA-4 ($p=0,001$) ve PD-L2 ile CTLA-4 ($p=0,002$)) anlamlı ilişki saptanmıştır. İmmunohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu izlenen 4 olgunun, CTLA-4 ekspresyonu izlenen 5 olgunun tamamının aynı zamanda PD-L1 ekspresyonu da gösterdiği tespit edilmiştir. CTLA-4 ekspresyonu olan 5 olgunun 3’ünde PD-L2 ekspresyonu da izlenmiştir.

Real-Time PCR ile PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 gen ekspresyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında kuvvetli ilişki saptanmıştır. İstatistiksel olarak PD-L1

ile PD-L2, PD-L1 ile CTLA-4 ve PD-L2 ile CTLA-4 arasında p değeri 0,000 olarak saptanmıştır. PD-L1 gen ekspresyonu izlenen 5 olgunun tamamının aynı zamanda PD-L2 ve CTLA-4 gen ekspresyonu da gösterdiği tespit edilmiştir. CTLA-4 gen ekspresyonu gösteren 10 olgunun 9'ünde PD-L2 ekspresyonu da izlenmiştir.

MPM hastalarında PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 immün kontrol noktalarını hedefleyen ajanlara yönelik klinik çalışmalarla da araştırmalar desteklenmeli, ekspresyon varlığı ile tedavi yanıtı arasındaki ilişki gösterilmelidir.



6. SONUÇLAR

- Histolojik alt tip ile immünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmedi.
- PD-L1 immün ekspresyonu ile sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
- RT-PCR yöntemi ile PD-L1 gen ekspresyonunun MPM histolojik alt tipleri ve ortalama sağkalım süreleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
- İmmünohistokimyasal PD-L1 ekspresyonu ile RT-PCR yöntemi ile PD-L1 overekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptandı.
- Histolojik alt tip ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.
- İmmünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu ile ortalama sağkalım süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlendi. PD-L2 pozitif hastalarda ortalama sağkalım süresinin daha uzun olduğu saptandı.
- RT-PCR yöntemi ile PD-L2 gen ekspresyonunun MPM histolojik alt tipleri ve ortalama sağkalım süreleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
- Moleküler PD-L2 gen ekspresyonu ile immünohistokimyasal PD-L2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı.
- İmmünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu ile histolojik alt tip ve ortalama sağkalım süresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı.
- CTLA-4 gen ekspresyonu ile MPM histolojik alt tipleri ve ortalama sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
- İmmünohistokimyasal CTLA-4 ekspresyonu ile RT-PCR yöntemi ile CTLA-4 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptandı.
- İmmünohistokimyasal PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 ekspresyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında (PD-L1 ile PD-L2, PD-L1 ile CTLA-4 ve PD-L2 ile CTLA-4) anlamlı ilişki saptandı.
- Real-Time PCR ile PD-L1, PD-L2 ve CTLA-4 gen ekspresyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında (PD-L1 ile PD-L2, PD-L1 ile CTLA-4 ve PD-L2 ile CTLA-4) kuvvetli ilişki saptandı.

7. KAYNAKLAR

1. Dağlı A. Diffüz plevral malign mezotelyomada patolojik tanı ve ayırıcı tanı. Türkiye Klinikleri J Thor Surg-Special Topics. 2011;4(1):50-7.
2. Travis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A. Tumours of the Pleura. In: Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2015. p. 153-81.
3. Metintaş M. Malign Plevral Mezotelyoma Türkiye Standartlar Rehberi. In: Grubu TMÇ, editor. 2014.
4. Robinson B, Lake L. Advances in malignant mesothelioma. N Engl J Med. 2005;353(15):1591-603.
5. Bagia M, Nowak A. Novel targeted therapies and vaccination strategies for mesothelioma. Curr Treat Options Oncol. 2011;12(2):149-62.
6. Robert C, Soria J, Eggermont A. Drug of the year: programmed death-1 receptor/programmed death-1 ligand-1 receptor monoclonal antibodies. Eur J Cancer. 2013;49(14):2968-71.
7. Wong R, Ianculescu I, Sharma S, Gage D, Olevsky O, Kotova S, et al. Immunotherapy for malignant pleural mesothelioma. Current status and future prospects. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;50(5):870-5.
8. McCoy K, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. Immunol Cell Biol. 1999;77(1):1-10.
9. Pioli C, Gatta L, Ubaldi V, Doria G. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. J Immunol. 2000;165(10):5530-6.
10. Wang X, Giscombe R, Yan Z, Heiden T, Xu D, Lefvert A. Expression of CTLA-4 by human monocytes. Scand J Immunol. 2002;55(1):53-60.
11. Pistillo M, Tazzari P, Palmisano G, Pierri I, Bolognesi A, Ferlito F, et al. CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. Blood. 2003;101(1):202-9.
12. Pico de C, Masucci G, J H, Kiessling R. Myeloid-derived suppressor cells and their role in CTLA-4 blockade therapy. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2014;63(9):977-83.
13. Bakker E, Qattan M, Mutti L, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. Biochim Biophys Acta. 2016;1863(3):414-26.
14. Roncella S, Laurent S, Fontana V, Ferro P, Franceschini M, Salvi S, et al. CTLA-4 in mesothelioma patients: tissue expression, body fluid levels and possible relevance as a prognostic factor. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2016;65(8):909-17. doi: 10.1007/s00262-016-1844-3. PubMed PMID: 27207606.
15. Sharpe A, Wherry E, Ahmed R, Freeman G. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol. 2007;8:239-45.
16. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. 2007;19:813-24.
17. Keir M, Butte M, Freeman G, Sharpe A. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.
18. Kalaycıoğlu O. Plevra Hastalıkları. Numanoğlu N, editor. Ankara: Antıp A.Ş. Yayınları; 1997.

19. Fraser R, Müller N, Colman N, Pare P. Diagnosis of Diseases of the Chest. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. 151-71 p.
20. Arseven O, Kıyan E. Akciğer Hastalıkları. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. O. A, editor: Nobel Tıp Kitapevleri; 2002. 379-405 p.
21. Kothari H, Kaur G, Sahoo S, Idell S, Rao L, Pendurthi U. Plasmin enhances cell surface tissue factor activity in mesothelial and endothelial cells. Journal of thrombosis and haemostasis. 2009;7(1):121-31. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03218.x.
22. Broaddus V, Light R. Disorders of the pleura; General principles and diagnostic approach. SF M, Nadel, editors. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994.
23. Murray J, Nadel J. Disorders of the pleura; Pleural effusion. Textbook of Respiratory Medicine. 2. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994. p. 2164.
24. Ögetürk M. Plevra anatomisi ve histolojisi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci. 2005(1):1-5.
25. Kinasevitz G. Pleural fluid dynamics and effusions. In: Fishman A, editor. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. New York: McGraw-Hill Book Company; 1998. p. 1389-409.
26. Özyardımcı N. Plevra ve plevral hastalıkları. In: Özyardımcı N, editor. Nonspesifik Akciğer Hastalıkları. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1999. p. 1043-67.
27. Inai K. Pathology of mesothelioma. Environ Health Prev Med. 2008(13):60-4.
28. Rosai J. Respiratory Tract-Lung and Pleura. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 1. 10 ed2011. p. 340-436.
29. Hillerdal G. Mesothelioma: cases associated with non-occupational and low exposures. Occup Environ Med. 1999(56):505-13.
30. Metintaş M. Malign Mezotelyoma. In: Göze G, Köktürk O, editors. Plevra Hastalıkları. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2003. p. 230-59.
31. Light R. Tumors of the pleura. In: Murray J, Nadel J, editors. Textbook of respiratory medicine. 2. Philadelphia: Saunders; 1994. p. 2222-30.
32. Emri S, Demir A. Malignant pleural mesothelioma in Turkey, 2000-2002. Lung cancer. 2004;45(1):17-20.
33. Metintaş M, Özdemir N, Hillerdal G, Uçgun I, Metintas S, Baykul C, et al. Environmental asbestos exposure and malignant pleural mesothelioma. Respir Med. 1999(93):349-55.
34. Şenyiğit A, Babayiğit C, Gökırmak M, Topçu F, Asan E, Coşkunsel M, et al. Incidence of malignant pleural mesothelioma due to environmental asbestos exposure in the southeast of Turkey. Respiration. 2000(67):610-4.
35. Işık R, Metintaş M, Gibbs A, Metintas S, Jasani B, Oner U, et al. p53, p21 and metallothionein immunoreactivities in patients with malignant pleural mesothelioma: correlations with the epidemiological features and prognosis of mesotheliomas with environmental asbestos exposure. Respir Med. 2001(95):588-93.
36. Barış Y. Asbestos and erionite related chest diseases. Ankara: Semih Ofset Matbaacılık Ltd. Co.; 1987.
37. Boutin C, Schlessler M, Frenay C, Astoul P. Malignant pleural mesothelioma. Eur Respir J. 1998(12):972-81.
38. Selçuk Z, Çöplü L, Emri S, Kalyoncu A, Sahin A, Barış Y. Malignant pleural mesothelioma due to environmental mineral fiber exposure in Turkey: Analysis of 135 cases. Chest. 1992(102):790-6.
39. Aisner J. Current approach to malignant mesothelioma of the pleura. Chest. 1995(107):332-44.

40. Barış B, Demir A, Shehu V, Karakoca Y, Kisacik G, Barış Y. Environmental fibrous zeolite (erionite) exposure and malignant tumors other than mesothelioma. *J Environ Path Tox Oncol*. 1996(15):183-9.
41. Gaudino G, Yang H, Carbone M. HGF/Met Signaling Is a Key Player in Malignant Mesothelioma Carcinogenesis. *Biomedicines*. 2014;2(4):327-44.
42. Corrin B, Nicholson A. Pleura and chest wall. In: Corrin B, Nicholson A, editors. *Pathology of the Lungs*. 3 ed 2011. p. 707-52.
43. Soufir N, Daya-Grosjean L, de La Salmoniere P, Moles J, Dubertret L, Sarasin A, et al. Association between INK4a-ARF and p53 mutations in skin carcinomas of xeroderma pigmentosum patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(22):1841-7.
44. Jaklitsch M, Grondin S, Sugarbaker D. Treatment of Malignant Mesothelioma. *World J Surg*. 2001(25):210-7.
45. Testa J, Giordano A. SV40 and cell cycle perturbations in malignant mesothelioma. *Seminars in cancer biology*. 2001;11(1):31-8.
46. Carbone M, Kratzke R, Testa J. The pathogenesis of mesothelioma. *Seminars in oncology*. 2002;29(1):2-17.
47. Powers A, Carbone M. The role of environmental carcinogens, viruses and genetic predisposition in the pathogenesis of mesothelioma. *Cancer biology & therapy*. 2002;1(4):348-53.
48. Carbone M, Pass H, Miele L, Bocchetta M. New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene*. 2003(22):5173-80.
49. Dejmek A, Hjerpe A. The Combination of CEA, EMA and BerEp4 and Hyaluronan Analysis Specifically Identifies 79% of All Histologically Verified Mesotheliomas Causing an Effusion. *Diagnostic Cytopathol*. 2005(32):160-6.
50. Zanella C, Timblin C, Cummins A, Jung M, Goldberg J, Raabe R, et al. Asbestos-induced phosphorylation of epidermal growth factor receptor is linked to c-fos and apoptosis. *The American journal of physiology*. 1999;277(4 Pt 1):L684-93.
51. Stermán D, Albelda S. Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma. *Respirology*. 2005;10(3):266-183.
52. Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, et al. Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent nonrandom chromosomal alteration regions including jun amplification on 1p32. *Cancer Sci*. 2007;98(3):438-46.
53. Christensen B, Houseman E, Poage G, Godleski J, Bueno R, Sugarbaker D, et al. Integrated profiling reveals a global correlation between epigenetic and genetic alterations in mesothelioma. *Cancer Res* 2010;70(14):5686-94.
54. Robinson B, Musk A, Lake R. Malignant mesothelioma. *Lancet*. 2005;366(9483):397-408.
55. Berk S, Dogan O, Kilickap S, Epozturk K, Akkurt I, Seyfikli Z. Clinical characteristics, treatment and survival outcomes in malignant mesothelioma: eighteen years' experience in Turkey. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2012;13(11):5735-9.
56. Ismail-Khan R, Robinson L, Williams C, Garrett C, Bepler G, Simon G. Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2006;13(4):255-63.
57. Eibel R, Tuengerthal S, Schoenberg S. The role of new imaging techniques in diagnosis and staging of malignant pleural mesothelioma. *Current opinion in oncology*. 2003;15(2):131-8.
58. Wick MR, Tazelaar HD, Ritter JH, Mills SE. Malignant and Borderline Mesothelial Tumors of the Pleura. In: Leslie KO, Wick MR, editors. *Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach* 2011. p. 721-59.

59. Metintas M, Ucgun I, Elbek O, Erginel S, Metintas S, Kolsuz M, et al. Computed tomography features in malignant pleural mesothelioma and other commonly seen pleural diseases. *European journal of radiology*. 2002;41(1):1-9.
60. Leung A, Muller N, Miller R. CT in differential diagnosis of diffuse pleural disease. *AJR American journal of roentgenology*. 1990;154(3):487-92.
61. Moore A, Parker R, Wiggins J. Malignant mesothelioma. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008;3:34.
62. Gill R, Gerbaudo V, Sugarbaker D, Hatabu H. Current trends in radiologic management of malignant pleural mesothelioma. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*. 2009;21(2):111-20.
63. Moran C, Suster S. Tumors of the Pleura. In: Moran C, Suster S, editors. *Tumors and Tumor-like Conditions of the Lung and Pleura*. 1 ed 2010. p. 387-435.
64. Stelow EB. Pleura. In: Mills SE, editor. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. 2. 6 ed 2015.
65. Thomas S. Primary Pleural Neoplasms. In: Zander DS, Farver CF, editors. *Pulmonary Pathology: Foundations In Diagnostic Pathology Series*. 1 ed 2008. p. 693-717.
66. Suster S, Moran CA. Tumors of the Lung and Pleura. In: Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 2. 4 ed 2013. p. 207-45.
67. Weiss S, Goldblum J. Mesothelioma. In: Weiss S, Goldblum J, editors. *Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors*. 5 ed. St Louis: Mosby; 2008. p. 789-823.
68. Hasleton P. Plevral Disease. In: Hasleton P, editor. *Spencer's Pathology of the lung*. 5 ed. Manchester, United Kingdom 1996. p. 1154-99.
69. Rice D. Standardizing surgical treatment in malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1:497-501.
70. Flores R, Pass H, Seshan V, Dycoco J, Zakowski M, Carbone M, et al. Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: results in 663 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135:620-6.
71. Taioli E, Wolf A, Flores R. Meta-analysis of survival after pleurectomy decortication versus extrapleural pneumonectomy in mesothelioma. *Ann Thorac Surg*. 2015;99(472-480).
72. Kostron A, Friess M, Cramer O, Inci I, Schreiner D, Hillinger S, et al. Relapse pattern and second-line treatment following multimodality treatment for malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016;49:1516-23.
73. Tonoli S, Vitali P, Scotti V, Bertoni F, Spiazzi L, Ghedi B, et al. Adjuvant radiotherapy after extrapleural pneumonectomy for mesothelioma. Prospective analysis of a multi-institutional series. *Radiother Oncol*. 2011;101:311-5.
74. Minatel E, Trovo M, Bearz A, Di Maso M, Baresic T, Drigo A, et al. Radical radiation therapy after lung-sparing surgery for malignant pleural mesothelioma: survival, pattern of failure, and prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;93:606-13.
75. Rimner A, Zauderer M, Gomez D, Adusumilli P, Parhar P, Wu A, et al. Phase II study of hemithoracic Intensity-Modulated Pleural Radiation Therapy (IMPRINT) as part of lung-sparing multimodality therapy in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2016;34:761-8.
76. Tsao A, Wistuba I, Roth J, Kindler H. Malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2009;27:2081-90.
77. Buikhuizen W, Hiddinga B, Baas P, van Meerbeeck J. Second-line therapy in malignant pleural mesothelioma. *Lung cancer*. 2015;89:223-31.
78. Bonelli MA, Fumarola C, Monica SL, Alfieri R. New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma. *Biochemical Pharmacology*. 2017;123:8-18.

79. van E, Hurwitz A, Allison J. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med*. 1999;190(2):355–66.
80. Brahmer J, Tykodi S, Chow L, Hwu W, Topalian S, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455–65.
81. Topalian S, Hodi F, Brahmer J, Gettinger S, Smith D, McDermott D, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443–54.
82. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi F, Hwu W, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369(2):134–44.
83. Lipson E, Sharfman W, Drake C, Wollner I, Taube J, Anders R, et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res*. 2013;19(2):462–8.
84. Greenwald R, Freeman G, Sharpe A. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515–48.
85. Fife B, Bluestone J. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008;224:166–82.
86. Krummel M, Allison J. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182:459–65.
87. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39:98–106.
88. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):467–77.
89. Chambers C, Kuhns M, Egen J, Allison J. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:565–94.
90. Collins A, Brodie D, Gilbert R, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002;17:201–10.
91. Egen J, Kuhns M, Allison J. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol*. 2002;3:611–8.
92. Parry R, Chemnitz J, Frauwirth K, Lanfranco A, Braunstein I, Kobayashi S, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9543–53.
93. Leung H, Bradshaw J, Cleaveland J, Linsley P. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem*. 1995;270(42):25107–14.
94. Linsley P, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett K, Mittler R. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996;4(6):535–43.
95. Krummel M, Allison J. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*. 1996;183:2533–40.
96. Piccirillo C, Shevach E. Naturally-occurring CD4 + CD25 + immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol*. 2004;16:81–8.
97. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192:303–9.
98. Creelan B. Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *Cancer Control*. 2014;21(1):80–9.

99. Marcq E, Pauwels P, Meerbeeck JPV, Smits ELJ. Targeting immune checkpoints: New opportunity for mesothelioma treatment? *Cancer treatment reviews*. 2015;41:914–24.
100. Salomon B, Bluestone J. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:225–52.
101. Greenfield E, Nguyen K, Kuchroo V. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol*. 1998;18:389–418.
102. Erfani N, Mehrabadi S, Ghayumi M, Haghshenas M, Mojtahedi Z, Ghaderi A, et al. Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung cancer*. 2012;77(2):306–11.
103. Vanky F, Nagy N, Hising C, Sjøvall K, Larson B, Klein E. Human ex vivo carcinoma cells produce transforming growth factor beta and thereby can inhibit lymphocyte functions in vitro. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 1997;43(6):317–23.
104. Christeli E, Zoumpourlis V, Kiaris H, Ergazaki M, Vassilaros S, Spandidos D. TGF-beta 1 overexpression in breast cancer. *Oncol Rep*. 1996;3(6):1115–8.
105. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):715–27.
106. van der Merwe P, Bodian D, Daenke S, Linsley P, Davis S. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 1997;185(3):393–403.
107. Mandelbrot D, Oosterwegel M, Shimizu K, Yamada A, Freeman G, Mitchell R, et al. B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4. *J Clin Invest*. 2001;107(7):881–7.
108. Rudd C, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009;229(1):12–26.
109. Kissick H, Ireland D, Krishnan S, Madondo M, Beilharz M. Tumour eradication and induction of memory against murine mesothelioma by combined immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(8):822–6.
110. Calabrò L, Danielli R, Sigalotti L, Maio M. Clinical studies with anti-CTLA-4 antibodies in non-melanoma indications. *Semin Oncol*. 2010;37:460–7.
111. Maio M, Grob J, Aamdal S, Bondarenko I, Robert J, Thomas L, et al. Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. *J Clin Oncol*. 2015;33:1191–6.
112. Calabrò L, Morra A, Fonsatti E, Cutaia O, A G, Giannarelli D, et al. Tremelimumab for patients with chemotherapy-resistant advanced malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:1104–11.
113. Calabrò L, Ceresoli G, di Pietro A, Cutaia O, Morra A, Ibrahim R, et al. CTLA4 blockade in mesothelioma: finally a competing strategy over cytotoxic/ target therapy? *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64:105–12.
114. Maio M, Scherpereel A, Calabrò L, Aerts J, Cedres Perez S, Bearz A, et al. Tremelimumab as second- or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma: a phase 2b, randomised, double-blind, placebo-controlled study (DETERMINE). *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1261–73.
115. Chemnitz J, Parry R, Nichols K, June C, Riley J. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004;173:945–54.
116. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:13866–71.
117. Francisco L, Sage P, Sharpe A. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219–42.

118. Pardoll D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
119. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omar A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*. 2006;8(3):190-8.
120. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(9):3360-5.
121. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/ programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2151-7.
122. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2947-53.
123. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010;116:1757-66.
124. Taube J, Klein A, Brahmer J, Xu H, Pan X, Kim J, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20:5064-74.
125. Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E, Shinagawa N, Konishi-Sakakibara J, Ishimine A, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(10):1543-9.
126. Leigh A, Webster I. Lymphocytic infiltration of pleural mesothelioma and its significance for survival. *S Afr Med J*. 1982;61:1007-9.
127. Anraku M, Cunningham K, Yun Z, Tsao M, Zhang L, Keshavjee S, et al. Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(4):823-9.
128. Butte M, Keir M, Phamduy T, Sharpe A, Freeman G. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111-22.
129. Rozali E, Hato S, Robinson B, Lake R, Lesterhuis W. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. doi: 10.1155/2012/656340.
130. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, et al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(3):672-7.
131. Merelli B, Massi D, Cattaneo L, Mandala M. Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(1):140-65.
132. Barber D, Wherry E, Masopust D, Zhu B, Allison J, Sharpe A, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-7.
133. Ott P, Hodi F, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2013;19:5300-9.
134. Herbst R, Soria J, Kowanetz M, Fine G, Hamid O, Gordon M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-7.

135. Robert C, Schachter J, Long G, Arance A, Grob J, Mortier L, et al. KEYNOTE-006 Investigators. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372:2521–32.
136. Robert C, Long G, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372:320–30.
137. Rizvi N, Mazie`res J, Planchard D, Stinchcombe T, Dy G, Antonia S, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:257–65.
138. Weber J, D'Angelo S, Minor D, Hodi F, Gutzmer R, Neyns B, et al. 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*. 2015;16:375–84.
139. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J, Cowey C, Lao C, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373:23–34.
140. Brahmer J, Reckamp K, Baas P, Crinò L, Eberhardt W, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:123–35.
141. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel D, Steins M, Ready N, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:1627–39.
142. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Schadendorf D, Hamid O, Robert C, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:908–18.
143. Kindler HL, Pietro AD, Robbins PB, Hong S, Shalabi A, Ibrahim R, et al. A randomized, double-blind study comparing tremelimumab to placebo in second and third line treatment of subjects with unresectable pleural or peritoneal mesothelioma. *J Thorac Oncol*; 2013. p. 942.
144. Cedres S, Ponce-Aix S, Zugazagoitia J, Sansano I, Enguita A, Navarro-Mendivil A, et al. Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *PloS one*. 2015;10(3):e0121071. doi: 10.1371/journal.pone.0121071. PubMed PMID: 25774992; PubMed Central PMCID: PMC4361537.
145. Cowan M, Forde P, Taube J, Illei P. PD-L1 expression in malignant mesothelioma: an immunohistochemical analysis of 33 cases. *Lab Invest*. 2014;94.
146. Mansfield AS, Roden A, Peikert T, Sheinin Y, Harrington S, Krco C, et al. B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2014;9(7):1036–40. doi: 10.1097/JTO.000000000000177. PubMed PMID: 24926549; PubMed Central PMCID: PMC4058651.
147. Quispel-Janssen J, Zago G, Schouten R, Buikhuisen W, Monkhorst K, Thunissen E, et al. A Phase II study of nivolumab in malignant pleural mesothelioma (NivoMes): with translational research (TR) biopies. *J Thorac Oncol* 2017. p. 292–3.
148. Hassan R, Thomas A, Patel MR, Nemunaitis JJ, Bennouna J, Powderly JD. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with advanced unresectable mesothelioma from the JAVELIN solid tumor Phase Ib trial: Safety, clinical activity, and PD-L1 expression. *J Clin Oncol* 2016. p. 8503-.

149. Calabrò L, Ceresoli G, D'Incecco A, Scherpereel A, Aerts J, Maio M. Immune checkpoint therapy of mesothelioma: Pre-clinical bases and clinical evidences. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2017;36:25-31. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.07.003.
150. Alley E, Lopez L, Santoro A, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, et al. Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2017;18:623–30.
151. Kindler HL, Karrison TG, Rose B, Tan Y-HC, Khattari A, Acharya R. Biomarkers of pembrolizumab activity in mesothelioma: results from a phase II trial. *J Clin Oncol*. 2017;15:8557-.
152. Bueno R, Stawiski E, Goldstein L, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 2016;48:407–16.
153. Thapa B, Watkins D, John T. Immunotherapy for malignant mesothelioma: reality check. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016;6:1-10.
154. Gao Q, Wang X, Qiu S, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, et al. Overexpression of PDL1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(3):971–9.
155. Curran M, Montalvo W, Yagita H, Allison J. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(9):4275–80.
156. Alabalık U, Türkcü G, Keleş AN, Ibiloğlu I, Urakçı Z, Büyükbayram H. Aquaporin 1, Aquaporin 3 and Aquaporin 5 expression and EGFR mutation in malignant pleural mesotheliomas: an imunohistochemical and molecular study. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017;31(2):367-72.
157. Craighead J. Epidemiology of mesothelioma and historical background. *Recent Results Cancer Res*. 2011;189:13-25.
158. Cedres S, Ponce-Aix S, Pardo-Aranda N, Navarro-Mendivil A, Martinez-Marti A, Zugazagoitia J, et al. Analysis of expression of PTEN/PI3K pathway and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung cancer*. 2016;96:1-6. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.03.001. PubMed PMID: 27133741.
159. Combaz-Lair C, Galateau-Salle F, McLeer-Florin A, Le Stang N, David-Boudet L, Duruisseaux M, et al. Immune biomarkers PD-1/PD-L1 and TLR3 in malignant pleural mesotheliomas. *Human pathology*. 2016;52:9-18. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.010. PubMed PMID: 26980049.
160. Ikeda S, Okamoto T, Okano S, Umemoto Y, Tagawa T, Morodomi Y, et al. PD-L1 Is Upregulated by Simultaneous Amplification of the PD-L1 and JAK2 Genes in Non–Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;11(1):62-71.
161. Sasaki H, Suzuki A, Shitara M, Hikosaka Y, Okuda K, Moriyama S, et al. PD-L1 gene expression in Japanese lung cancer patients. *Biomedical Reports*. 2013;1:93-6.
162. Kösemehmetoğlu K, Özoğul E, Babaoğlu B, Tezel GG, Gedikoğlu G. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Malignant Mesenchymal Tumors. *Türk Patoloji Derg*. 2017;33:192-7.
163. Thapa B, Salcedo A, Lin X, Walkiewicz M, Murone C, Ameratunga M, et al. The Immune Microenvironment, Genome-wide Copy Number Aberrations, and Survival in Mesothelioma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2017;12(5):850-9.

164. Hsu P-C, Miao J, Wang Y-C, Zhang W-Q, Yang Y-L, Wang C-W, et al. Inhibition of yes-associated protein down-regulates PD-L1 (CD274) expression in human malignant pleural mesothelioma. *J Cell Mol Med*. 2018;22(6):3139-48.
165. Yang X, Zhu G, Yang Z, Zeng K, Liu F, Sun J. Expression of PD-L1/PD-L2 is associated with high proliferation index of Ki-67 but not with TP53 overexpression in chondrosarcoma. *Int J Biol Markers*. 2018;1. doi: 10.1177/1724600818774464.
166. Tanaka Y, Maeshima A, Nomoto J, Makita S, Fukuhara S, Munakata W, et al. Expression pattern of PD-L1 and PD-L2 in classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, and gray zone lymphoma. *Eur J Haematol*. 2018;100(5):511-7.
167. Pinto N, Park J, Murphy E, Yearley J, McClanahan T, Annamalai L, et al. Patterns of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(11).
168. Panjwani P, Charu V, DeLisser M, Molina-Kirsch H, Natkunam Y, Zhao S. Programmed death-1 ligands PD-L1 and PD-L2 show distinctive and restricted patterns of expression in lymphoma subtypes. *Human pathology*. 2018;71:91-9.
169. Chang H, Kim J, Choi Y, Cho J, Woo J, Kim A, et al. Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors. *Onco Targets Ther*. 2017;13(10):2983-92.
170. Yearley J, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, et al. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):3158-67.
171. Santoni G, Amantini C, Morelli M, Tomassoni D, Santoni M, Marinelli O, et al. High CTLA-4 expression correlates with poor prognosis in thymoma patients. *Send to Oncotarget*. 2018;9(24):16665-77.