



T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**MALİGN MELANOM HASTALARINDA
ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN DİAGNOSTİK VE
PROGNOSTİK ROLÜ**

BAŞAK KOÇDOR
ORCID ID: 0000-0003-4359-9511
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. ZEYNEP GÜLSÜM GÜÇ
YARDIMCI DANIŞMAN
PROF. DR AHMET ALACACIOĞLU

İZMİR-2025

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**MALİGN MELANOM HASTALARINDA
ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN DİAGNOSTİK VE
PROGNOSTİK ROLÜ**

BAŞAK KOÇDOR
ORCID ID: 0000-0003-4359-9511
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. ZEYNEP GÜLSÜM GÜÇ

Bu tez çalışması, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'nün
2024-TDU-TIPF-0031 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir.

İZMİR-2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tıp Fakültesi;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı tarafından yürütülmüş olan “Malign Melanom Hastalarında antimikrobiyal peptitlerin diagnostik ve prognostik rolü” başlıklı bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19 / 09 / 2025

Tez Danışmanı: Doç Dr. Zeynep Gülsüm Güç (ORCID: 0000-0001-8960-2208) (İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

Üye: Prof. Dr. Ahmet Alacacıoğlu (ORCID: 0000-0003-3428-5932) (İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

ONAY: Bu Uzmanlık tezi, Eğitim Planlama Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tuğrul BULUT
Dekan

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	4
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	ix
TABLolar.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	1
1.4. Araştırmanın Önemi ve Yaygın Etkisi	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Araştırmanın Türü	24
3.2. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Zaman	24
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme	24
3.4. Çalışma Materyali	24
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	26
3.6. Veri Toplama Araçları.....	26
3.7. İstatistiksel Analiz.....	27
3.8. Araştırma Takvimi	28
3.9. Etik İzinler.....	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
7. KAYNAKLAR	51
EKLER.....	55
ÖZGEÇMİŞ	59

TEŞEKKÜR

Tez yazma ve tıpta uzmanlık eğitim sürecim boyunca her defasında gerek bilimsel, gerek manevi desteğini eksik etmeyen, Hastalarla iletişim, bilimsel etik, empati, sevgi, çalışkanlık, hekimlik ve bilim yolunda ilerlediğim her adımda kendisini rol model aldığım çok sevgili, zarif hocam Doç. Dr. Zeynep Gülsüm Güç'e

Eğitim sürecim ve tezimin her aşamasında mentorum olan bilim ve hekimlik sanatını icra etme hususunda fikirlerine çok kıymet verdiğim değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Alacacıoğlu'na,

İç Hastalıkları uzmanlık eğitim sürecimde büyük katkıları olan Prof. Dr.Servet Akar, Prof. Dr. Yüksel Küçükzeybek, Doç. Dr. Zeki Soypaçacı,,Doç. Dr.Sezgin Vatansever, Öğr. Üyesi Dr. Kâmil Gönderen'e ve Öğr. Üyesi Uğur Bayram Korkmaz'a

Her zaman desteklerini yanımda hissettiğim annem Hilal Koçdor'a ve babam Mehmet Ali Koçdor'a ve kıymetli arkadaşlarım Arzu Yıldırım, Yağmur Kaya'ya gösterdikleri sabır ve destekler için teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak çalışmama sağladıkları bilimsel katkı ve maddi destek için İzmir Onkoloji Grubu (İZOG) ve İnterdisipliner Onkoloji Derneği'ne (İDOD) şükranlarımı sunarım.

ÖZET

MALİGN MELANOM HASTALARINDA ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN DİAGNOSTİK VE PROGNOTİK ROLÜ

Başak KOÇDOR

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi, İzmir, Türkiye, 2025

Giriş: Malign melanom, melanositlerden köken alan, yüksek mortalite oranı ve biyolojik agresifliği ile dikkat çeken bir deri kanseridir. Erken evrede tanı konulduğunda cerrahi tedavi ile yüksek oranda kür sağlanabilse de ileri evrelerde metastaz eğilimi ve tedaviye dirençli seyri nedeniyle ciddi bir klinik sorun oluşturmaktadır. Günümüzde malign melanomun patogeneğinde yalnızca genetik ve moleküler değişiklikler değil, aynı zamanda immün sistemin rolü de ön plana çıkmaktadır.

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), doğuştan gelen immün yanıtın temel bileşenlerinden olup bakteriler, virüsler ve mantarlar gibi pek çok patojene karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bunun yanı sıra immün yanıtın düzenlenmesi, inflamasyonun modülasyonu ve hücresel proliferasyonun etkilenmesi gibi fonksiyonları da giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, AMP'lerin kanser biyolojisinde yalnızca savunma işleviyle değil, aynı zamanda tümör mikroçevresi, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve metastatik süreçler üzerinde de etkili olabileceğini göstermiştir.

Malign melanomda AMP'lerin ekspresyon düzeyleri ve dağılımının, hastalığın erken tanısında ve prognozun öngörülmesinde belirleyici olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, AMP'lerin melanomda tanısal ve prognostik biyomarker olarak potansiyellerinin araştırılması, hem klinik yönetim hem de hedefe yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Amaç: Bu çalışmada, malign melanom hastalarında antimikrobiyal peptitlerin (AMP'ler) ekspresyon düzeylerinin incelenmesi ve bu moleküllerin tanısal ve prognostik belirteç olarak potansiyel rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Malign melanom tanısı alan hastaların kan plazmalarında belirli AMP'lerin moleküler yöntemlerle ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Bulgular, klinikopatolojik veriler ve hasta prognozları ile ilişkilendirilerek analiz edildi.

Bulgular: AMP'lerin ekspresyon düzeylerinde malign melanom olguları ile sağlıklı gönüllüler arasında anlamlı istatistiksel farklılıklar saptandı. Ayrıca belirli AMP'lerin yüksek veya düşük ekspresyonunun, tümör kalınlığı, mitotik aktivite, metastaz varlığı ve sağkalım gibi prognostik parametrelerle korelasyon gösterdiği izlendi.

Sonuçlar: Bu çalışma, AMP'lerin malign melanomda yalnızca immün sistemin savunma bileşenleri değil, aynı zamanda hastalığın tanısı ve prognozunun öngörülmesinde potansiyel biyomarker adayları olabileceğini ortaya koymaktadır. Bulgular, gelecekte AMP'lerin klinik kullanımına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine ışık tutabilir.

Anahtar Kelimeler: malign melanom, antimikrobiyal peptitler, defensinler, kanser biyomarkırları

ABSTRACT

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN PATIENTS WITH MALIGNANT MELANOMA

Başak KOÇDOR

Izmir Katip Celebi University, Faculty of Medical Sciences Department of Internal Medicine Medical Specialization Thesis, Izmir, Türkiye, 2025

Introduction: Malignant melanoma is a skin cancer originating from melanocytes, characterized by its high mortality rate and biological aggressiveness. While early-stage diagnosis allows for a high rate of cure through surgical intervention, advanced stages pose a significant clinical challenge due to their tendency to metastasize and resistance to therapy. In recent years, not only genetic and molecular alterations but also the role of the immune system have been emphasized in the pathogenesis of malignant melanoma.

Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of the innate immune response, exhibiting broad-spectrum antimicrobial activity against various pathogens including bacteria, viruses, and fungi. Beyond this antimicrobial function, AMPs have gained increasing attention for their roles in immune regulation, modulation of inflammation, and influence on cellular proliferation. Recent studies suggest that AMPs are involved not only in host defense but also in processes such as tumor microenvironment modulation, cell proliferation, angiogenesis, and metastatic progression.

The expression levels and distribution of AMPs in malignant melanoma are thought to be significant in both the early diagnosis and prognostic evaluation of the disease. Therefore, investigating the potential of AMPs as diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma is of great importance for both clinical management and the development of novel targeted therapeutic strategies.

Objective: The aim of this study was to investigate the expression levels of antimicrobial peptides (AMPs) in patients with malignant melanoma and to evaluate their potential roles as diagnostic and prognostic biomarkers.

Materials and Methods: Expression levels of selected AMPs were assessed in the plasma samples of patients diagnosed with malignant melanoma using molecular techniques. The findings were analyzed in correlation with clinicopathological data and patient prognosis.

Results: Significant differences were observed in AMP expression levels between malignant melanoma cases and healthy controls. Furthermore, high or low expression levels of certain AMPs showed correlation with prognostic parameters such as tumor thickness, mitotic activity, presence of metastasis, and survival.

Conclusion: This study demonstrates that AMPs may serve not only as innate immune defense molecules but also as potential biomarkers in the diagnosis and prognostic evaluation of malignant melanoma. These findings may provide valuable insights for the development of future clinical applications and novel strategies involving AMPs.

Keywords: malignant melanoma, antimicrobial peptides, defensins, cancer biomarkers



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABCED – Asymmetry, Border, Color, Diameter, Evolving (Melanom klinik tanı kriterleri)

ACT – Adoptif Hücre Tedavisi

AI – Artificial Intelligence (Yapay Zekâ)

AJCC – American Joint Committee on Cancer

AMP – Antimikrobiyal Peptit

APC – Antijen Sunucu Hücre

ARID2 – AT-rich Interaction Domain 2

AUC: Area Under the Curve (Eğri Altındaki Alan)

BCC – Bazal Hücreli Karsinom

BRAF – v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B

BRAF V600 – B-Raf Proto-Oncogene, serin/treonin kinaz, V600 mutasyonu

CD4+ – Cluster of Differentiation 4 (yardımcı T hücre yüzey belirteci)

CD8+ – Cluster of Differentiation 8 (sitotoksik T hücre yüzey belirteci)

CDKN2A – Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CheckMate 067 – Phase III clinical trial evaluating nivolumab ± ipilimumab in advanced melanoma

coBRIM – Phase III clinical trial evaluating vemurafenib + cobimetinib in BRAF-mutant melanoma

COLUMBUS – Phase III clinical trial evaluating encorafenib + binimetinib in BRAF-mutant melanoma

COMBI-AD – Phase III clinical trial evaluating adjuvant dabrafenib + trametinib in stage III BRAF-mutant melanoma

CTL – Sitotoksik T Lenfosit

CTLA-4 – Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4

Cut-off: Cut-off Value (Kesim Noktası / Eşik Değer)

DAMP – Damage-Associated Molecular Pattern

DEFB – Defensin Beta (gen ailesi)

DF- Serbestlik derecesi

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GLOBOCAN – Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence

GNAQ – Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit Alpha-Q

hBD – Human Beta-Defensin

HMB-45 – Human Melanoma Black antibody

HMGB1 – High Mobility Group Box 1

HNP – Human Neutrophil Peptide

HRP – Horseradish Peroxidase

IL – Interleukin

IL-1 β – Interleukin-1 beta

IL-6 – Interleukin-6

KIT – Proto-oncogene Receptor Tyrosine Kinase

LDH – Laktat Dehidrogenaz

LPS – Lipopolysaccharide

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

Mart-1 / Melan-A – Melanoma Antigen Recognized by T cells-1

MC1R – Melanokortin 1 Reseptörü

MEK – Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

NEMO – Phase III clinical trial evaluating binimetinib in NRAS-mutant melanoma

MHC – Major Histocompatibility Complex

MIA – Melanoma Inhibitory Activity protein

mm- milimetre

NF- κ B – Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NF1 – Neurofibromin 1

NRAS – Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog

OS – Overall Survival (Genel Sağlıkım)

p: p-value (p-değeri, istatistiksel anlamlılık)

PD-1/PD-L1 – Programmed Death-1 / Programmed Death Ligand-1

PFS – Progression-Free Survival (İlerlemesiz Sağlıkım)

PGE2 – Prostaglandin E2

ROS – Reaktif Oksijen Türevleri

RSK – Ribosomal S6 Kinase

S100B – S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein

SCC – Squamöz Hücreli Karsinom

SLPI – Secretory Leukocyte Protease Inhibitor

STAT3 – Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TCR – T-Cell Receptor

TERT – Telomeraz Reverse Transcriptase

TGF-β – Transforming Growth Factor-beta

Th – T helper (Yardımcı T hücreleri)

TILs – Tumor Infiltrating Lymphocytes (Tümör İnfiltran Lenfositler)

TMB – Tetramethylbenzidine

TNF-α – Tumor Necrosis Factor-alpha

TNM – Tümör, Nod, Metastaz sınıflaması

TP53 – Tümör protein 53

95% CI: 95% Confidence Interval (%95 Güven Aralığı)

ŞEKİLLER

Şekil 1: Melanomda gen mutasyonları sonrası kontrolsüz çoğalma yolağı (1)

Şekil 2: İmmünoterapide hedeflenen PD1/PD-L1

Şekil 3: AMP'lerin sınıflandırılması

Şekil 4: AMP'lerin hücre zarı üzerinde aksiyonları (38)

Şekil 5: AMP'lerin çeşitli uygulamaları (38)

Şekil 6: AMP'lerin immünmodülatör etkileri (44)

Şekil 7: HMGB1'in vitiligo üzerinde etki mekanizması (48)

Şekil 8: S100B proteininin IL-6 üzerinden immüniteyi baskılaması (52)

Şekil 9: Çalışmanın hasta popülasyon dağılımı

TABLÖLAR

Tablo 1: Mutasyona uğrayan gen ve fonksiyonu

Tablo 2: AJCC 8. Baskı – Melanom TNM Sınıflaması (15)

Tablo 3: Antimikrobiyal Peptitlerin canlılardaki genel yerleşimi ve koruyuculukları

Tablo 4: Hastaların evrelere göre dağılımı

Tablo 5: Çalışmaya dahil edilen 58 hastanın histolojik alttip dağılımı

Tablo 6: Çalışmaya dahil edilen 58 hastanın kaba anatomik lokalizasyonlara göre dağılımı

Tablo 7: Metastaz- cinsiyet karşılaştırması

Tablo 8: Ülser varlığı ve LN/uzak metastaz ilişkisi

Tablo 9: Güneş maruziyeti metastaz ilişkisi

Tablo 10: Clark Evreleri ve metastaz ilişkisi

Tablo 11: Breslow skorunun lenf nodu ve uzak metastaz ilişkisi

Tablo 12: Evrelere göre plazma relative HMGB-1 seviyeleri

Tablo 13: Evrelere göre plazma relative S100B seviyeleri

Tablo 14: Evrelere göre plazma relative HBD-1 seviyeleri

Tablo 15: Evrelere göre plazma relative HBD-2 seviyeleri

Tablo 16: Evrelere göre plazma relative HBD-3 seviyeleri

Tablo 17: Tüm HBD'lerin sensitivite-spesifitesinin kıyaslaması ROC Analizi

Tablo 18: Evrelere göre plazma relative HNP1-3 seviyeleri

Tablo 19: Evrelere göre plazma LDH düzeyleri

Tablo 20: Çalışılan AMP'lerin ROC analiz sonuçları

1. GİRİŞ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Malign melanom, melanositlerden köken alan, agresif seyirli ve mortalitesi yüksek bir deri kanseridir. Son yıllarda immün kontrol noktası inhibitörleri (checkpoint inhibitors) ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi, bu alanda adeta bir dönüm noktası yaratmıştır. 2018 yılında James P. Allison ve Tasuku Honjo'nun immün sistemin kanserle savaşındaki rolünü keşfederek Nobel Tıp Ödülü'nü alması, bu ilerlemenin bilimsel önemini de vurgulamıştır. İmmünmodülatör tedaviler ile metastatik melanomda sağkalım süreleri anlamlı derecede uzamış, hatta bazı hastalarda uzun dönem remisyon sağlanabilmiştir.

Buna karşın, ileri evre melanomda kür sağlamak halen mümkün değildir ve hastalık çoğu vakada tedaviye direnç geliştirmektedir. Bu nedenle hem erken tanıyı kolaylaştıracak hem de prognozu öngörmeye yardımcı olacak yeni biyomarkere ihtiyaç duyulmaktadır.

Antimikrobiyal peptitler, yalnızca mikroorganizmalara karşı etkili savunma molekülleri olmayıp; inflamatuvar süreçleri düzenleme, immün yanıtı şekillendirme, hücrel proliferasyon ve apoptoz gibi temel biyolojik olayları da etkilemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, AMP'lerin farklı kanser türlerinde tümör mikroçevresini ve hastalık seyrini etkileyebildiğini ortaya koymuştur. Ancak malign melanomda bu peptitlerin ekspresyon düzeyleri ve klinik sonuçlarla ilişkisi yeterince aydınlatılamamıştır. Bu bilgi eksikliği, araştırmanın temel problemini oluşturmaktadır.

Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, malign melanom hastalarında seçilmiş antimikrobiyal peptitlerin plazma düzeylerini değerlendirmek ve bu peptitlerin tanısallık ve prognostik belirteç olarak potansiyel rollerini ortaya koymaktır. AMP'lerin sağlıklı bireyler ile malign melanom hastaları arasındaki ekspresyon farklılıklarının yanı sıra; tümör kalınlığı, mitotik aktivite, metastaz varlığı ve sağkalım gibi klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

1. Malign melanom hastalarının plazmasında antimikrobiyal peptitlerin ekspresyon düzeyleri, sağlıklı bireylere kıyasla farklıdır.

2. AMP'ler, malign melanomda hem tanı hem de prognoz açısından kullanılabilir biyomarker adaylarıdır.

1.4. Araştırmanın Önemi ve Yaygın Etkisi

Malign melanom, özellikle ileri evrelerde yüksek mortaliteye neden olan ve tedaviye direnç geliştirebilen bir hastalık olduğundan, yeni biyomarkerların tanımlanması bilimsel ve klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu araştırma, antimikrobiyal peptitlerin malign melanomda biyolojik rollerini ve klinik değerini aydınlatarak literatüre katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

Elde edilecek bulguların, gelecekte AMP'lerin tanısal ve prognostik amaçlı kullanımına yönelik klinik yaklaşımları desteklemesi beklenmektedir. Ayrıca AMP temelli biyomarkerların ortaya konması, malign melanom yönetiminde kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Böylece çalışmanın bulguları, yalnızca bilimsel bilgiye değil, aynı zamanda toplum sağlığına yönelik yaygın etkiye de sahip olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MALİGN MELANOM

2.1.1 MALİGN MELANOM EPİDEMİYOLOJİ:

Malign melanom, nöral krestten köken alan melanositlerden gelişen, oldukça agresif seyirli bir solid tümördür. En çok kutanöz formu görülmekle birlikte oküler ve mukozal formları da mevcuttur. Kutanöz melanom, tüm deri kanserlerinin küçük bir yüzdesini oluşturmasına karşın, deri kanseri ilişkili ölümlerin yaklaşık %75'inden sorumludur. (1) GLOBOCAN (Global Cancer Observatory – Cancer Incidence and Mortality Worldwide) 2022 verilerine göre melanom, tüm kanserler arasında insidansta 17., kansere bağlı mortalitede ise 22. sırada yer almakta olup, 2020–2040 yılları arasında görülme sıklığının yaklaşık %50 oranında artacağı öngörülmektedir. (2)

Hastalık tüm dünyada heterojen bir demografik dağılım göstermektedir. Ülkemizde bir yılda saptanan tüm kanser vakaları arasında 21. sırada yer almaktadır. (2) TC. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Türkiye Kanser İstatistikleri 2020 raporuna göre, melanom (C43) için toplam 1.293 yeni olgu bildirilmiştir. Bu olguların 780'i erkeklerde, 513'ü ise kadınlarda görülmüştür. Erkeklerde kaba insidans hızı yüz binde 1,86, kadınlarda ise yüz binde 1,23 olarak hesaplanmıştır. Yaşa standardize hızlar (ASR) dikkate alındığında ise erkeklerde 1,6/100.000, kadınlarda 0,9/100.000 değerleri saptanmıştır. (3)

2.1.2 MALİGN MELANOM ETİYOLOJİSİ

Etiyolojisinde güneş ışığı maruziyeti, somatik ve germline mutasyonlar yer almaktadır. Epiderminin alt tabakasında yer alan melanositlerce, ultraviyole ışınlarının absorbe edilmesi amacıyla melanin pigmenti üretilmektedir. UV ve radyasyon maruziyetine yanıt olarak keratinositler tarafından α -melanosit stimüle edici hormon(α -MSH) salgılanır ve melanosit üzerindeki melanokortin 1 receptörüne (MC1R) bağlanarak melanin sentezi artırılır. (3) Sentez sonrası melanositlerce taşınan melanin pigmenti, keratinosit üzerinde parmaksı çıkıntılar şeklinde birikerek ve sonrasında ise birlikte ölü bir hücre tabakası oluşturarak deride, UV'nin olası mutajen etkilerine karşın bariyer görevi üstlenirler. (4)

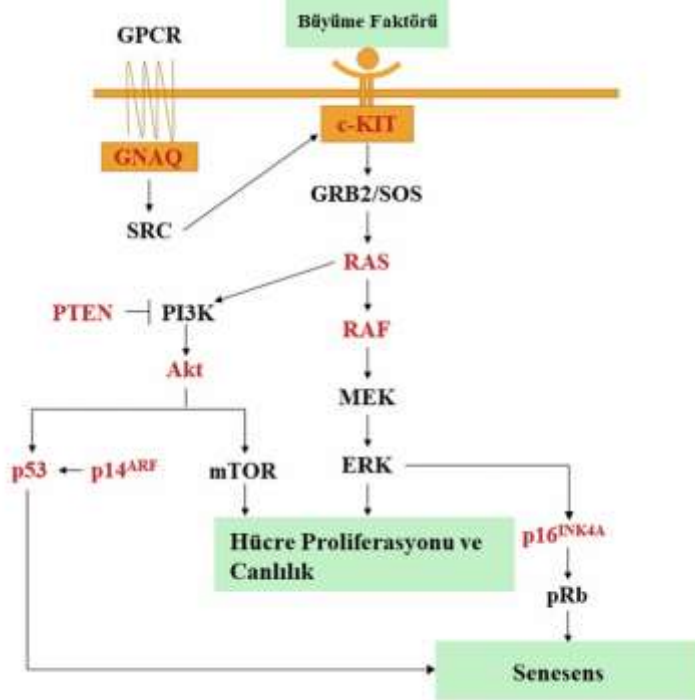
2.1.3 MALİGN MELANOMDA RİSK FAKTÖRLERİ

Malign melanom dünyada, Avusturalya, Yeni Zelanda başta olmak üzere en sık Kuzey Amerika, Kanada ve İskandinav ülkelerinde görülmektedir. Ekvatora (Afrika, Asya ülkeleri) yaklaştıkça görülme sıklığı azalmaktadır. (2) Bunun başlıca sebebinin, beyaz tenli etnik kökene sahip ırkların, UV maruziyeti yüksek ülkelere göç etmesi olduğu düşünülebilir. Moleküler mekanizmaları incelendiğinde; melanositlerce üretilen melanin pigmentinin iki formu bulunmaktadır. Kahverengi/siyah ömelanin ve sarı/kırmızı renkli feomelanin pigmenti; Bu pigmentlerin birbirine oranı kişinin ten rengini belirlerken, ömelanin derinin UV koruması konusunda rol oynamaktadır. Feomelanin ise daha düşük UV koruması sunmakla birlikte aynı zamanda karsinojen üretiminde de rol oynamaktadır. Bazı çalışmalarda feomelaninin UV maruziyeti sonrası DNA hasarına sebep veren reaktif oksijen türevlerini (ROS) artırdığı gösterilmiştir. (6) Açık ten renkli, kızıl-açık sarı saçlı, açık göz iris pigmentine sahip kişilerde kutanöz melanoma riskinin fazla olduğu bilinmektedir. (7) Deri, göz ve saç rengini belirleyen pigmentasyondan sorumlu gen MC1R'dir. Bu gendeki polimorfizm, MC1R aktivasyonunu ve dolayısıyla açık renklenme sağlayan feomelanin üretimini ve feomelanin\ömelanin oranını belirlemektedir. Tam fonksiyon gösteren bir MC1R geninde; teorik olarak daha fazla kahve-siyah pigmentasyon sağlayan ve UV radyasyon hasarından hücre çekirdeğini üst düzey koruyacak ömelanin sentezinin fazla olması beklenir. Dolayısıyla varyant MC1R geninin az aktive olması ve feomelanin miktarındaki rölatif fazlalık, açık tenli kişinin güneş ışınlarına daha fazla hassasiyeti ve oküler- kutanöz melanomaya yakalanma insidansında artışa neden olacaktır. (4) Her ne kadar cilt rengi ve güneş maruziyeti melanom oluşmasında önemli bir rol oynasa da bazı melanomların tipleri güneş maruziyetinden uzak noktalarda veya halihazırda bir nevus üzerinden geliştiği görülebilir. Bu noktada 'sürücü' somatik mutasyonların tanımlanması, çoğunlukla insan tümör örnekleri üzerinde ve yeni nesil genetik tarama yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

2.1.4 GENETİK MUTASYONLAR

Saptanan ilk somatik mutasyon BRAF aktivasyonu üzerinde bulunmuştur. Tekrar eden çalışmalar BRAF mutasyonunun, hastalığın malign süreci üzerinde doğrudan katkıda bulunduğunu göstermektedir. (8) 2002 yılında Davies ve arkadaşları, genom çapında yaptıkları taramada MAPK sinyal yoluna odaklanmış ve melanom örneklerinin yaklaşık %66'sında BRAF geninde V599E (sonradan V600E olarak

tanımlanan) mutasyonu saptamışlardır. Bu mutasyon, hücrelerin MAPK yolunu RAS'tan bağımsız aktive edebilmesine yol açarak kontrolsüz proliferasyon ve malign transformasyona neden olmaktadır. Sonraki çalışmalarda BRAF'ın kodon 600'deki bu aktivasyon mutasyonlarının sık olduğunu gösterilmiş ve BRAF'ın melanom tedavisinde önemli bir hedef olabileceği fikrini ortaya koymuştur. (8–10) Melanomun tüm varyantlarında mutasyon sıklıkları aynı değildir. Ancak tüm tiplerde tekrarlayan (recurrent) bazı somatik mutasyonlar sık görülür. Bu sürücü mutasyonlar genellikle hücrel sinyal yollarında yoğunlaşır ve farklı biyolojik süreçleri etkiler. Anılan biyolojik süreçler, hücre proliferasyonu (BRAF, NRAS, NF1), büyüme ve metabolizma (PTEN, KIT), apoptoza direnç (TP53), replikatif ömür (TERT), hücrel kimlik (ARID2) ve hücre döngüsü kontrolü (CDKN2A) ile ilişkili sinyal yollarında yoğunlaşmaktadır. (11) Raamsdonk ve ark. yaptığı bir çalışmada üveal melanomların %46'sında GNAQ mutasyonu saptanmıştır. (12) GNAQ onkogenindeki mutasyonlar, GTPaz aktivitesini bozarak MAPK yolunu BRAF/NRAS olmadan aktive etmektedir.



Şekil 1: Melanomda gen mutasyonları sonrası kontrolsüz çoğalma yolu (1)

Gen	İlgili Biyolojik Süreç / Fonksiyon
BRAF, NRAS, NF1	Hücre proliferasyonu / MAPK yolunun aktivasyonu
PTEN, KIT	HücreSEL büyüme ve metabolizma düzeni
TP53	Apoptozdan kaçış (hücre ölümüne direnç)
TERT	Replikatif ömür (telomer uzunluğu ve ömür)
ARID2	HücreSEL kimlik / kromatin yeniden şekillenmesi
CDKN2A	Hücre döngüsü kontrolü (G1/S geçişi)

Tablo:1 Mutasyona uğrayan gen ve fonksiyonu

2.1.5 HİSTOLOJİK SINIFLAMA

1960'lı yıllarda dermatolog Wallace Clark, melanomun sınıflandırılmasında histolojik özelliklerin esas alınması gerektiğini öne sürerek tanı yaklaşımında devrim niteliğinde bir değişiklik başlatmıştır. Clark, başlangıçta üç histolojik alt tip tanımlamıştır:

- Yüzeysel yayılan melanom (Superficial Spreading Melanoma, SSM),
- Lentigo Maligna Melanom (LMM),
- Nodüler Melanom (NM).

Daha sonra; Akral Lentiginöz Melanom, Mukozal Melanom, Desmoplastik Melanom ve Nevoid Melanom gibi yeni varyantlar da tanımlanmış olmakla birlikte, günümüzde halen SSM, LMM ve NM temel histolojik alt tipler olarak kabul edilmektedir. (13)

2.1.6 PATOLOJİK VE KLİNİK EVRELEME

Daha sonraki yıllarda Clark, deriyi histolojik olarak ayırt edilebilir anatomik kompartmanlara ayırmıştır. Melanom hücrelerinin, bu katmanları geçtikçe uzak metastaz riskinin de teorik olarak arttığını belirtmiştir:

- Seviye I: Melanom hücreleri yalnızca epidermis ile sınırlıdır (Melanom in situ).
- Seviye II: Melanom hücreleri tek tek ya da çok küçük hücre kümeleri halinde papiller dermise invaze olmuştur.
- Seviye III: Melanom hücreleri papiller dermisi tamamen doldurur ve genişletir.
- Seviye IV: Retiküler dermise invazyon vardır.
- Seviye V: Subkutan yağ dokusuna invazyon söz konusudur. (13)

Clark seviyeleri günümüzde hâlâ bazı patoloji raporlarında hastalığın agresifliği ile ilgili bilgi aktarmak için kullanılan bir yöntem olmakla birlikte, 1970 yılında Alexander Breslow, melanomu sınıflandırmak için daha doğru kabul edilen bir sistem geliştirmiştir. Breslow sınıflaması, tümörün anatomik kompartmanlarına göre değil, invazyon derinliğinin milimetre olarak ölçülmesine dayanır. Çünkü anatomik tabakaların kalınlığı vücut bölgelerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Breslow, başlangıçta melanomu beş evreye ayırmıştır. (13) Daha sonra bu milimetrik sınıflandırma şekillenerek 4 dereceye ayrılarak günümüzde AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer) T basamağında halen kullanılmaktadır.

AJCC 8. Baskı – Melanom TNM Sınıflaması (14)

T (Primer tümör)

- Tis: Melanom in situ
- T1: Kalınlık $\leq 1,0$ mm
 - o T1a: $<0,8$ mm ve ülserasyon yok
 - o T1b: $0,8-1,0$ mm veya $<0,8$ mm + ülserasyon
- T2: $1,01-2,0$ mm
 - o T2a: Ülserasyon yok
 - o T2b: Ülserasyon var
- T3: $2,01-4,0$ mm
 - o T3a: Ülserasyon yok
 - o T3b: Ülserasyon var
- T4: $>4,0$ mm
 - o T4a: Ülserasyon yok
 - o T4b: Ülserasyon var

N (Bölgesel lenf nodu)

- N0: Metastaz yok
- N1: 1 metastatik LN
 - o N1a: Mikrometastaz
 - o N1b: Makrometastaz
 - o N1c: In-transit, satelit veya mikrosatelit metastaz, LN yok

- N2: 2–3 metastatik LN
 - o N2a: Mikrometastaz
 - o N2b: Makrometastaz
 - o N2c: In-transit/satelit ± LN
- N3: ≥4 LN, matted LN veya kombine LN + satelit/in-transit

M (Uzak metastaz)

- M0: Uzak metastaz yok
- M1a: Deri, subkutan doku veya uzak LN
- M1b: Akciğer metastazı
- M1c: Diğer viseral metastazlar
- M1d: Beyin metastazı
- o (Her M kategorisi LDH normal/yüksek olarak alt gruplandırılır)

Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b – T2a	N0	M0
IIA	T2b – T3a	N0	M0
IIB	T3b – T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA–D	Herhangi T	N1–N3	M0
IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 2: AJCC 8. Baskı – Melanom TNM Sınıflaması (15)

Malign melanomda serum LDH, tümör yükü ve doku hasarını yansıtan, bağımsız kötü prognostik bir biyobelirteçtir: AJCC 8. baskıda metastatik evrelemede LDH yükselişi M evresine ek bir değiştirici olarak yer alır ve sağkalımın anlamlı biçimde kısılmasıyla ilişkilidir. (16) Güncel kılavuzlar (ESMO/NCCN) metastatik hastalarda LDH'nin tanı anında ve takipte ölçülmesini önerir; yüksek başlangıç LDH'si daha kötü yanıt

olasılığı, daha kısa PFS/OS oranı (PFS (Progression-Free Survival): “Hastalığın ilerlemesiz sağkalım süresi”- OS (Overall Survival): “Genel sağkalım süresi” ve artmış mortalite riski ile ilişkilidir. (17) Yapılan meta-analiz ve büyük çaplı seriler, yüksek LDH’nin immünoterapiler ve hedefe yönelik tedaviler altında dahi daha zayıf klinik sonuçlar verdiğini göstermiş; tedavi başlangıcından ilk değerlendirmeye kadar LDH’de artış da kötü yanıt ve daha kısa OS ile koreledir. (18)

Klinik pratikte LDH, spesifik olmayan bir belirteç olsa da (karaciğer, kas vb. komorbid durumlarda da yükselebilir), zaman içindeki eğilimi hastalık aktivitesi ve survival/prognoz hakkında ek bilgi sağlar; bu nedenle görüntüleme ve diğer belirteçlerle (S100B gibi) birlikte yorumlanmalıdır. (19)

2.1.7 TANI

1. Klinik tanı

Melanom tanısında klinik muayene en temel basamaktır. Dermatologlar ve onkologlar, pigment lezyonları değerlendirirken genellikle “ABCDE kuralı”ndan yararlanır:

- A (Asymmetry): Lezyonun iki yarısının simetrik olmaması,
- B (Border): Düzensiz, girintili-çıkıntılı kenar yapısı,
- C (Color): Birden fazla renk tonunun aynı lezyonda bulunması,
- D (Diameter): Çapın >6 mm olması,
- E (Evolving): Zamana bağlı değişiklik göstermesi.

Bu kriterler, özellikle toplum taramalarında ve klinik pratikte şüpheli nevüsleri saptamak için yüksek duyarlılığa sahiptir.

Buna ek olarak, literatürde tanımlanan “Ugly Duckling Sign” (Çirkin Ördek İşareti) kavramı da önemlidir. (20) Hastanın cildindeki diğer nevüslerden farklı görünümde olan, “sıradışı” bir lezyonun melanom olma olasılığı yüksektir. Bu yaklaşım, özellikle çok sayıda ben bulunan bireylerde duyarlılığı artırmaktadır.

2. Yapay Zekâ Destekli Tanı

Son yıllarda yapay zekâ (AI) ve derin öğrenme algoritmaları, dermoskopik görüntülerin değerlendirilmesinde yaygın şekilde araştırılmaktadır. Cochrane Skin Group’un 2021 tarihli sistematik derlemesi, AI tabanlı algoritmaların melanomu tanımda bazı çalışmalarda dermatologlardan daha yüksek doğruluk gösterebildiğini

ortaya koymuştur. Ancak derlemede, algoritmaların performansının gerçek yaşam koşullarında, farklı popülasyonlarda ve değişken fotoğraf kalitelerinde tutarlı olmayabileceği, ayrıca klinik bağlam ve hekimin deneyiminin hâlâ kritik olduğu vurgulanmıştır. Başka bir deyişle, yapay zekâ sistemleri klinisyenin muayene gücüne tek başına üstün olmaktan ziyade destekleyici bir araç niteliğindedir. (21)

2.1.8 MELANOM TEDAVİSİ

1. Kemoterapi

Melanom tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk ve tek kemoterapötik ilaç “Dakarbazin” olmuştur (1975). 1970’lerden yakın zamana kadar yaklaşık 30 yıllık bu süreçte metastatik melanom için standart tedavi olarak dakarbazin kullanılmıştır. Ancak tedavi yanıt oranları en fazla kısmi düzeyde kalmış; objektif yanıt oranı %20 civarında, medyan yanıt süresi 5–6 ay, 1 yıllık sağkalım ise %25–30 arasında bildirilmiştir. (22) Dakarbazine ek olarak malign melanom tedavisinde çeşitli sitotoksik ajanlar araştırılmış ve klinik kullanıma girmiştir. Temozolomid, oral biyoyararlanımı olan ve kan-beyin bariyerini geçebilmesi nedeniyle özellikle beyin metastazlı melanom hastalarında tercih edilen bir alkilleyici ajandır. Yanıt oranları dakarbazine benzer düzeylerde olmakla birlikte uygulama kolaylığı ve santral sinir sistemi tutulumundaki etkinliği nedeniyle klinikte öne çıkmıştır.

Platin türevleri (sisplatin, karboplatin) DNA’ya çapraz bağlar oluşturarak sitotoksik etki gösterir. Bu ajanlar, tek başlarına sınırlı etkinliğe sahip olmakla birlikte paklitaksel veya temozolomid gibi ajanlarla kombinasyonlarda değerlendirilmiş ve belirli hasta alt gruplarında, kısmi yanıtlar elde edilmiştir.

Taksoidler (paklitaksel, dosetaksel) mikrotübül stabilizasyonu yoluyla hücre bölünmesini inhibe ederler. Platin ajanlarla birlikte kullanıldıklarında özellikle metastatik hastalarda palyatif amaçlı kombinasyon rejimlerinin birer parçası olmuşlardır.

Geçmişte ayrıca vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin) ve nitrosüreler (karmustin, lomustin) de kullanılmıştır. Vinka alkaloidleri, mikrotübül polimerizasyonunu bozarak; nitrosüreler ise DNA üzerinde alkilasyon ve çapraz bağlanma yoluyla sitotoksikite oluşturur. Ancak bu ajanların yanıt oranları düşük, toksisiteyi ise belirgin olduğundan günümüzde sınırlı kullanımları vardır. (23)

Melanom tedavisi için geliştirilen hiçbir diğer kemoterapötik ajan dakarbazinden daha etkili veya daha az toksik bulunmamıştır. Bu nedenle, hastaların prognozunu iyileştirmek açısından, melanomun erken dönemde saptanması kritik öneme sahiptir.

Erken ve doğru tanı, hastalara en iyi sağkalım şansını sunsa da bazı melanom vakaları ancak ileri evrede teşhis edilebilmektedir. Bu nedenle melanom tedavisinde yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi hâlâ öncelikli bir konudur. Son 30 yılda, özellikle metastatik melanom için immünoterapi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

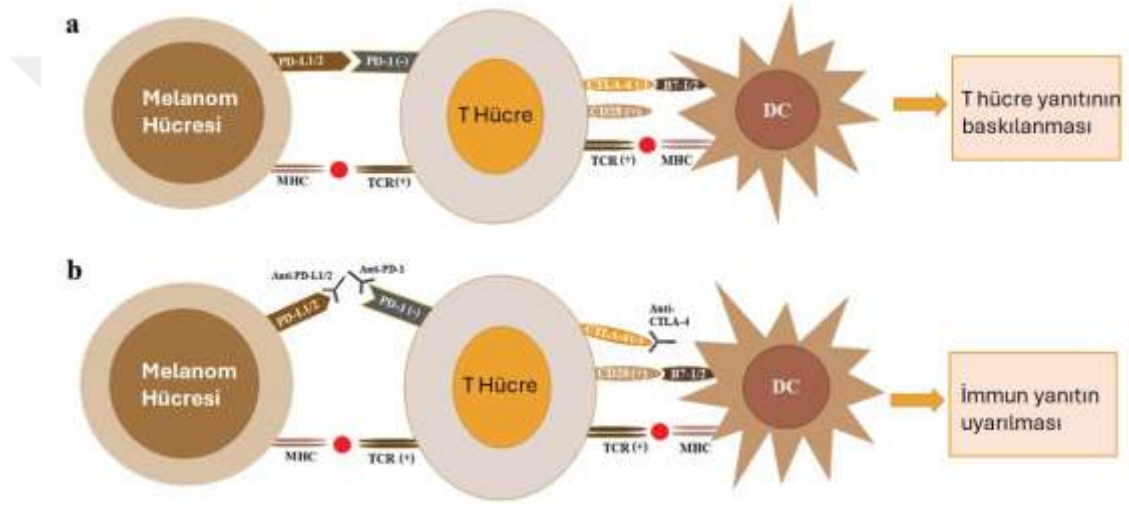
2. İmmünoterapi

İmmün sistemin temel görevlerinden biri, hücresel yapıların self ya da non-self kökenli olup olmadığını ayırt edebilmektir. Bu immünojenik gözetim mekanizması, tüm çekirdekli hücrelerin membran yüzeyinde eksprese edilen major histocompatibility complex (MHC) Sınıf I molekülleri aracılığıyla gerçekleşir. MHC Sınıf I kompleksleri, sitoplazmada sentezlenip proteazom yoluyla parçalanan endojen proteinlerden türeyen peptid antijenlerini (epitoplar) bağışıklık hücrelerine sunar. T lenfositleri bu peptitleri tanıyarak hücrenin fizyolojik, kendi hücresi mi, yoksa patojenik ajan içeren, transformasyona uğramış ya da tümöral özellik gösteren bir hücre mi olduğunu ayırt edebilir.

MHC Sınıf I aracılığıyla sunulan yabancı kökenli epitoplar, bağışıklık sistemine hücrenin patojen taşıdığını bildirerek “eliminasyon” sürecini başlatır. Normalde kendi kökenli olan tümör hücreleri ise yüksek mutasyon yükleri nedeniyle anormal epitoplar üretebilir. Bu durum, immün sistemin söz konusu hücreleri hatalı veya hastalıklı olarak tanımasına yol açar. Melanom, tüm kanserler içinde en yüksek mutasyon oranına sahip tümörlerden biri olup çok sayıda tümör antijeni üretir; bu antijenler immün sistem tarafından güçlü biçimde tanınarak, yüksek immünojenite oluşturur.

MHC Sınıf I’de sergilenen antijenler, CD8+ sitotoksik T lenfositlerde (CTL) bulunan T hücre reseptörleri (TCR) tarafından tanınır. Bu hücreler, yabancı veya hastalıklı self hücreleri ortadan kaldırabilir. Öte yandan MHC Sınıf II molekülleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelerin (APC) yüzeyinde bulunur. APC’ler çevreden aldıkları ekstrasellüler proteinleri işler ve bunları CD4+ T yardımcı (Th) hücrelerine sunar; Bu mekanizma spesifik antijenlere yönelik immün yanıtın aktive edilmesini sağlar.

Tümör dokusunda gözlenen tümör infiltran lenfositlerin (TILs) varlığı, melanom da dahil olmak üzere bazı tümörlerde prognostik öneme sahiptir. İmmün sistem ile tümör arasındaki bu etkileşim, immün düzenleme (immune editing) olarak adlandırılır ve üç aşamada tanımlanır: Eliminasyon, denge ve kaçış. (24) Melanom hücreleri yüksek mutasyon yükleri nedeniyle, hızla immün yanıtta kaçış mekanizmaları geliştirir. Bu süreçte; MHC Sınıf I ekspresyonunun azalması, tümör antijenlerinin baskılanması, immün inhibitör moleküllerinin (TGF- β , PGE2, immün baskılayıcı sitokinler) salgılanması ve immün kontrol noktalarının (ör. PD-1/PD-L1) manipülasyonu, önemli rol oynar. Özellikle PD-1/PD-L1 yolunun tümör hücreleri tarafından aşırı ekspresyonu, T-hücre aktivitesini baskılayarak immün yanıtta kaçışa neden olur. (25)



Şekil 2: İmmünoterapide hedeflenen PD1/PD-L1 (1)

Bu bilgi birikimi, son yıllarda immünmodülatör ilaçların (ör. Kontrol Noktası İnhibitörleri, Kanser Aşıları ve Adoptif Hücre Tedavileri) geliştirilmesine zemin hazırlamış ve metastatik melanom tedavisinde önemli bir dönüm noktası olmuştur.

a. Kontrol Noktası İnhibitörleri (Checkpoint Inhibitors)

Tümörler, bağışıklık sisteminden kaçabilmek için immün kontrol noktalarını manipüle eder. Özellikle CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 yolları melanom tedavisinde hedeflenmiştir.

İpilimumab: CTLA-4 inhibitörü olarak melanomda ilk onaylanan immünoterapi ajanıdır.

Nivolumab ve Pembrolizumab: PD-1 inhibitörleridir ve hem tek başına hem de kombinasyon tedavilerinde yüksek etkinlik göstermiştir.

Bu ajanların en önemli avantajı, uzun süreli tam yanıt elde edilebilmesidir. Bununla birlikte immün aracılı advers etkiler (ör. kolit, tiroidit, dermatit) yakından izlenmelidir. (26)

b. Sitokin Bazlı Tedaviler

İlk immünoterapötik yaklaşımlar yüksek doz interlökin-2 (IL-2) ve interferon- α kullanımı üzerine kurulmuştur. Bu tedaviler sınırlı bir hasta grubunda kalıcı yanıt sağlamış olsa da ciddi toksisiteleri nedeniyle günümüzde ikincil seçenekler arasında yer almaktadır.

c. Adoptif Hücre Tedavileri (ACT)

Adoptif T-hücre tedavisi, tümörden izole edilen tümör infiltre edici lenfositlerin (TILs) ex vivo çoğaltılarak yeniden hastaya verilmesi esasına dayanır. Klinik çalışmalarda bazı olgularda yüksek yanıt oranları bildirilmiştir, ancak uygulaması karmaşık ve yüksek uzmanlık gerektiren bir yöntemdir.

d. Kanser Aşıları

Melanom, yüksek mutasyon yükü ve immünojenik tümör antijenleri nedeniyle terapötik kanser aşılarının geliştirilmesinde model tümörlerden biri olmuştur. Henüz rutin kullanımda etkili bir aşı bulunmamakla birlikte, araştırmalar devam etmektedir. (25)

İmmünoterapiler, metastatik melanomun sağkalım oranlarını önceki dönemlere kıyasla anlamlı ölçüde artırmıştır. Özellikle PD-1 inhibitörleri ve CTLA-4 inhibitörlerinin kombinasyonu, ileri evre melanomda standart tedavi seçenekleri arasına girmiştir. Bununla birlikte, direnç mekanizmaları ve immün ilişkili toksisiteler günümüzde araştırmaların odak noktasıdır.

3. Hedefe Yönelik Tedaviler

Kutanöz melanomda en sık görülen moleküler değişiklik BRAF V600 mutasyonlarıdır (~%40–50). Bu nedenle BRAF inhibitörleri (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib) ve bunlarla kombine edilen MEK inhibitörleri (trametinib, cobimetinib, binimetinib) tedavide devrim yaratmıştır. Büyük faz III çalışmaları; (coBRIM, COLUMBUS, COMBI-AD) (27–29) Bu kombinasyonların yanıt oranlarını artırdığını, progresyonsuz ve genel sağkalımı uzattığını göstermiştir. Özellikle adjuvan COMBI-AD çalışması,

evre III BRAF V600 mutasyonlu hastalarda 12 aylık dabrafenib+trametinib tedavisinin, nüks riskini anlamlı olarak azalttığını ortaya koymuştur.

Daha nadir alt gruplarda, NRAS mutasyonu olan hastalarda; MEK inhibitörü binimetinib (NEMO çalışması) (30) sınırlı fayda göstermiş; KIT mutasyonu taşıyan akral veya mukozal melanomlarda ise imatinib gibi ajanlarla seçilmiş olgularda yanıtlar bildirilmiştir. Günümüzde hedefe yönelik tedaviler, özellikle BRAF V600 mutasyonlu metastatik veya adjuvan evredeki hastalarda, standart seçenekler arasındadır. Ancak kılavuzlar çoğu durumda immünoterapileri ilk basamakta tercih etmeyi önermektedir. CheckMate 067 çalışmasının 6,5 yıllık analizinde, median genel sağkalım kombinasyon kolunda 72,1 ay olarak bildirilmiş; bu süre tek başına nivolumab (36,9 ay) ve ipilimumab (19,9 ay) kollarına kıyasla belirgin olarak daha uzun bulunmuştur. Bu sonuçlar, kombine immünoterapinin sağkalım açısından üstün etkinliğini ortaya koymaktadır. (31)

4. Diğer Tedavi Seçenekleri:

Malign Melanom genel olarak radyo-rezistan bir tümör kabul edilse de radyoterapi; Seçilmiş olgularda palyatif amaçla (ör. beyin ve kemik metastazları) veya cerrahi sonrası lokal kontrolü artırmak için kullanılabilir. Brakiterapi özellikle oküler melanomlarda standart tedavi yöntemlerinden biridir. Tümör dokusuna yerleştirilen radyoaktif plaklarla yüksek doz, hedefe yönlendirilirken çevre dokular korunur. (1) Daha nadir kullanılan kriyoterapi ise; Küçük yüzeysel lezyonlarda lokal tümör kontrolü sağlayabilen bir yöntem olup, özellikle adjuvan amaçlı tercih edilmektedir. Bu yöntemler sağkalımı artırmaya da lokal kontrol ve organ korunumu açısından klinik değere sahiptir. (32)

2.2 ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLER

2.2.1 ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN TANIMI

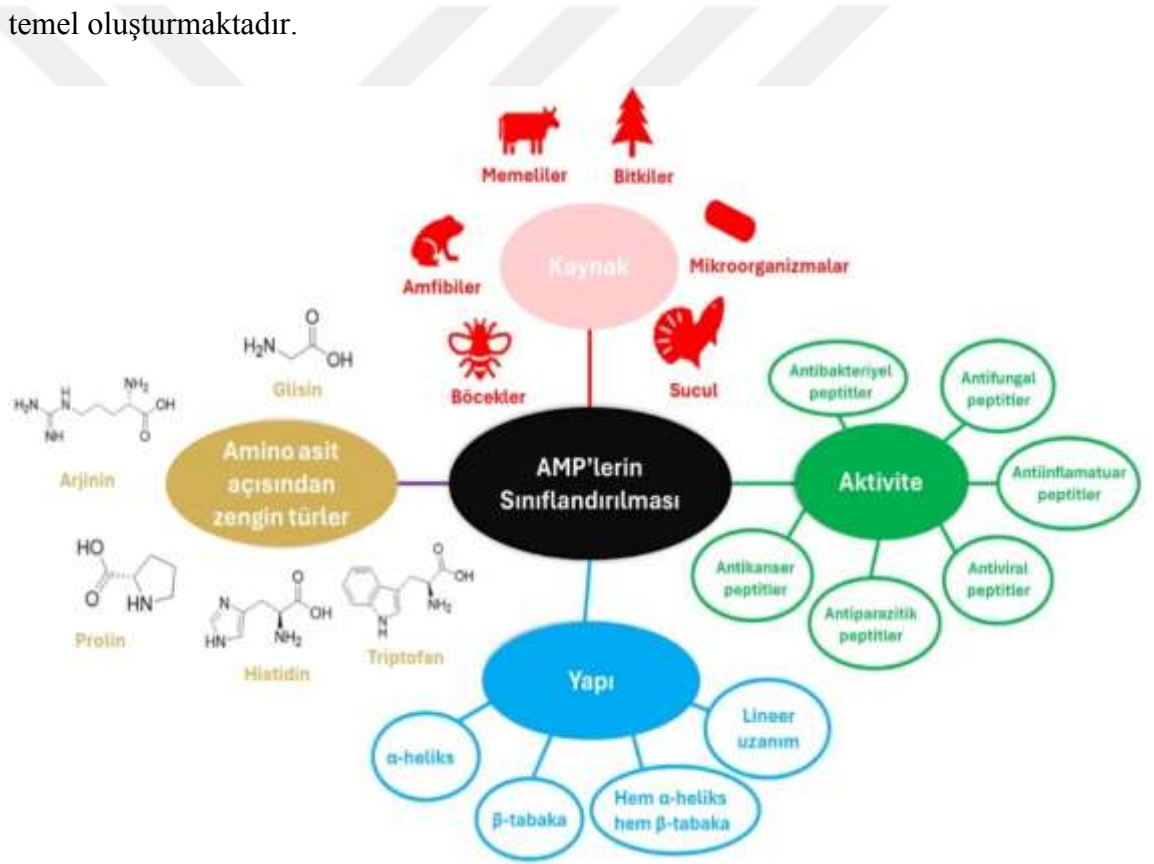
Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), evrimsel açıdan en eski savunma mekanizmalarından biridir. AMP'ler genellikle 12–50 amino asitten oluşan küçük moleküllü peptitlerdir. Günümüze kadar doğada 3100'den fazla AMP tanımlanmıştır. (33) Hayvan ve bitki aleminde yaygın olarak bulunmaları, bu moleküllerin çok hücreli organizmaların başarılı evriminde temel bir rol oynadığını göstermektedir. Antimikrobiyal peptitler, köklü bir biyolojik geçmişe sahiptirler. Bakteriler, mantarlar ve virüslere karşı evrimsel süreçte etkinliklerini korumaya devam etmişlerdir. Bu

durum, patojenlerin her türlü ajana karşı direnç geliştirebileceği yönündeki genel kanıyı sorgulamaktadır. (34)

2.2.2 DOĞADA AMP'LERİN YERİ

AMP'ler insan mukozalarından anne sütüne, kurbağa derisinden arı zehrine kadar çok farklı biyolojik ortamlarda bulunurlar. Bu da onların evrimsel olarak ne kadar köklü ve korunmuş savunma molekülleri olduğunu gösterir. (35)

AMP'lerin etkinliği; "mikroorganizmaların hücre zarındaki, çok hücreli organizmalardan ayrılan özgün yapısal özelliklerini" hedeflemelerine dayanmaktadır. Bu seçici mekanizma, onları patojenlerin en savunmasız noktalarına yöneltmekte ve günümüzde AMP temelli yeni anti-enfektif ajanların geliştirilmesi için bilimsel bir temel oluşturmaktadır.



Şekil 3: AMP'lerin sınıflandırılması (1)

Kaynak	Bulunduğu Yer / Canlı	Örnek AMP'ler	Notlar
İnsan ve memeliler	Deri, mukozalar, süt, tükürük	β -defensinler (HBD-1, HBD-2, HBD-3), LL-37, histatin, lactoferricin, psoriasin	Doğuştan bağışıklığın önemli parçası, bariyer dokuları korur.
Amfibiler (kurbağalar)	Deri	Magainin, dermaseptin, temporin	Nemli ve mikrobiyal ortamlara karşı koruyucudur.
Böcekler	Arı zehri, ipekböceği	Melittin, cecropin	AMP'ler böceklerde temel savunma molekülleridir.
Balık ve deniz canlıları	Balık epitel dokusu, kabuklular	Piscidin, crustin	Su ortamında patojenlere karşı güçlü koruma sağlarlar.
Bitkiler	Tohum, yaprak, kök	Thionin, bitki defensinleri	Fungus ve bakterilere karşı direnç geliştirirler.

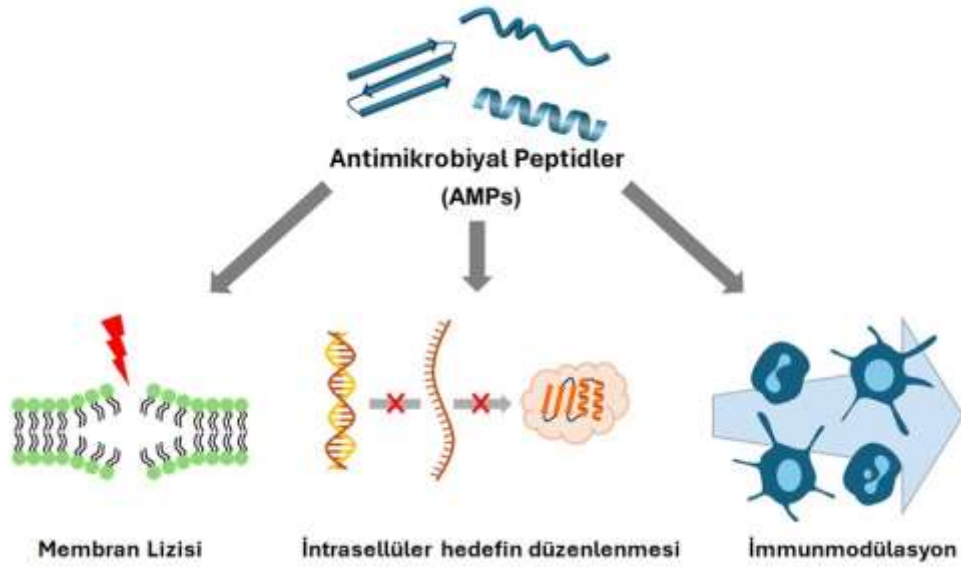
Tablo 3: Antimikrobiyal Peptitlerin canlılardaki genel yerleşimi ve koruyuculukları

2.2.3 AMP'LERİN MOLEKÜLER YAPISI

Bugüne kadar tanımlanan antimikrobiyal peptitlerin yoğun çeşitliliğinin temeli, proteinlerin sekonder yapısından kaynaklanmaktadır. AMP'leri katlanma tiplerine göre sınıflandıracak olursak;(37)

- α -helikal AMP'ler
- β -tabakalı AMP'ler
- Genişlemiş/düzensiz yapıdaki AMP'ler
- Döngüsel AMP'lerden bahsedebiliriz.

Tüm sınıfların ortak yapısal ilkesi; molekülün hidroforik ve katyonik amino asit kümelerini belirli bölgelerde toplayarak 'amfipatik' bir düzen sergileme yeteneğidir. Bu amfipatik yapı, AMP'lerin mikrobiyal hücre zarlarıyla seçici etkileşimini mümkün kılan temel tasarım özelliğini oluşturur.

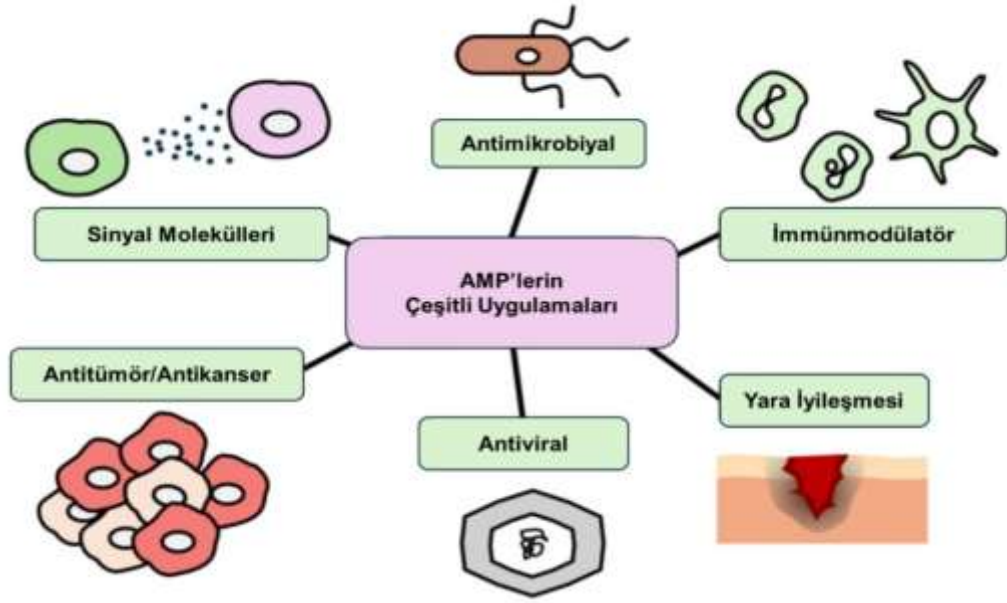


Şekil 4: AMP'lerin hücre zarı üzerinde aksiyonları (38)

2.2.4 AMP'LERİN ETKİ MEKANİZMALARI

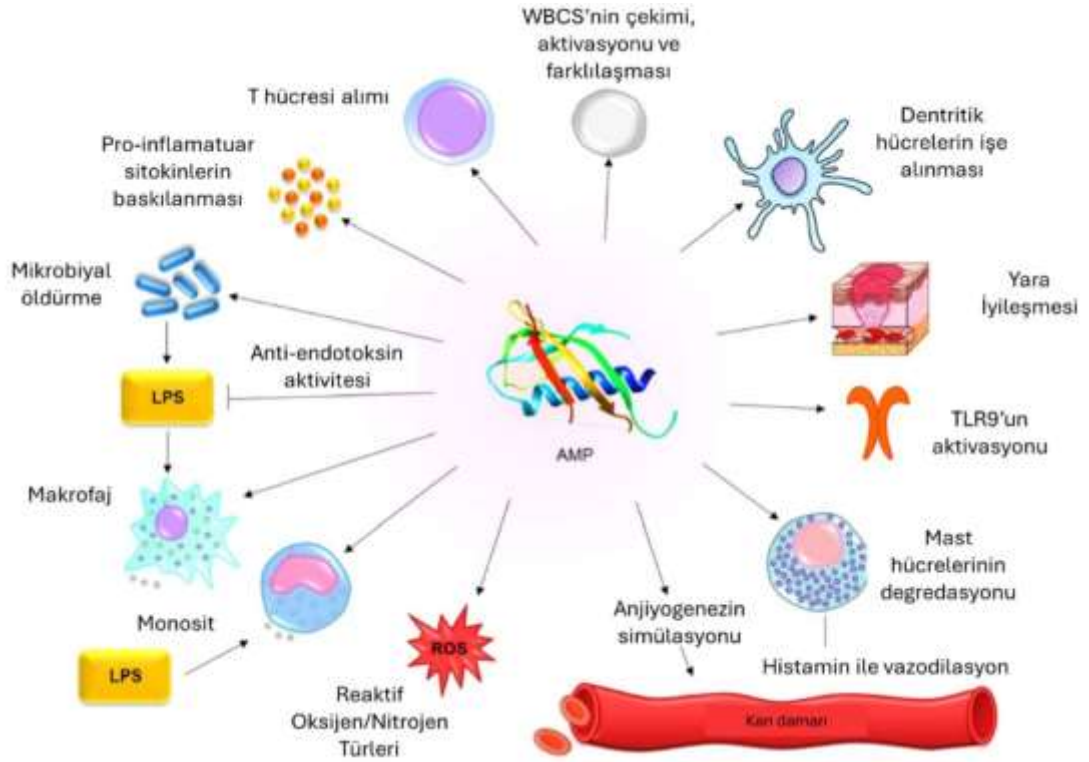
AMP'ler ilk keşfedildiklerinde doğrudan bakterileri öldürme kapasiteleri nedeniyle 'insan kaynaklı peptid antibiyotikler' olarak anılmaktaydı. (39) Ancak mekanizmalarının oldukça çeşitlilik göstermesi ve mevcut teknik sınırlılıklar nedeniyle 'antibiyotik' amaçlı tek ajan olarak kullanımları tam olarak geliştirilememiştir. (40) Günümüzde halen antibiyotik direncine karşı AMP'lerin katkısı araştırılmaktadır. Düşük toksisite ve yüksek aktiviteye sahip AMP'lerin geliştirilmesi bilimsel araştırmaların temel hedefidir. AMP'lerin antimikrobiyal etkileri temel olarak hücre duvarı ve hücre zarı hedeflemesine dayanır. Hücre duvar lipidlerine bağlanarak (41) peptidoglikan sentezini inhibe eder ve mevcut yapıyı bozarlar. Zar üzerinde ise katyonik yapıları sayesinde negatif yüklü membrana elektrostatik olarak bağlanırlar. (42) Bu etkileşim sonrası zar üzerinde por oluşturabilir veya membranı destabilize edebilirler. Ayrıca hücre içine girerek nükleik asit ve protein sentezini inhibe eder, immün yanıtı düzenler ve anti-inflamatuvar etki gösterebilirler.

AMP'lerin antimikrobiyal etkinliklerinin yanı sıra anti-inflamatuvar, antikanser ve immünmodülasyon gibi farklı biyolojik işlevleri de tanımlanmıştır.



Şekil:5 AMP'lerin çeşitli uygulamaları (38)

AMP'ler yalnızca doğrudan antimikrobiyal etki göstermez, aynı zamanda immün sistem ile çift yönlü bir iletişim kurarlar. Epitelyal hücreler, bakteriyel ürünler (ör. LPS) veya proinflamatuar sitokinler (IL-1 β , TNF- α) ile uyarıldığında AMP üretimini artırır. Bu süreçte NF- κ B temel düzenleyici rol oynar: Uyaran sonrası NF- κ B sitoplazmadan nükleusa taşınarak β -defensin genlerinin transkripsiyonunu başlatır. IL-1 β 'nin etkisi, IL-1 reseptörünün Toll Benzeri Reseptörlerle (TLR) yapısal ve fonksiyonel benzerliği sayesinde NF- κ B üzerinden gerçekleşir. (43) Böylece AMP'ler hem mikrobiyal ürünler hem de konak sitokinleri tarafından indüklenir. Ortaya çıkan peptitler sadece patojeni elimine etmekle kalmaz, aynı zamanda immün yanıtı düzenler, inflamasyonu dengeleyerek epitel bariyer bütünlüğünü korur.



Şekil 6: AMP'lerin immünmodülör etkileri (44)

Epiteliyal yüzeylerde antimikrobiyal peptitler hem epitel hücreleri tarafından sentezlenir hem de dolaşımdaki lökositler tarafından ilgili bölgeye taşınırlar. İnsanlarda kuru cilt ve dil gibi keratinize epitelden aktif peptitler izole edilebilmekte, solunum yolu gibi mukozal bölgelerde ise AMP'ler epitel üzerinde ince bir sıvı tabakaya salgılanarak doğrudan bariyer koruması sağlamaktadır. Bu tabakanın iyon dengesi, çeşitli pompa ve kanallar tarafından düzenlenir; örneğin kistik fibroziste CFTR defekti bu dengeyi bozarak AMP etkinliğini azaltarak kronik inflamasyona yol açıyor olabilir.(45)

2.2.5 ENDOJEN AMP'LER

İnsan kaynaklı AMP'ler birkaç büyük aileye ayrılır: Defensinler, Cathelicidin, Histadinler, Dermcidin S100 proteinleri (psoriasin, calprotectin) ve diğer AMP'ler (Lactoferrin fragmanları, Lysozyme, RNase A süperfamilyası üyeleri, Elafin, Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)) Bu kısımda çalışmada kullanılan AMP'ler özetlenmiştir.

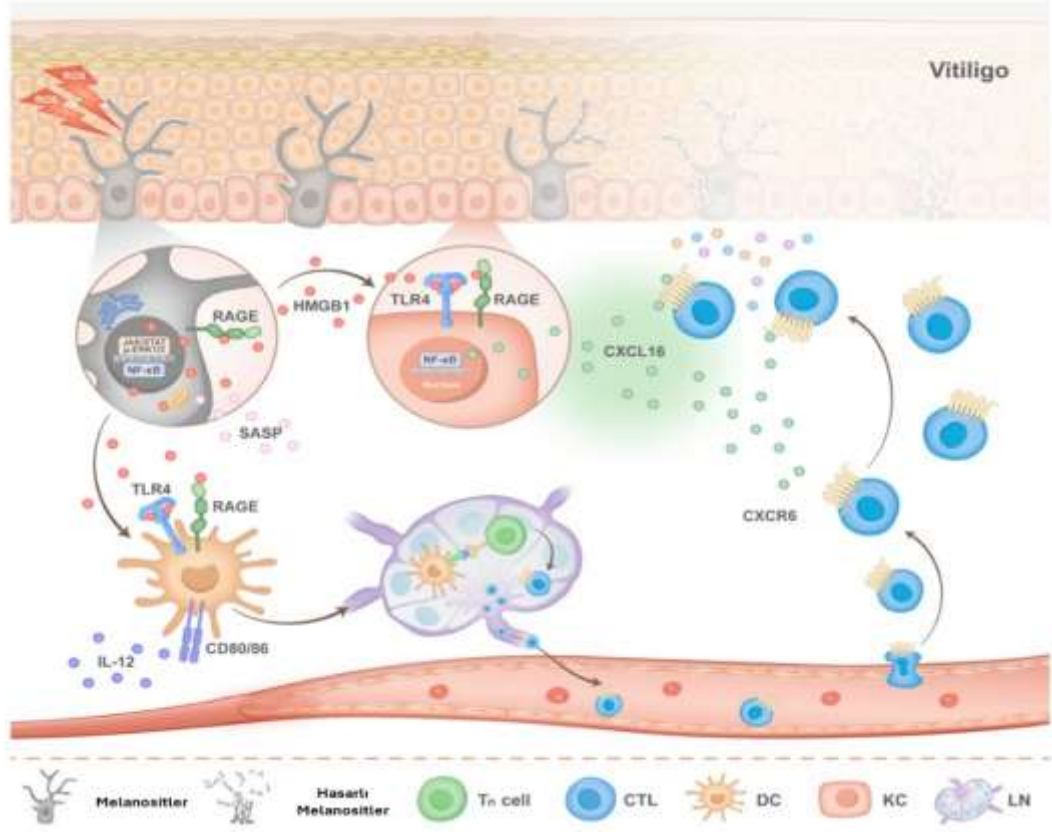
HMGB 1

High mobility group box 1 (HMGB1), HMG protein ailesinin en bol üyesi olup hemen tüm insan hücrelerinde eksprese edilir. Normalde çekirdekte DNA şaperonu olarak

görev yapar; nükleozom yapısını koruyarak DNA replikasyonu, onarımı, transkripsiyonu ve kromatin düzenlenmesini kolaylaştırır. Fonksiyonları post-translasyonel modifikasyonlar ve özellikle üç sistein rezidüsünün redoks durumu ile belirlenir: İndirgenmiş HMGB1, immün hücreleri hasar bölgesine çekerken, disülfid formu TLR4 üzerinden NF- κ B yolunu aktive ederek proinflamatuvar sitokin üretimini uyarır; Tamamen okside form ise inflamatuvar etki göstermez. Bu nedenle HMGB1'in hücre içi lokalizasyonu ve redoks durumu, fizyolojik işlevleri ile inflamatuvar yanıtlardaki rolünü belirleyen temel faktörlerdir. (46)

Apoptoz veya nekroz sırasında hücrelerden ekstrasellüler ortama salınan HMGB1, bir 'alarmin' ya da "Hücre hasarı veya stresinde salınan endogen tehlike sinyali proteinleri" DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern-) gibi davranarak immün hücrelerin doku hasarı bölgesine göçünü tetikler. Kronik inflamatuvar ortamda ise ekstrasellüler formunda, proinflamatuvar sitokin olarak da işlev görür. HMGB1'in genetik silinmesi, genom instabilitesi ve gelişim bozukluklarıyla sonuçlanır. Çekirdek dışında, sitoplazmada çevresel streslere yanıt olarak otofaji sürecini destekleyebilir; hücre membranında 'amfoterin' formuyla nöronal gelişim, kas hücre göçü ve tümör metastazında rol alır.

Çok sayıda çalışmada HMGB1'in multipl skleroz, romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalığı, sistemik lupus eritematozus ve vitiligo gibi otoimmün hastalıklarda, hastalık aktivitesini yansıtan bir biyomarker olduğu gösterilmiştir. (47)



Şekil 7: HMGB1'in vitiligo üzerinde etki mekanizması (48)

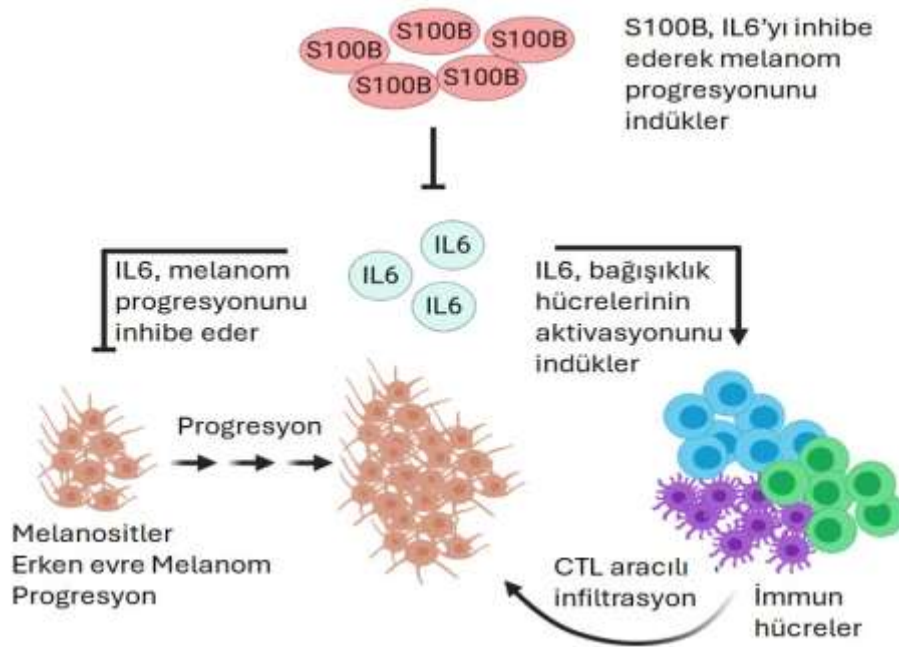
S100B de HMGB1 gibi alarminler sınıfında incelenmelidir. Alarminler, endojen kökenlidir ve konstitutif olarak eksprese edilen, kemotaktik ve immün sistemi aktive eden protein/peptitlerdir. Hücre hasarı veya ölümü sonrası salınarak hem doğal hem de adaptif bağışıklığı başlatır ve yönlendirirler. Diğer deriyi tutan otoimmün hastalıkların yanı sıra (romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve psoriatik artrit) özellikle vitiligo patogenezinde de HMGB1 ve S100B'nin rol aldığı, hatta potansiyel tedavi hedefi olabileceği bildirilmiştir. (47)

S100B

S100B, normalde astrositler ve melanositler dahil bazı hücrelerde eksprese edilen bir kalsiyum bağlayıcı proteindir; ancak malign melanomda, sıklıkla aşırı ekspresyon gösterir. (49) Klinik olarak serum S100B düzeyleri, kötü tedavi yanıtı, yüksek rekürrens riski ve düşük sağkalım oranlarıyla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Ayrıca S100B yalnızca prognostik bir biyomarker değil, aynı zamanda tümör progresyonuna katkıda bulunan aktif bir faktördür. (50) p53, Hdm2/HdmX ve RSK gibi moleküller üzerinden sinyal yollarını etkileyerek hücre davranışları değiştirir.

Melanom için MIA proteini, LDH, HMB-45 ve Melan A/Mart-1 gibi çeşitli prognostik biyobelirteçler kullanılmakla birlikte, serum düzeylerindeki artışın zayıf tedavi yanıtı, yüksek nüks riski ve düşük sağkalım oranlarıyla güçlü şekilde ilişkili olması nedeniyle S100B proteini en değerli belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir. (51)

Bazı çalışmalar yüksek S100B düzeylerinin CREB fosforilasyonunu baskılayarak IL-6 üretimini azalttığını, dolayısıyla STAT3 aktivasyonunu zayıflattığını ortaya koymuştur. Bu mekanizma, erken evre melanomda immün yanıtı tetikleyen IL-6 bağımlı savunma yollarının baskılanmasına yol açabilir ve böylece melanom hücrelerinin immün gözetimden kaçışına katkıda bulunabilir. (52)



Şekil 8: S100B proteininin IL-6 üzerinden immüneyi baskılaması (52)

hBD1-2-3

İlk insan β -defensin (hBD-1) 1995 yılında renal hastalarının plazmasından saflaştırılarak tanımlanmıştır. Bunu izleyen yıllarda genom analizleri ve biyoinformatik çalışmalar sayesinde yeni β -Defensin genleri tanımlanmış, hBD-2 ve 3 psoriatik deri lezyonlarından izole edilmiştir. (53) Yakın dönemde yapılan kapsamlı insan genomu taramaları, β -Defensinler (DEFB) için yaklaşık 40 potansiyel kodlayıcı bölge ortaya koymuştur. (54)

Mukoza yüzeylerinde keşfedilen insan β -Defensinleri (hBD1–3), doğuştan gelen bağışıklığın önemli bileşenleri olup epitel hücreleri tarafından üretilir ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterirler. Bunun yanı sıra kemokin benzeri özellikleri sayesinde adaptif immün yanıtla da etkileşime girer ve yara iyileşmesine katkıda bulunabilirler. Ancak son yıllarda hBD ekspresyonunun çeşitli neoplazmlarda (ağız, özofagus, deri, böbrek, prostat, tiroid, karaciğer, akciğer, kolon, vulva, serviks vb.) bozulduğu bildirilmiştir. Bu değişiklikler tümör tipine ve anatomik lokalizasyona göre farklılık göstermekte, bazı çalışmalarda hBD'lerin tümör hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırdığı, bazılarında ise tümör baskılayıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir. (55)

HNP

İnsanlarda α -Defensin ailesi altı üyeden oluşur (HNP1–4, HD5 ve HD6) ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtının önemli bileşenleridir. HNP1–3 nötrofil prekürsörlerinde sentezlenir ve olgun nötrofiller tarafından inflamasyon bölgelerinde salınır. Gastrointestinal sistem defensin ekspresyonunun en yoğun olduğu alanlardan biridir; β -Defensinler farklı bölgelerde eksprese edilirken, α -Defensinler esas olarak ince barsakla sınırlıdır. α -Defensinlerin genel olarak aktif inflamatuvar barsak hastalığında intestinal epitel hücrelerinden ekspresyonunun arttığı geçmiş çalışmalarda gösterilmiştir. (56) Bazı çalışmalar ise kolorektal tümör gelişiminin α -Defensinlerin regülasyonu ile ilişkili olduğunu yönündedir. (57) Kolon kanserinde gözlenen APC genindeki mutasyonun, β -Katenin sinyal yolunu aktive ederek defensin gen ekspresyonunu etkilemesi bu ilişkiyi açıkça ortaya koymaktadır. (58)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Türü

Bu çalışma, malign melanom tanısı alan hastalar ile sağlıklı gönüllülerde antimikrobiyal peptit düzeylerinin karşılaştırıldığı, kontrollü gözlemsel, analitik, kesitsel (olgu-kontrol) tipte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Zaman

Araştırmaya, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Polikliniği'ne başvuran hastalar dahil edildi.

Hastalardan alınan kanlar, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda plazma düzeyinde ayrıldı. LDH ve total protein düzeylerine bakıldı.

Plazmalar ayrıldığı aynı gün içerisinde Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvar 2'ye soğuk zincir transfer koşullarına dikkat edilerek taşındı. Materyaller -80°C derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklandı ve aynı laboratuvarında analiz edildi.

Veri toplama süreci, etik kurul izni tarihinden itibaren belirlenen süre boyunca yürütülmüş ve gerekli klinik değerlendirmeler standardize edilmiş şekilde yapılmıştır.

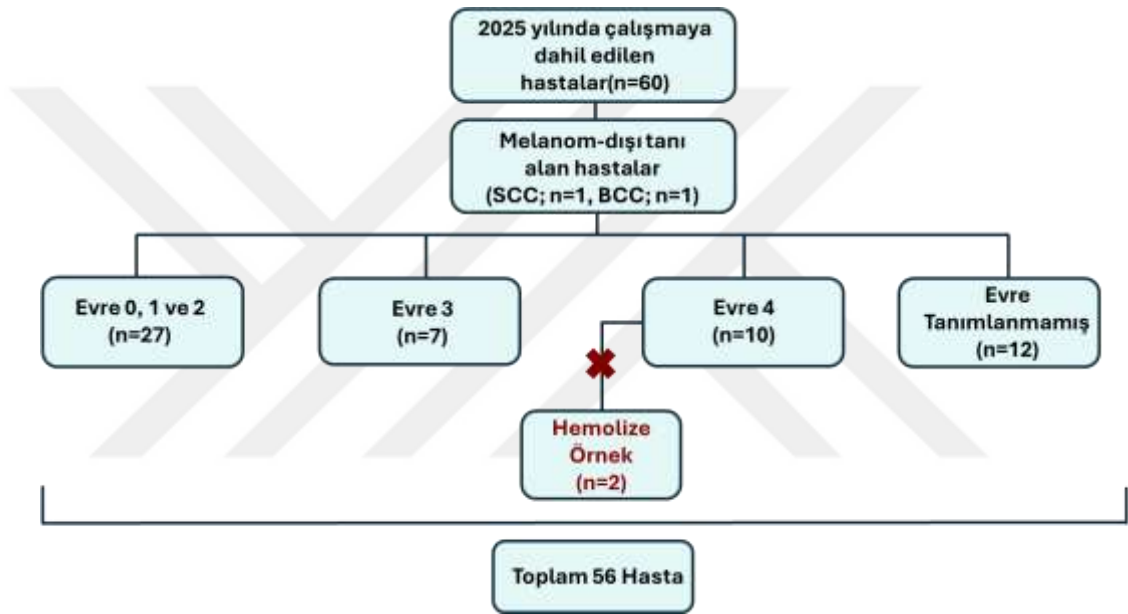
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniğine 2019- 2025 tarihleri arasında başvurmuş, takip ve/veya tedavi süreci aktif devam eden, malign melanom tanısı almış ve tanısı histopatolojik olarak kanıtlanmış hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma evreninde, 60 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü mevcuttur. 2 Hastadan alınan kan örneklerinin hemolizli olduğunun gözlenmesi, 2 hastanın da nihai tanısının “kanları alındıktan sonra” SCC ve BCC olduğu kesinleşmesi üzerine çalışmadan çıkarılmıştır. Evre I olarak dış merkez patoloji raporuyla çalışmaya dahil edilen 2 hastanın histopatolojik preparatı, merkezimizde yapılan yeniden değerlendirme sonucunda Tis (evre 0) olarak revize edilmiştir. Hasta örnekleri evre 0 olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta popülasyonu Resim 9 'da özetlenmiştir.

Çalışma evrenine dahil olan 18 yaş üzerindeki Malign Melanom (kutanöz, mukozal, oküler tip) tanısı alan hastaların evrelemesi; AJCC 8. baskısına göre TNM sistemi kullanılarak yapıldı.

Kontrol grubu; kronik hastalığı olmayan, düzenli ilaç kullanmayan ve daha önce malignite öyküsü bulunmayan sağlıklı gönüllülerden oluşturuldu.

18 yaş altındaki bireyler, son bir hafta içerisinde sistemik kemoterapi, steroid veya NSAID kullanmış, bilinen aktif enfeksiyonu, immünsüpresyon durumu (ciddi lökopeni gibi) olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.



Şekil 9: Çalışmanın hasta popülasyonu dağılımı

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma onamı alınan Malign Melanom hastalarından, rutin kontrol sırasında alınan kan tetkikleri ile eş zamanlı olarak EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarında, kanların plazması ayrıldı. Elde edilen plazma örnekleri, planlanan analizler için uygun soğuk zincirde saklama koşullarında Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvar 2'ye taşındı. Plazma örneklerinde; S100B (SunRedBio, Kat. No: 202410) ve HMGB-1 (SunRedBio, Kat.No: 202410) ile HBD1 (FineTest, Kat. No: EH0868), HBD2 (FineTest, Kat. No: EH5075), HBD3 (FineTest, Kat. No: EH0817) ve HNP1-3 (FineTest, Kat. No: EH3231) düzeyleri ticari ELISA kitleri kullanılarak, spektrofotometrik yöntemle, her bir örnek triplike olarak ölçüldü. Ayrıca LDH ve total protein düzeyleri Beckman Coulter au860'de spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: S100B, HMGB-1, HBD1, HBD2, HBD3, HNP1-3, LDH ve Total Protein düzeyleri

Bağımsız değişkenler: Malign Melanom; Evre 0-1-2, Evre 3, Evre 4 hastaları ve Sağlıklı Gönüllüler (Kontrol)

3.6. Veri Toplama Araçları

Hastaların demografik ve klinik bilgileri, hastane dosya sisteminden etik onay alındıktan sonra taranarak incelendi ve kaydedildi. Kişisel ve tıbbi verilerin işlenmesine ilişkin hastalardan aydınlatılmış onam alındı.

Onam formunu imzalayan hastalardan, rutin kontrolleri ile eş zamanlı olarak ek kan örnekleri alındı. Bu amaçla rutin taramaya ek her hastadan iki adet EDTA'lı tüpe kan alındı ve plazmaları ayrılarak alıquotlandı.

Plazma ayrımı ile LDH ve total protein düzeylerinin belirlenmesi, Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında kan alımında herhangi bir randomizasyon uygulanmamış, örnekler yalnızca rutin tetkikler sırasında tek seferde alınmış olup hastalara ek bir işlem veya uyum gerekliliği doğmamıştır.

Plazma örneklerinde S100B ve HMGB-1 düzeyleri SunRedBio ELISA Kitleri (SunRedBio, Shanghai, Çin) ile; HBD1, HBD2, HBD3 ve HNP1-3 düzeyleri ise FineTest ELISA Kitleri (FineTest, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi. Bu işlemler Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda Laboratuvar 2'de gerçekleştirildi.

ELISA Protokolü (HBD1, HBD2, HBD3 ve HNP1-3 – FineTest):

Kit içerisindeki standartlar seri dilüsyonlar halinde hazırlandı. Standartlar ve hasta plazmaları, antikor kaplı 96'lı plakalara, triplike (her bir örnekten 3 er kuyucu) olacak şekilde 100er µl eklendi. 90 dk 37°C'de inkübe edildi. Biotin işaretli antikor (Biyotin Ab) çalışma çözeltisi 1:100 oranında hazırlandı. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 350 µl olacak şekilde 2 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından her kuyucuğa 100 µl Biotin işaretli antikor çalışma çözeltisi eklendi. 60 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sırasında HRP-Streptavidin Konjugatı 1:100 oranında hazırlandı. İnkübasyonun ardından 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama sonrası her kuyucuğa HRP-Streptavidin Konjugatı 100 µl eklendi. 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Ardından 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası, her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı eklendi. 10-20 dk 37°C'de inkübe edildi. Standartlar arasında gradiyentin görüldüğü dakikada 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alındı. Standartlar için eğim grafiği oluşturuldu.

ELISA Protokolü (S100B ve HMGB-1 – SunRedBio):

Kit içeriğindeki standartlar seri dilüsyonlar halinde hazırlandı. Standartlar ve plazma örnekleri antikor kaplı olan 96 kuyucuklu plakalara triplike (her bir örnekten 3 er kuyucuk) olarak eklendi. Ardından her kuyucuğa 50 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. 60 dk 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 350 µl olacak şekilde 2 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi sonrası her bir kuyucuğa 50 µl Kromojen A ve 50 µl Kromojen B eklendi. 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklendi. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alındı. Standartlar için eğim grafiği oluşturuldu.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizler SigmaStat 4.0 (Systat Software Inc., USA) SPSS ver 29.0.0 ve Graphpad Prism ortamında gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi, varyans homojenliği ise Brown-Forsythe testi ile değerlendirildi. Normal dağılım ve homojen varyans varsayımları sağlanan verilerde gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile belirlendi. Anlamlı farklılık bulunan değişkenlerde çoklu karşılaştırmalar Holm-Sidak post-hoc testi ile yapıldı. P <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık gösteren parametreler için tanısal ayırt ediciliğin değerlendirilmesi amacıyla ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi analizi yapıldı. ROC analizi ile eğri altında kalan alan (AUC), optimal kesim noktası (cut-off), duyarlılık (sensitivity) ve özgüllük (specificity) değerleri hesaplandı.

3.8. Araştırma Takvimi

15 Mart 2024- 20 Nisan 2024: Tez konusu belirlemek için araştırmalar yapıldı.

25 Nisan 2024– 25 Mayıs 2024: Belirlenen tez konusu hakkında literatür taraması yapıldı.

25 Mayıs 2024- 10 Haziran 2025: Araştırma evreni ve örnekleminin tanımlanması,

18 Temmuz 2024 tarihinde etik kurul onayı alındı.

19 Temmuz 2024 – 20 Mart 2025: hastalarla iletişime geçildi

8 Ağustos 2024 -10 Mayıs 2025: Çalışma için örnekler toplandı.

- Laboratuvar analizlerinin yapılması,
- İstatistiksel değerlendirmelerin tamamlanması

- Tez yazımı aşamalarını içerecek şekilde planlandı.

2024-2025 tarihleri arasında Tıbbi Onkoloji polikliniğine başvuran hastalardan rutin kontrolleri sırasında onam alınarak plazma örnekleri alındı. Araştırma örnekleme tamamlandıktan ve Kitlerin temini sağlandıktan sonra bir hafta içinde ölçümler tamamlandı. Ardından istatistiksel analizler gerçekleştirilerek tez yazım aşamasına geçildi.

3.9. Etik İzinler

Çalışma, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Başvuru Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 18.07.2024 tarihli 0061 sayılı karar ile etik onay almıştır.



3. BULGULAR

Çalışmaya 60 hasta ile başlandı. 2 hastanın kesin patolojik tanısının melanom olmaması üzerine hastalar çalışmadan dışlandı. 58 hastanın 30 tanesi erkek (%51,7), 28'i kadın (%48,3) olarak saptandı. Yaş ortalaması 57, median değer 58 minimum yaş 32- maksimum 82 saptandı. Hastaların evrelere göre dağılımı;

Evre dağılımları (n=58):

0: 2 hasta (%3.4)

1A: 6 hasta (%10.3)

1B: 10 hasta (%17.2)

2A: 4 hasta (%6.9)

2B: 4 hasta (%6.9)

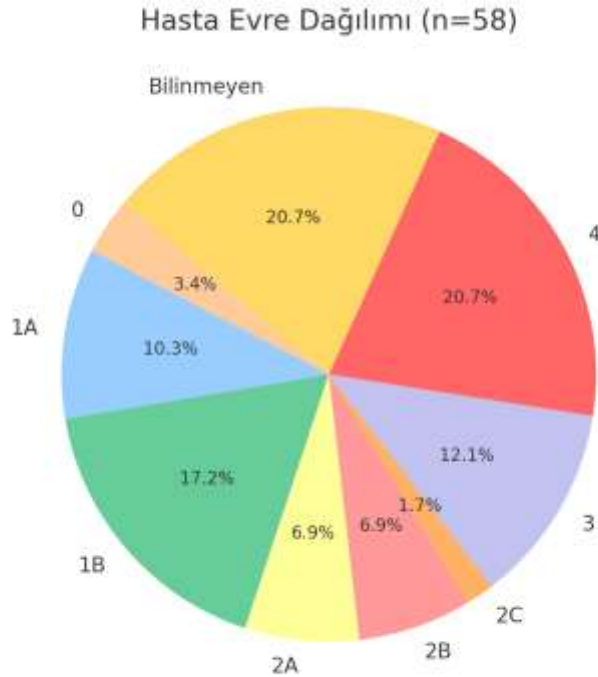
2C: 1 hasta (%1.7)

3: 7 hasta (%12.1)

4: 12 hasta (%20.7)

Bilinmeyen: 12 hasta (%20.7)

Aşağıdaki pasta grafikte 58 hastanın evrelere göre dağılımı verilmiştir. Bilinmeyen Grup; Breslow, lenf nodu tutulumu gibi bilgi eksikliklerinden ötürü klinik evresi hesaplanamamış hastaları göstermektedir.



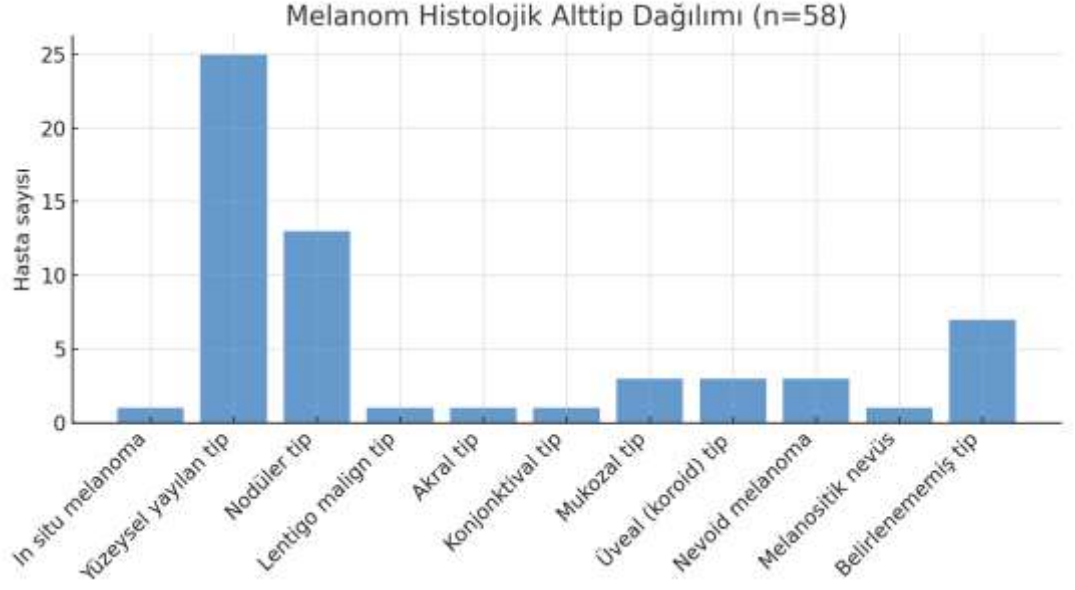
Tablo 4: Hastaların evrelere göre dağılımı

Tüm örnekler (n:58) arasında ek maligniteye sahip 14 hasta gözlendi.7 hastada Bazal Hücreli Karsinom, 1 hastada Skuamöz Hücreli Karsinom, 1 hastada Bazoskuamöz Ca,1 hastada Sebaseöz Ca, 1 hastada Adeno Ca, 1 hastada Papiller Üretelyal Karsinom, 1 hastada Papiller Tiroid Ca, 1 hastada Kolon Tübüler Adenom varlığı görüldü.

Hastalardan sadece 1'i ailede melanom öyküsü tanımlarken, otoimmün süreçler sorgulandığında; 2 hastada otoimmün tiroidit, 1 hastada multinodüler guatr, 2 hastada psöriazis, 1 hastada sarkoidoz, 1 hastada SAPHO Sendromu (Synovitis, Acne, Pustulosis, Hyperostosis, and Osteitis)

Hastaların histolojik tiplere göre dağılımı ise;(Tablo 5)

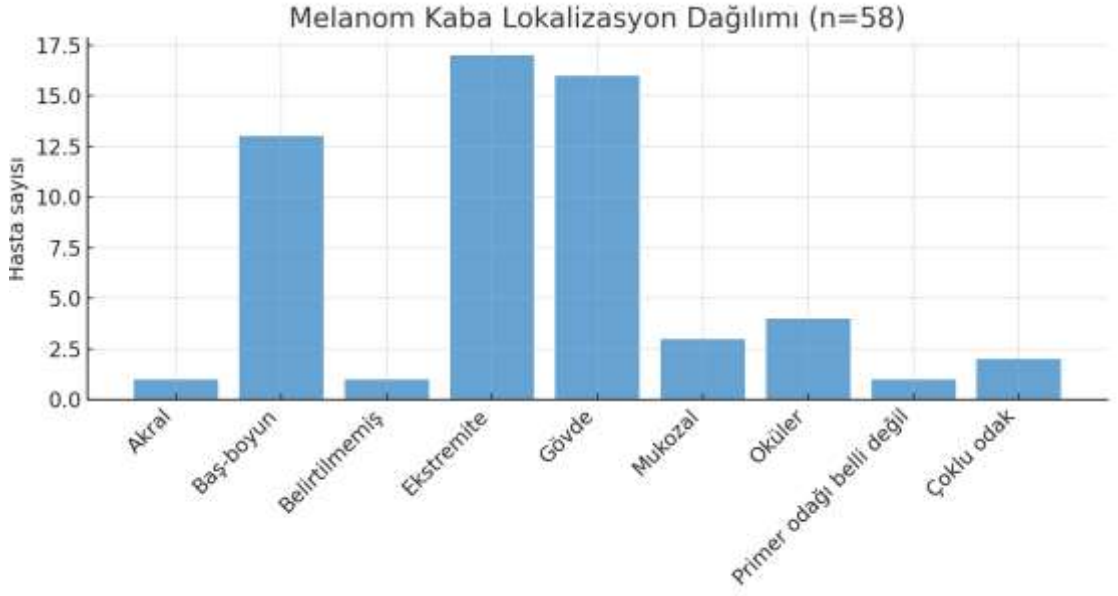
- Yüzeysel yayılan tip: 25 hasta (%43.1)
- Nodüler tip: 13 hasta (%22.4)
- Belirlenememiş tip: 7 hasta (%12.1)
- Mukozal tip: 3 hasta (%5.2)
- Nevoid melanoma: 3 hasta (%5.2)
- Üveal (koroid) tip: 3 hasta (%5.2)
- Akral tip: 1 hasta (%1.7)
- Konjonktival tip: 1 hasta (%1.7)
- Lentigo malign tip: 1 hasta (%1.7)
- In situ melanoma: 1 hasta (%1.7)
- Melanositik nevüs: 1 hasta (%1.7)



Tablo 5: Çalışmaya dahil edilen 58 hastanın histolojik alt tip dağılımı

Hastaların primer tümör odaklarının vücutta kaba anatomik lokalizasyonlara göre dağılımı; (Tablo 6)

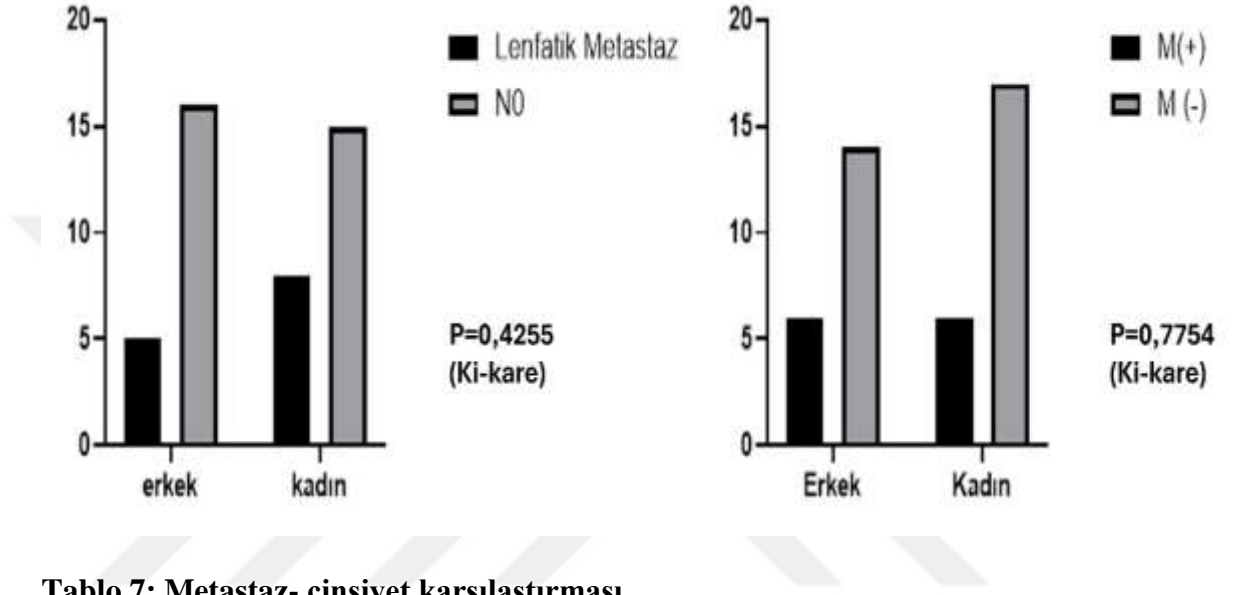
- Akral: 1 hasta (%1.7)
- Baş-boyun: 13 hasta (%22.4)
- Belirtilmemiş: 1 hasta (%1.7)
- Ekstremiteler: 17 hasta (%29.3)
- Gövde: 16 hasta (%27.6)
- Mukozal: 3 hasta (%5.2)
- Oküler: 4 hasta (%6.9)
- Primer odağı belli değil: 1 hasta (%1.7)
- Çoklu odak: 2 hasta (%3.4)



Tablo 6: Çalışmaya dahil edilen 58 hastanın kaba anatomik lokalizasyonlara göre dağılımı

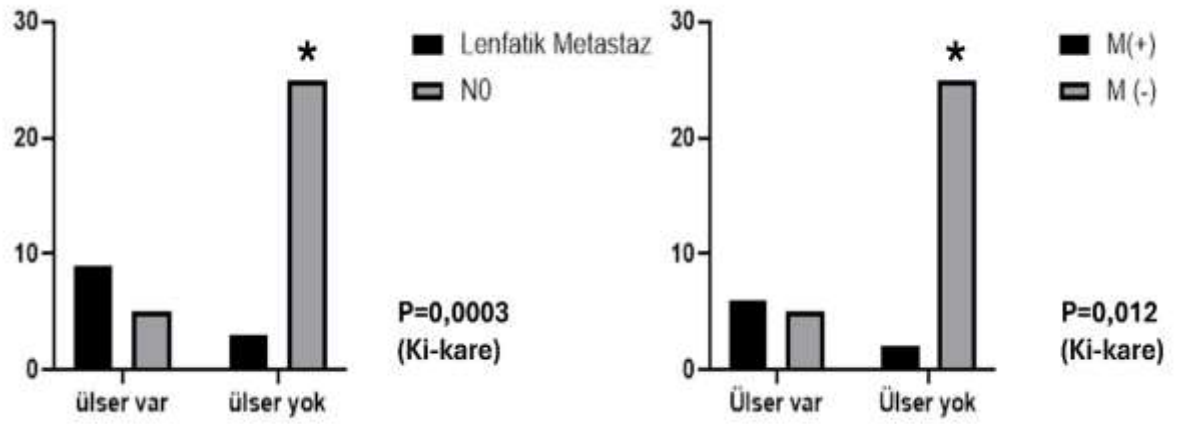
Hastaların genetik mutasyonları değerlendirildiğinde; 8 hastada BRAF gen mutasyonu saptanırken, 13 hastanın wild tipte olduğu gözlemlendi, 2 hastanın mutasyonu genetik materyal yetersizliği sonucu değerlendirilemediği ve 35 hastada sisteme mutasyon bilgisinin eklenmediği veya çalışılmadığı gözlemlendi. 1 hastada NRAS, 1 hastada KRAS 1 hastada ise c-KIT mutasyonu saptandı.

Kadın ve erkek cinsiyet, lenf nodu ve uzak metastaz varlığı ile karşılaştırıldığında; cinsiyet farklılığı ve LN ve/veya uzak metastaz ilişkisinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.(Tablo 7) (Lenfatik met. analizi için Ki-Kare: 0.635 p: 0.4255 df:1) (Sistemik met. için Ki-Kare: 0.081 p:0.775 df:1)



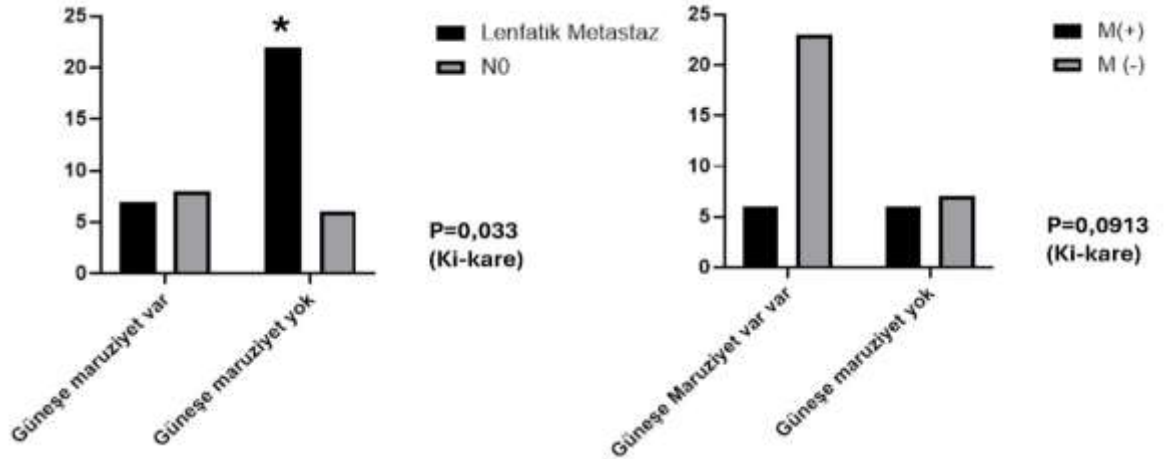
Tablo 7: Metastaz- cinsiyet karşılaştırması

Ülser varlığı ile lenf nodu ve uzak metastaz varlığı; arasında istatistiksel anlamlı sonuç saptandı. (Tablo 8) Tümör dokusundaki ülser varlığının istatistiksel olarak LN ve/veya uzak metastazı artırdığı gözlemlendi. (Lenfatik met. için Ki-Kare:13.13 p:0.0003 df:1 uzak met, için Ki-Kare:10.45 p:0.0012 df:1)



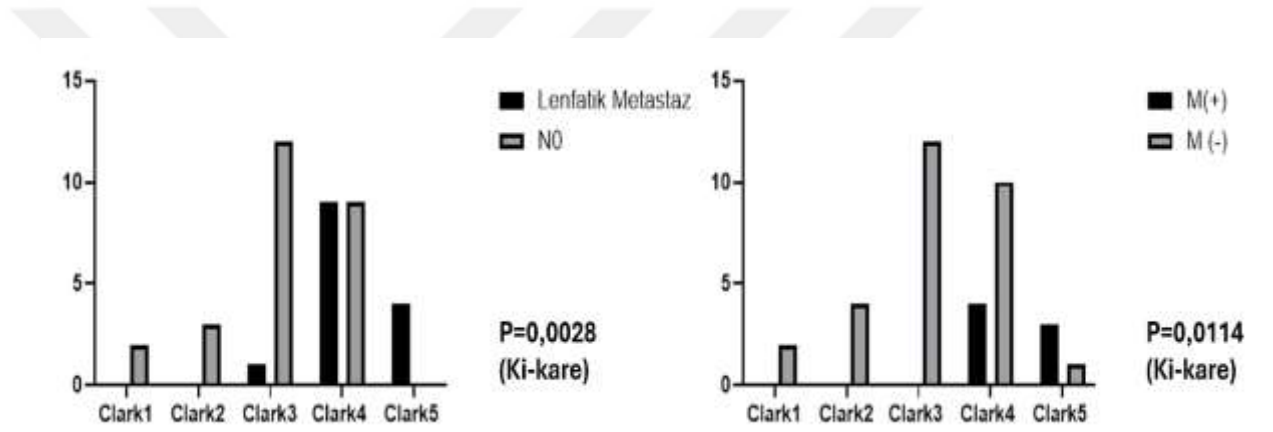
Tablo 8: Ülser varlığı ve LN/uzak metastaz ilişkisi

Güneşe maruziyet öyküsü ile lenfatik ve/veya uzak metastaz ilişkisi karşılaştırıldığında, güneşe maruz kalmayan hastalardaki lenfnodu metastaz oranıyla, UV maruziyeti olanlar kıyaslandığında istatistiksel anlamlı fark saptandı. (Tablo 9) Güneş maruziyeti olmayan hastalarda lenfnodu metastaz oranı istatistiksel olarak daha fazla gözlendi. (LN Ki-Kare 4.528 p: 0.0333 df:1 uzak met. Ki-Kare 2.852 p:0.913 df:1)



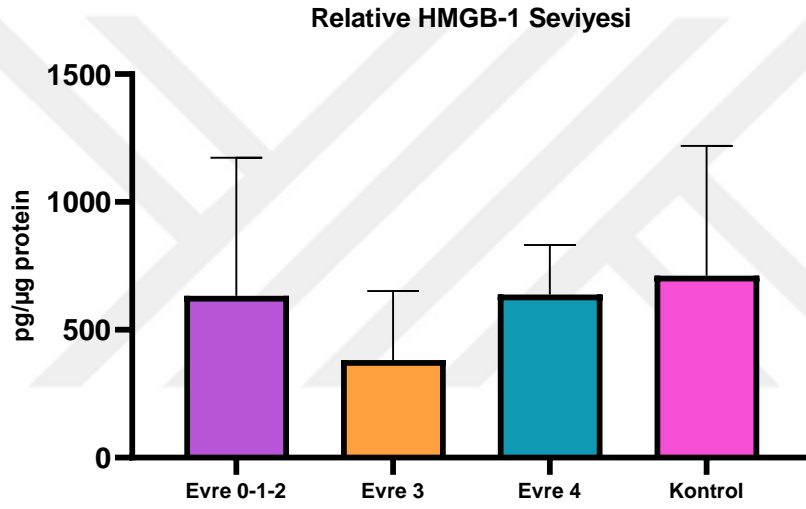
Tablo 9: Güneş maruziyeti metastaz ilişkisi

Clark evreleri, lenf nodu ve uzak metastaz varlığıyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptandı(Tablo 10) Clark evresi arttıkça lenfatik ve uzak metastaz oranının arttığı istatistiksel olarak gözlemlendi.LN Ki-Kare:16.16 p:0,0028 df:4 uzak met: Ki-Kare:12,97 p:0,0114 df:4)



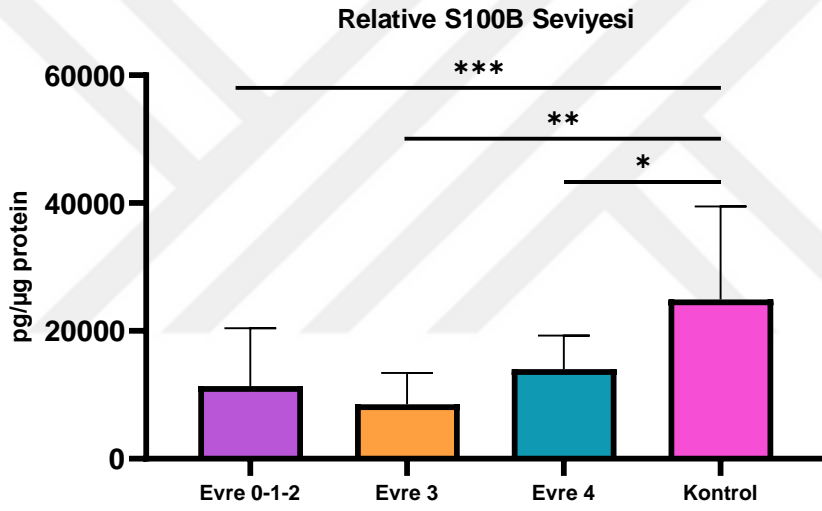
Tablo 10: Clark Evreleri ve metastaz ilişkisi

Gruplara göre plazma relative HMGB-1 seviyeleri (pg/ μ g protein) One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk), ardından Equal Variance Test (Brown-Forsythe) ile kıyaslandı. Gruplar arası anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.



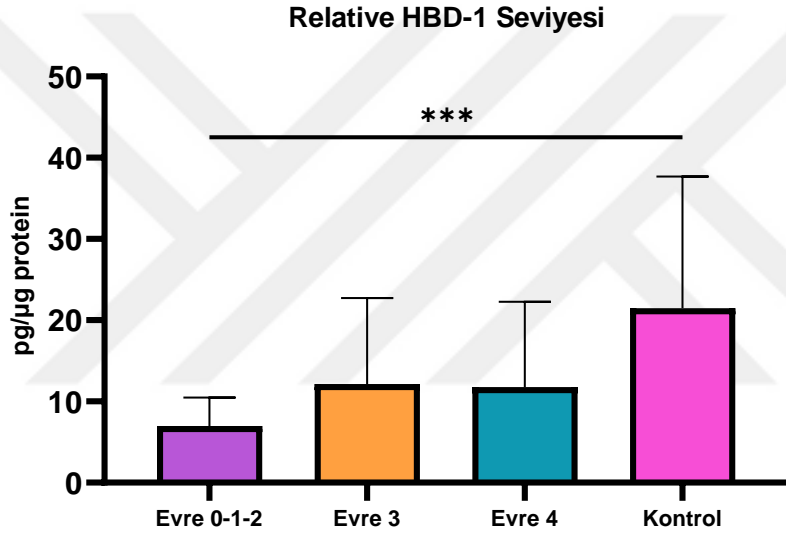
Tablo 12: Evrelere göre plazma relative HMGB-1 seviyeleri

Evrelere göre plazma relative S100B seviyeleri (pg/ μ g protein): One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk) uygulanmasının ardından Holm- Sidak yöntemi ile gruplar kendi aralarında kıyaslandı. Kontrol grubu ve Evre 0-1-2 arasında p:0,001/ Kontrol ve Evre3 arasında p: 0,004 / Kontrol ve Evre 4 arasında p: 0,044, istatistiksel olarak anlamlılık saptandı.



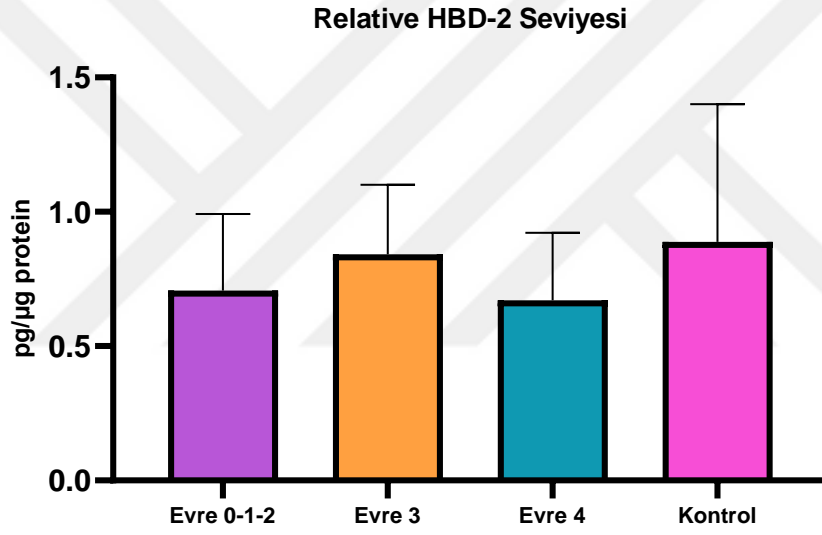
Tablo 13: Evrelere göre plazma relative S100B seviyeleri

Evrelere göre plazma relative HBD-1 seviyeleri (pg/ μ g protein): One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk) uygulanmasının ardından Holm-Sidak yöntemi ile gruplar kendi aralarında kıyaslandı. Kontrol grubu ve Evre 0-1-2 arasında $p < 0,001$ istatistiksel anlamlı fark saptandı. (Tablo 14)



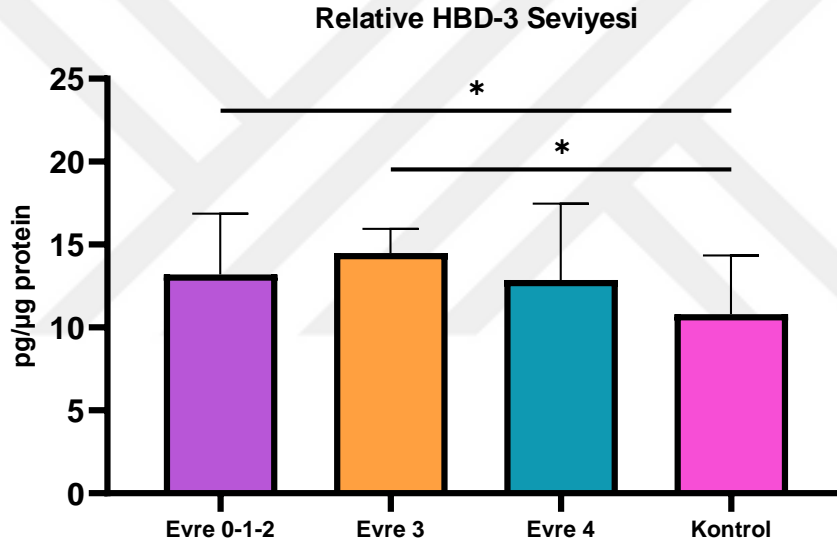
Tablo 14: Evrelere göre plazma relative HBD-1 seviyeleri

Evrelere göre plazma relative HBD-2 seviyeleri (pg/ μ g protein): One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk) uygulanmasının ardından Equal Variance Test (Brown-Forsythe) uygulandı. Gruplar arası anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı. (Tablo 15)



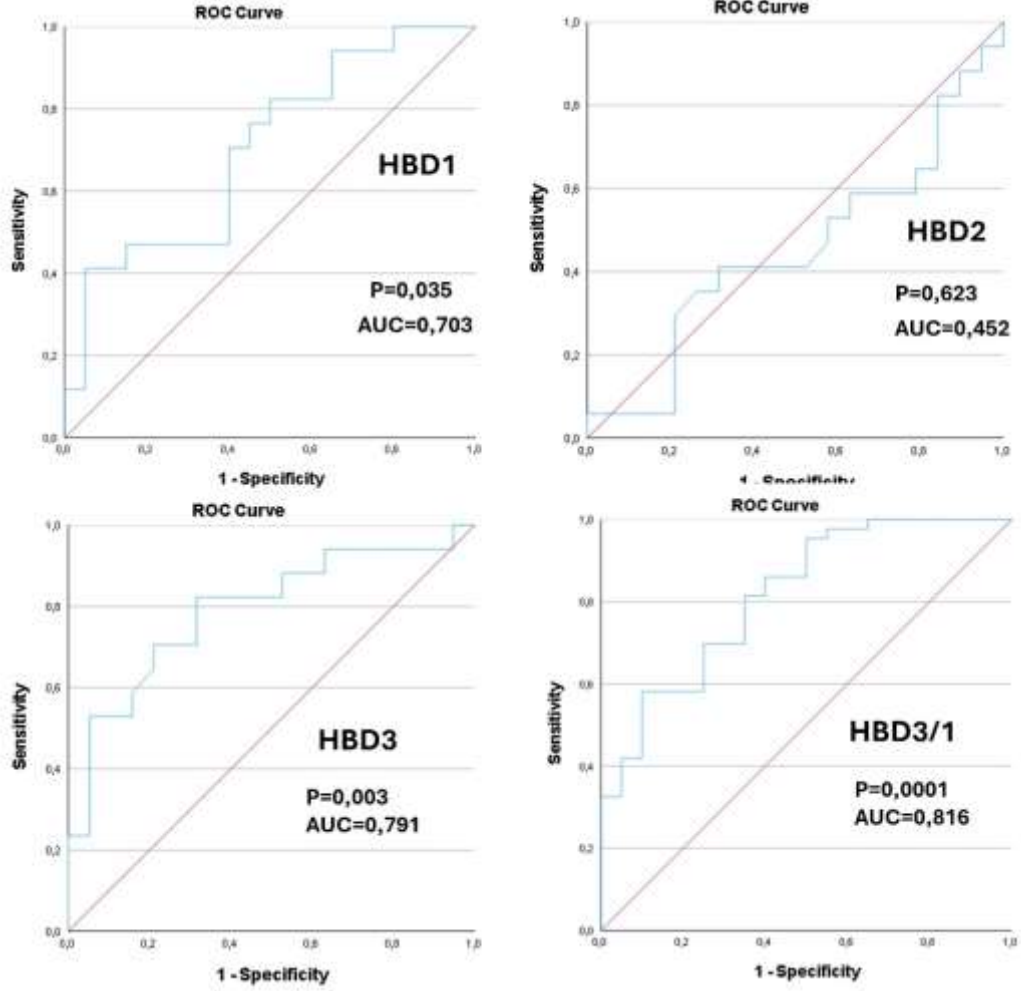
Tablo 15: Evrelere göre plazma relative HBD-2 seviyeleri

Evrelere göre plazma relative HBD-3 seviyeleri (pg/ μ g protein): One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk) uygulanmasının ardından Equal Variance Test (Brown-Forsythe) uygulandı. Evre 0-1-2 ve Kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı değer saptandı. p: 0,022. Evre3 ve Kontrol grubu arasında da istatistiksel anlamlı değer görüldü. p: 0,024 (Tablo 16)



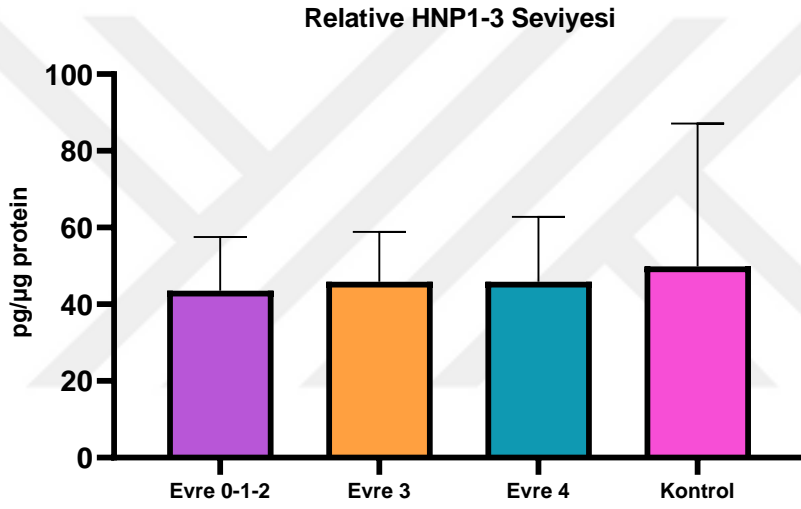
Tablo 16: Evrelere göre plazma relative HBD-3 seviyeleri

Tüm HBD'lerin sensitivite-spesifitesinin kıyaslaması amaçlı ROC eğrisi grafiği Tablo 17'de gösterilmiştir. İstatistiksel sonuçlara göre HBD1 (AUC 0.7), HBD3 (AUC 0,79) ve HBD3/1'e oranı (0,81) bulunması, testin yüksek ayırt edici güce sahip olduğunu göstermektedir.(Tablo 17)



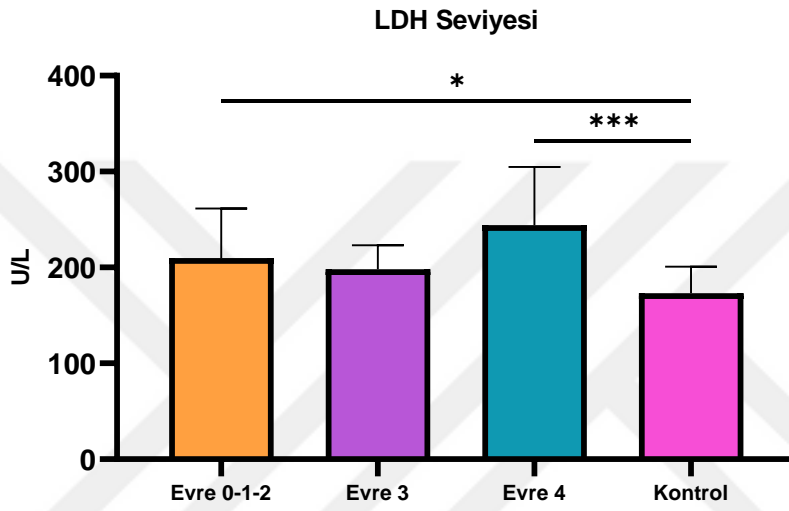
Tablo 17: Tüm HBD'lerin sensitivite-spesifitesinin kıyaslaması ROC Analizi

Evrelere göre plazma relative HNP1-3 seviyeleri (pg/ μ g protein): One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk) uygulanmasının ardından Equal Variance Test (Brown-Forsythe) uygulandı. Gruplar arası anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı. (Tablo 18)



Tablo 18: Evrelere göre plazma relative HNP1-3 seviyeleri

Evrelere göre LDH seviyelerinin kıyaslanmasına One Way Analysis of Variance-Normality Test (Shapiro-Wilk) uygulanmasının ardından Equal Variance Test (Brown-Forsythe) uygulandı. Kontrol grubu ve evre 4 ($p < 0,001$) - kontrol grubu ile erken evre arasında ($p: 0,037$) sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Tablo 19)



Tablo 19: Evrelere göre plazma LDH düzeyleri

Çalışılan tüm AMP'ler ve LDH düzeylerini ROC eğri altı alanları aşağıdaki tabloda kıyaslanmıştır. LDH, S100B , HBD1 ve HBD3'ün ayırıcı değerlerinin yüksek olduğu görüldü.

Test	AUC	p	Cut-off	95% CI
HNP1-3	0,544	0,648	40,275	0.354–0.734
HBD1	0,703	0,035	6,297	0.534–0.872
HBD2	0,452	0,623	0,895	0.258–0.646
HBD3	0,791	0,003	13,89	0.638–0.944
HMGB1	0,579	0,464	165,3	0.348–0.810
S100	0,763	0,017	7172	0.560–0.969
LDH	0,832	0,001	214	0.702–0.963

Tablo 20: Çalışılan AMP'lerin ROC analiz sonuçları

5. TARTIŞMA

Malign melanom, farklı histolojik türlerle birlikte ve çok yaygın lokalizasyon özelliği nedeniyle tanısız güçlükleri olan bir malignitedir. Örneğin bazı olgular primer odak bulunmasa bile metastatik aşamada saptanabilmektedir. Nitekim çalışmamızdaki 2 olguda tümör lokalizasyonu belirli olmamakla birlikte metastatik evrede tanı konmuştur. Üstelik bu evrelerde tüm gelişmelere rağmen kür olasılığı oldukça düşüktür. Bu durum gerek tanısız gerek tedavini monütörizasyonu bakımından yeni tanısız testlere ihtiyacı göstermektedir. Bu sebepten çalışmamızda, malign melanom hastalarında seçilmiş antimikrobiyal peptitlerin (S100B, HMGB-1, HBD1, HBD2, HBD3, HNP1-3) ve LDH düzeylerinin plazmada incelenmesiyle, bu moleküllerin tanısız ve prognostik belirteç olarak potansiyel rollerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde AMP'lerin melanom ile ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda veri bulunmakta olup, çalışmamız bu kapsamda özgün sonuçlar sunmaktadır.

Bu çalışmada yer alan olgularda birkaç klinik parametreyi bu biyobelirteçlerin dışında da analiz etmeyi uygun gördük. Örneğin ülser varlığı bir metastaz belirteci olarak gerek lenfatik ve gerek se sistemik metastaz açısından geçerliliğini korumaktadır (Tablo 8). İlginç şekilde çalışmamızda güneşe maruziyet sistemik metastaz açısından bir prediktif değeri olmamakla birlikte lenfatik metastaz açısından anlamlı sonuç elde edildi. Bir başka değişle kapalı bölgelerde veya sıklıkla sırt - göğüs bölgesi yerleşimli melanom olgularının lenfatik metastaz eğiliminin, lenfatik drenaj paterni ve sentinel nod dağılımındaki farklılıklar ile ilişkili yüksek olduğu söylenebilir. (59,60) Ancak çalışmamızda hasta sayısının düşüklüğü nedeniyle çok değişkenli ve tek değişkenli lojistik regresyon analizi yapılamadığı için yeterince sağlıklı ölçüt kabul edilemeyebilir. Beklenildiği üzere Clark ve Breslow ölçütlerinin metastazı ön görmedeki rolü bizim çalışmamızda da ortaya çıkmıştır. Bu skorlamalar arttıkça lenfatik ve sistemik metastaz eğilimi artış göstermektedir.

Elde edilen bulgulara göre, S100B düzeylerinin tüm hasta evrelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuç literatürde sıklıkla bildirilen “melanom hastalarında yüksek S100B” bulgularıyla uyumlu değildir. Çalışmamızdaki farklılık, hasta evrenimizin sınırlı sayısı, ve örnekleme zamanlarının (örneğin cerrahi sonrası dönemde alınmış plazma örnekleri) etkisiyle açıklanabilir. S100B değerindeki düşüklük ayrıca hastalardaki

tümör yüküyle ya da lokalizasyonla da ilişkili olabilir. Çünkü S100B ekspresyonu dokudan dokuya değişkenlik gösterebilmektedir. (61) Aynı zamanda bazı çalışmalarda immünoterapi sonrası tümör yükü azaldığında S100B oranları da belirgin düşüş olduğu saptanmıştır. (62) Ayrıca düşük klinik evredeki hastaların literatürde bazı çalışmalarda, S100B serum düzeyleri çoğu zaman normal limiti aşmadığı gösterilmiştir. (63)

Bizim çalışmamızdaki en çarpıcı sonuçlar HBD ailesinde elde edilmiştir. HBD1 düzeyleri tümör evresine göre azalma gösterirken HBD 3 düzeyleri tümör evresine göre anlamlı artış göstermiştir. Bu durumda bir hastadan elde edilen HBD-3 verisinin HBD-1'e oranı çok daha güvenilir tanısal ve prognostik önemi yüksek bir parametre olarak karşımıza çıkmıştır. Bu oran tümör olgularını sağlıklı gönüllülerden ayırt etmek için güvenilir bir parametre olarak kullanılabilir. HBD ailesi, tümör baskılayıcı özellikleri yanında inflamatuvar yanıtı tetikleyici etkiler de gösterebilen çift yönlü fonksiyonlara sahiptir. Bizim serimizde de HBD1/HBD3 oranlarındaki değişimlerin istatistiksel anlamlılık göstermesi, melanomda bu dual etkinin klinik olarak da karşılık bulabileceğini düşündürmektedir. (64) Özellikle HBD1 düzeylerinin evre 0–1 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olması, erken evrede tümör baskılayıcı etkinin kaybolmaya başladığını ve bunun melanom gelişiminde rol oynayabileceğini desteklemektedir.

LDH düzeyleri ise erken evre ve metastatik evre gruplarında literatürle uyumlu olarak tanısal ve prognostik belirteç değerini korumuştur. Düşük evrelerde prognozu öngörmede, ileri evrede ise tanısal doğrulamayı desteklemede kullanılacak bir parametre olarak öne çıkmaktadır. Ancak HBD3/1 oranı da gerek tanı gerekse tedavinin takibi açısından LDH kadar duyarlı görülmektedir. Bu oran LDH'tan elde edilen istatistiklerle benzer niteliktedir. Bulgular hipotezlerimizle uyumlu olarak (özellikle HBD3/1 oranı) plazma düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda ayrıca AMP'lerin sağlıklı bireyler ile melanom hastaları arasındaki ekspresyon farklılıkları yanında tümör kalınlığı, mitotik aktivite, metastaz varlığı ve sağkalım gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkileri de değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler AMP'lerin melanomda hem tanısal hem de prognostik açıdan biyomarker aday olabileceğini düşündürmektedir. Bu özgün

bulgular, gelecekte daha geniş serilerde yapılacak doğrulama çalışmalarıyla desteklendiğinde, klinik kullanıma yönelik yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.



4. KAYNAKLAR

1. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. Vol. 20, *Cancer Biology and Therapy*. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 1366–79.
2. Ferlay J *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France; 2024 Feb.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı HSGM. *Türkiye Kanser İstatistikleri 2020*. Ankara; 2025.
4. Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: A meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer*. 2011 Oct 1;129(7):1730–40.
5. Seiberg M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. Vol. 14, *Pigment Cell Research*. Blackwell Publishing Ltd; 2001. p. 236–42.
6. Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
7. Robles-Espinoza CD, Roberts ND, Chen S, Leacy FP, Alexandrov LB, Pornputtpong N, et al. Germline MC1R status influences somatic mutation burden in melanoma. *Nat Commun*. 2016 Jul 12;7.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer [Internet]. 2002. Available from: www.nature.com/nature
9. Mehnert JM, Kluger HM. Driver mutations in melanoma: Lessons learned from bench-to-bedside studies. *Curr Oncol Rep*. 2012 Oct;14(5):449–57.
10. David A. Tuveson, Barbara L. Weber, BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies *Cancer Cell*, 2003 1-s2.0-S1535610803001892-main.
11. Read J, Wadt KAW, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet*. 2015 Sep 3;53(1):1–14.
12. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):599–602.
13. Scolyer RA, Long G V., Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. Vol. 5, *Molecular Oncology*. John Wiley and Sons Ltd; 2011. p. 124–36.

14. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. Vol. 18, Expert Review of Anticancer Therapy. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 775–84.
15. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93–9.
16. Waninger JJ, Ma VT, Journey S, Skvarce J, Chopra Z, Tezel A, et al. Validation of the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Staging of Patients with Metastatic Cutaneous Melanoma Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA Netw Open*. 2021 Mar 9;4(3):E210980.
17. Maral T, Ottaviano M, Arance A, Blank C, Chiarion-Sileni V, Donia M, et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2025 Jan 1;36(1):10–30.
18. Xu J, Zhao J, Wang J, Sun C, Zhu X. Prognostic value of lactate dehydrogenase for melanoma patients receiving anti-PD-1/PD-L1 therapy: A meta-analysis. Vol. 100, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2021. p. E25318.
19. Janka EA, Várvolgyi T, Sipos Z, Soós A, Hegyi P, Kiss S, et al. Predictive Performance of Serum S100B Versus LDH in Melanoma Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 11, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
20. Grob JJ BJ. “The ‘ugly duckling’ sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening.” *Arch Dermatol*. 1998 Jan;134(1).
21. Dinnes J, Deeks JJ, Grainge MJ, Chuchu N, Ferrante di Ruffano L, Martin RN, et al. Visual inspection for diagnosing cutaneous melanoma in adults. Vol. 2018, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2018.
22. Serrone L. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000 Mar 19; 1:21–34.
23. Pham JP, Joshua AM da Silva IP, Dummer R, Goldinger SM. Chemotherapy in Cutaneous Melanoma: Is There Still a Role? Vol. 25, *Current Oncology Reports*. Springer; 2023. p. 609–21.

24. Lee N et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology*. 2016 Feb;48(2):177–87.
25. Passarelli A, Mannavola F, Stefania Stucci L, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape [Internet]. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
26. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2022 Jan 6;386(1):24–34.
27. Dummer R, Flaherty KT, Robert C, Arance A, Jan ;, De Groot WB, et al. COLUMBUS 5-Year Update: A Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Encorafenib Plus Binimetinib Versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients With BRAF V600-Mutant Melanoma [Internet]. Vol. 40, *J Clin Oncol*. 2022. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15.15>.
28. Long Final Results for Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III Melanoma. *N Engl J Med*. 2024 Oct 7;391(18):1709–20.
29. James Larkin Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Nov;371(20):1867–76.
30. Dummer R et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Apr;18(4):435–45.
31. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Christopher; et al. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021;40:127–37. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15.15>.
32. Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: Relatively rare but deadly cancer. Vol. 31, *Eye (Basingstoke)*. Nature Publishing Group; 2017. p. 241–57.
33. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. Vol. 368, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2020.
34. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [Internet]. Vol. 415, *NATURE* |. 2002. Available from: www.nature.com
35. Satchanska G, Davidova S, Gergova A. Diversity and Mechanisms of Action of Plant, Animal, and Human Antimicrobial Peptides. Vol. 13, *Antibiotics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.

- 36.Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Vol. 11, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
- 37.Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Vol. 11, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
- 38.Min KH, Kim KH, Ki MR, Pack SP. Antimicrobial Peptides and Their Biomedical Applications: A Review. Vol. 13, *Antibiotics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
39. Harder J, et al. *Nature*. 1997. A peptide antibiotic from human skin PMID: 9202117
- 40.Li X, Zuo S, Wang B, Zhang K, Wang Y. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules*. 2022 May 1;27(9).
- 41.Wiley W, Schneewind O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. Vol. 63, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. 1999.
- 42.Luo Y, Song Y. Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
- 43.Kimbrell DA BB. The evolution and genetics of innate immunity. . *Nat Rev Genet*. 2001;2(4):256–67.
- 44.Parchebafi A, Tamanaee F, Ehteram H, Ahmad E, Nikzad H, Haddad Kashani H. The dual interaction of antimicrobial peptides on bacteria and cancer cells; mechanism of action and therapeutic strategies of nanostructures. Vol. 21, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd; 2022.
45. Wu M, Chen JH. CFTR dysfunction leads to defective bacterial eradication on cystic fibrosis airways. Vol. 15, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media SA; 2024.
- 46.Cecchinato V, D'Agostino G, Raeli L, Nerviani A, Schiraldi M, Danelon G, et al. Redox-mediated mechanisms fuel monocyte responses to CXCL12/HMGB1 in active rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2018 Sep 19;9(SEP).
- 47.He K, Wu W, Wang X, Dai W, Wang S, Li C, et al. Circulatory levels of alarmins in patients with non-segmental vitiligo: Potential biomarkers for disease diagnosis and activity/severity assessment. *Front Immunol*. 2022 Dec 7;13.

48. Fan J, He K, Zhang Y, Li R, Yi X, Li S. HMGB1: new biomarker and therapeutic target of autoimmune and autoinflammatory skin diseases. Vol. 16, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2025.
49. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. Vol. 15, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2015. p. 96–109.
50. Egberts F, Pollex A, Egberts JH, Kaehler KC, Weichenthal M, Hauschild A. Long-term survival analysis in metastatic melanoma: Serum S100B is an independent prognostic marker and superior to LDH. *Onkologie*. 2008 Jul;31(7):380–4.
51. Böni R, Heizmann CW, Doguoglu A, Ilg EC, Schäfer BW, Dummer R, et al. Ca²⁺-binding proteins S100A6 and S100B in primary cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol*. 1997;24(2):76–80.
52. Alasady MJ, Terry AR, Pierce AD, Cavalier MC, Blaha CS, Adipietro KA, et al. The calcium-binding protein S100B reduces IL6 production in malignant melanoma via inhibition of RSK cellular signaling. *PLoS One*. 2021 Aug 1;16(8 August).
53. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human β -defensins. Vol. 63, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006. p. 1294–313.
54. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Peng Jia H, Welsh MJ, et al. Discovery of five conserved-defensin gene clusters using a computational search strategy [Internet]. Vol. 99. 2002. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.042692699
55. Abiko Y, Mitamura J, Nishimura M, Muramatsu T, Inoue T, Shimono M, et al. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma.
56. Mothes H, Melle C, Ernst G, Kaufmann R, Von Eggeling F, Settmacher U. Human Neutrophil Peptides 1-3-Early markers in development of colorectal adenomas and carcinomas. Vol. 25, *Disease Markers*. IOS Press; 2008.
57. Albrethsen J, Møller CH, Olsen J, Raskov H, Gammeltoft S. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2006 Nov;42(17):3057–64.
58. Melle C Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005;
59. Moro R, González-Ramos J, Martínez-García S, Requena C, Traves V, Manrique-Silva E, et al. Locoregional Lymph Node Recurrence of Trunk Melanoma in Non-sentinel Lymph Node Basins: An Observational Retrospective Study. *Acta Derm Venereol*. 2020 Oct 6;100(17): adv00284.

60. Bobirca F, Leventer M, Georgescu DE Dumitrescu DA Alexandru C, Serban D, et al. Variability of Sentinel Lymph Node Location in Patients with Trunk Melanoma. *Diagnostics*. 2023 Sep 1;13(17).
61. Weinstein D, Leininger J, Hamby C Diagnostic And Prognostic Biomarkers In Melanoma *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7 (6):13-24
62. Prkačin, I.; Mokos, M.; Ferara, N.; Šitum, M. Melanoma's New Frontier: Exploring the Latest Advances in Blood-Based Biomarkers for Melanoma. *Cancers* 2024, *16*, 4219. <https://doi.org/10.3390/cancers16244219>
63. Bolovan, L.M.; Ceausu, M.; Stanciu, A.E.; Panait, M.E.; Busca, A.; Hotnog, C.M.; Bleotu, C.; Gales, L.N.; Georgescu, M.T.; Prunoiu, V.M.; et al. Correlation Studies between S100 Protein Level and Soluble MIA or Tissue MelanA and gp100 (HMB45) Expression in Cutaneous Melanoma. *J. Pers. Med.* **2023**, *13*, 898. <https://doi.org/10.3390/jpm13060898>
64. Donald, C., Sun, C., Lim, S. *et al.* Cancer-Specific Loss of β -Defensin 1 in Renal and Prostatic Carcinomas. *Lab Invest* **83**, 501–505 (2003). <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000063929.61760.F6>