

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MALİGN MELANOMLARDA CD271 VE BRAF
EKSPRESYONUNUN KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN
İMMUNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Afife UĞUZ

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nermin KARAHAN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon
Birimi tarafından 4811-TU1-16 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA – 2017

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım yetişmemde büyük emeği olan başta tez danışmanım ve Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Nermin Karahan ve değerli hocalarım Prof. Dr. Sema Bircan, Doç. Dr. İ. Metin Çiriş, Doç. Dr. Şirin Başpınar, Yrd. Doç. Dr. Kemal Kürşat Bozkurt'a, asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, laboratuvarıda görevli çalışma arkadaşlarıma, desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili eşime ve aileme teşekkür ederim.

Ayrıca 4811-TU1-16 No'lu proje ile tezime maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Melanosit Embriyolojisi	4
2.2. Melanosit Histolojisi	5
2.3. Malign Melanom	7
2.3.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	7
2.3.2. Melanom Risk Faktörleri.....	7
2.3.3. Malign Melanomun Klinik Tanısı	8
2.3.4. Malign Melanom Histopatolojisi.....	10
2.3.4.1. Breslow Tümör Kalınlığı	11
2.3.4.2. Clark Level.....	12
2.3.4.3. Büyüme Fazı	12
2.3.4.4. Ülserasyon.....	12
2.3.4.5. Mitotik İndeks	13
2.3.4.6. Satellitler	13
2.3.4.7. İn Transit Metastaz.....	13
2.3.4.8. Tümörde Lenfositik İnfiltrasyon	13
2.3.5. Malign Melanom Alt Tipleri	14
2.3.6. Malign Melanom Evrelemesi	14
2.4. İmmunhistokimyasal Belirteçler	16
2.4.1. BRAF	16
2.4.2. CD271.....	19

3. MATERİYAL ve METOD	21
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	44
ÖZET.....	54
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	56



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABCB5	: ATP-Bağlayıcı Kaset Alt-Ailesi B Üyesi (ATP-Binding Cassette Sub-Family B Member) 5
ABCDE	: Asimetri, Sınırlar (Border), Renk (Color), Çap (Diameter), Gelişim (Evolving)
AEC	: 3-Amino-9-etilkarbazol (3-Amino-9-Ethylcarbazole)
AJCC	: Amerikan Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer)
AP-3	: Aktivatör Protein (Activator Protein-3)
ARAF	: Hızlı Hızlanan Fibrosarkom (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) A
BLOC-1	: Lizozom ile İlgili Organeller Kompleksinin Biyogenezi (Biogenesis Of Lysosome-Related Organelles Complex) 1
BRAF	: V-RAF murin sarkom viral onkogen homolog B1
CI	: Güven Aralığı (Confidence Interval)
c-kit	: tirozin kinaz reseptör kit
CRAF	: Selüler Hızla Hızlanan Fibrosarkom (Cellular Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
CTLA-4	: Sitotoksik T-Lenfosit ile İlişkili Antijen 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DUSPs	: Çift Özgüllük Fosfataz (Dual-Specificity Phosphatases)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz (extracellular-signal-regulated kinase)
FAMMM	: Ailesel atipik multiple mol melanom (Familial atypical multiple mole melanoma)
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
Fos	: Finkel-Biskis-Jinkins Murine Osteogenik Sarkom Virüs Protoonkogen
Grb2	: Büyüme Faktörü Reseptörüne Bağlanan Protein (Growth Factor Receptor-Bound Protein) 2
H&E	: Hemotoksilen Eozin
HMB-45	: İnsan Melanom Siyah (Human Melanoma Black)-45
HMG-box	: Yüksek Mobiliteli Grup (High Mobility Group) box
İHK	: İmmunhistokimyasal
MAPK	: Mitoz Aktive Eden Protein Kinaz
MART1	: T Hücrelerinin Tanıdığı Melanom Antijeni (Melanoma Antigen Recognized by T cells) 1

MEK	: Mitojen Aktif Ekstresellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
MITF	: Mikrooftalmi İlişkili Transkripsiyon Faktörü
MM	: Malign melanom
Myc	: Myelositomatozis Onkojen (Myelocytomatosis Oncogene)
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-Hafif-Zincir-Enhancer'in Aktive Ettiği B Hücreleri
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü (Nerve growth factor)
NGF-R	: Sinir Büyüme Faktörü (Nerve growth factor)- reseptör
NRAS	: Nöroblastom Viral Onkojen Homolog RAS
OCA2	: Okülokutanöz Albinizm 2
Pax 3	: Paired Bax Gen Ailesinin Bir Transkripsiyon Faktörü 3
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PCR	: Polimeraz zincirleme tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
Pmel17	: Premelanozom Protein
RAF	: Hızla Hızlanan Fibrosarkom (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
RalGDS	: Ral guanin nükleotid ayrışma uyarıcısı (Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator)
RAS	: Rat Sarcoma oncogene
RNA	: Ribonükleik Asit
RSK	: Ribozomal S6 Kinaz
SCREEN	: Kuzey Almanya'da Taramanın Etkinliği için Kanıt Sunmayı Amaçlayan Deri Kanseri Araştırması (Skin Cancer Research to Provide Evidence for Effectiveness of Screening in Northern Germany)
SOS	: Son Of Sevenless
SOX-10	: SRY-iliskili HMG-box geni ile kodlanan transkripsiyon faktörü
SOX-2	: SRY (sex determining region Y)-box 2
TNFR	: Tümör Nekroz Faktörü reseptörü
TNM	: Tümör Nodül Metastaz
TYRP-2	: Melanojenik Enzim Tirozinaz İlişkili Protein
UICC	: Uluslararası Kansere Kontrol Birliği
UV	: Ultraviyole
V-RAF	: Virüs Tarafından İndüklenen Hızlı Hızlanan Fibrosarkom (Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
α-MSH	: α-Melanocyte-Stimulating Hormone

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Dermatoskopinin ABCDE kuralı	8
Tablo 2.2. Menzies metodu	8
Tablo 2.3. Argenziano 7 puanlık kontrol listesi.	9
Tablo 2.4. Primer MM'ların eksizyonunda cerrahi sınırların prensipleri.	10
Tablo 2.5. AJCC malign melanom TNM Sınıflaması	15
Tablo 4.1. Primer ve metastatik MM'larda cinsiyet ve yaş karşılaştırılması.	25
Tablo 4.3. Primer ve metastatik MM'larda mm ² 'de mitoz sayısı karşılaştırılması. ..	26
Tablo 4.4. Primer ve metastatik MM'larda Breslow kalınlığı karşılaştırılması.	27
Tablo 4.5. Primer ve metastatik MM'larda lenfositik infiltrasyon varlığı karşılaştırılması.	27
Tablo 4.6. Primer ve metastatik MM'larda pigmentasyon varlığı karşılaştırılması..	28
Tablo 4.7. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyon şiddeti karşılaştırılması.	28
Tablo 4.8. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyon yüzdesi karşılaştırılması.	30
Tablo 4.9. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyon şiddeti ve yüzdesi toplam puan karşılaştırılması.	32
Tablo 4.10. Primer ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyon şiddeti karşılaştırılması.	32
Tablo 4.11. Primer ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyon yüzdesi karşılaştırılması.	35
Tablo 4.12. Primer ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyon şiddeti ve yüzdesi toplam puan karşılaştırılması.	36
Tablo 4.13. Çok değişkenli sağkalım analizi (cinsiyet, Breslow kalınlığı, ülser, pigmentasyon) Kaplan-Meier sağkalım analizi.	37
Tablo 4.14. BRAF V600E ekspresyon şiddeti Kaplan-Meier sağkalım analizi.....	38
Tablo 4.15. BRAF V600E ekspresyon yüzdesi Kaplan-Meier sağkalım analizi	39
Tablo 4.16. BRAF V600E ekspresyon şiddeti puanı 0 olanlar ve diğerlerinin Kaplan-Meier sağkalım analizi.	40
Tablo 4.17. BRAF V600E ekspresyon şiddeti puanı 3 olanlar ve diğerlerinin Kaplan-Meier sağkalım analizi.	41

Tablo 4.18. CD271 ekspresyon şiddeti Kaplan-Meier sağkalım analizi. 42

Tablo 4.19. CD271 ekspresyon yüzdesi Kaplan-Meier sağkalım analizi. 43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Melanosit histolojisi	5
Şekil 2.2. MAP-Kinaz sinyal yolağı	6
Şekil 2.3. RAS/RAF/MEK/ERK yolağı.	18
Şekil 4.1. Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisi... 38	
Şekil 4.2. Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon yüzdesi ile sağkalım ilişkisi. 39	
Şekil 4.3. Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti negatif olanlar ile diğerlerinin sağkalım ilişkisi karşılaştırması.....	40
Şekil 4.4. Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti 3 olanlar ile diğerlerinin sağkalım ilişkisi karşılaştırması.....	41
Şekil 4.5. Sağkalım eğrisi. CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisi.....	42
Şekil 4.6. Sağkalım eğrisi. CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım ilişkisi.	43

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. Metastatik lenf nodunda 3+ BRAF V600E boyanması.....	29
Resim 4.2. Metastatik lenf nodunda 3+ BRAF V600E boyanması.....	29
Resim 4.3. Metastatik lenf nodunda 2+ BRAF V600E boyanması.....	31
Resim 4.4. Metastatik lenf nodunda 1+ BRAF V600E boyanması.....	31
Resim 4.5. Metastatik lenf nodunda 3+ CD 271 boyanması	33
Resim 4.6. Metastatik lenf nodunda 2+ CD 271 boyanması	33
Resim 4.7. Metastatik lenf nodunda 2+ (soldaki ok), 3+ (sağdaki ok) CD 271 boyanması	34
Resim 4.8. Metastatik lenf nodunda 2+ (soldaki ok) 3+ (sağdaki ok) CD 271 boyanması	34

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Malign melanom (MM) nöroektodermal kökenli pigment üreten vücutta deri, iris ve rektumda bulunan melanositlerin malignitesidir (1, 2). MM insidansı tüm dünyada diğer tümörlerden daha hızlı şekilde artmaktadır. Her yıl tüm dünyada 160.000 yeni vaka tanı alırken 48.000 ölüm rapor edilmektedir (3).

Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) 1998'den beri MM evreleme sistemi prognostik önemi olan intrinsik faktörlerin daha fazla tümörde görülmesiyle güncellenen 7. basımıyla klinik sınıflandırmanın temelini oluşturmaktadır. Ancak, benzer ya da aynı klinik ve histolojik özellikler gösteren hastalarda bile klinik sonuç ciddi farklılıklar gösterebilmektedir. Özellikle AJCC orta risk evresi ve ileri evre hastalarda durum böyle olabilmektedir. Gen ekspresyon profilinin eklenmesi ile kesin prognostik sonuç sağlanabilir (4). Erken evre primer MM tanı için yapılan cerrahi rezeksiyon sıklıkla lokalize hastalığı olanlarda tedavi edicidir, fakat lokal metastazı olan hastalarda prognoz daha kötü seyreder. Uzak metastazlı hastalarda sağkalım ve konvansiyonel kemoterapiye yanıt pek yoktur (5).

Melanositik biyolojide hızla anlaşılan buluşlarda hızla yeni moleküler testlerin geliştirilmesiyle tümör prognozu ve sınıflandırılmasının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Bu gelişmeler ile ailesel MM sendromlarındaki yeni mutasyonların tanımlanması, tümör gelişimindeki yeni kritik somatik mutasyonların tanımlanması, ve tanı aracı olarak spesifik kromozomal sayı sapmalarının kullanılması sağlanmaktadır (6). Son on yılda MM hücrelerindeki genetik değişikliklerin anlaşılmasıyla önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. MM'ların melanositlerdeki genetik anormalliklerin birikiminden kaynaklanan genetik kompleks bir hastalık olduğunun kanıtları da artmaktadır. MM'ların çoğunda mitoz aktive eden protein kinaz (MAPK) yolağının hiperaktivasyonunun invazyon, sağkalım ve hücre proliferasyon regülasyonunda kritik oyuncu olduğu tanımlanmıştır (7). Bunun genetik arka planında genellikle: virüs tarafından indüklenen hızlı hızlanan fibrosarkom (Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) (V-RAF) murin sarkom viral onkogen homolog B1 (BRAF); ya da nöroblastom viral onkogen homolog (NRAS) bulunmaktadır. Bu mutasyonların ortaya çıkışının birbirinden bağımsız olarak gerçekleşmesi daha sık görülmektedir. Kutanöz MM'larda bildirilen BRAF mutasyon sıklığı % 40-70

arasında değişmekle birlikte kronik güneş ışığı hasarı olmayan derilerde meydana gelen tümörlerde daha sık saptanmaktadır (7).

Primer MM'larda %33-%47 oranında ve metastatik MM'larda %41-55 oranında BRAF onkogenini aktive eden mutasyon vardır (8, 9). MM'ların çoğunda serin/treonin kinaz BRAF mutasyonu bulunmaktadır. Diğer tümör antitelerinde de bu mutasyon bulunabilse de MM'lara göre insidansı dramatik olarak daha düşüktür (10). Bu mutasyon klasik MAPK yolağını aktive eder (11). Bu yolak RAF kinazlarının yanında RAS ailesinin GTPaz'larını, mitojen aktif ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (MEK1/2) ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) içermektedir. MM dokularında aktive ERK1/2 de bulunmuştur (10, 11). En sık görülen mutasyon BRAF proteininde 600. dizideki valinin yerine glutamik asidin geçmesiyle (V600E) oluşan mutasyondur. Bu mutasyonla kinaz aktive olarak kalır (8).

Primer MM'larda BRAF mutasyonu olanların daha genç yaş, kronik güneş ışığı hasarının daha az olması, vücutta daha yüksek oranda nevüsün olması gibi klinikopatolojik özellikler ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (8, 9). BRAF V600E mutasyonu tümörün çıkarılamadığı Evre III ve Evre IV hastalarda saptanması tedavide BRAF inhibitörlerinin kullanılmasından dolayı artık zorunlu hale gelmiştir (8, 12, 13).

Malign Melanomların tümöröenezini ve metastazını anlamak kanser kök hücre teorilerine dayandığı anlaşıldı. Kanser kök hücreleri, tümörün oluşup yayılmasına sebep olan kendi kendini devamlı yenileyen küçük bir hücre popülasyonudur (1, 14). MM nöral krest kök hücrelerinden köken alan melanositlerin fenotipik özelliklerini gösterirler (1, 15). Melanositlerin nöral krest kök hücrelerinden köken alması MM'un benzer morfolojisinden dolayı belirteç ve yolakların aktive olmasıyla melanosit prekürsörlerinden köken alabileceği düşünülmektedir (15).

CD271, düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörüdür. p75 ve sinir büyüme faktörü reseptörü (NGF-R) adlarıyla da bilinmektedir. Düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü nöral krestten köken alan hücrelerin yüzeyinde eksprese edilirler. Birçok nöral tümörde CD271 ekspresyonu gösterilmiştir (16-18). CD271, tümör kök hücre belirteçlerindendir. CD 271 eksprese eden tümörler CD 271 negatif olan MM'lardan daha yüksek metastaz potansiyeli ve daha kötü prognoza sahiptir (14). Özellikle CD271 ekspresyonu gösterenler MM'larda beyin metastazı artmıştır ve

CD271 ekspresyonu kötü prognosisla ilişkilidir (1). Başka çalışmalarda ise CD271 ekspresyonunun MM'un prognostik faktörlerinden olan Breslow kalınlığı, Clark level, sentinel lenf nodu durumu, patolojik evresi, rekürens, ölüm ile önemli bir korelasyonu gösterilememiştir (1, 14).

Yavaş döngülü MM hücrelerinde kontrol hücre popülasyonu ile karşılaştırıldığında vemurafenib ve trametinib sitotoksik etkileri görülebilmekle birlikte bu sonuçlar artmış CD271 ekspresyonuyla birlikte değerlendirildiğinde ilaç etkileri yavaş bölünen MM kök hücrelerinde ilaç etkilerinin olduğu görülmüştür (19). Başka bir çalışmada MM hücrelerinde CD271 pozitif olanlarda nükleer faktör kappa-hafif-zincir-enhancer'in aktive ettiği B hücreleri (NF- κ B) yolağının inaktive olduğu CD271'in kaybında da aktive olduğu bildirilmiştir (20).

Bu çalışma ile Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış primer ve metastatik MM olgularında BRAF V600E ve CD271 ekspresyonunun immunhistokimyasal yöntemle belirlenmesi, prognostik faktörler ve sağkalım ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Melanosit Embriyolojisi

İnsandaki melanositler heterojen hücre gruplarındandır. Embriyonik dönemde nöral krest hücrelerinden köken alırlar ve melanin üreten hücrelerdir (21). Melanositlerin yaşam döngüsünde birkaç adım vardır: embriyonik nöral krest hücrelerinden farklılaşma, göç, melanoblastların proliferasyonu, melanoblastlardan melanositlere farklılaşma, melanositlerin maturasyonu (melanozom adı verilen özel organellerde melanin üretimi ve dendritik morfoloji), matür melanozomlardan keratonisitlere melanin aktarılması ve son olarak hücre ölümüdür. Nöral krest hücrelerinin melanosit oluşturduğu kranial, dorsal ve ventral trunkuslar olmak üzere birkaç populasyon vardır (22, 23).

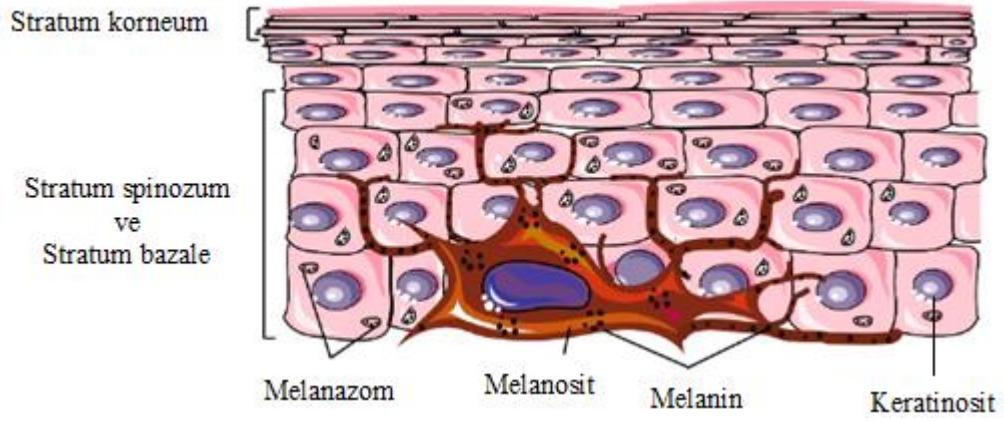
Melanositler nöral krest hücreleri embriyonik germ yaprağı olan ektodermden köken alırlar. Embriyolojik 4. haftada embriyonik diskin orta alanı nöral tabaka şeklinde görülebilen nöroektoderm gelişir (21). Nöral krest hücreleri periferik sinir sistemi, kraniofasial kıkırdak ve kemik, aortikopulmoner septumun düz kası, deride pigment hücreler gibi çeşitli yapılara dönüşerek embriyonun farklı yerlerine göçerler (22, 24). Geleneksel bir görüşte melanositlerin farklılaşması nöral krest gelişiminin erken bir aşamasında gerçekleşir. Gerçekten de melanositlerin köken aldığı hücreler nöral tüpten göç ettikten hemen sonra diğer nöral krest hücrelerinden ayrılarak farklılaşırlar (24). İnsan gelişimi sırasında melanoblastların göç etmesi deri sinirlerinin gelişimi aynı zamanda olur. Bu embriyo gelişiminin 6. ve 8. haftalarında başlar (21). Doğumdan sonra sinir kılıfı hücreleri (Schwann hücreleri) melanosit üretme potansiyeline sahiptir (22, 24).

Melanoblastlar özelleştikten sonra proliferasyon ve son duraklarına doğru göç ederler ve en son olarak deri, kıl follikülleri, oral mukoza, gözün koroid tabakası, iris, meninks, iç kulakta stria vaskularise yerleşirler. Bu göç 6.-8. haftalar ile 12.-13. haftalar arasında ve çoğunun epidermise yerleşmesiyle gerçekleşir (21). Melanosit maturasyonunun en önemli aşaması melanin sentez enzimi tirozinazın ortaya çıkmasıdır (21). Melanoblastlar melanosit özellikleri taşırlar fakat melanin üretemezler. Melanosit prekürsörleri için bilinen belirteçler: tirozin kinaz reseptör kit

(c-kit), transkripsiyon faktörleri (mikrooftalmi ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF), SRY-iliskili HMG-box geni ile kodlanan transkripsiyon faktörü (SOX-10), paired box gen ailesinin bir transkripsiyon faktörü (Pax 3)), melanojenik enzim tirozinaz ilişkili protein (TYRP-2) (11, 21, 24, 25). Melanoblast/melanosit gelişiminde temel yollar: Wnt sinyal yolağı, β -catenin-sinyal yolağı, Notch yolağı, MAPK-sinyal yolağıdır (21, 24, 25).

2.2. Melanosit Histolojisi

Melanositler, epidermisen bazal tabakasında 30-40 keratinosit ile ilişkili olarak epidermal melanin ünitesini oluştururlar (21, 23) (Şekil 2.1). İnsan derisinde ırktan bağımsız olarak milimetrekarede yaklaşık 1200 melanosit vardır (21).



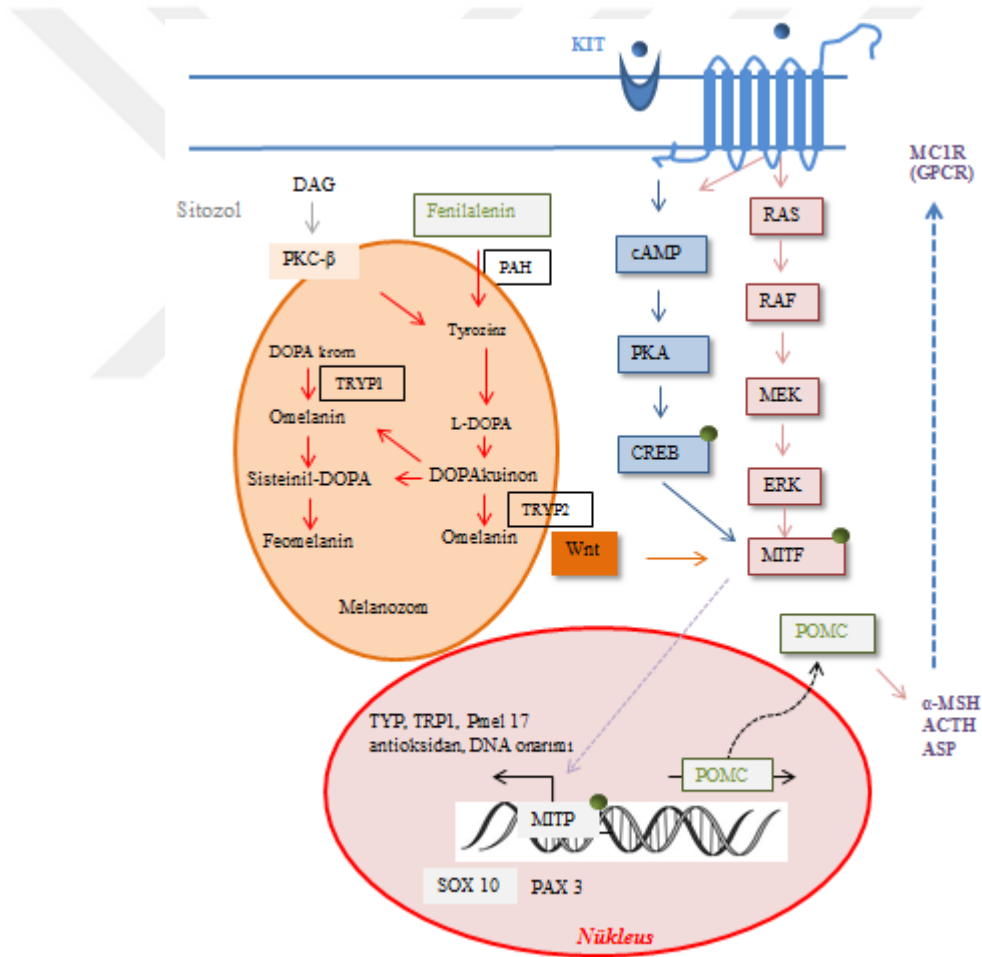
Şekil 2.1. Melanosit histolojisi (23).

Işık mikroskobunda hemotoksilen eozin (H&E) kesitlerde matür melanositler, oval, iğsi, dendritik hücreler şeklinde ve keratinositlerden küçüklerdir. Sitoplazmalarında melanin üreten membran ile ilişkili melanozomlar bulunur (21, 23). Melanogenezis, melanin sentezinden sorumlu biyokimyasal bir yoldur. Melanogenezis ile renkleri ve sentez yolları farklı iki tip melanin üretilir. Bunlar: feomelanin ve ömelanindir. Ömelanin kahverengi siyah renklidir ve L-dopakromdan sentezlenir, feomelanin kırmızı-sarı renklidir ve sentezi melanozomlardaki sülfidril bileşiklerine bağlıdır (21, 22).

Melanin ultraviyole (UV) ışığın absorpsiyonu ve saçılımı, serbest radikal temizleme, çift oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ve iyon depolama işlevlerine

sahiptir (21, 23). Melanozomlarda melanin üretimi sırasında bir takım spesifik enzimatik ve yapısal protein gerekir. TYR ve TYRP2 melaninin miktarını ve kalitesini etkileyen kritik enzimler arasında yer alırken Pmel17 ve MART1 ise kritik yapısal proteinlerdir (26). AP-3, BLOC-1 ve OCA2 (Activator protein-3, biogenesis of lysosome-related organelles complex 1, oculocutaneous albinism 2), melanozomların sınıflandırılmasında ve iletilmesinde önemli rol oynamaktadır (27).

L-Dopakrom tirozinaz aktivitesini artırırken L-tirozin melanozom sentezini başlatır ve tirozinaz aktivitesini artırır. L-Tirozin, melaninin biyosentezi için başlangıç malzemesi olarak görev yapmaktadır. Sonra çıkan ürün, dopa, melanin sentezini upregüle eder (23, 27) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. MAP-Kinaz sinyal yolağı. (23).

2.3. Malign Melanom

2.3.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Malign Melanomun kutanöz formu, Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Avusturalya gibi ülkelerde yaygındır ve deri kanseri ile ilişkili ölümlerin %75'inden sorumludur. Bütün dünyada 100.000'de 15-25 oranında görülmektedir. UV maruziyeti kutanöz MM'lar için majör risk faktörüdür. UV MM'un karakteristik genetik değişikliklerine yol açar. Aslında son zamanlarda kutanöz MM'un altında yatan karakteristik genetik değişiklikler Asya'da daha sık görülen MM'ların uveal ve mukozal formlarından önemli farklılıklar göstermektedir (2). Kutanoz MM'lar diğer solid tümörlerden daha hızlı artan bir insidansa sahiptir. Dünya'da insidansı her yıl 160.000 yeni olgunun ve 48.000'i ölmektedir (3). Mukozal MM'lar oldukça nadir klinik antitelerdir ve insidansı tüm MM'ların %1-2'si olup 1.000.000'da 2-2,6'dır (28).

2.3.2. Melanom Risk Faktörleri

Malign Melanom için ana bilinen ekzojen risk faktörü ultraviyole radyasyona maruziyettir. Ultraviyole maruziyeti, çok sayıda nevüs, dev konjenital nevüs, eskiden MM'unun olması, displastik nevüs, ailesel MM öyküsü, bazı mutasyonlar, aktinik keratoz, MM dışı deri kanseri ve organ transplantasyonu MM gelişme riskini artırır. Sosyoekonomik düzeyi düşük olan hastalarda daha kalın lezyonlar görülür. Çalışmalar, güneş kremi kullanımının devam etmesinin invaziv MM'ların görülme sıklığını azalttığını göstermektedir (29-33).

Malign Melanom için ultraviyole maruziyeti dâhil olmak üzere iyi bilinen bir dizi risk faktörü vardır. Bu risk, kronik veya sürekli güneş ışığına maruz kalma yerine, yüksek yoğunluklu güneş ışığına aralıklı maruz kalma ile daha fazla bağlantılıdır. Yüksek yoğunluklu güneş ışığının aralıklı maruz kalması güneş yanığı ile ilişkilidir ve güneş yanıkları öyküsü MM riskini artırır. Var olan nevüs sayısı ve ≥ 5 mm olması ve düzensiz renkli ve düzensiz kenarlı atipik nevüslerin varlığı da diğer MM risk faktörlerindendir. Ailede MM öyküsü olması ve bir organ nakli olması MM gelişme riskini iki katına çıkarır. Daha önce MM geçirenlerde ikinci bir MM riski artar ve bu

risk kadınlarda daha yüksektir. Ayrıca, birçok kanser türünden birini örneğin tiroid kanseri veya bazı lenfomalar geçirmiş olmak MM gelişme riskini artırır (33-35).

2.3.3. Malign Melanomun Klinik Tanısı

Malign Melanomun klinik tanısında asimetri, sınırlar (border), renk (color), çap (diameter), gelişim (evolving) (ABCDE), Menzies yöntemi, Argenziano 7-puanlık kontrol listesi ve patern analizi gibi tanısal algoritmalarının kullanılması önerilir. Bazı MM'lar, özellikle erken evrelerinde, bu kurallara uymamakla birlikte, diğer benign lezyonlar ara sıra bu kurallara uyabilir (32, 36, 37). Nodüler MM genellikle asimetriktir, tek renk veya amelanotiktir (38) (Tablo 2.1, Tablo 2.2, Tablo 2.3.).

Tablo 2.1. Dermatoskopinin ABCDE kuralı (37).

Kriter	Puan	Ağırlık Faktörü	Skor (aralık)
Asimetri	0 – 2 (A)	1,3	0 – 2,6
Sınır (border)	0 – 9 (B)	0,1	0 – 0,08
Renk (color)	1 – 6 (C)	0,5	0,5 – 3,0
Dermatoskopik yapı	1 – 5 (D)	0,5	0,5 – 2,5

- Toplam skor = puan x ağırlık faktörü.
- Benign < 4,75; yüksek ihtimalle MM > 5,45; şüpheli lezyon 4,75 – 5,45.
- Dermatoskopik yapı, düzensiz alanlar, çizgilenmeler, globüller.

Tablo 2.2. Menzies metodu (37).

Pozitif Özellikler	Negatif Özellikler
Mavi-beyaz renk	Simetrik patern
Multiple kahverengi noktalanmalar	Tek renk
Psödopod	
Radyal yayılma	
Skar benzeri depigmentasyon	
Periferik siyah globüller ya da noktalanmalar	
Multiple (5 – 6) renk	
Multiple mavi-gri noktalanmalar	
Genişlemiş ağ	

- Lezyonda negatif özellikler varsa MM dışlanırken bir ya da daha fazla pozitif özellik MM'u düşündürür.

Tablo 2.3. Argenziano 7 puanlık kontrol listesi (37).

Major Kriterler (Her biri iki puan)	Minor Kriterler (Her biri bir puan)
Atipik pigment ağı	Düzensiz çizgiler
Mavi-beyaz renk	Düzensiz pigmentasyon
Atipik vasküler patern	Düzensiz globüller
	Regresif yapılar

Argenziano 7-puanlık kontrol listesi veya ABCDE kuralı, tanıda yardımcıdır. Sensitif olmakla birlikte kadar spesifik değildir (37).

Puberteden sonra oluşan şekil, renk veya boyutta değişiklik görülen yeni nevüs görülmesi; şekli, rengi veya büyüklüğü değişen uzun süredir devam eden nevüs; üç veya daha fazla renge sahip veya simetrikliğini kaybeden herhangi bir nevüs; kaşıntı veya kanama olan bir nevüs; herhangi bir kalıcı yeni oluşan cilt lezyonu pigmentli veya vasküler görünüyorsa ve tanısı kesin konulamıyorsa; tırnakta yeni oluşan pigmentte çizgi özellikle daha önceki olan bir travma sonrası; tırnağın altında büyüyen lezyon durumlarında MM'dan kuşkulandırılmalıdır (34).

Malign Melanom olduğu düşünülen bir lezyon önce fotoğraflanmalı ve daha sonra tamamen eksize edilmelidir. Eksizyonel biyopside, tümörün tamamı çevresinde 2 mm normal cilt ile ve etrafında yağ doku olmalıdır. Böylece lezyonun tamamının görülebilmesini, tanının kesinleşmesini ve Breslow kalınlığının da belirlenebilmesini sağlar (34, 37, 39). Doğru lenfatik haritalama yapılabilmesi için tümörün çıkarılmasında daha geniş sınırlar kullanmaktan kaçınılmalıdır. Her ne kadar eksizyonel biyopsi yapmak gerekse de bazı anatomik lokalizasyonlarda (avuç içi, ayak tabanı, parmaklar, yüz, kulak gibi) lezyonun en kalın olduğu kabul edilen alandan tam kat insizyonel biyopsi ya da punch biyopsi yapılması kabul edilebilir. Shave biyopsi, patolojik tanıya ve Breslow kalınlığının tam olarak değerlendirilmesine zarar verebilir, ancak kuşku düşük olduğunda kabul edilebilir (Tablo 2.4.) (39). Pigmente lezyonlarda tanı için kabul edilen biyopsi metodları; yüzeysel shave biopsi, derin shave biyopsi, punch biyopsi ve kısmi insizyonel biyopsi veya eksizyonel biyopsidir. Kutanöz MM'u teşhis etmek için ince iğne aspirasyonu kullanılabilir ancak derinlik ve ülser anlaşılamayacağından önerilmemektedir. İnce iğne aspirasyonu deri altı bölgede

metastatik MM'larda, lenf düğümleri veya yumuşak dokularda metastatik MM'larda önerilmektedir (37).

Tablo 2.4. Primer MM'ların eksizyonunda cerrahi sınırların prensipleri (39).

Tümör Kalınlığı	Tavsiye Edilen Klinik Sınırlar
<i>In situ</i>	0.5 cm
≤ 1.0 mm	1.0 cm
1.01 – 2 mm	1.0 – 2.0 cm
2.01 – 4 mm	2.0 cm
> 4 mm	2.0 cm

2.3.4. Malign Melanom Histopatolojisi

Malign Melanom tanısı için altın standart, lezyonun klinik bilgisi ve hasta bilgisi ile birlikte hematoksilen ve eozin ile boyanmış kesitlerin histopatolojik değerlendirilmesidir.

Bununla birlikte, tüm MM'lara uygulanan objektif ve tekrarlanabilir kriterlerin yokluğu ve çelişkili veya sınırda bulguları olan lezyonlar uzmanlar arasında bile MM'un histopatolojik tanısında önemli uyumsuzluğa neden olur (2). MM'un 4 ana histolojik paterni vardır; süperfisyal, nodüler, lentigo maligna ve akral lentiginöz. Bu sınıflandırma daha az önemlidir, çünkü prognoz ve tedavi seçimini diğer faktörler daha çok etkilemektedir (32).

Biyopside asimetri, epidermal/dermal komponent ve sitolojik özellikler değerlendirilen unsurlardır. Asimetri ile hem intraepidermal bileşenin lateral yayılımı hem de dermal yayılımı anlaşılmalıdır. Hücre tipi ve yapısı ile pigmentasyonun yoğunluğu ve dağılımı, inflamasyon ve fibrozis ilişkilendirilir. Primer kutanöz MM, bazal intraepidermal tabakada proliferasyonla başlamakla birlikte sıklıkla izole atipik melanositler epidermis yüzeyine doğru pagetoid yayılıp ve epidermin granüler tabakasına kadar uzanan gruplar oluşturabilirler. MM'lar dermal komponentte tek tek dağılan hücrelerden difüz yayılıma ya da gruplar şeklinde ya da mikro-makronodüller oluşturabilmektedir ve tümör içerisinde heterojen olup derinlerde maturasyon göstermez. İnflamasyon, fibrozis, desmoplazi ve vasküler proliferasyon gibi reaktif

değişiklikler yaygındır. Epidermisin erozyonu, neoplastik melanositlerle doğrudan temas halinde olan bölgelerdeki epidermisin kaybıyla bazal ve suprabazal katmanların incelmesidir. Bu durum MM'ların % 86'sında ve tüm Spitz nevüslerinin sadece % 9,6'sında görülür (40, 41). Sitolojide MM hücreleri poligonal, yuvarlak, oval, fuziform, dendritik, taşlı yüzük gibi çok farklı şekillerde görülebilirler. Hücre boyutları lenfositten dev hücreye kadar değişen boyutlarda olabilir ve atipik multinükleer dev hücreler sık görülür. Önemli bir özellik de farklı hücre tipleri arasındaki ani geçiştir (32).

Ülserasyon olup olmadığı, Breslow kalınlığı, mitoz sayısı, histolojik alt tip, cerrahi sınırlar, patolojik evreleme, büyüme şekli, tümör regresyonu-lenfosit infiltrasyonu varlığı, lenfatik ya da vasküler invazyon, perinöral invazyon, mikrosatellit, prekürsör nevüs, Clark level-dermal invazyon patoloji raporunda belirtilmesi gereken prognostik faktörlerdir (34).

2.3.4.1. Breslow Tümör Kalınlığı

Breslow 1969 yılında tümör evresi ile milimetre olarak tümör kalınlığını karşılaştırarak tümör kalınlığı arttıkça sağkalım oranlarının düştüğünü bildirdi. Breslow tümör kalınlığı granüler tabakanın üstünden en alttaki tümör hücresine kadar ölçümüdür (42). AJCC ve Uluslararası Kansere Kontrol Birliği (UICC) evreleme sistemi, primer tümörün değerlendirilmesine, Breslow kalınlığı ve ülserasyonun olup olmaması bölgesel lenfatik metastazların varlığı veya yokluğunun prognostik faktörler olarak değerlendirilmesine dayanır (3, 32, 43).

Breslow tümör kalınlığı, epidermisin granüler tabakasının tepesinden veya ülser tabanından en derindeki tümör hücresine kadar tümörün maksimum vertikal boyutudur. AJCC dört prognostik kategori oluşturmuştur: ≤ 1 mm, 1.01– 2.0 mm, 2.01– 4.0 mm, ≥ 4.0 mm. Tümör kalınlığı ≤ 1 mm olan MM'larda 5 yıllık sağkalım $>90\%$ iken, ≥ 4.0 mm kalınlıkta ve ülseri olanlarda yaklaşık 45% civarındadır (40). Batı Avrupa'da ve Avustralya'da 1980 ve 1990'larda kamu kampanyaları ve tarama programları ile erken tanı alan primer MM'un tümör kalınlığında belirgin bir düşüş bildirildi. Bu gelişme ile ≤ 1 mm tümör kalınlığı olan tümörlerin daha erken tanı alması demektir. Bununla birlikte, Avrupa, Birleşik Devletler ve Avustralya'da Breslow

kalınlığı ≥ 2 mm olan MM görölme sıklığı azalmadı hatta insidans oranları giderek arttı. Gelişmiş dünyada, kutanöz MM'un büyük bir kısmı artık ≤ 1 mm Breslow kalınlığı ile tanı alır ve tüm MM'ların %10-15'i daha sonra metastaz yapar (2).

2.3.4.2. Clark Level

Clark ve arkadaşları 1969 yılında tümör invazyonunun prognozu etkilediğini bildirirken level I, II, III, IV, V şeklinde MM invazyonunu derecelendirdiler. Buna göre; level I; epidermiste sınırlı, level II; papiller dermisi invaze etmiş, level III; papiller dermisi doldumuş retiküler dermis sınırına dayanmış, level IV; retiküler dermisi invaze etmiş, level V; subkutan dokuyu invaze etmiş şeklinde bildirdiler (44, 45).

Tümör invazyonunun seviyesi tümör kalınlığıyla yakından ilişkilidir, ancak zaman içindeki önemi azalmıştır (34). AJCC evreleme sisteminin 7. basımında, Clark leveli aynı zamanda 1 mm'den ince primer MM'ların sonuçlarının güçlü bağımsız prediktörüdür (43).

2.3.4.3. Büyüme Fazı

Radyal büyüme fazında çok düşük metastatik potansiyel varken vertikal büyüme fazında metastaz potansiyeli artar. Radyal büyüme fazında tümör intraepidermal ya da papiller dermise mikroinvazyon yapar ve mitoz içermeyen, infiltre eden regresyon özellikleri olmaksızın <15 hücreden az gruplar şeklindedir (32).

Vertikal büyüme fazı olmadan invazyon yapan MM'lar mikroinvaziv kabul edilmektedir. Mikroevreleme kriterlerinin değerlendirilmesi yalnızca vertikal büyüme fazında uygulanmalıdır (34).

2.3.4.4. Ülserasyon

Ülserasyon mikroskobik olarak fibrinöz eksuda ve komşu epidermiste akantoz ya da incelme gibi değişiklikler olan reaktif değişiklikler ile epidermin kalınlığının azalmasıdır. Böylece gerçek ülserasyon ve artefaktlar ayırt edilebilir (34).

Evre III MM'da en önemli prognostik faktörlerden biri de ülserasyonun olup olmamasıdır. Ülserasyon varlığı veya yokluğu, primer MM'larda evre I ve II'de evre III'de olduğu gibi bağımsız prediktör prognostik özelliktir. AJCC MM Evreleme Komitesi bu durumu hesaba kattıklarında patolojik evre III olan hastalarda ülserasyon varlığında evreyi bir kademe düşürdüler. Hayatta kalma ile evre alt grupları birlikte analiz edildiğinde aralarındaki korelasyon kayda değerdir (46).

2.3.4.5. Mitotik İndeks

Mitotik indeks, tümör proliferasyonunun bir göstergesidir ve mm² başına mitoz sayısı olarak ölçülür (43). En fazla mitoz içeren alanlarda mitoz sayılarak mm²'de kaydedilmelidir. Mitotik indeks tüm kalınlıklarda prognostik faktördür (47). Mitotik indeks hesaplanırken mitozun en fazla olduğu odak seçilir ve bu alanın çevresindeki alanlar ile beraber 1 mm²'ye tamamlanır (48).

2.3.4.6. Satellitler

Satellit, dermiste ve/veya subkutan dokuda ana vertikal büyüme faz komponentinden uzağa yerleşmiş >0.05 mm'den daha büyük tümör nodülleridir (40). Satellitlerin varlığında, 8 yıllık yaşam süresinde %75'den % 40'a düştüğü saptandı (49).

2.3.4.7. İn Transit Metastaz

Transit metastazlar MM hücrelerinin primer MM bölgesi ile drene olan bölgesel lenf düğümleri arasındaki dokulara lenfatik yayılımı sonucunda oluşur. Mevcut MM evreleme sisteminde bölgesel lenf nodu metastazları ve in transit metastaz evre III hastalık olarak gruplandırılmaktadır (50).

2.3.4.8. Tümörde Lenfositik İnfiltrasyon

Clark ve arkadaşları 1989 yılında bir tümörün bulunduğu yerde lenfositlerin varlığını ölçmek için şimdi bile kullanılan tümörü infiltre eden lenfositler

sınıflandırması tarif etti. Lenfosit infiltrasyonu derecesini; yoğun lenfositik infiltrasyon, yoğun olmayan lenfositik infiltrasyon, lenfositik infiltrasyon yok şeklinde 3 gruba ayırdılar. Yoğun olmayan infiltrasyon sadece fokal infiltrasyondan oluşur. Yoğun infiltrasyon, vertikal büyüme faz boyunca difüz infiltrasyon şeklinde veya lezyonun tabanında %90'dan fazlasını çevreleyen lenfosit infiltrasyonudur (49).

2.3.5. Malign Melanom Alt Tipleri

Histolojik alt tipler, süperfisyal MM (% 60), nodüler MM (% 16), lentiginöz MM (% 13) ve akral lentiginöz MM (% 5) (32).

Dezmoplastik MM'lar nörotropizm yapsın ya da yapmasın biyolojik davranışları ve klinikleri farklı olduğundan bildirilmelidir. Süperfisyal, nodüler, lentiginöz ve akral lentiginöz MM'ların klinikopatolojik korelasyonları iyidir (34).

2.3.6. Malign Melanom Evrelemesi

MM'lu hastalarda hem patolojik, hem de klinik evreleme hastanın sağkalımını etkilemektedir. Bu nedenle 2002 yılında 6. basımı AJCC MM evrelemesini geliştirilmiş olup, 2009 yılında 7. basımı yayınlanarak, genişletilmiştir. Böylece tümör nodül metastaz (TNM) evreleme sisteminde yenilenmeler olmuştur (Tablo 2.2) (34).

Klinik veya patolojik olarak bölgesel veya uzak metastaz bulgusu olmayan primer MM'lu hastalar ikiye ayrılır. Evre I, metastaz ve MM mortalitesi açısından 'düşük riskli' erken evre hastalardır. Evre II, metastaz ve MM mortalitesi açısından 'orta riskli' hastalardır. Her evrede ülserasyonun varlığı eşit kalınlıktaki ülserasyonsuz MM'lu hastalardan daha yüksek metastaz riskine işaret eder. Evre I ve II, lokalize MM'lar iken, Evre III'de bölgesel metastazlar ve Evre IV'de uzak metastazlar görülür (34, 48).

Evre I-II MM'larda önemli olan klinik prognostik faktörler yaş, cinsiyet, lokalizasyon, gebelik; cerrahi prognostik faktörler cerrahi sınırlar ve elektif lenf nodu diseksiyonudur. Patolojik prognostik faktörler ise Breslow kalınlığı, invazyon derinliği, ülser, mitoz, mikroskopik satellit, iltihabi infiltrasyon, histolojik tip, regresyon, vasküler invazyon, stromal vaskülarite, eşlik eden nevüs varlığı, tümör

boyutu olarak sayılabilir. Evre III MM'lardaki klinik prognostik faktörler lokalizasyon, yaş, palpabl lenf düğümlerinin boyutu, remisyon süresi ve primeri bilinmeyen metastatik MM'lardır. Evre IV MM'lu hastaların prognozu genellikle kötü kabul edilir. Bu evredeki en önemli prognostik faktörler uzak metastazın lokalizasyonu ve metastatik organların sayısıdır (51).

Tablo 2.5. AJCC malign melanom TNM Sınıflaması (7.baskı)

T Sınıflaması	Kalınlık	Ülserasyon Durumu / Mitozlar
T1	$\leq 0,1$ mm	a: Ülserasyonsuz ve mitoz < 1 mm ² b: Ülserasyonlu veya mitoz ≥ 1 mm ²
T2	1,01 – 2,00	a: Ülserasyonsuz b: Ülserasyonlu
T3	2,01 – 4, 00	a: Ülserasyonsuz b: Ülserasyonlu
T4	> 4 mm	a: Ülserasyonsuz b: Ülserasyonlu
Tx	Primer tümör belirlenemez (Örneğin kürete edilmiş ya da ciddi bir şekilde regrese olmuş MM)	
T0	Primer tümör kanıtı yok	
Tis	Melanoma <i>in situ</i>	
N Sınıflaması	Metastatik Lenf Nodu Sayısı	Nodal Metastatik Kitle
N1	1 nod	a: Mikrometastaz ^a b: Makrometastaz ^b
N2	2 – 3 nod	a: Mikrometastaz ^a b: Makrometastaz ^b c: Metastazlı lenf nodu olmaksızın, intransit metastaz / satellit
N3	≥ 4 nod veya pake halinde nodlar veya metastatik lenf nodları ile intransit metastaz / satellit	
NX	Hastalardaki rejyonel nodlar değerlendirilemez (örneğin; önceden çıkarılmış)	
N0	Rejyonel metastazı saptanamayan	
M Sınıflaması	Tutulum Yeri	Serum LDH
M1a	Uzak deri, subkutan veya nodal metastaz	Normal
M1b	Akciğer metastazı	Normal
M1c	Diğer tüm organ metastazları	Normal
M0	Uzak metastaz saptanamaz	Yüksek

^aSentinel lenf nodu biyopsisi ve tamamlayıcı lenfadenektomi sonrasında tanı konan mikrometastazlar.

^bMakrometastazlar terapötik lenfadenektomi veya gözle görülür kapsül dışı yayılım ile doğrulanan klinik olarak saptanabilir nodal metastazlar.

2.4. İmmunhistokimyasal Belirteçler

İmmünhistokimyasal belirteçlerin çoğalmasına rağmen, S-100, melanositik lezyonlar için en hassas belirteç olmayı sürdürürken, HMB-45, MART-1/Melan-A, tyrosinase, ve MITF gibi belirteçler daha spesifik iken S-100 kadar sensitivite göstermezler. MM’u benign nevüslerden ayırmak için kullanılan proliferasyon ve aynı zamanda prognostik faktörler: Ki-67’de artış, p16 kaybı, p21 (nevüste nadir MM’da%50-98), p27,p53 çoğu nevüste boyanmaz (52). Sentinal lenf nodları seri kesitler ve immünohistokimya ile değerlendirilmelidir (43). Çalışmada tanıdan ziyade, prognostik açıdan önemli olabilecek BRAF V600E, CD271 belirteçleri çalışıldı.

2.4.1. BRAF

BRAF, serin/treonin protein kinaz olan bir protoonkogendir (51). Davies ve arkadaşları ilk defa 2002 yılında BRAF mutasyonunun insan tümörlerinin %8’inde en sık olarak da MM’ların %50-70’inde bulunduğunu göstermiştir. BRAF mutasyonu ayrıca papiller tiroid karsinomu (%36-69), kolorektal kanser (%5-12), küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda da (%1-4) bulunmaktadır (12).

Nevüslerin %25-80’inde, primer ya da metastatik MM’larda ve MM hücre serilerinde BRAF somatik mutasyonların sıklığını bildiren çalışmalar vardır. BRAF mutasyon sıklığındaki farklılıklar, histolojik alt tiplerinin oranlarındaki değişiklikler, farklı evrelerdeki tümörlerin bulunması ve mutasyonların saptanması için kullanılan yöntemlerin sensitivitesinden kaynaklanabilir. BRAF mutasyonu sıklığı ilerlemiş lezyonlarda daha yüksektir (53).

Bugüne kadar MM tedavisinde sınırlı ilerleme kaydedildi; metastatik MM, konvansiyonel radyoterapiye ve kemoterapiye karşı direnci nedeniyle ünlüdür. Yakın zamana kadar, bir DNA alkilleyici ajan olan dacarbazine, MM tedavisinde kullanılabilen FDA onaylı ilaçtır. 2011’de, BRAF V600E’nin spesifik inhibitörü olan vemurafenib ve sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen 4’e (CTLA-4) karşı monoklonal bir antikor olan ipilimumab, MM tedavisi için onaylanmıştır (54).

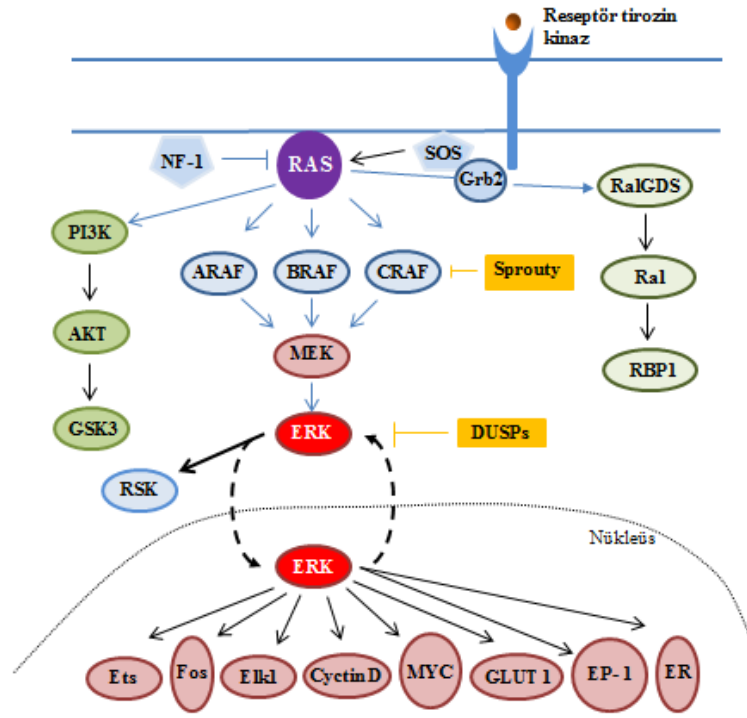
BRAF proto-onkogeni, serin / treonin sitoplazmik kinazların RAF ailesinin üyesi olan BRAF kinazı kodlar. RAF kinazları, hücre büyümesi, çoğalması ve

farklılaşmanın kontrolünde rol oynayan bir RAS aktive protein kinaz kaskadı olan mitojenik aktive protein kinaz (MAPK) yolağının bir parçasıdır (55). Onkogenik RAS, RAF proteinlerini aktive eder ve böylece MEK / ERK basamağını harekete geçirir (56).

Melanosit biyolojisinde BRAF'ın önemi, proliferasyonu başlatan α -melanokortin uyaran hormonu (α -MSH) ERK kinaz kaskadındaki BRAF aktivasyonu ile başlaması, MM'da yüksek BRAF mutasyon sıklığı için olası bir sebep olarak gösterilmiştir (53).

RAF ailesinin üyeleri (ARAF, BRAF, CRAF), düzenleyici sinyalleri RAS'dan MEK1/2'ye dönüştürmek için MAPK yolunda hareket eden serin / treonin kinazları kodlamaktadır. Ayrıca BRAF'ın RNAi'yi baskılaması BRAF mutant MM hücre çizgilerinde ERK aktivasyonu yaparken ARAF ya da CRAF böyle bir etki oluşturmazlar (53). BRAF proteinine temel bir kinaz aktivitesi kazandıran BRAF'ın V600 pozisyonundaki mutasyonlar, MM'ların yaklaşık % 50'sinde tespit edilmiştir (57-59) (Şekil 2.3).

MM progresyonu boyunca yüksek BRAF mutasyonu insidansı, BRAF'ın etkili bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (60). Bir BRAF ve MEK inhibitör kombinasyonu ile tedavi, % 64-69 oranında tümör yanıtı ile sonuçlanır. BRAF V600E mutant MM'u olan hastaların hayatta kalmasını iyileştirir (58). BRAF V600E mutasyonları çoğu tümör tipinde baskınken, non-V600E mutasyonları akciğer adenokarsinomalarında akut lösemilerde ve non-Hodgkin lenfomalarında daha sık görülür (56).



Şekil 2.3. RAS/RAF/MEK/ERK yolağı.

Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki tirozin kinaz reseptörlerine bağlanıp, Grb2 ve SOS gibi araçlarla RAS'ı aktive eder. Bu RAF proteinlerinin aktivasyonuna ve o da sırasıyla MEK ve ERK'in aktivasyonuna neden olur. Aktive edilmiş ERK, birkaç nükleer transkripsiyon faktörünün (Fos, Myc, Elk) fosforile ederek veya diğer hücre içi sinyal moleküllerini (RSK) hedefleyerek dolaylı olarak gen ekspresyonunu düzenler. Kanserde yapısal ERK aktivasyonu, RAS veya BRAF'daki mutasyonlardan ve overekspresyonlarından ya da bunları aktive eden tirozin kinaz reseptörlerinin mutasyonlarından kaynaklanabilir. ERK aktivasyonu, Sprouty ve dual özgüllük fosfatazları (DUSPs) yoluyla negatif geri bildirim döngülerinin indüklenmesi ile ilişkilidir. Sprouty negatif olarak RAS sinyalini düzenler ve RAF üzerinde direkt inhibitör etkilere sahip olabilir. DUSPs, ERK'i defosforile eden MAPK fosfatazlarıdır. RAS, RAF dışındaki efektör moleküllerini de aktive eder. Bunlara PI3K protein kinaz ailesinin üyeleri ve RalGDS dahildir. (MEK - mitojenle aktive protein kinaz ekstraselüler sinyal regüle eden kinaz; ERK - ekstraselüler sinyal regüle eden kinaz; Grb2 - büyüme faktörü-reseptör bağlı-2; SOS – Son-of-sevenless; DUSPs dual özgüllük fosfatazlar; RalGDS – Ral guanin nükleotid ayrışma uyarıcısı; PI3K - Phosphoinositide 3-kinaz) (56).

En yaygın BRAF mutasyonu, 1799 pozisyonundaki bir T> A transversiyonuna karşılık gelir ve protein Valin'in 600 pozisyonundaki Glutamate ile yer değiştirmesidir. Aktive edilmiş BRAF proteinleri, MEK1 ve 2'yi fosforile eder ve aktive eder; bu da, ERK1 ve 2'yi fosforile eder ve etkinleştirir. Bunlar, Ets-1, c-Jun ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere çeşitli sitoplazmik ve nükleer hedefleri

fosforile eder. Maligniteye ilerlemesi için ek genetik olayların edinilmesini gerekir (Şekil 2.3) (61).

BRAF mutasyonlarının saptanması için kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Bu teknikler, ilgilenilen geni yükseltmek için polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanır ve daha sonra numuneyi analiz eder (62).

Moleküler genotipleme temelli çeşitli teknikler halen formalin-tespitli parafine gömülü örneklerde bu mutasyonları saptamak için kullanılmaktadır, ancak bunlar uzmanlaşmış platformlar gerektirir. Capper ve arkadaşlarının MM hastalarında bu mutasyonu tanımlamak için oldukça hassas ve spesifik olduğunu ispatladıkları ilk BRAF V600E'ye özgü antikoru (VE1) geliştirdi (62). BRAFV600E mutasyonu olan MM'larda oldukça yüksek sensitif ve spesifik, BRAFV600 mutasyonlarının% 80'inden fazlasını temsil eden BRAFV600E proteinine karşı bir fare monoklonal antikoru (VE1 klonu) üretilmesi büyük önem taşımaktadır (59, 63, 64).

2.4.2. CD271

CD271 (p75), tümör Nekroz Faktörü reseptörünün (TNFR) transmembran protein süperailisinin on altıncı üyesi olup düşük afiniteli sinir büyüme faktör reseptörüdür (17, 18, 65). Sinir büyüme faktörünün (NGF) işlevsel yüksek afiniteli reseptör tirozin kinaz A'ya bağlanmasını sağlar. NGF'nün büyüme, apoptoz ve sinir sisteminin işlevinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Normal dokulardaki CD271'in, özellikle de sinir dışı mezenkimal dokularda ekspresyonu, tam olarak anlaşılamamıştır. Dahası, nöral veya santral sinir sistemi ile ilgili tümörlerde CD271 ekspresyonu üzerine yapılan incelemeler değişken, yani nöroblastom, feokromositoma ve Ewing sarkomunda da CD271 ekspresyonu olmuştur. Son olarak, rabdomyosarkom ya da dermatofibrosarkom protuberans gibi bazı sinir tümörü dışındaki mezenkimal tümörlerde CD271'in ekspresyonu bilinirken başka tümörlerde tam olarak araştırılmamıştır (66, 67).

CD271, gelişmekte olan sinir dokusunda geniş ölçüde eksprese edilmektedir. Bununla birlikte, yetişkinlerde, santral sinir sistemi ekspresyonu, koku glia ve serebellar Purkinje nöronları gibi birkaç sınırlı hücre popülasyonu ile sınırlıdır. Periferik sempatik ve duyu nöronlarında farklı seviyelerde reseptör eksprese edilir.

Sinir sistemi dışındaki CD271, mezenkimal kaynaklı myoblastlar ve gelişen mezenkimal dokularda; kıl follikülleri, fibroblastlar, böbrek, akciğer ve testislerde eksprese edilir. Matür hücrelerde, endotel hücrelerinde, perivasküler fibroblastlarda, diş pulpa hücrelerinde, prostat epitel hücrelerinde ve immün B hücrelerinde bulunur (17).

CD271'in yaygın olarak apoptotik yolu aktive ettiği ve nöronal ve nöronal olmayan dokuların çoğalması, korunması, sağkalımı, korunması ve apoptozisi dahil olmak üzere farklı hücre reaksiyonlarına neden olduğu düşünülmektedir (68).

MM, nöral krest kök hücrelerinin bir türevi olan melanositlerin fenotipik özelliklerine sahiptir. Bu kanserli kök hücreler, kök hücre yüzey belirteci CD133 (bir transmembran glikoprotein), ABCB5 (bir zar nakil proteini), CD166 (aktive edilmiş lökosit adezyon molekülü), Nestin (nöroepitelyal kök hücreler sitoplazmik ara filament) ve SOX2 (Nöral krest kök hücre onarım için transkripsiyon faktörü) ve CD271 (1).

MM'da mevcut tümörögenез ve metastaz anlayışı kanser kök hücre kuramı kavramı üzerine kurulmuştur. Bu model, çeşitli kanserlerin tümörögenез incelemesinin gerekliliğini göstermektedir. Göreceli bir yanlış isim olan "Kanser Kök Hücre", bir tümörün hacminde sürekli kendini yenileme yeteneğine sahip olan ve tümörün tamamında büyük tümör başlatma ve yayılım kapasitesini sunan nispeten yavaş döngülü hücrelerin küçük bir popülasyonunu belirtir (1).

Tümör başlatan hücreler, ana hücrenin tümör başlatma potansiyelini kaybetmiş olan tümör başlatan bir hücrenin ve farklılaşmış kuşağın oluşumuyla sonuçlanan, asimetrik hücre bölünmesiyle kendi kendini yenilemektedirler (65).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Aralık 2010 - Mayıs 2017 tarihleri arasında tanı almış 47 MM olgusu incelendi. Bu olgulara BRAF V600E ve CD271 belirleyicileri uygulandı. Bu belirteçlerin ülser, lenfositik infiltrasyon, pigmentasyon, mitoz, Breslow kalınlığı, metastaz yapıp yapmaması, yaş, cinsiyet ve sağkalım ile ilişkisi araştırıldı.

%10'luk formalin solüsyonu ile tespit edilmiş dokulara ait tüm H&E kesitler arşivden çıkarıldı. Bunlar incelenerek uygun MM odaklarını içeren kesitler belirlendi. Seçilen kesitlere ait rutin doku takibi ile hazırlanmış parafin bloklar tespit edildi.

Bu parafin bloklardan Poly-L-Lysine ile kaplı lamalara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere avidin-biyotin peroksidaz İHK'sal yöntemi ile BRAF V600E (Ventana, Mouse Monoclonal Antibody, clone VE1, kullanıma hazır form), CD271 (LSBio, Rabbit Monoclonal Antibody, clone EP1039Y, 1:100) yapıldı.

İmmunhistokimyasal boyama yöntemi

Boyama işlemi nemlendirilmiş, oda sıcaklığı 27 °C'ye kadar çıkarılmış, ıslak zeminli bir ortamda uygulandı. Sonra sırasıyla aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- Formalinle fikse edilen ve parafine gömülü bloklardan 5 µm kalınlığında hazırlanan doku kesitleri 65°C'de en az 90 dakika etüvde bekletildikten sonra ksilene alınarak 30 dakika süreyle 65°C'de etüvde tekrar deparafinize edildi.
- Bu işlemden sonra kesitler %96'lık alkolde 5 dakika bekletildi. Beş dakikanın sonunda 1 dakika distile suda yıkandı. Bu işlem 5 defa tekrarlandı. Sonra kesitler tekrar %99'luk alkolde 5 dakika bekletilerek dehidrate edildi.
- Dehidratasyondan sonra 5 dakika distile suda tutulan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırabilmek için oda ısısında 10 dakika hidrojen peroksit ile inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı.

- Dokudaki antijenleri ortaya çıkarabilmek için kesitler mutfak tipi, 3 kademeli + mikrodalga fırında; BRAF V600E ve CD271 antikoru kaynatma solüsyonu pH değeri 8.4 olan EDTA tamponu kullanılarak 3. kademedede 35 dakika kaynatıldı.
- Kesitler 20 dakika aynı solüsyonlar içerisinde oda ısısında tutularak soğumaya bırakıldı.
- Soğutulan kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı.
- Kesitler tekrar PBS solüsyonuna alınarak 5 dakika yıkandı.
- Daha sonra içerisine ılık su konulan ağzı kapanan tablaya alınan kesitlere Ultra-V blok damlatılarak 15 dakika inkübasyon uygulandı.
- Tablanın ağzı açılarak preparatlar üzerine kullanıma hazır solüsyonları olan antikorlardan damlatılıp 90 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra kesitler 5 dakika PBS solüsyonunda yıkandı.
- Kesitler tekrar içerisinde ılık su bulunan ağzı kapanan tablaya alınarak bağlayıcı solüsyon (Link) ile 15 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı.
- Kesitler tekrar 5 dakika PBS solüsyonunda yıkandı.
- Kesitler tablaya alınarak Streptavidin-Peroksidaz (Label) ile 15 dakika inkübe edildi.
- Kesitler tekrar 5 dakika PBS'de yıkandı.
- Son olarak substrat kromojen karışımı ile renklendirme işlemi yapıldı. Bunun için bir damla AEC (3-amino-9-ethylcarbozole) kromojen ve 2 ml H₂O₂'li substrat tamponu karışımından oluşan dilüsyon ile hazırlanan solüsyonla kesitler 10 dakika inkübe edildi.
- Kesitler tekrar 5 dakika PBS'de yıkandı.
- Zıt boyama için kesitlere 45 saniye süre ile Haris Hematoksilen'in kullanıma hazır formu uygulandı.
- Kesitler distile sudan geçirildi.

- Etüvde bekletilmek suretiyle dokudan suyun arındırılması sağlandı.
- Son olarak kesitler immun mount kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Değerlendirme

Çalışmadaki histolojik değerlendirmede olgulara ait bütün H&E boyalı preparatlar, ışık mikroskopunda incelendi.

Olgulara ait klinik bilgiler patoloji ve onkoloji rapor arşivinden elde edildi.

Breslow kalınlığı da aynı mikroskopta mikrometre ile, ≤ 1 mm, 1.01–2.0 mm, 2.01–4.0 mm ve >4 mm olarak sınıflandırıldı.

Ülser var ya da yok olarak belirtildi.

Mitoz sayısı mm^2 'de belirtildi.

Pigmentasyon var ya da yok olarak belirtildi.

Lenfositik infiltrasyon var ya da yok belirtildi.

Her bir İHK'sal boya için eksternal kontrol preparatları hazırlandı.

BRAF V600E ekspresyonu değerlendirilirken, sitoplazmik boyanma esas alındı. Boyanmanın en yüksek olduğu alan belirlenerek yüzde oranı verildi. Boyanma yüzde ve şiddet olarak gruplara ayrıldı. Şiddet olarak 0, 1+ (zayıf pozitif) , 2+ (orta şiddette pozitif) , 3+ (kuvvetli pozitif) yüzde olarak $<10\%$, $10\text{--}50\%$, $>50\%$ şeklinde değerlendirildi (13).

CD271 ekspresyonu değerlendirilirken, sitoplazmik boyanma esas alındı. Boyanmanın en yüksek olduğu alan belirlenerek yüzde oranı verildi. Boyanma yüzde ve şiddet olarak gruplara ayrıldı. Şiddet olarak 0, 1+ (zayıf pozitif) , 2+ (orta şiddette pozitif) , 3+ (kuvvetli pozitif) yüzde olarak $<10\%$, $10\text{--}50\%$, $>50\%$ şeklinde değerlendirildi (69).

İstatistiksel değerlendirme

Çalışmanın verileri SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, II, America) programına yüklendi. Verilerin değerlendirilmesinde 2x2 düzenlerde Ki-kare, çok gözlü düzenlerde Ki-kare testi, Kaplan-Meier analizi kullanıldı. Verilerimiz tablolarda olgu sayısı ve yüzdesi şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için gerekli etik kurul onayı, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’da 28.09.2016 tarihinde 154 karar no’ lu rapor ile alındı.



4. BULGULAR

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Aralık 2010 - Mayıs 2017 tarihleri arasında tanı almış 47 Malign Melanom olgusu incelendi.

Primer MM'u olan bireylerin yaşları 35-93 arasında değişmekte olup ortalama $64,12 \pm 20,35$, metastatik MM grubundaki bireylerin yaşları 35-89 arasında değişmekte olup ortalama $69 \pm 13,42$ idi. Yaş yönünden iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0,310$; $p<0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Primer ve metastatik MM'larda cinsiyet ve yaş karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n=17	Metastatik MM n=30	P değeri
Cinsiyet			0,760
Kadın (%)	7 (%41,1)	11 (%36,6)	
Erkek (%)	10 (%58,9)	19 (%62,4)	
Yaş			0,310
ortalama	64,12	69	
ortanca	59	71,5	

Primer MM'u olan bireylerin 10'u (%58,9) erkek, 7'si (%41,1) kadın, metastatik MM grubundaki bireylerin 19'u (%62,4) erkek, 11'i (%36,6) kadın olup cinsiyet yönünden gruplar arası fark anlamlı bulunmadı ($p:0,760$; $p<0,05$) (Tablo 4.1.).

Primer MM'lu hastaların 1'i (%5,8) Evre 1A, 1'i (%5,8) Evre 1B, 4'ü (%23,5) Evre 2A, 3'ü (%17,6) Evre 2B, 8'i (%47) Evre 2C bireylerden oluşurken metastatik MM'lu bireylerin 9'u (%30) Evre 3 iken, 21'i (%70) Evre 4'ten oluşmaktaydı (Bu parametrede Khi- kare dağılışı ile ilgili varsayımlar yerine getirilemediğinden test istatistiğine ait sonuçlar verilememiş ve yüzdeler ile açıklanmıştır).

Ülser: Primer MM'larda 7 olguda (%41,2) ülser bulunmazken, 10 olguda (%58,8) ülser görüldü. Metastatik MM'larda 0 olguda (%0) ülser bulunmazken, 11 olgunun tamamında (%100) ülser görüldü. Primer ve metastatik MM'lar, ülser

yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,000$; $p<0,05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Primer ve metastatik MM'larda ülser varlığı karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n= 17 (%)	Metastatik MM n=11 (%)	P değeri
Ülser			0,000
Var	10 (%58,8)	11 (%100)	
Yok	7 (% 41,2)	0 (% 0)	

Mitoz: Primer MM'larda $<2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 2 (%11,8), $\geq 2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 15 (%88,2) saptandı. Metastatik MM'larda $<2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 0 (%0), $\geq 2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 11 (%100) olgu bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM'lar mitoz yönünden karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı pozitif doğrusal bir ilişki vardır ($p:0,02$; $p<0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Primer ve metastatik MM'larda mm^2 'de mitoz sayısı karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n= 17 (%)	Metastatik MM n=11 (%)	P değeri
Mitoz			0,02
$< 2/ \text{mm}^2$	2 (% 11,8)	0 (% 0)	
$\geq 2/ \text{mm}^2$	15 (% 88,2)	11 (% 100)	

Breslow kalınlığı: Primer MM'larda Breslow kalınlığı $< 1.0 \text{ mm}$ olan 2 olgu (%11,8), $1.01-2.0 \text{ mm}$ olan ve $2.01-4.0 \text{ mm}$ olan 3'er olgu (%17,6) ve $> 4 \text{ mm}$ olan 9 olgu (%52,9) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda ise $\leq 1.0 \text{ mm}$ olan 0 olgu (%0), $1.01-2.0 \text{ mm}$ ve $2.01-4.0 \text{ mm}$ olan 1'er olgu (%10) ve $> 4 \text{ mm}$ olan 8 olgu (%80) bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda, Breslow kalınlığı yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0,358$; $p<0,05$) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Primer ve metastatik MM’larda Breslow kalınlığı karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n= 17 (%)	Metastatik MM n=11 (%)	P değeri
Breslow			0,358
≤ 1 mm	2 (% 11,8)	0 (% 0)	
1,01 – 2 mm	3 (% 17,6)	1 (% 9)	
2,01 – 4 mm	3 (% 17,6)	1 (% 9)	
≥4 mm	9 (% 52,9)	9 (% 82)	

Lenfositik infiltrasyon: Primer MM’larda lenfositik infiltrasyon yapan 5 olgu (%29,4), lenfositik infiltrasyon yapmayan 12 olgu (%70,6) bulunmaktaydı. Metastatik MM’larda lenfositik infiltrasyon yapan 3 olgu (%30) lenfositik infiltrasyon yapmayan 7 olgu (%70) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM’larda lenfositik infiltrasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,974; p<0,05) (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Primer ve metastatik MM’larda lenfositik infiltrasyon varlığı karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n= 17 (%)	Metastatik MM n=11 (%)	P değeri
Lenfositik İnfiltrasyon			0,507
Var	5 (%29,4)	4 (% 36)	
Yok	12 (%70,6)	7 (% 64)	

Pigmentasyon: Primer MM’larda pigmentasyon olan 4 olgu (%23,5), pigmentasyon olmayan 13 olgu (%76,5) bulunmaktaydı. Metastatik MM’larda ise pigmentasyon olan 4 olgu (%36), pigmentasyon olmayan 7 olgu (%64) bulunmaktaydı. Primer MM’larda ve metastatik MM’larda pigmentasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,376; p<0,05) (Tablo 46.).

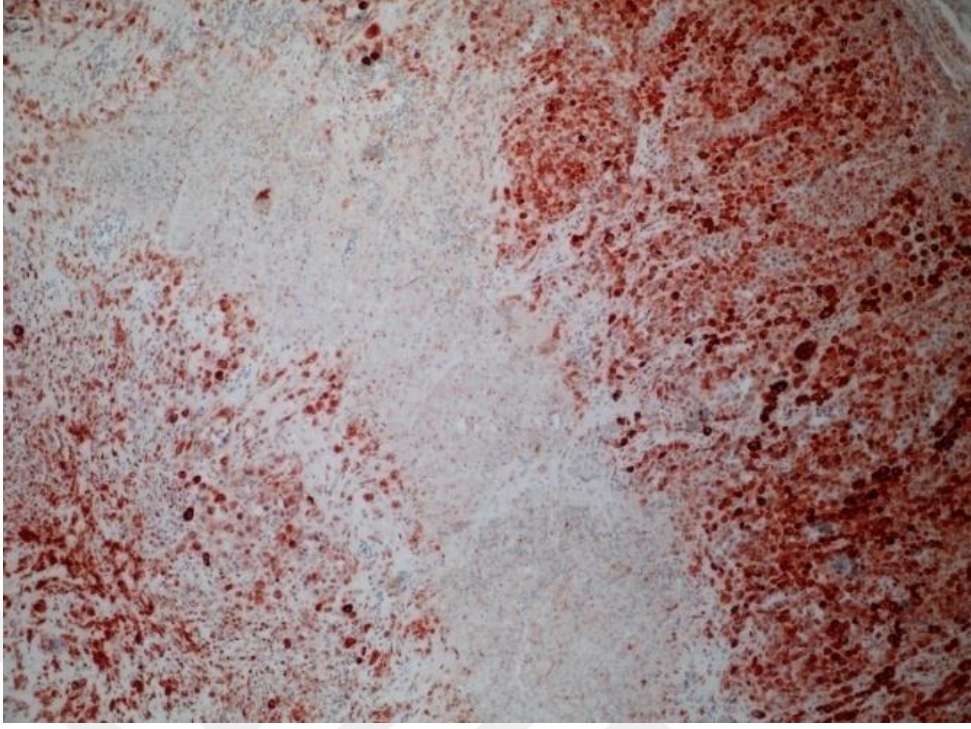
Tablo 4.6. Primer ve metastatik MM'larda pigmentasyon varlığı karşılaştırılması

Özellikler	Primer MM n= 17 (%)	Metastatik MM n=11 (%)	P değeri
Pigmentasyon			0,376
Var	4 (% 23,5)	4 (% 36)	
Yok	13 (% 76,5)	7 (%64)	

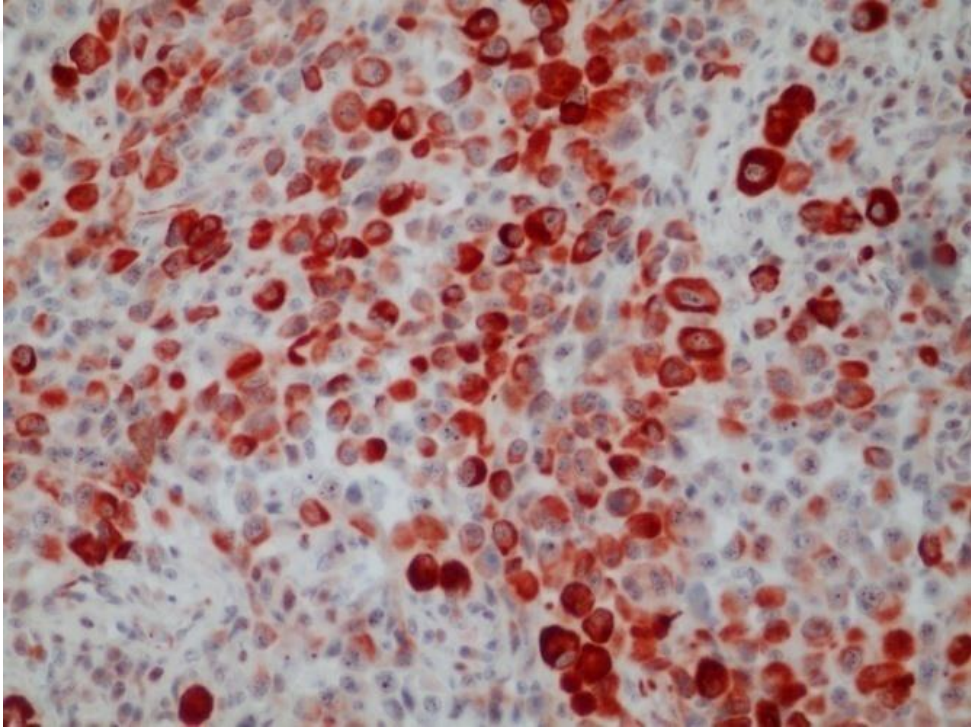
BRAF V600E ekspresyonu: Primer MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti negatif olan 4 olgu (%23,5), 1+ olan 3 olgu (%17,6), 2+ olan 6 olgu (%35,3), 3+ olan 4 olgu (%23,5) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti 0 olan 9 olgu (%30), 1+ olan 7 olgu (%23,3), 2+ olan 6 olgu (%20), 3+ olan 8 olgu (%26,6) bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,803; p<0.05) (Tablo 4.7) (Resim 4. 1, Resim 4. 2, Resim 4.3, Resim 4.4).

Tablo 4.7. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyon şiddeti karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n=17 (%)	Metastatik MM n=30 (%)	P değeri
BRAF V600E ekspresyon şiddeti (puan)			0,803
Negatif (0)	4 (% 23,5)	9 (% 30)	
1+ (1)	3 (% 17,6)	7 (% 23,3)	
2+ (2)	6 (% 35,3)	6 (%20)	
3+ (3)	4 (% 23,5)	8 (% 26,6)	



Resim 4.1. Metastatik lenf nodunda 3+ BRAF V600E boyanması (H&E x100)



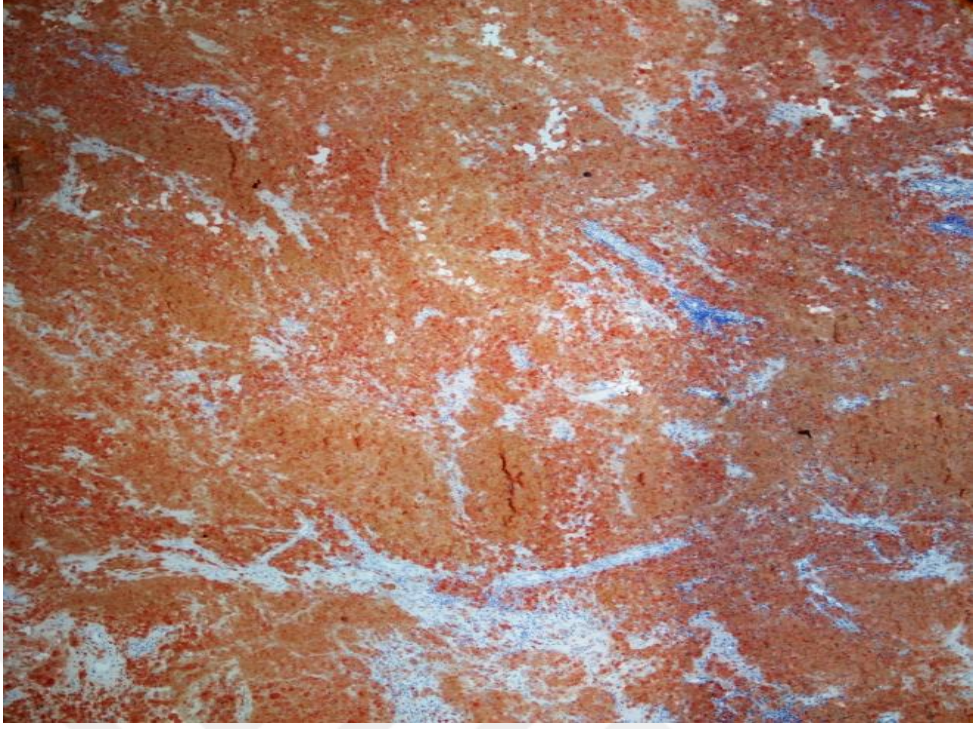
Resim 4.2. Metastatik lenf nodunda 3+ BRAF V600E boyanması (H&E x400)

Primer MM'larda BRAF V600E ekspresyon yüzdesi negatif olan 4 olgu (%23,5), <%10 olan 0 olgu (%0), %10-50 olan 3 olgu (%17,6), >%50 olan 10 olgu (%58,8) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu yüzdesi % 0 olan 9 (%30), <%10 olan 2 (%6,6), %10-50 olan 6 (%20), >%50 olan 13 (%43,3) olgu bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu yüzdesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,602$; $p<0,05$) (Tablo 4.8.).

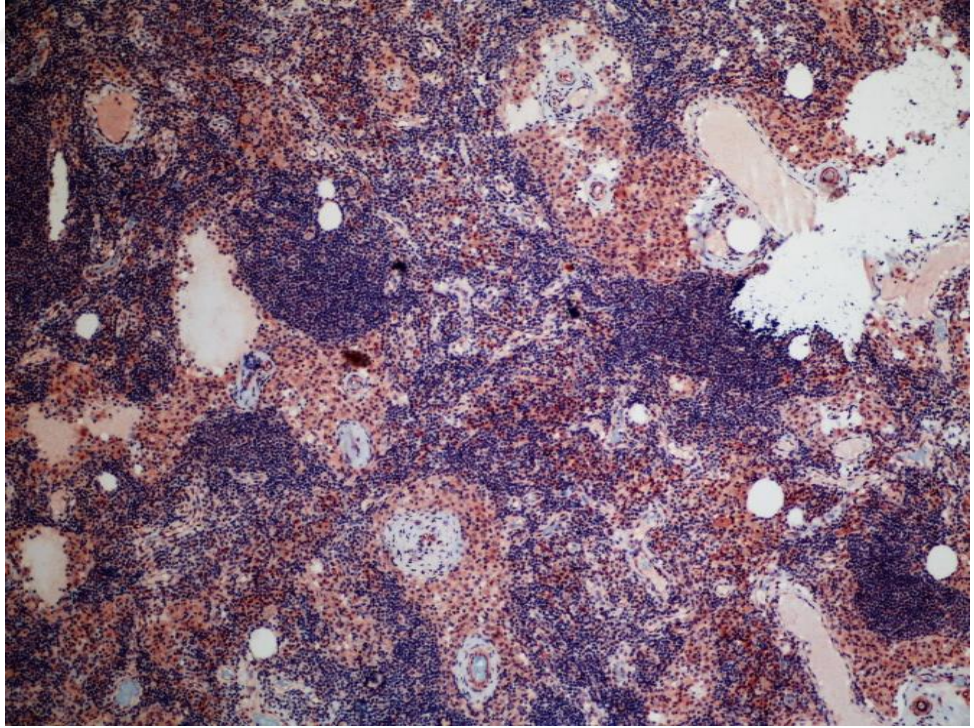
Tablo 4.8. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyon yüzdesi karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n=17 (%)	Metastatik MM n=30 (%)	P değeri
BRAF ekspresyon yüzdesi (puan)			0,602
Negatif (0)	4 (% 23,5)	9 (% 30)	
<10 (1)	0 (% 0)	2 (% 6,6)	
10-50 (2)	3 (% 17,6)	6 (% 20)	
>50 (3)	10 (%58,8)	13 (% 43,3)	

Primer ve metastatik MM'larda her olguda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti (negatif, 1+, 2+, 3+ ve CD271) ekspresyonu yüzdesi (negatif, <%10, %10-50, >%50) sırasıyla 0, 1, 2, 3 şeklinde puanlanmıştır. Her olgu kendi içinde puanları toplanarak istatistiksel olarak bakılmıştır. Primer MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 4 olgu (%23,5), 2 olan 0 olgu (%0), 3 olan 2 olgu (% 11,8), 4 olan 1 olgu (% 5,9), 5 olan 7 olgu (%41,1), 6 olan 3 olgu (%17,6) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 8 olgu (%26,7), 2 olan 1 olgu (%3,3), 3 olan 2 olgu (%6,6), 4 olan 8 olgu (%26,7), 5 olan 7 olgu (%23,3), 6 olan 4 olgu (%13,3) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puan açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,456$; $p<0,05$) (Tablo 4.9).



Resim 4.3. Metastatik lenf nodunda 2+ BRAF V600E boyanması (H&E x40)



Resim 4.4. Metastatik lenf nodunda 1+ BRAF V600E boyanması (H&E x40)

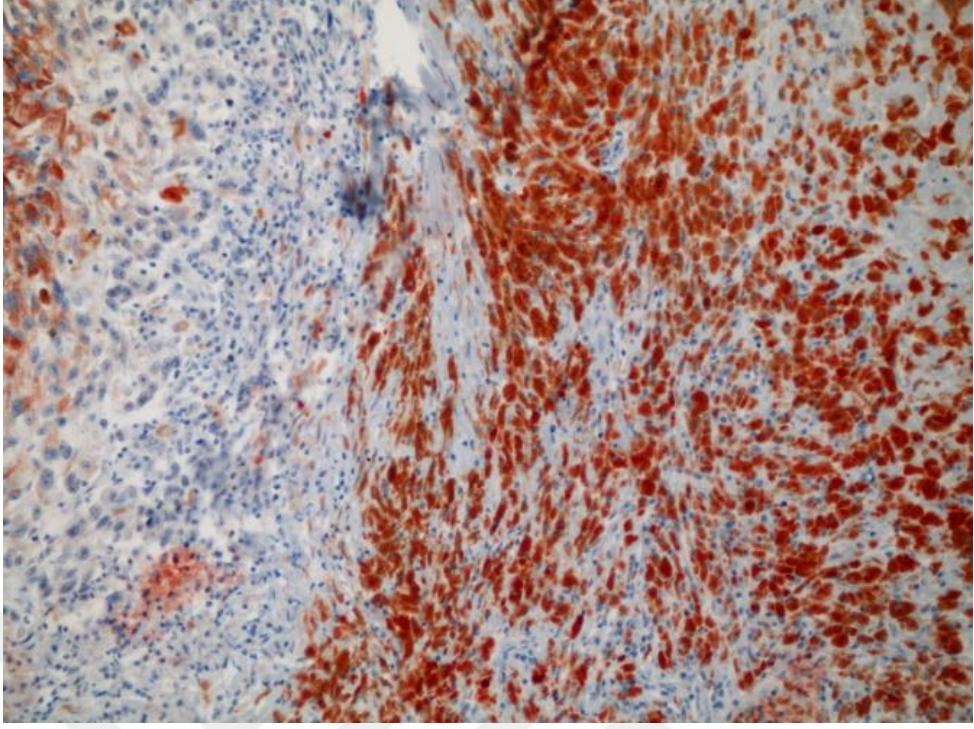
Tablo 4.9. Primer ve metastatik MM’larda BRAF V600E ekspresyon şiddeti ve yüzdesi toplam puan karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n=17 (%)	Metastatik MM n=30 (%)	P değeri
BRAF ekspresyon şiddeti ve yüzdesi toplam puan			0,456
0	4 (% 23,5)	8 (% 26,7)	
2	0 (% 0)	1 (% 3,3)	
3	2 (% 11,8)	2 (% 6,6)	
4	1 (% 5,9)	8 (% 26,7)	
5	7 (% 41,1)	7 (% 23,3)	
6	3 (% 17,6)	4 (% 13,3)	

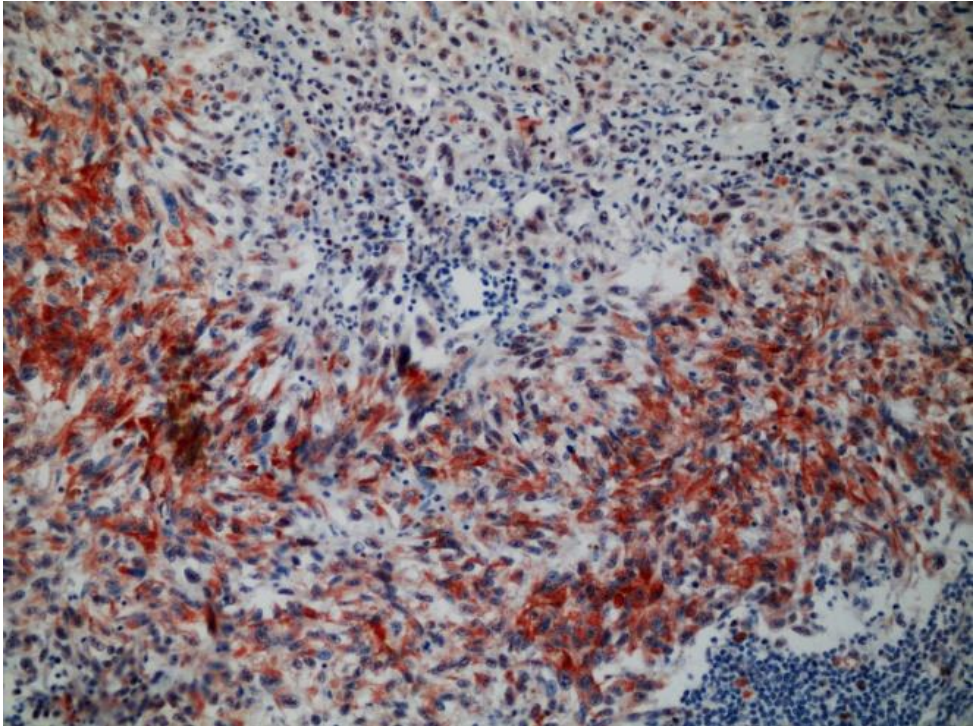
CD271 ekspresyonu: Primer MM’larda CD271 ekspresyonu şiddeti negatif olan 1 olgu (%5,9), 1+ olan 1 olgu (%5,9), 2+ olan 5 olgu (%29,4), 3+ olan 10 olgu (%58,8) bulunmaktaydı. Metastatik MM’larda CD271 ekspresyonu şiddeti 0 olan 2 olgu (%6,6), 1+ olan 3 olgu (%10), 2+ olan 4 olgu (%13,3), 3+ olan 21 olgu (%70) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM’larda CD271 ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,837; p<0.05) (Tablo 4.10) (Resim 4.5, Resim 4.6, Resim 4.7, Resim 4.8).

Tablo 4.10. Primer ve metastatik MM’larda CD271 ekspresyon şiddeti karşılaştırılması.

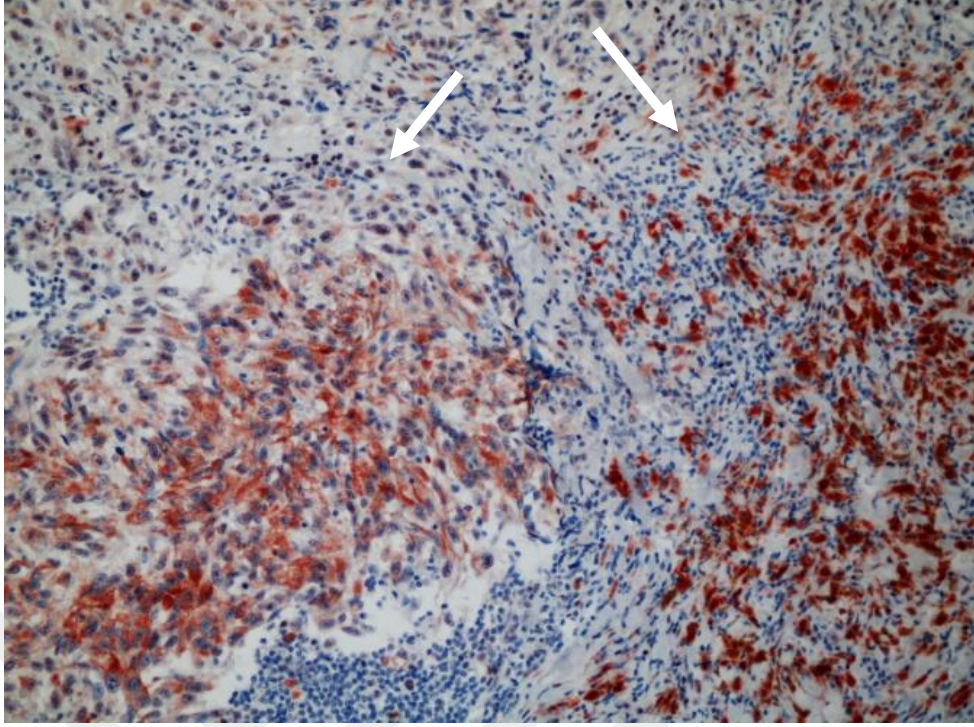
Özellikler	Primer MM n=17 (%)	Metastatik MM n=30 (%)	P değeri
CD271 ekspresyon şiddeti (puan)			0,837
Negatif (0)	1 (% 5,9)	2 (% 6,6)	
1+ (1)	1 (% 5,9)	3 (% 10)	
2+ (2)	5 (% 29,4)	4 (% 13,3)	
3 +(3)	10 (% 58,8)	21 (% 70)	



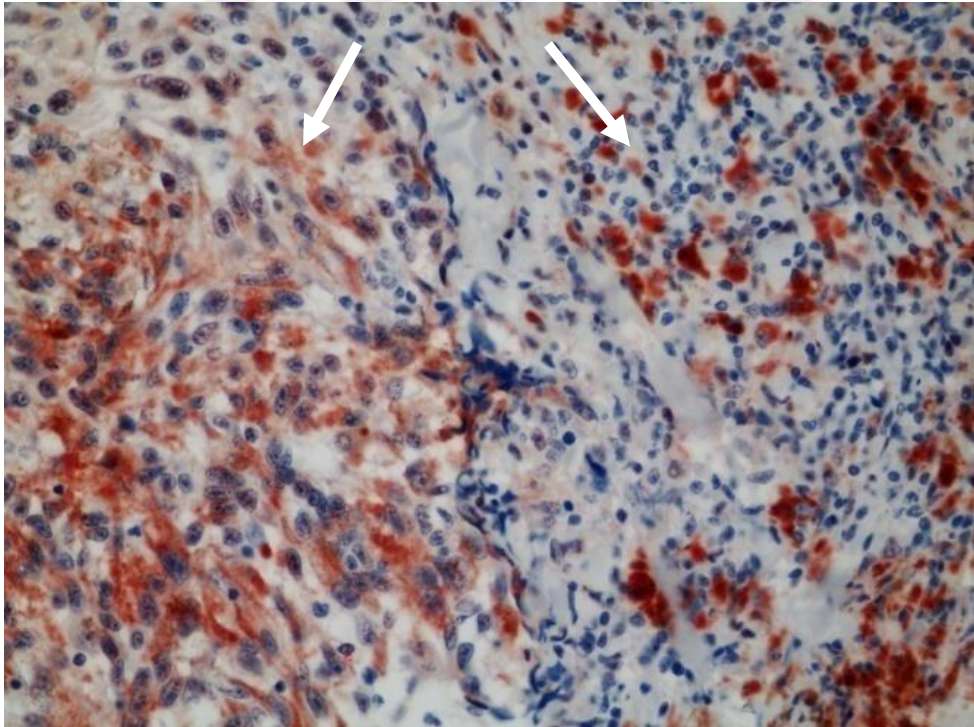
Resim 4.5. Metastatik lenf nodunda 3+ CD 271 boyanması (H&E x100)



Resim 4.6. Metastatik lenf nodunda 2+ CD 271 boyanması (H&E x100)



Resim 4.7. Metastatik lenf nodunda 2+ (soldaki ok), 3+ (sağdaki ok) CD 271 boyanması (H&E x100)



Resim 4.8. Metastatik lenf nodunda 2+ (soldaki ok) 3+ (sağdaki ok) CD 271 boyanması (H&E x400)

Primer MM'larda CD271 ekspresyon yüzdesi negatif olan 1 olgu (%5,9), <%10 olan 3 olgu (%17,6), %10-50 olan 6 olgu (%35,3), >%50 olan 7 olgu (%41,2) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu yüzdesi %0 olan 2 olgu (%6,6), <%10 olan 3 olgu (%10), %10-50 olan 4 olgu (%13,3), >%50 olan 21 olgu (%70)olgu bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu yüzdesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,214; p<0,05) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Primer ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyon yüzdesi karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n=17 (%)	Metastatik MM n=30 (%)	P değeri
CD271 ekspresyon yüzdesi (puan)			0,214
Negatif (0)	1 (% 5,9)	2 (% 6,6)	
<10 (1)	3 (%17,6)	3 (% 10)	
10-50 (2)	6 (% 35,3)	4 (% 13,3)	
>50 (3)	7 (%41,2)	21 (%70)	

Primer ve metastatik MM'larda her olguda CD271 ekspresyonu şiddeti (negatif, 1+, 2+, 3+ ve CD271) ekspresyonu yüzdesi (negatif, <%10, %10-50, >%50) sırasıyla 0, 1, 2, 3 şeklinde puanlanmıştır. Her olgu kendi içinde puanları toplanarak istatistiksel olarak bakılmıştır. Primer MM'larda CD271 ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 1 olgu (%5,9), 2 olan 0 olgu (%0), 3 olan 2 olgu (% 11,8), 4 olan 4 olgu (% 23,5), 5 olan 5 olgu (%29,4), 6 olan 5 olgu (%29,4) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 2 olgu (%6,6) , 2 olan 1 olgu (%3,3), 3 olan 1 olgu (%3,3), 4 olan 5 olgu (%16,6), 5 olan 3 olgu (%10), 6 olan 18 olgu (%60) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puan açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,258; p<0.05) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Primer ve metastatik MM’larda CD271 ekspresyon şiddeti ve yüzdesi toplam puan karşılaştırılması.

Özellikler	Primer MM n=17 (%)	Metastatik MM n=30 (%)	P değeri
CD271 ekspresyon şiddeti ve yüzdesi toplam puan			0,258
0	1 (% 5,9)	2 (% 6,6)	
2	0 (% 0)	1 (% 3,3)	
3	2 (% 11,8)	1 (% 3,3)	
4	4 (% 23,5)	5 (% 16,6)	
5	5 (% 29,4)	3 (% 10)	
6	5 (% 29,4)	18 (% 60)	

Sağkalım Analizleri:

Olguların tanı anından bugüne kadar izlemleri incelendi. Primer MM’u olan bireylerin 1-51 ay arasında izlendiği bunlarında 3’ünün (%17,6) bu sırada ölen olduğu metastatik MM’lu bireylerin 1-77 ay arasında izlendiği bunların 7’sinde (% 23,3) ölüm olduğu görüldü.

Primer MM’lu ölüm olan 3 bireyin hepsi tanı anında evre 2c olarak değerlendirilirken metastatik MM’lu ölüm olan bireylerin 5’i (%71,4) Evre 3, 2’si (%28,5) Evre 4 olarak değerlendirildi. Sağkalım ilişkileri Kaplan-Meier Analizi ile değerlendirildi. Cinsiyet, ülser, mitoz, pigmentasyon, lenfositik infiltrasyon, Breslow kalınlığı, BRAF V600E ekspresyon şiddeti, BRAF V600E ekspresyon yüzdesi, CD271 ekspresyon şiddeti, CD271 ekspresyon yüzdesinin puan olarak değeri sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi.

Kadınların 6’sı (%60), erkeklerin 4’ünde (%40) ölüm olmuştur. Kadın ve erkekler arasında sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,765; %95 CI:24,512-34,724 p<0,05) (Tablo 4.13.).

Breslow kalınlığı ≤ 1.0 mm olan 3 olgu, 1.01–2.0 mm olan 3 olgu ve 2.01–4.0 mm olan 4 olgunun hiçbirinde ölen olmazken ≥ 4 mm olan 18 olguda 5 olguda (%27,8) ölüm olmuştur. Breslow kalınlığı ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,000; %95 CI: 24,512- 34,724; p<0,05) (Tablo 4.13.).

Ülser olan olguların 5'i (%23,8) ölüm olurken ülser olmayan olgularda ölen yoktur. Ülser ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,02$; %95 CI: 24,512- 34,724; $p<0,05$) (Tablo 4.13.).

Pigmentasyon olan olguların 1'inde (%12,5) ölüm olurken pigmentasyon olmayan olguların 4'ünde (%20) ölüm olmuştur. Pigmentasyon ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0,02$; %95 CI: 24,512- 34,724; $p<0,05$) (Tablo 4.13.).

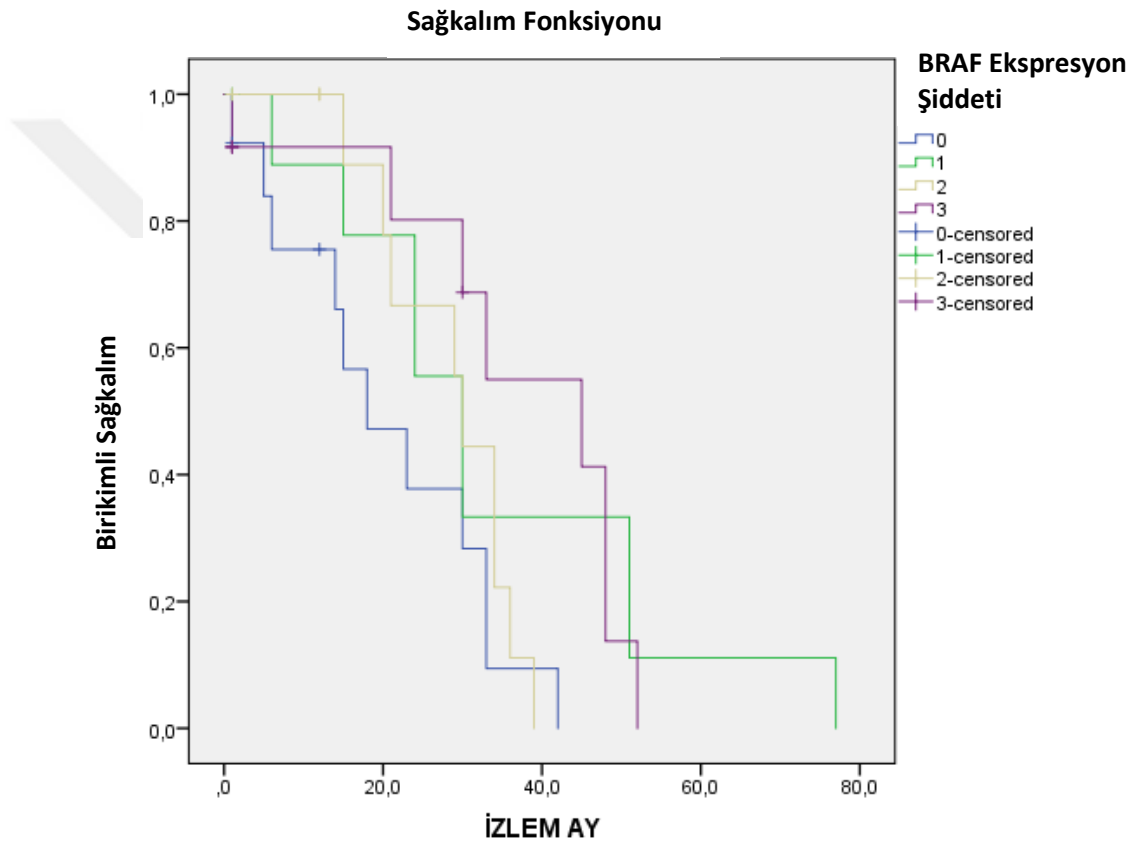
Tablo 4.13. Çok değişkenli sağkalım analizi (cinsiyet, Breslow kalınlığı, ülser, pigmentasyon) Kaplan-Meier sağkalım analizi.

Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
Cinsiyet			0,765
Kadın	18	22,86 – 35,47	
Erkek	29	22,28 – 36,57	
Breslow kalınlığı			0,000
≤ 1 mm	3		
1,01 – 2 mm	3		
2,01 – 4 mm	4		
≥4 mm	18		
Ülser			0,02
Var	21	16,054-27,664	
Yok	7	31,567-47,290	
Pigmentasyon			0,668
Var	8	6,013-13,239	
Yok	20	3,413-21,354	

BRAF V600E ekspresyon şiddeti 0 (0 puan) olan 13 (%) , 1+ (1puan) olan 10 (%), 2+ (2 puan) olan 12, 3+ (3 puan) olan 12 olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin BRAF V600E ekspresyon şiddetine bakıldığında; şiddeti 0 olan 2 (%15,4), 1+ olan 10 (%10,0), 2+ olan 12 (%25), 3+ olan 12 (%33,3) olgu bulunmaktadır. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,037$; %95 CI: 24,512- 34,724; $p<0,05$) (Tablo 4.14.) (Şekil 4.1.). (%95 CI: Confidence Interval (Güven Aralığı)).

Tablo 4.14. BRAF V600E ekspresyon şiddeti Kaplan-Meier sağkalım analizi.

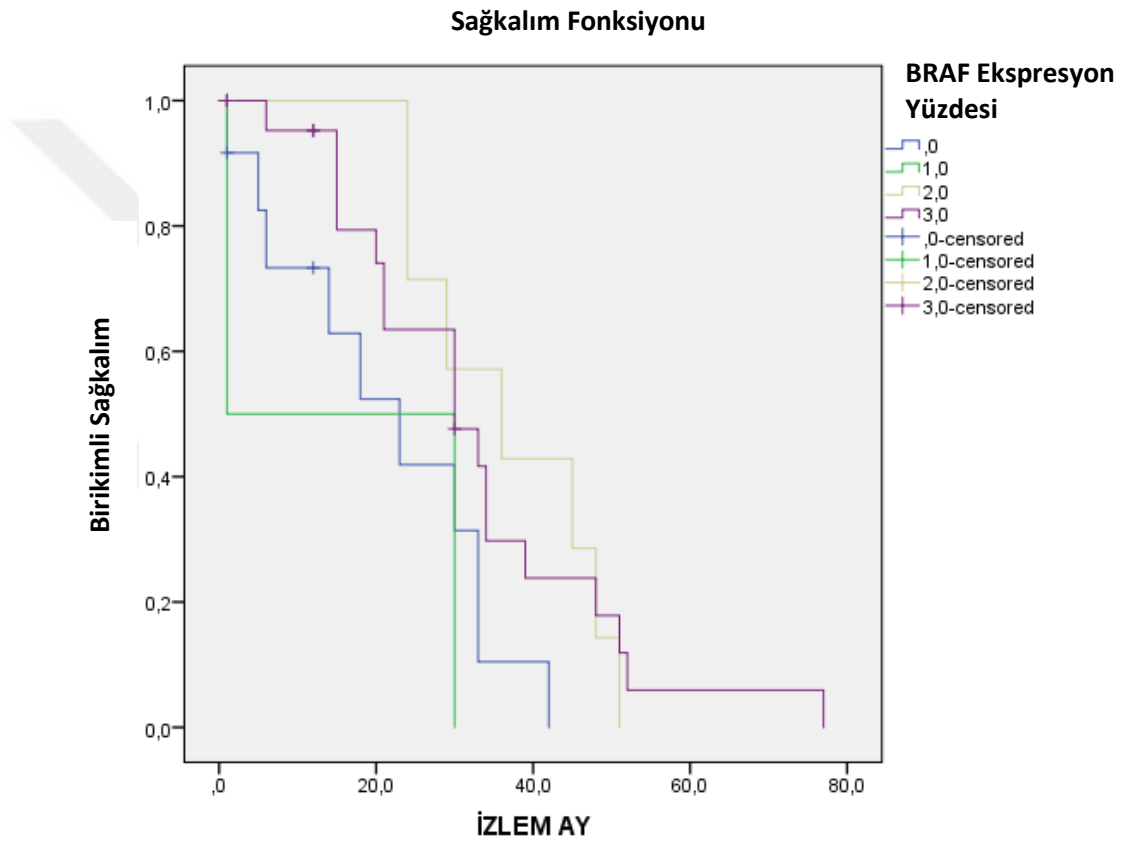
Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
BRAF V600E Ekspresyon Şiddeti			0,037
0 (Negatif)	13	13,04 – 28,22	
1 (1 +)	10	19,97 – 48,46	
2 (2 +)	12	23,29 – 34,03	
3 (3 +)	12	27,12 – 46,82	

**Şekil 4.1.** Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisi.

BRAF V600E ekspresyon yüzdesi %0 (0 puan) olan 13, <%10 (1puan) olan 2, %10-50 (2puan) olan 9, >%50 (3puan) olan 23 olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin BRAF V600E ekspresyon yüzdesine bakıldığında; %0 olan 2 (%16,7), <%10 olan 0 (%0), %10-50 olan 2 (%22,2), >%50 olan 6 (%26,1) bulunmaktadır. BRAF V600E ekspresyon yüzdesi ile sağkalım karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,066; %95 CI: 24,512- 34,724; p<0,05) (Tablo 4.15.) (Şekil4.2.).

Tablo 4.15. BRAF V600E ekspresyon yüzdesi Kaplan-Meier sağkalım analizi

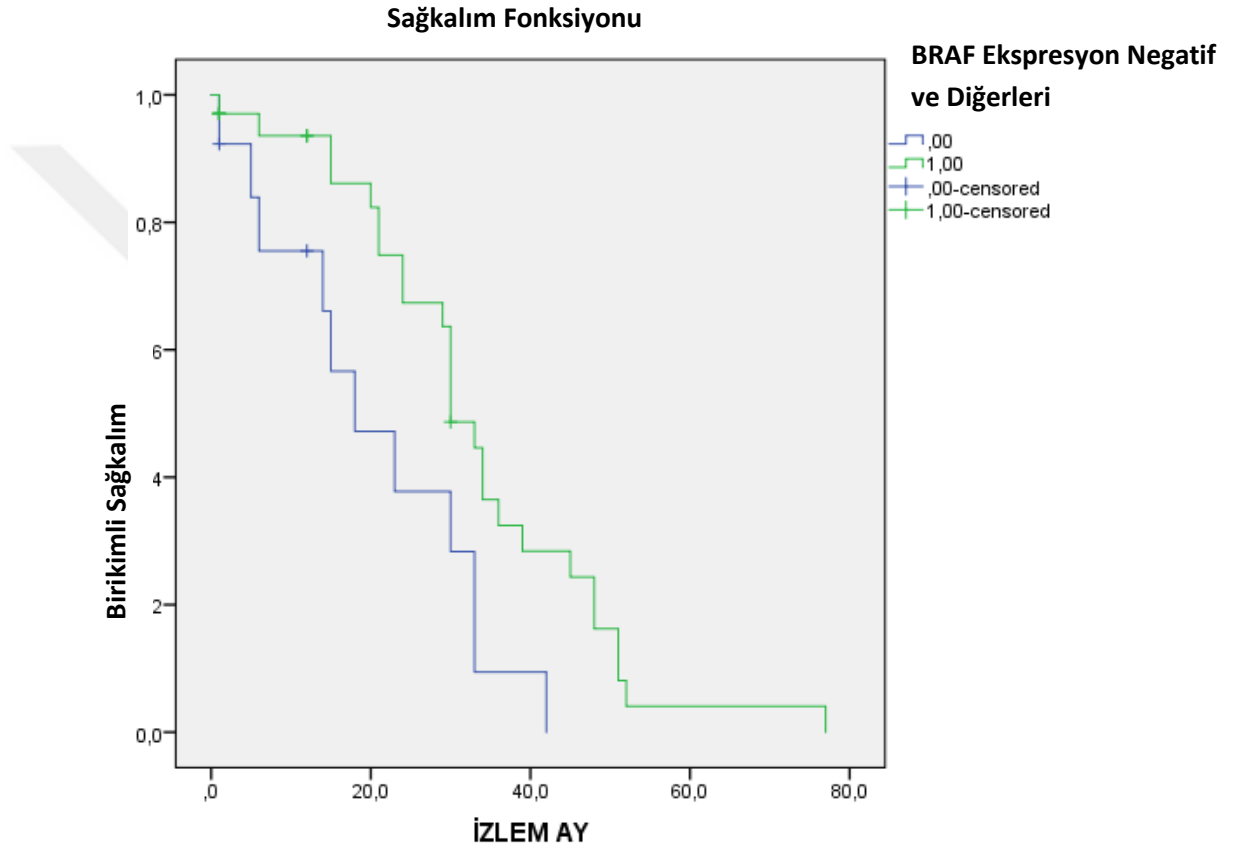
Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
BRAF V600E Ekspresyon Yüzdesi			0,066
0 (Negatif)	13	13,06 – 29,55	
1 (< % 10)	2	0 – 43,92	
2 (% 10 - 50)	9	28,24 – 45,17	
3 (> % 50)	23	24,69 – 40,52	

**Şekil 4.2.** Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon yüzdesi ile sağkalım ilişkisi.

BRAF V600E ekspresyon şiddeti 0 puan olan 13 (%27,6) , 1, 2, 3 puan olan 34 (%72,4) olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin BRAF V600E ekspresyon şiddeti; 0 puan olan 2 (%15,4), 1, 2, 3 puan olan 34 (%23,5) bulunmaktadır. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,012$; %95 CI: 24,512- 34,724; $p<0,05$) (Tablo 4.16.) (Şekil 4.3.).

Tablo 4.16. BRAF V600E ekspresyon şiddeti puanı 0 olanlar ve diğerlerinin Kaplan-Meier sağkalım analizi.

Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
BRAF V600E Ekspresyon Şiddeti Puanı			0,012
0 (Negatif)	13	13,04 – 28,22	
Diğerleri	34	27,20 – 39,35	

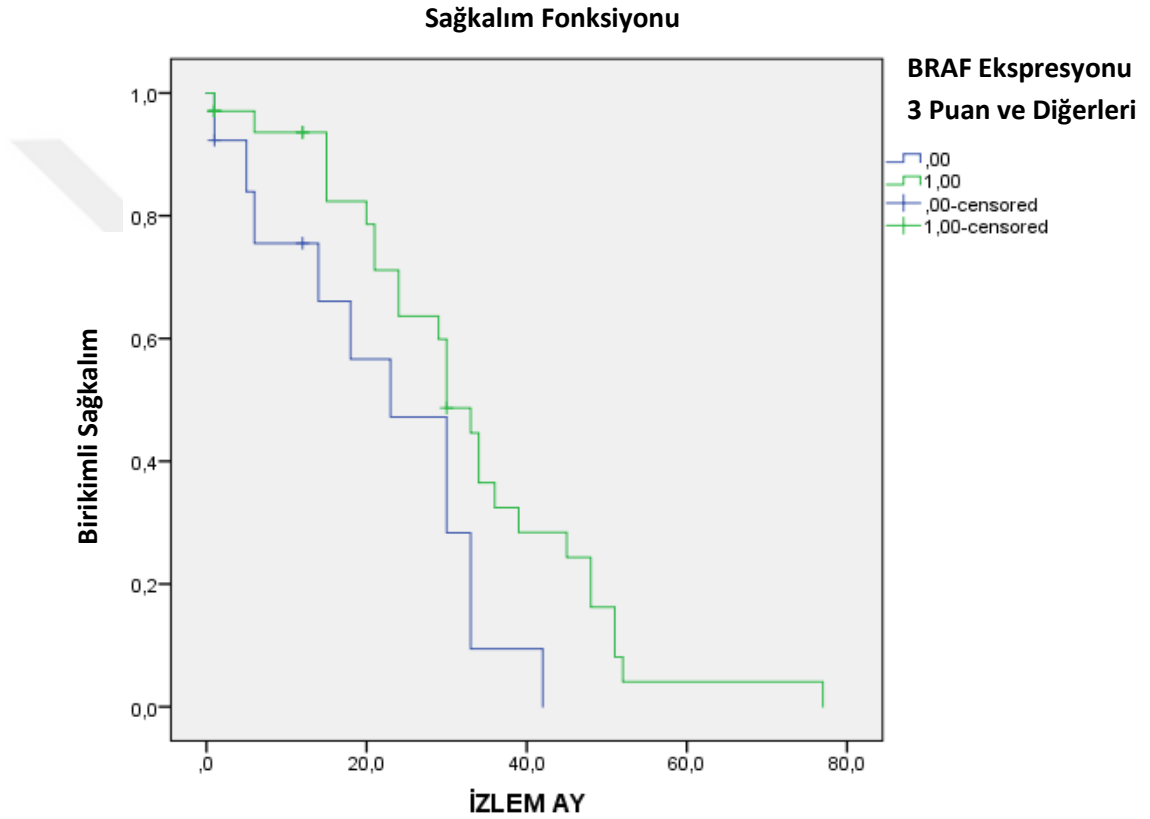


Şekil 4.3. Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti negatif olanlar ile diğerlerinin sağkalım ilişkisi karşılaştırması.

BRAF V600E ekspresyon şiddeti ve yüzdesi puanları toplamı 3 puan olan 13 (%27,6) , 2, 4, 5, 6 puan olan 34 (%72,3) olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin; 3 puan olan 2 (%15,4), 2, 4, 5, 6 puan olan 34 (%23,5) bulunmaktadır. BRAF toplam puan 3 ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,029$; %95 CI: 24,512- 34,724; $p<0,05$)(Tablo 4.17.) (Şekil 4.4).

Tablo 4.17. BRAF V600E ekspresyon şiddeti puanı 3 olanlar ve diğerlerinin Kaplan-Meier sağkalım analizi.

Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
BRAF V600E Ekspresyon Şiddeti ve yüzdesi toplam Puanı			0,029
3 puan	13	14,43 – 29,67	
Diğerleri	34	26,49 – 38,34	

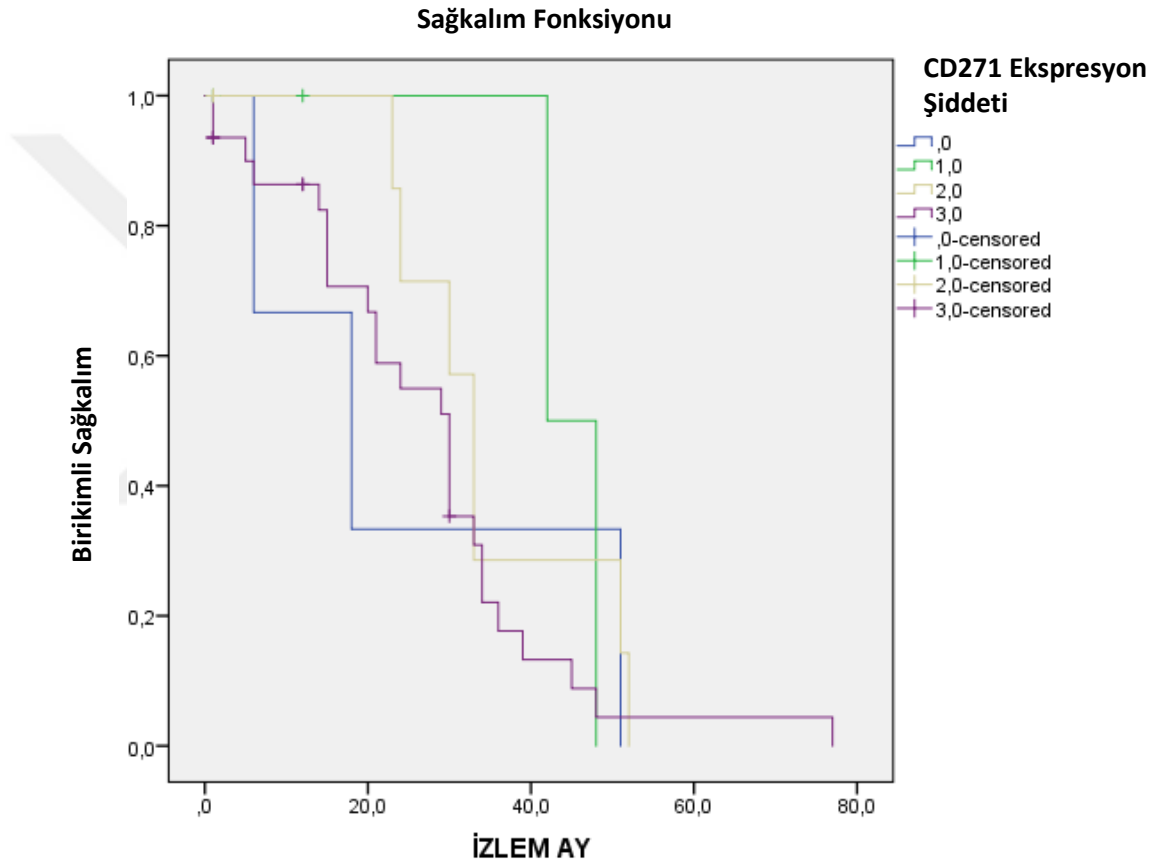


Şekil 4.4. Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti 3 olanlar ile diğerlerinin sağkalım ilişkisi karşılaştırması.

CD271 ekspresyon şiddeti 0 (0 puan) olan 3 (%6,3), 1+ (1 puan) olan 4 (%8,5), 2+ (2 puan) olan 9 (%19,1), 3+ (3 puan) olan 31 (%65,9) olgu bulunmaktadır. Ölenlerin CD 271 ekspresyon şiddeti; şiddeti 0 olan 0 (%0), 1+ olan 2 (%50), 2+ olan 2 (%22,2), 3+ olan 6 (%19,4) olgu vardır. CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,520; %95 CI: 24,512- 34,724; p<0,05) (Tablo 4. 18.) (Şekil 4.5).

Tablo 4.18. CD271 ekspresyon şiddeti Kaplan-Meier sağkalım analizi.

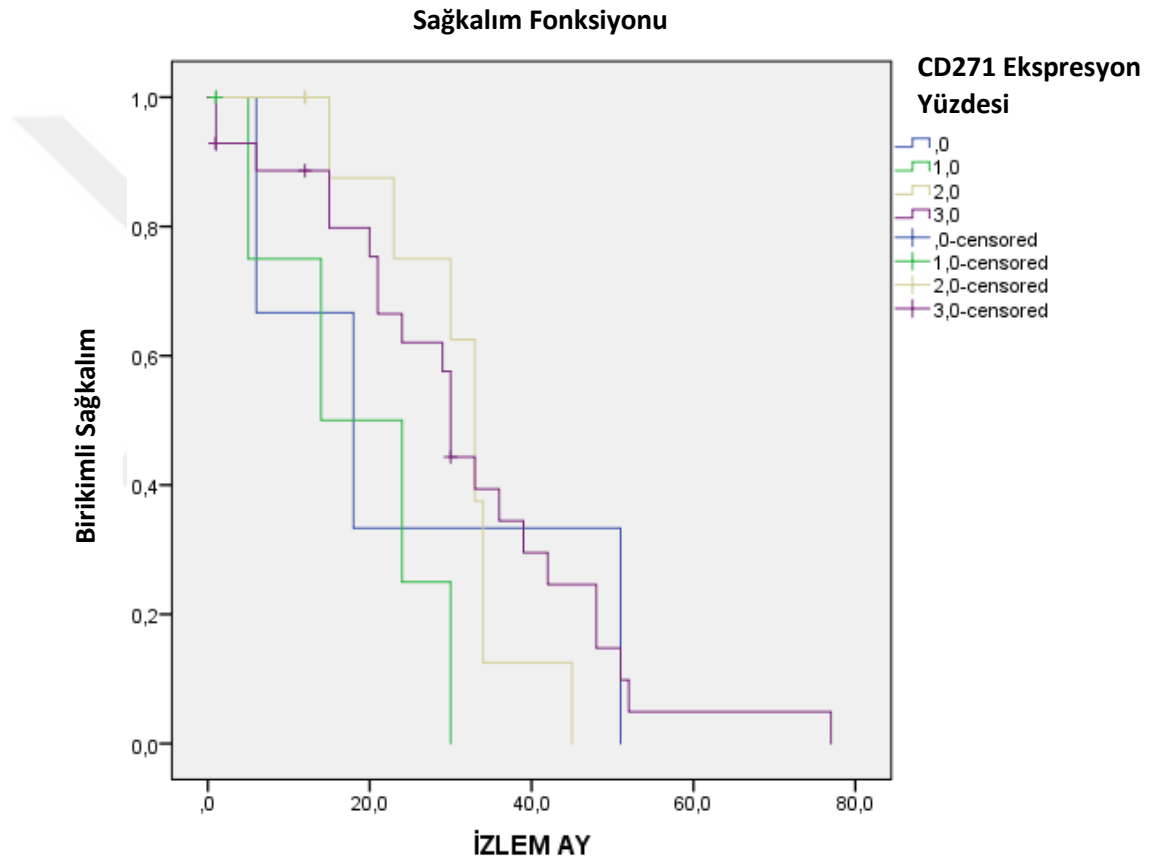
Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
CD 271 Ekspresyon Şiddeti (puan)			0,520
Negatif (0)	3	0 – 51,36	
1 + (1)	4	39,12 – 50,88	
2 + (2)	9	26,36 – 43,92	
3 + (3)	31	20,84 – 33,71	

**Şekil 4.5.** Sağkalım eğrisi. CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisi.

CD271 ekspresyon yüzdesi %0 (0 puan) olan 3 (%6,3), <%10 (1puan) olan 6 (%12,7), %10-50 (2 puan) olan 10 (%21,3), >%50 (3 puan) olan 28(%59,6) olgu bulunmaktadır. Ölenlerin CD271 ekspresyon yüzdesi; %0 olan 0 (%0), <%10 olan 2 (%33,3), %10-50 olan 2 (%20), >%50 olan 6 (%21,4) olgu vardır. CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,231$; %95 CI: 24,512- 34,724; $p<0,05$) (Tablo 4.19.) (Şekil 4.6).

Tablo 4.19. CD271 ekspresyon yüzdesi Kaplan-Meier sağkalım analizi.

Özellikler	N	% 95 CI	P değeri
CD 271 Ekspresyon Yüzdesi (puan)			0,231
Negatif (0)	3	0 – 51,36	
< % 10 (1)	6	7,4 – 29,05	
% 10 – 50 (2)	10	24,77 – 36,97	
> % 50 (3)	28	24,33 – 39,10	

**Şekil 4.6.** Sağkalım eğrisi. CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım ilişkisi.

5. TARTIŞMA

MM tüm deri kanserlerinin %4-5'ini oluşturmaktadır ve deri kanserlerine bağlı ölümlerin %75'ini oluşturmaktadır (2, 70). MM insidansı dramatik olarak artmaktadır, erkeklerde toplamda % 33, 2002'den 2006'ya kadar ise % 23 oranında artmaya devam etmektedir. MM erkeklerde diğer malignitelerden daha hızlı artarken ve kadınlarda akciğer kanseri hariç diğer malignitelerden daha hızlı artmaktadır. 2009'dan 2011'e kadar olan verilere dayanılarak, kutanöz MM olmanın yaşam boyu riski kadınlar için 34'te 1 iken erkeklerde 53'te 1'dir. Tanıdaki medyan yaş 59 yıldır. Ortalama olarak, bir kişi, MM mortalitesi sonucu 20,4 yıllık potansiyel ömrünü kaybeder, buna karşın tüm maligniteler için 16,6 yıl (35).

Uzak metastazlı MM hastaları tipik olarak kötü prognoza sahiptir ve beş yıllık sağkalım oranları % 16 ve medyan sağkalım bir yıldan azdır (71). 2010-2014 yılları arasındaki derideki yeni MM olgusu sayısı her 100.000 erkek ve kadın için yılda 22,3 iken ölümlerin sayısı her yıl 100.000 erkek ve kadın için 2,7'dir. Yaşam boyu deride MM geçirme riski her bir birey için % 2,2'dir. 2014 yılında ABD'de MM tanısı almış olan 1.169.351 hasta bulunmaktadır. Tanı anındaki tümör evresinin durumunun tedavi seçenekleri ve sağkalım süresi üzerine etkisi vardır. MM'ların % 83,7'si metastaz yapmadan tanı almaktadır. Bunlarda 5 yıllık sağkalım % 98,5 iken bölgesel lenf nodlarına metastaz yapanlarda % 62,9, uzak metastazda %19,9'dur (72).

MM risk faktörleri ve bu riske sahip kişiler tespit edilirse erken tanı imkânı artar ve bireylerin sağkalım oranları ile tedavi seçenekleri de artırılabilir. Risk altındaki hastaların uygun yönetimi, melanom risk faktörlerinin genel bir değerlendirilmesini gerektirir. MM daha çok açık ten renkli kişilerde görülmekle birlikte bu kişilerde palmoplantar bölgeler mukozalar gibi daha az rastlanan alanların tutulumu da sık görülmektedir (73). Melanom ile aşırı güneş ışığına maruz kalma veya kronik aktinik hasarın kutanöz bulguları arasındaki ilişki defalarca belirtildi. Ancak MM'un daha sık görüldüğü yerler erkeklerde sırt, kadınlarda bacak gibi güneş ışığına aralıklı maruz kalan yerler iken yüz ve eller gibi daha sık maruz kalan yerlerde epitelyal tümörler daha sık görülmektedir (31, 73). Hübner ve arkadaşları da güneş ışığına maruziyet

sonucu cilt tipiyle de ilişkili olarak yaş ilerledikçe özellikle erkeklerde MM gelişme riskinin arttığını bildirdiler (74).

Almanya’da 2015 yılında Nüfus Temelli Kanser Kayıt Derneği’ne göre MM için en sık görülen risk faktörleri sırasıyla çok sayıda yaygın nevüs klinik olarak atipik nevüsler ve kadın cinsiyettir (74). Waldmann ve arkadaşları 2012 yılında SCREEN programı adlı 12 aylık bir program ile Schleswig-Holstein bölgesinde yaşayan 360.288 kişinin en az 1 kez tüm vücut muayenesini yaptılar. Muayene edilen kişilerden 2.722’si (% 0.76) daha önce MM tanısı alan, 5.344’i (% 1,48) MM dışı deri kanseri tanısı alan kişilerdir. Lezyonu olan 15.983 (% 4,4) kişiye eksizyon yaptılar ve bunların 3.103’üne malign deri tümörü tanısı verdiler. Bunlarında 585’i MM tanısı aldı (75). Bu dünyanın en büyük deri kanseri tarama programıdır. Otörler SCREEN programı kadar olmasa da taramanın MM ve diğer deri kanserlerinin erken tanısında ve lezyonların takibinde önemli olduğunu düşünmektedir (76). SCREEN programında, risk değerlendirmesinde atipik nevüs olarak sınıflandırılan bazı lezyonların eksizyondan sonra melanom olduğu anlaşıldı. Atipik bir nevüsün saptanması, doktorların diğer şüpheli lezyonları özellikle titiz bir şekilde araştırmalarına da neden olduğundan da bu durum ortaya çıkmaktadır (75).

Höbner ve arkadaşları konjenital nevüs ve MM arasında zayıf bir ilişki buldular fakat boyut arttıkça riskin arttığını bildiren çalışmalar da vardır. Aile öyküsü de MM gelişme de risk faktörleri arasındadır (73, 74, 77).

Fransa ulusal gözlemsel sağkalım anketinde MM’lu 1502 kişi, güneşe aşırı maruz kalma, suni UV radyasyona maruz kalma öyküsü, çocukluk çağında güneş yanığı, kişisel veya aile MM öyküsü, atipik veya sayısız nevüs varlığı, açık ten rengi, kıvrık veya sarışın saç rengi olan MM risk faktörleri hakkında sorgulandı. Yanıt veren 1502 kişiden 393’ü (% 26) en az bir melanom risk faktörü ve 1109’u (% 74) melanoma riski taşımadığını; 172 (% 11) açık ten rengi ve güneşe aşırı maruz kalma ankete katılanların % 76’sı tarafından olduğu söylendi (78).

MM risk faktörleri en yüksek risk oranından itibaren sıralayacak olursak; pigmentle lezyonda renk, boyut, şekil değişikliği, kseroderma pigmentozum, ailesel atipik multiple mole melanom sendromu (FAMMM sendromu) , atipik nevüs, sayısız

yaygın nevüs, atipik nevüs, dev konjenital nevüs, daha önce MM geçirmiş olmak, immunsupresyondur (79).

T1 evreli MM'larda, Clark level önemini yitirir mitotik indekse göre değerlendirilir. Bu nedenle sadece mitotik indeks bilgisi bulunmuyorsa kullanılması önerilir. Ülser olmayan T1 melanomlar arasında mitotik indeks $1/\text{mm}^2$ 'den küçük lezyonlarda 10 yıllık sağkalım oranı %95 iken, mitotik indeks $1/\text{mm}^2$ 'ye eşit veya daha yüksek olanlar için %88'dir. Mitotik indeks tümör kalınlığı ile koreledir; T1 melanomlarda ortalama $1/\text{mm}^2$ mitoz sayısı, 8 mm derinliğinde melanomlar için ise $9,6/\text{mm}^2$ 'dir (80). AJCC çalışma grubu, mikroskopik nodal metastazlı melanoma hastalarında bile mitotik indeksin sağkalımda güçlü bir belirteç olduğunu ortaya koymaktadır (48).

Lokalize evre I ve II MM'lar için diğer bir prognostik faktör Breslow tümör kalınlığıdır (80). Tümör kalınlığı ana prognostik faktördür. Mitotik indeks ve ülserasyon Breslow kalınlığının prognostik doğruluğunu artırmak için daha da alt kategorilere ayırır. Tümör kalınlığı lokalize kutanöz melanom için en güçlü prognostik göstergedir. Kalınlık arttıkça 5- ve 10 yıllık sağkalımda belirgin bir düşüş vardır. 0.01- to 0.5-mm tümör kalınlığı olanlarda sağkalım %96 iken; 6.00 mm'den daha kalın lokalize MM'larda 10 yıllık sağkalım %42'dir (81).

AJCC MM evreleme veri tabanının analizi, mitotik indeksin artması ile prognozun kötüleştiğini ortaya koymaktadır. Evre I ve II MM'larda beş yıllık sağkalım mitoz $1/\text{mm}^2$ 'de % 97 iken, mitoz $20/\text{mm}^2$ 'den fazla ise %60'a düşmektedir. Mitotik indeks $\geq 1/\text{mm}^2$ ve sağkalım arasında korelasyon vardır (81-83).

Evre I ve II MM'larda diğer prognostik faktörler: güçlü prognostik olanlar(sağkalım açısından bağımsız prediktif faktörler): Breslow tümör kalınlığının artması, ülser varlığı, mitotik indeksin artması; zayıf prognostik faktörler; yaşın artması, erkek cinsiyet, baş-boyun lokalizasyonu, Clark levelin artması, yüzeyel dışındaki alt tipler, lenfovasküler invazyon varlığı, perinöral invazyon varlığı, regresyonun olması tümörü infiltre eden lenfositlerin olmamasıdır (80).

Ülserasyon, aynı T kategorisindeki tümörler için klinik açıdan anlamlı düşük sağkalım oranını öngörür ve bir sonraki T kategorisinin risk seviyesine yükseltir. Örneğin T2a MM (IB evresi) 5 yıllık sağkalım oranı %91 iken, T2b ve T3a MM'ları

(evre IIA) sırasıyla %82 ve %79 gibi benzer 5 yıllık sağkalım oranlarına sahiptir (48). Sarpa ve arkadaşlarının 235 MM'lu hastada yaptığı bir çalışmada ülserasyon yüzdesi, ülserasyonun çapı ve tümörün dikey büyüme fazının üzerinde kalan yüzey çapı karşılaştırılarak belirlendi. % 5 ülserasyona sahip tümörlerde genel sağkalım %80,7 iken, % 5'ten büyük tümörlerde % 66,7 sağkalım görüldü (84).

Balch ve arkadaşları tarafından, nodal mikrometastazlı 1872 evre III hastada yapılan bir çalışmada; nodal metastazların sayısı, ülserasyon durumu, kalınlık, yaş ve primer anatomik bölge sağkalımda bağımsız prediktif faktörler olduğunu bildirdiler. Mevcut AJCC melanom evrelemesinde, 5 yıllık sağkalım, ülseri olmayan evre IIIA'da % 78 iken evre IIIC'de % 40'dır. Evre III MM'u bulunan 2313 hastada (mikrometastaz ile %81 ve makrometastaz ile %19) yapılan bu çalışmada, 5 yıllık sağkalım nodal mikrometastazlı hastalarda %67, nodal makrometastazlı hastalarda %43'dür (85).

Ottawa Bölgesel Kanser Merkezi'nde yapılan bir çalışmada sentinel lenf nodu negatif olan 152 hastanın 5 yıldan uzun bir süre takibinde hastaların % 28,6'sında metastaz gelişmiştir. Breslow tümör kalınlığı 2,0 mm'den büyük olanlarda metastatik tümör gelişiminde Clark level, ülserasyon, mitoz istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sentinel lenf nodu negatif olan hastalarda metastaz gelişimi multifaktöriyeldir. Bu çalışmada izlem süresi ortalama, 5,3 yıl iken, 0,5-12,3 yıl arasında değişmektedir. İlk metastaz tespit etme zamanı en erken ilk tanıdan 4 yıl sonradır (86).

Clemente ve arkadaşlarının 285 MM'lu hastada yaptığı bir çalışmada tümörde lenfositik infiltrasyon olanlarda 5 yıllık sağkalım % 77 iken, lenfositik infiltrasyon olmayanlarda %37'dir (87). Mihm ve arkadaşlarının 264 MM hastası ile yaptığı bir çalışmada da yine aynı şekilde belirgin lenfositik infiltrasyonu olanlarda 8 yıllık sağkalım %88 iken, hafif lenfositik infiltrasyonu olanda % 75, lenfositik infiltrasyon olmayanlarda %59'a düşmektedir (88).

Erkek kadın oranı çalışmamızda 1,7'dir. Literatür bilgilerinde biraz farklı olmakla birlikte bizim çalışmamızda primer MM'u olan bireylerin yaşları 35-93 arasında değişmekte olup ortalama $64,12 \pm 20,35$, metastatik MM grubundaki bireylerin yaşları 35-89 arasında değişmekte olup ortalama $69 \pm 13,42$ idi (55). 40 yaşındaki hastalarda çarpıcı derecede daha yüksek bir BRAF mutasyonu sıklığı vardır. MM gelişen yaşlı hastaların, UV'ye maruz kalmış anatomik bölgelerde uzun süre

güneşe maruz kalma ve birincil lezyon öyküsü olma olasılığı daha yüksektir. Yaşın artması sağkalıma ve bağımsız bir prognostik faktör ile ters orantılıdır. MM, 40 yaş altı kadınlarda ve 45 yaş altı erkeklerde daha sık teşhis konulmaktadır (7, 13, 57, 89-91) .

Çalışmamızda primer MM'lu hastaların 1'i (%5,8) Evre 1A, 1'i (%5,8) Evre 1B, 4'ü (%23,5) Evre 2A, 3'ü (%17,6) Evre 2B, 8'i (%47) Evre 2C bireylerden oluşurken metastatik MM'lu bireylerin 9'u (%30) Evre 3 iken, 21'i(%70) Evre 4'ten oluşmaktadır. Yine bizim çalışmamızda primer MM'larda ve metastatik MM'larda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; Bhandaru M. ve arkadaşları AJCC evre I'den evre III'e ilerledikçe yüksek BRAF ekspresyonu anlamlı şekilde arttığını ve evre III'den IV'e ilerledikçe anlamlı şekilde azaldığını bildirdiler (54). Chen G. ve arkadaşları lenf nodu metastazı ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı ilişki bildirdiler (90). Shinozaki M. ve arkadaşları eşzamanlı lenf nodu metastazı ile ilişkili primer tümörlerde BRAF mutasyon sıklığı biraz daha yüksek bulurken; bununla birlikte, bizim çalışmamızla paralel olarak, lenf nodu metastazı olmayan primer MM'lara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulmadılar (89). Bunun aksine Eigentler T. ve arkadaşları ilk tanıdaki tümör evresi ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı ilişki buldular (57).

Çalışmamızda primer MM'larda $<2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 2 olgu (%11,8), $\geq 2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 15 olgu (%88,2) saptandı. Metastatik melanomlarda $<2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 0 olgu (%0), $\geq 2/ \text{mm}^2$ mitoz görülen 11 (%100) olgu bulunmaktaydı ve iki grup arasında anlamlı pozitif doğrusal bir ilişki bulundu. Yine çalışmamızda BRAF V600E mutasyonu ile mitoz arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Liu W. ve arkadaşları yaptığı çalışmada mitoz sayısı $<1/\text{mm}^2$ olan olgularla $\geq 10/\text{mm}^2$ olan olgular karşılaştırıldığında daha az mitoz yapanlarda daha yüksek oranda BRAF V600E mutasyonu görülmüştür (55).

Çalışmamızda primer MM'larda 7 olguda (%41,2) ülser bulunmazken, 10 olguda (%58,8) ülser görüldü. Metastatik MM'larda 0 olguda (%0) ülser bulunmazken, 30 olgunun tamamında (%100) ülser görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. BRAF mutasyonu ile ülser arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken

Bhandaru M. ve arkadaşları ile Hugdahl E. ve arkadaşları ülser durumu ile BRAF ekspresyonu arasında önemli bir ilişki bildirdiler (13, 54).

Çalışmamızda primer MM'larda Breslow kalınlığı $< 1,0$ mm olan 2 olgu (%11,8), 1,01–2,0 mm olan ve 2,01–4,0 mm olan 3'er olgu (%17,6) ve > 4 mm olan 9 olgu (%52,9) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda ise $\leq 1,0$ mm olan 0 olgu (%0), 1,01–2,0 mm ve 2,01–4,0 mm olan 1'er olgu (%10) ve > 4 mm olan 8 olgu (%80) bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda, Breslow kalınlığı yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bizim çalışmamızda BRAF V600 E mutasyon varlığı ile Breslow kalınlığı aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Liu W. ve arkadaşları yaptığı çalışmada tümör kalınlığının artmasıyla BRAF V600E mutasyon oranının azaldığını bildirdiler (55). Bunun aksine Eigentler T. ve arkadaşları, Hugdahl E. ve arkadaşları pozitif BRAF V600E ekspresyonu, artan tümör kalınlığı ile anlamlı olarak ilişkili buldular (13).

Çalışmamızda primer MM'larda pigmentasyon olan 4 olgu (%23,5), pigmentasyon olmayan 13 olgu (% 76,5) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda ise pigmentasyon olan 4 olgu (% 36,4), pigmentasyon olmayan 7 olgu (% 63,6) bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda pigmentasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Liu W. ve arkadaşları çalışmasında tümör pigmentasyonu ayrıca BRAF mutasyonu ile kuvvetli bir şekilde ilişkili buldular (55).

Çalışmamızda primer MM'larda lenfositik infiltrasyon yapan 5 olgu (% 29,4), lenfositik infiltrasyon yapmayan 12 olgu (% 70,6) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda lenfositik infiltrasyon yapan 3 olgu (% 30) lenfositik infiltrasyon yapmayan 7 olgu (% 70) bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda lenfositik infiltrasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Lenfosit infiltrasyonu ile tümör hücresi tipi, pigmentasyon, atipi, mitotik sayı ve hastanın cinsiyeti ve yaşı arasında anlamlı bir ilişki gösteremedik. Ne invazyonun bir seviyesinde ne tümör tipi ile lenfosit infiltrasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu (92).

Çalışmamızda BRAF V600E ekspresyon şiddeti 0 (0 puan) olan 13 (% 27,6) , 1+ (1puan) olan 10 (%21,3) , 2+ (2 puan) olan 12 (%25,5), 3+ (3 puan) olan 12 (%25,5)

olgu bulunmaktaydı. Bunların içinde ölenlerde; şiddeti 0 olan 2 (%15,4), 1+ olan 10 (%10,0), 2+ olan 12 (%25), 3+ olan 12 (%33,3) olgu bulunmaktadır. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bhandaru M. ve arkadaşları, Rutkowski P. ve arkadaşları, Kumar R. ve arkadaşları BRAF ekspresyonun bağımsız bir prognostik faktör olmadığını gösterdiler (7, 54, 89, 93) .

Çalışmamızda primer MM'larda CD271 ekspresyonu şiddeti 0 olan 1 olgu (%5,9), 1+ olan 1 olgu (%5,9), 2+ olan 5 olgu (%29,4), 3+ olan 10 olgu (%58,8) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu şiddeti 0 olan 2 olgu (%6,6), 1+ olan 3 olgu (%10), 2+ olan 4 olgu (%13,3), 3+ olan 21 olgu (%70) bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Primer MM'larda CD271 ekspresyon yüzdesi %0 olan 1 olgu (%5,9), <%10 olan 3 olgu (%17,6), %10-50 olan 6 olgu (%35,3), >%50 olan 7 olgu (%41,2) bulunmaktaydı. Metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu yüzdesi %0 olan 2 olgu (%6,6), <%10 olan 3 olgu (%10), %10-50 olan 4 olgu (%13,3), >%50 olan 21 olgu (%70) olgu bulunmaktaydı. Primer MM'larda ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu yüzdesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Guo R. ve arkadaşları yine bizim çalışmamızda olduğu gibi primer ve metastatik MM'larda CD271 ekspresyonu arasında fark bulmamışlardır (1). CD271 daha önce yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda iğsi hücreli MM'larda, dermal MM'larda, desmoplastik MM'larda S100'den daha sensitif bir immunhistokimyasal belirleyici olarak karşımıza çıkmaktadır ve malign iğsi hücreli tümörler ile iğsi hücreli MM ayrımında önemli olduğu bildirilmiştir (18, 69, 94). CD271'in nörotropik invaziv MM'larda eksprese edildiğini, buna karşın perinöral invazyonu olmayan invaziv MM'larda CD271 ekspresyonu bulunmadığını gösteren çalışmalar vardır (67). Ayrıca MM'larda CD 271 pozitif olanların daha invaziv olduğu ve beyin invazyonun sık olduğu bilinmektedir (16). Bizim çalışmamızda da primer MM'larda CD 271 pozitif olan olgularda CD 271 pozitifliğini tümörün daha derin alanlarında daha fazla olduğunu ya da ekspersyon şiddetinin arttığını gördük. Ayrıca metastatik ve primer MM'larda büyük damarların çevresine ve perinöral invazyon alanlarında CD 271 ekspresyon şiddetinin diğer alanlardan daha fazla olduğunu beyin invazyonu yapan vakaların hepsinde de CD 271

ekspresyonu olduğunu gördük. Mohamed A. ve arkadaşları bizim çalışmamızda olduğu gibi CD271 ile Breslow, evre, lenf nodu durumu ile ya da sağkalım ile ilişki bulamamışlardır (14).

Çalışmamızda CD271 ekspresyon şiddeti 0 (0 puan) olan 3 (% 6,3) , 1+ (1 puan) olan 4 (% 8,5), 2+ (2 puan) olan 9 (% 19,1), 3+ (3 puan) olan 31 (% 65,9) olgu bulunmaktadır. Bunların içinde ölenlerin; şiddeti 0 olan 0 (%0), 1+ olan 2 (%50), 2+ olan 2 (%22,2), 3+ olan 6 (%19,4) olgu vardır. CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. CD271 ekspresyon yüzdesi %0 (0 puan) olan 3, <%10 (1puan) olan 6, %10-50 (2 puan) olan 10, >%50 (3 puan) olan 28 olgu bulunmaktadır. Bunların içinde ölenlerin; %0 olan 0 (%0), <%10 olan 2 (%33,3), %10-50 olan 2 (%20), >%50 olan 6 (%21,4) olgu vardır. CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; Beretti F. ve arkadaşları CD271 ve sağkalım arasında önemli ilişki bildirdiler (15). Gambichler T. ve arkadaşları CD 271 ile yaş arasında negatif ölümle pozitif korelasyon bildirdiler (65).

Sonuç olarak; primer ve metastatik MM'lar arasında ülser varlığı ve mitoz sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Metastatik MM'ların hepsinde ülser tesbit ettik. Bu durum metastatik MM gelişene kadar ülserasyonun da olduğu şeklinde ya da ülserasyon olanlar da metastaz gelişmesinin daha kolay olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ülserasyonun tek başına MM'un prognostik bir faktörü olduğu bilinmektedir (48). Mitoz sayısında ile pozitif doğrusal bir ilişki vardır mitoz sayısı arttıkça lokal MM'dan metastatik MM'a ilerlemektedir. Tümör kalınlığı arttıkça mitotik indeks arttığını gösteren çalışmalar vardır aynı zamanda mitoz metastatik MM'lu hastalarda prognozu etkilemektedir (80).

Çalışmamızda Breslow tümör kalınlığı ile primer ve metastatik MM'lar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Fakat primer MM'larda tümör kalınlığı ≥ 4 mm olanlar %52,9 iken metastatik MM'larda bu oran % 82'dir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da yeterli olgu sayısı sağlandığında aradaki orantısal fark göz önüne alındığında metastatik MM'larda tümör kalınlığının daha fazla olduğunu görebiliriz.

Çalışmamızda tümöre lenfositik infiltrasyon ve pigmentasyon varlığı açısından primer ve metastatik MM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Fakat lenfositik infiltrasyon ve pigmentasyon varlığının her iki grupta da benzer oranlarda ve aynı vakalarda olması lenfositik infiltrasyonun makroskopik pigmentasyon olan olgularda olduğunu düşündürdü. Ancak bununla ilgili daha çok olgu sayısı olan çalışmalar yapılmasında fayda vardır.

Çalışmamızda cinsiyet, pigmentasyon varlığı açısından sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmadık. Fakat Breslow kalınlığı ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulduk ve Breslow kalınlığı arttıkça sağkalım oranları düşmektedir. Ülser varlığı ve sağkalım arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulduk. Ülser olanlarda sağkalım oranlarının düştüğünü gördük.

Çalışmamızda CD271 ekspresyon şiddeti ve yüzdesi açısından primer ve metastatik MM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık. Fakat CD271 ekspresyonunun şiddet ve yüzdesinin toplam puan olarak değerlerine bakıldığında en yüksek puan olan 6 puanı alan olgu sayısının primer MM'larda % 29,4 oranında, metastatik MM'larda % 60 oranında bulduk. Bu durumda yeterli olgu sayısında metastatik MM'larda CD271 ekspresyonunun daha fazla olduğu görülebilir. CD271'in invazyonda daha fazla eksprese olduğu bildirilmektedir (16). CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık. Ama yine yeterli olgu sayısı sağlandığında CD271'in invazyon alanlarında ekspresyonunun fazla olduğundan yola çıkarak metastatik MM'larda daha fazla CD271 ekspresyonu gösterilebilir.

Çalışmamızda BRAF V600E ekspresyon şiddeti ve yüzdesi açısından primer ve metastatik MM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmadı ve her grupta benzer şiddet ve yüzde oranlarında ekspresyon görüldü. Fakat BRAF V600E ekspresyonunun sağkalımla istatistiksel olarak anlamlı ilişkisini bulduk. Ayrıca BRAF V600E ekspresyonu olmayanlarla şiddeti ne olursa olsun ekspresyon olanlar arasında da sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Bu durum da BRAF V600E ekspresyonunun evreden bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini gösterebilir. BRAF V600E'nin ekspresyonun kötü prognoz göstergesi olması hastalar açısından olumsuz gibi durmasına rağmen gelişen immunoterapiler ile ekspresyon

olan hastalarda yeni tedavi seçeneklerinin gelişmesi bu durumun tersine döneceğini her yeni gün kendini daha çok gösterecektir.



ÖZET

Malign Melanomlarda CD271 ve BRAF Ekspresyonunun Klinikopatolojik Parametrelerle ve Prognoz ile İlişkisinin İmmunhistokimyasal Yöntemle Araştırılması

Malign melanomun (MM) en önemli prognostik faktörleri patolojik evreleme ve metastaz varlığıdır. Patolojik evrelemede tümör boyutu, invazyon derinliği, ülserasyon, mitotik indeks önemlidir. Çalışmamızda BRAF V600E ve CD271'in immunhistokimyasal ekspresyonları ile klinikopatolojik parametreler ve prognoz ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Aralık 2010 - Mayıs 2017 tarihleri arasında tanı almış 47 MM olgusu vardır. Olgular AJCC 7. basımındaki evreleme sistemine göre primer MM'lu hastaların 1'i (%5,8) evre 1A, 1'i (%5,8) evre 1B, 4'ü (%23,5) evre 2A, 3'ü (%17,6) evre 2B, 8'i (%47) evre 2C bireylerden oluşurken metastatik MM'lu bireylerin 9'u (%30) evre 3 iken, 21'i(%70) evre 4'ten oluşmaktaydı.

Çalışmamızda Primer MM'u olan bireylerin yaşları 35-93 arasında değişmekte olup ortalama $64,12 \pm 20,35$, metastatik MM grubundaki bireylerin yaşları 35-89 arasında değişmekte olup ortalama $69 \pm 13,42$ idi. Yaş yönünden iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

Primer MM'lar ve metastatik MM'lar karşılaştırıldığında ülserasyon, mitotik indeks açısından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Breslow tümör kalınlığı, lenfositik infiltrasyon, pigmentasyon, CD271 ve BRAF V600E ekspresyonu açısından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sağkalım ile ilişkilerine bakıldığında Breslow tümör kalınlığı, ülserasyon, BRAF V600E ekspresyonu şiddeti, BRAF V600E ekspresyonu olmayanlar ile olanlar arasındaki ve BRAF V600E ekspresyon şiddeti 3+ olanlar ile diğerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Cinsiyet, pigmentasyon, BRAF V600E ekspresyon yüzdesi, CD271 ekspresyon şiddeti, CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuçta, BRAF V600E ekspresyonu prognoz ile ilişkili gözükmemektedir. BRAF V600E ekspresyonu olmayanlarda yüksek sağkalım oranları varken ekspresyon şiddeti arttıkça sağkalım düştüğünü düşündürdü.

Anahtar kelimeler: BRAF, CD271, immunhistokimya, malign melanom, prognostik faktörler

SUMMARY

Investigation of the Relationship between CD271 and BRAF Expression with Clinicopathological Parameters by Immunohistochemical Method in Malignant Melanoma

The most important prognostic factors of malignant melanoma (MM) are metastasis and pathological staging. The sizes of the tumor, depth of the invasion, ulceration, mitotic index are important for pathologic staging. In the current study, we aimed to investigate the immunohistochemical expressions, clinicopathological parameters and their relations between prognosis of BRAF V600E and CD271.

In the current study we determined 47 MM in Department of Pathology, School of Medicine, Suleyman Demirel University between December 2010 and May 2017. Cases were classified according to the 7th edition of AJCC. 1 of (5,8%) MM patients were stage 1A, 1 of (5,8%) MM patients were stage 1B, 4 (23,5%) of MM patients were stage 2A, 3 of (17,6%) MM patients were stage 2B, 8 of (47%) MM patients were stage 2C, 9 of (30%) MM patients were stage 3, 21 of (70%) MM patients were stage 4.

The age range of the primary MM patients was between 35 and 93 years old and the age average of the patients was $64,12 \pm 20,35$. The age range of the metastatic MM patients was between 35 and 89 years old and the age average of the patients was $69 \pm 13,42$. When compared the ages, we did not determine any statistical significance between these two groups.

When comparing primary MM and metastatic MM, statistical significant was determined for ulceration, mitotic index. However we did not determine any statistical significant between Breslow tumor thickness, lymphocytic infiltration, pigmentation, expressions of CD271 and V600E. Statistical significance was determined when compared with survival and Breslow tumor thickness, ulceration, the expression intensity of BRAF V600E, between those with and without expression of BRAF V600E and which has the BRAF V600E expression intensity as 3+. We did not determine any statistical significance between gender, pigmentation, BRAF V600E percentage of expression, CD271 expression intensity and survival.

As summary, BRAF V600E expression seems to be related with prognosis. Patients without BRAF V600E expression have high percentage of survival. However, our results suggest that the survival rate decreases as the expression intensity increases.

Keywords: BRAF, CD271, immunohistochemistry, malignant melanoma, prognostic factors

KAYNAKLAR

1. Guo R, Fierro-Fine A, Goddard L, Russell M, Chen J, Liu CZ, *et al.* Increased expression of melanoma stem cell marker CD271 in metastatic melanoma to the brain. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 8947-51.
2. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, *et al.* Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15003.
3. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2014; 383: 816-27.
4. Cirenajwis H, Ekedahl H, Lauss M, Harbst K, Carneiro A, Enoksson J, *et al.* Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: Prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy. *Oncotarget* 2015; 6: 12297-309.
5. Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015; 161: 1681-96.
6. Cooper C, Sorrell J, Gerami P. Update in molecular diagnostics in melanocytic neoplasms. *Adv Anat Pathol* 2012; 19: 410-6.
7. Rutkowski P, Gos A, Jurkowska M, Switaj T, Dziewirski W, Zdzienicki M, *et al.* Molecular alterations in clinical stage III cutaneous melanoma: Correlation with clinicopathological features and patient outcome. *Oncol Lett* 2014; 8: 47-54.
8. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, *et al.* Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1239-46.
9. Mar VJ, Liu W, Devitt B, Wong SQ, Dobrovic A, McArthur GA, *et al.* The role of BRAF mutations in primary melanoma growth rate and survival. *Br J Dermatol* 2015; 173: 76-82.
10. Kunz M. Oncogenes in melanoma: An update. *Eur J Cell Biol.* 2014; 93: 1-10.
11. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; 12: 406-14.
12. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
13. Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE, Ladstein RG, Akslen LA. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. *Br J Cancer* 2016; 114: 801-8.
14. Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. Tumor stem cells (CD271, c-kit, SOX10) in melanomas: Prognostic and outcome implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014; 22: 142-5.
15. Beretti F, Manni P, Longo C, Argenziano G, Farnetani F, Cesinaro AM, *et al.* CD271 is expressed in melanomas with more aggressive behaviour, with correlation of characteristic morphology by in vivo reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* 2015; 172: 662-8.

16. Marconi A, Borroni RG, Truzzi F, Longo C, Pistoni F, Pellacani G, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α and CD271 inversely correlate with melanoma invasiveness. *Exp Dermatol* 2015; 24: 396-8.
17. Rogers ML, Beare A, Zola H, Rush RA. CD 271 (P75 neurotrophin receptor). *J Biol Regul Homeost Agents* 2008; 22: 1-6.
18. Sigal AC, Keenan M, Lazova R. P75 nerve growth factor receptor as a useful marker to distinguish spindle cell melanoma from other spindle cell neoplasms of sun-damaged skin. *Am J Dermatopathol* 2012; 34: 145-50.
19. Hartman ML, Rozanski M, Osrodek M, Zalesna I, Czyz M. Vemurafenib and trametinib reduce expression of CTGF and IL-8 in V600EBRAF melanoma cells. *Lab Invest* 2017; 97: 217-27.
20. Redmer T, Welte Y, Behrens D, Fichtner I, Przybilla D, Wruck W, *et al.* The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS One* 2014; 9: e92596.
21. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 2013; 30: 30-41.
22. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4: 10.1101/cshperspect.a017046.
23. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 10.3390/ijms17071144.
24. Sommer L. Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 411-21.
25. Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest* 2017; 97:649-656
26. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 2007; 282: 27557-61.
27. Sitaram A, Marks MS. Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. *Physiology (Bethesda)* 2012; 27: 85-99.
28. Schaefer T, Satzger I, Gutzmer R. Clinics, prognosis and new therapeutic options in patients with mucosal melanoma: A retrospective analysis of 75 patients. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e5753.
29. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1241-4.
30. Newton-Bishop JA, Chang YM, Iles MM, Taylor JC, Bakker B, Chan M, *et al.* Melanocytic nevi, nevus genes, and melanoma risk in a large case-control study in the united kingdom. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 2043-54.
31. Newton-Bishop JA, Chang YM, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, *et al.* Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *Eur J Cancer* 2011; 47: 732-41.

32. Berrocal A, Cabanas L, Espinosa E, Fernandez-de-Misa R, Martin-Algarra S, Martinez-Cedres JC, *et al.* Melanoma: Diagnosis, staging, and treatment. consensus group recommendations. *Adv Ther* 2014; 31: 945-60.
33. National Collaborating Centre for Cancer (UK) 2015.
34. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, *et al.* Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol* 2010; 163: 238-56.
35. Coit DG, Thompson JA, Algazi A, Andtbacka R, Bichakjian CK, Carson WE, 3rd, *et al.* Melanoma, version 2.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016; 14: 450-73.
36. Dolianitis C, Kelly J, Wolfe R, Simpson P. Comparative performance of 4 dermoscopic algorithms by nonexperts for the diagnosis of melanocytic lesions. *Arch Dermatol* 2005; 141: 1008-14.
37. Tran KT, Wright NA, Cockerell CJ. Biopsy of the pigmented lesion--when and how. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59: 852-71.
38. Liu W, Dowling JP, Murray WK, McArthur GA, Thompson JF, Wolfe R, *et al.* Rate of growth in melanomas: Characteristics and associations of rapidly growing melanomas. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1551-8.
39. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE, 3rd, Daud A, *et al.* Melanoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2012; 10: 366-400.
40. Hantschke M, Bastian BC, LeBoit PE. Consumption of the epidermis: A diagnostic criterion for the differential diagnosis of melanoma and spitz nevus. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 1621-5.
41. Walters RF, Groben PA, Busam K, Millikan RC, Rabinovitz H, Cagnetta A, *et al.* Consumption of the epidermis: A criterion in the differential diagnosis of melanoma and dysplastic nevi that is associated with increasing breslow depth and ulceration. *Am J Dermatopathol* 2007; 29: 527-33.
42. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-8.
43. Coit DG, Andtbacka R, Bichakjian CK, Dilawari RA, Dimaio D, Guild V, *et al.* Melanoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7: 250-75.
44. Clark WH, Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-27.
45. Holmes EC, Clark W, Morton DL, Eilber FR, Bochow AJ. Regional lymph node metastases and the level of invasion of primary melanoma. *Cancer* 1976; 37: 199-201.
46. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, *et al.* Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-48.

47. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, *et al.* Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol* 2010; 163: 238-56.
48. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-206.
49. Clark WH, Jr, Elder DE, Guerry D, 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-904.
50. Hayes AJ, Clark MA, Harries M, Thomas JM. Management of in-transit metastases from cutaneous malignant melanoma. *Br J Surg* 2004; 91: 673-82.
51. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Biopsy interpretation of the skin: Primary non-lymphoid cutaneous neoplasia. Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
52. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 433-44.
53. Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* 2006; 16: 97-103.
54. Bhandaru M, Ardekani GS, Zhang G, Martinka M, McElwee KJ, Li G, *et al.* A combination of p300 and braf expression in the diagnosis and prognosis of melanoma. *BMC Cancer* 2014; 14: 398,2407-14-398.
55. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, *et al.* Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 900-5.
56. Halilovic E, Solit DB. Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 419-26.
57. Eigentler T, Assi Z, Hassel JC, Heinzerling L, Starz H, Berneburg M, *et al.* Which melanoma patient carries a BRAF-mutation? A comparison of predictive models. *Oncotarget* 2016; 7: 36130-7.
58. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, *et al.* Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med* 2016; 14: 95,016-0852-6.
59. Manfredi L, Meyer N, Tournier E, Grand D, Uro-Coste E, Rochoix P, *et al.* Highly concordant results between immunohistochemistry and molecular testing of mutated V600E BRAF in primary and metastatic melanoma. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 630-4.
60. Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, *et al.* B-Raf is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 2004; 23: 6292-8.
61. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF(V600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008; 27: 877-95.

62. Anwar MA, Murad F, Dawson E, Abd Elmageed ZY, Tsumagari K, Kandil E. Immunohistochemistry as a reliable method for detection of BRAF-V600E mutation in melanoma: A systematic review and meta-analysis of current published literature. *J Surg Res* 2016; 203: 407-15.
63. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, Hackl M, *et al.* Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 223-33.
64. Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, *et al.* Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 61-5.
65. Gambichler T, Petig AL, Stockfleth E, Stucker M. Expression of SOX10, ABCB5 and CD271 in melanocytic lesions and correlation with survival data of patients with melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2016; 41: 709-16.
66. Fanburg-Smith JC, Miettinen M. Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: A study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. *Hum Pathol* 2001; 32: 976-83.
67. Chan MM, Tahan SR. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75 NGFR) as a marker of perineural invasion in malignant melanomas. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 336-43.
68. Alaeddini M, Etemad-Moghadam S. Immunohistochemical profile of oral mucosal and head and neck cutaneous melanoma. *J Oral Pathol Med* 2015; 44: 234-8.
69. Lazova R, Tantcheva-Poor I, Sigal AC. P75 nerve growth factor receptor staining is superior to S100 in identifying spindle cell and desmoplastic melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 852-8.
70. Shenenberger DW. Cutaneous malignant melanoma: A primary care perspective. *Am Fam Physician* 2012; 85: 161-8.
71. Evans RD, Kopf AW, Lew RA, Rigel DS, Bart RS, Friedman RJ, *et al.* Risk factors for the development of malignant melanoma--I: Review of case-control studies. *J Dermatol Surg Oncol* 1988; 14: 393-408.
72. Lewis DR, Chen HS, Cockburn M, Wu XC, Stroup AM, Midthune DN, *et al.* Preliminary estimates of SEER cancer incidence for 2013. *Cancer* 2016; 122: 1579-87.
73. Bastian BC, Xiong J, Frieden IJ, Williams ML, Chou P, Busam K, *et al.* Genetic changes in neoplasms arising in congenital melanocytic nevi: Differences between nodular proliferations and melanomas. *Am J Pathol* 2002; 161: 1163-9.
74. Hubner J, Waldmann A, Eisemann N, Noftz M, Geller AC, Weinstock MA, *et al.* Association between risk factors and detection of cutaneous melanoma in the setting of a population-based skin cancer screening. *Eur J Cancer Prev* 2017 [Epub ahead of print].

75. Waldmann A, Nolte S, Geller AC, Katalinic A, Weinstock MA, Volkmer B, *et al.* Frequency of excisions and yields of malignant skin tumors in a population-based screening intervention of 360,288 whole-body examinations. *Arch Dermatol* 2012; 148: 903-10.
76. Katalinic A, Waldmann A, Weinstock MA, Geller AC, Eisemann N, Greinert R, *et al.* Does skin cancer screening save lives?: An observational study comparing trends in melanoma mortality in regions with and without screening. *Cancer* 2012; 118: 5395-402.
77. Tannous ZS, Mihm MC,Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: Clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 197-203.
78. Saiag P, Sassolas B, Mortier L, Grange F, Robert C, Lhomel C, *et al.* EDIFICE melanoma survey: Knowledge and attitudes on melanoma prevention and diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29 Suppl 2: 11-5.
79. Sirott MN, Bajorin DF, Wong GY, Tao Y, Chapman PB, Templeton MA, *et al.* Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis. *Cancer* 1993; 72: 3091-8.
80. Bartlett EK, Karakousis GC. Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2015; 24: 215-27.
81. Wisco OJ, Sober AJ. Prognostic factors for melanoma. *Dermatol Clin* 2012; 30: 469-85.
82. Tejera-Vaquerizo A, Perez-Cabello G, Marinez-Leborans L, Gallego E, Oliver-Martinez V, Martin-Cuevas P, *et al.* Is mitotic rate still useful in the management of patients with thin melanoma? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017 [Epub ahead of print].
83. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF. Update on the melanoma staging system: The importance of sentinel node staging and primary tumor mitotic rate. *J Surg Oncol* 2011; 104: 379-85.
84. Grande Sarpa H, Reinke K, Shaikh L, Leong SP, Miller JR,3rd, Sagebiel RW, *et al.* Prognostic significance of extent of ulceration in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1396-400.
85. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: Comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2452-9.
86. Ward CE, MacIsaac JL, Heughan CE, Weatherhead L. Metastatic melanoma in sentinel node-negative patients: The ottawa experience. *J Cutan Med Surg* 2017: 1203475417720201 [Epub ahead of print].
87. Clemente CG, Mihm MC,Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77: 1303-10.

88. Mihm MC, Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: A histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996; 74: 43-7.
89. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1753-7.
90. Chen G, Dudley J, Tseng LH, Smith K, Gurda GT, Gocke CD, *et al.* Lymph node metastases of melanoma: Challenges for BRAF mutation detection. *Hum Pathol* 2015; 46: 113-9.
91. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72: 1036,46.e2.
92. Larsen TE, Grude TH. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 3. the relation between the tumour-associated lymphocyte infiltration and age and sex, tumour cell type, pigmentation, cellular atypia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumour type and prognosis. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1978; 86A: 523-30.
93. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhonen S, *et al.* BRAF mutations in metastatic melanoma: A possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3362-8.
94. Plaza JA, Bonneau P, Prieto V, Sanguenza M, Mackinnon A, Suster D, *et al.* Desmoplastic melanoma: An updated immunohistochemical analysis of 40 cases with a proposal for an additional panel of stains for diagnosis. *J Cutan Pathol* 2016; 43: 313-23.