

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**BENİGN VE MALİGN MELANOSİTİK
PROLİFERASYONLARDA EPİGENETİK DEĞİŞİKLİK
BELİRTEÇLERİ 5-HİDROKSİ METİL SİTOZİN VE HİSTON
DEASETİLİZ-6'NIN TANISAL DEĞERİ VE HİSTOPATOLOJİK
PROGNOSTİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

Dr. Aslıhan YAVAŞ

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aylin OKÇU HEPER**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**BENİGN VE MALİGN MELANOSİTİK
PROLİFERASYONLARDA EPİGENETİK DEĞİŞİKLİK
BELİRTEÇLERİ 5-HİDROKSİ METİL SİTOZİN VE HİSTON
DEASETİLİZ-6'NIN TANISAL DEĞERİ VE HİSTOPATOLOJİK
PROGNOSTİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

Dr. Aslıhan YAVAŞ

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aylin OKÇU HEPER**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 17L0230006 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2018**

KABUL VE ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	:Dr.Ashhan YAVAŞ	Sınav tarihi: 22 / 06 / 2017
Anabilim/Bilim Dalı	:Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	:Prof.Dr.Aylin OKÇU HEPER	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı Benign ve Malign Melanositik Proliferasyonlarda Epigenetik Değişiklik Belirteçleri 5-Hidroksi Metil Sitozin, Histon Deasetilaz-5'in Tanısal Değeri ve Histopatolojik Prognostik Parametrelerle İlişkisi	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği	☐ Oy çokluğu
ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	



Prof.Dr.Aylin OKÇU HEPER
Başkan/ Tez Danışmanı
Tıbbi Patoloji Anabilim/Bilim Dalı



Prof.Dr.Işmsu KUZU
Jüri Üyesi
Tıbbi Patoloji Anabilim/Bilim Dalı



Dr.Öğr.Üyesi Özay GÖKÖZ
Jüri Üyesi
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen sadece hoca olmayı değil insan olmayı da öğreten kıymetli hocalarıma sonsuz teşekkür ederim. Gelişiminde birçok aksaklıklarla karşılaştığımız bu tez sürecinde her zaman sakin duruşunu koruyan ve yol gösterici olan sevgili tez danışmanım Prof. Dr. Aylin OKÇU HEPER'e emekleri için minnettarım. Tezimizde kullandığımız ve değerlendirmelerimizi kolaylaştıran, A.Ü. BAP 14A0230003 No'lu proje ile bölümümüze dijital patoloji kurulmasına aracılık eden hocalarıma teşekkür ederim. İstatistik aşamasında emeği geçen Serhat HAYME'ye teşekkür ederim.

Her şartta desteklerini arkamda hissettiğim, tez gelişimime büyük katkıları olan, mesai saatlerinde olduğu kadar dışında da güzel paylaşımlarda bulunduğumuz, üyesi olmaktan onur duyduğum Ankara Tıp Patoloji ailesine (anabilim dalı sekreterleri, rapor sekreterleri, bölüm görevlileri, arşiv ve kayıt memurları, tüm patoloji, immünohistokimya, moleküler ve sitoloji laboratuvarı çalışanları) teşekkür ederim.

Öğrenme yolunda birlikte yürüdüğüm, her türlü sorunlarıma-sorularıma benim ile birlikte çözümler üretmeye çalışan, sayısız güzel anılar biriktirmeme vesile olan sevgili çalışma arkadaşlarım dostlarım; Dr. Elçin KADAN, Dr. Banu İNCE ALKAN, Dr. Seher YÜKSEL, Dr. Hale KIVRAK, Dr. Ayşegül EROL, Dr. Hilal ÖZAKINCI, Dr. Seda AKTÜRK, Dr. Melahat MUSAYEVA, Dr. Fatma ALTINTAŞ GÜZEL, Dr. Sonay KUŞ ÖZTÜRK, Dr. Faruk ARMAN, Dr. Elif ÖCAL, Dr. Fadime Gül SALMAN, Dr. Dilek KOYUNCU YAMAK, Dr. Dilara AKBULUT İPEK, Dr. Temmuz AYDUĞAN, Dr. Nuray AKSOY, Dr. Merve TURAL, Dr. Tuğba ATAK'a teşekkür ederim.

Asistanlık ve tez sürecinde fiziksel ve ruhsal desteklerine her zaman ihtiyaç duyduğum, hayatımı kolaylaştıran, varlıklarından güç aldığım kıymetli aileme ve tüm dostlarıma, ayrıca bana yaşama sevinci olan, minicik sevgisiyle motive eden biricik yeğenim Eylül YAVAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Aslıhan YAVAŞ

Ankara, 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri Histolojisi	3
2.2. Melanositler	4
2.2.1. Embriyoloji	4
2.2.2. Normal Mikroanatomi.....	5
2.2.3. Melanosit Morfolojisi.....	6
2.2.3.1. Işık Mikroskopi	6
2.2.3.2. Elektron Mikroskopi.....	7
2.2.4. Özel Boyalar.....	8
2.2.5. Melanogenez	10
2.2.6. Melanin Transferi.....	10
2.3. Melanositik Tümörler	11
2.3.1. Melanositik Tümörler.....	13
2.3.1.1. Nevus Hücrelerinin Morfolojisi	13
2.3.1.2. Nevus Hücrelerinin Histogenezi.....	14
2.3.1.3. Edinsel Melanositik Nevus.....	15
2.3.1.4. Bileşke Nevus	16
2.3.1.5. Bileşik Nevus.....	17
2.3.1.6. İntradermal/Dermal Nevus	17
2.3.1.7. Konjenital Nevus	20
2.3.1.8. Mavi (Blue) Nevus	23

2.3.1.9. Spitz Nevus/Tümör.....	25
2.3.1.10. Atipik Spitz Nevus/Tümör	28
2.3.1.11. Displastik (Atipik, Clark) Nevus	29
2.3.2. Malign Melanoma	33
2.3.2.1. Çevresel Risk Faktörleri ve Genetik Faktörler	33
2.3.2.2. Melanom Gelişiminde Genetik Mekanizmalar	34
2.3.2.3. Tümör Progresyonu	39
2.3.2.4. Melanom Sınıflaması.....	40
2.3.2.5. Tümörojenik ve Nontümörojenik Melanomlarda Morfoloji.....	41
2.3.2.6. Nontümörojenik Malign Melanom (Radial Büyüme Fazı)	42
2.3.2.6.1. Yüzeyel Yayılımlı Melanom	42
2.3.2.6.2. Lentigo Maligna/Lentigo Maligna Melanom	45
2.3.2.6.3. Akral Lentiginöz Melanom.....	48
2.3.2.6.4. Önemi Belirsiz Yüzeyel Atipik Melanositik Proliferasyon (SAMPUS)	50
2.3.2.7. Tümörojenik Malign Melanom (Vertikal Büyüme Fazı).....	51
2.3.2.7.1. Nodüler Melanom	52
2.3.2.7.2. Desmoplastik Melanom ve Desmoplastik Nörotopik Melanom.....	54
2.3.2.7.3. Nevoid (ve Spitzoid) Melanoma.....	56
2.3.2.8. Metastatik Melanom.....	59
2.3.2.9. Melanomda Evreleme.....	61
2.3.2.10. Prognostik Faktörler	65
2.3.2.10.1. Evreleme İçin Gerekli Olan Prognostik Faktörler.....	65
2.3.2.10.2. Klinik Takip İçin Önerilen Ek Prognostik Faktörler	68
2.3.2.11. Melanom ve Epigenetik Mekanizmalar	70

2.3.2.12. Çalışmamızda Kullanılan Epigenetik Belirteçler	71
2.3.2.12.1. 5-Hidroksimetilsitozin.....	71
2.3.2.12.2. Histon Deasetilaz 6.....	75
3._MATERYAL VE METOD.....	81
3.1. Olgu Seçimi	81
3.2. İmmünohistokimyasal Boyama	83
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	84
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	86
4. BULGULAR.....	87
4.1. Olgulara Ait Tanımlayıcı Bulgular.....	87
4.1.1. Genel Bulgular	88
4.1.2. Histopatolojik Prognostik Parametreler	91
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	96
4.2.1. 5- hmC ekspresyonu.....	97
4.2.2. HDAC6 Ekspresyonu.....	107
4.2.3. 5- hmC ve HDAC6 ekspresyonları ile histopatolojik parametrelerin ilişkisi.....	117
5. TARTIŞMA	118
5.1. 5-Hidroksimetilsitozin.....	119
5.2. Histon deasetilaz 6.....	130
6. SONUÇLAR.....	134
ÖZET	136
SUMMARY	139
KAYNAKLAR	143

KISALTMALAR

AIMP	: Atipik intraepidermal melanositik proliferasyon
Akt	: v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
BAP1	: BRCA associated protein 1
BRAF	: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDK4	: Cyclin Dependent Kinase 4
CDKN2A	: Cyclin Dependent Kinase 2A
DOPA	: 3,4- Dihidroksifenilalanin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
HDAC	: Histon Deasetilaz
H-E	: Hematoksilen Eozin
HMB45	: Human Melanoma Black
IAMPUS	: Önemi belirsiz intraepidermal atipik melanositik proliferasyon
KIT	: v-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KRAS	: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MAP Kinaz	: Mitogen Activated Protein Kinase
MC1R	: Melanocortin 1 Receptor
Melan A/MART1	: Melanocytic Antigen Recognized of cytotoxic T lymphocytes
MELTUMP	: Malignite potansiyeli belirsiz melanositik tümör
mTOR	: Mechanistic Target of Rapamycin
NRAS	: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PIK3CA	: Fosfatidilinozitol 4,5 bifosfonat 3 kinaz, katalitik alt ünite α
POMC	: Proopiomelanocortin
PRDM	: PRDI-BF1 and RIZ domain-containing
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
RB1	: Retinoblastom geni
RGP	: Radyal GrowthPhase
S100	: Nötral PH'da amonyum sülfat içerisinde %100 çözünen asidik protein

SAM	: S-adenozilmetiyonin
SAMPUS	: Önemi belirsiz yüzeyel atipik melanositik proliferasyon
STUMP	: Malignite potansiyeli belirsiz Spitzoid tümör
TERT	: Telomerase Reverse Transcriptase
TİL	: Tümörü İnfiltrate Eden Lenfositler
UV	: Ultraviyole
VGP	: Vertikal GrowthPhase
5- mC	: 5 Metilsitozin
5- hmC	: 5 Hidroksimetilsitozin
α MSH	: α Melanocyte Stimulating Hormone



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 2.1. A-B.	Dermal nevus.....	19
Resim 2.2. A-B.	Konjenital nevus olgusunda deri eklerini saran nevik hücreler	22
Resim 2.3. A-B.	Mavi nevus.....	24
Resim 2.4. A-B.	Spitz nevus.....	27
Resim 2.5. A-B.	Biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid tümör.....	29
Resim 2.6. A-B.	Şiddetli atipi gösteren displastik nevus.....	32
Resim 2.7. A-B.	Yüzeyel yayımlı melanom olgusu).....	44
Resim 2.8. A-B.	Lentigo maligna melanoma	47
Resim 2.9. A-B.	Akral lentiginöz melanom	49
Resim 2.10. A-B.	Önemi belirsiz yüzeyel atipik melanositik proliferasyon	51
Resim 2.11. A-B.	Nodüler melanom	53
Resim 2.12. A-B.	Desmoplastik tip melanom olgusu.....	55
Resim 2.13. A-D.	Nevoid melanom	57
Resim 2.14. A-B.	Spitzoid melanom	58
Resim 2.15. A-D.	Metastatik melanom olguları.....	61
Resim 3.1.	Nükleer 5-hmC boyanma şiddetinin değerlendirilmesi.....	85
Resim 3.2.	Sitoplazmik HDAC6 boyanma şiddetinin değerlendirilmesi	85
Resim 4.1. A-B.	Dermal nevus olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu	101
Resim 4.2. A-B.	Displastik nevus olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu	102
Resim 4.3. A-B.	Konjenital nevus olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu	103
Resim 4.4. A-B.	Nodüler melanom olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu	104
Resim 4.5. A-B.	Akral lentiginöz melanom olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu	105

Resim 4.6. A-B.	Lenf nodu metastazı olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu	106
Şekil 4.9.	Benign ana tanı grubunun alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması.	108
Şekil 4.10.	Malign alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması.....	109
Şekil 4.11.	Metastaz alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması.....	110
Şekil 4.12.	Ana tanı grupları arasında HDAC6 nükleer boyanma yüzdelerinin karşılaştırması.....	111
Resim 4.7. A-B.	Nodüler melanom olgusunda HDAC6 ekspresyonu.....	113
Resim 4.8. A-B.	Deri metastazı olgusu-Resim 4.7’de ki nodüler melanomun metastazında HDAC6 ekspresyonu	114
Resim 4.9. A-B.	Yüzeyel yayımlı melanom olgusunda HDAC6 ekspresyonu	115
Resim 4.10. A-B.	Deri metastazı olgusu	116

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1.	Melanositik tümörlerin 2006 DSÖ sınıflaması.....	12
Tablo 2.2.	AJCC-8'e Göre Melanom İçin Primer Tümör Sınıflaması (T)	62
Tablo 2.3.	AJCC-8'e Göre Melanom İçin Bölgesel Lenf Nodu Sınıflaması (N) ..	63
Tablo 2.4.	AJCC-8'e Göre Melanom İçin Uzak Metastaz Sınıflaması (M)	64
Tablo 2.5.	AJCC-8'e Göre Patolojik Evreleme (pTNM).....	65
Tablo 2.6.	Sınıf I, II ve IV HDAC enzimlerinin özellikleri.....	78
Tablo 3.1.	Tanı grupları ve olgu sayıları.....	82
Tablo 3.2.	Kullanılan antikorlara ve boyama tekniğine ilişkin bilgiler	83
Tablo 4.1.	Ana tanı gruplarına göre yaş, cinsiyet ve lokalizasyon dağılımı	89
Tablo 4.2.	Alt tanı gruplarında yaş, cinsiyet, lezyonların lokalizasyonu dağılımı.....	90
Tablo 4.3.	Lenf nodu metastazı grubunun tutulan anatomik bölgeye göre dağılımı.....	91
Tablo 4.4.	Visseral metastaz grubunun tutulan organa göre dağılımı	91
Tablo 4.5.	Malign alt tanı grupları Breslow kalınlığı	92
Tablo 4.6.	Malign alt tanı gruplarında mitoz sayısı	92
Tablo 4.7.	Primer malign melanom dışındaki olgularda ortalama mitoz sayıları	93
Tablo 4.8.	Alt tanı gruplarına göre Clark invazyon seviyesi dağılımı.....	94
Tablo 4.9.	Alt tanı gruplarına göre lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, ülserasyon ve regresyon dağılımı.....	94
Tablo 4.10.	Alt tanı gruplarına göre tümör infiltrate eden lenfositlerin varlık durumu.....	95
Tablo 4.11.	1 mm'den ince ve kalın yüzeysel yayımlı melanomlarda histopatolojik prognostik parametreler	96
Tablo 4.12.	1 mm'den ince ve kalın yüzeysel yayımlı melanomlarda tümör infiltrate eden lenfosit varlığı ve yoğunluğu	96
Tablo 5.1.	Farklı tanı gruplarında 5- hmC ekspresyonunun incelendiği çalışmalar.....	124
Tablo 5.2.	Malign melanomda 5- hmC ile prognostik parametrelerin korelasyonunu inceleyen çalışmalar	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Sitozin 5. pozisyonundaki karbon metilasyonu ve demetilasyonu.....	72
Şekil 2.2.	TET, IDH, SDH, FH mutasyonlarının 5-hidroksimetilsitozin dönüşümüne etkileri.....	74
Şekil 2.3.	Histon asetilasyonu ile transkripsiyon uyarılırken, deasetilasyon ile baskılanır.....	76
Şekil 2.4.	HDAC inhibitörlerinin melanom hücrelerine etki mekanizmaları	80
Şekil 4.1.	Olguların ana tanı gruplarına göre dağılımı.....	87
Şekil 4.2.	Olguların alt tanı gruplarına göre dağılımı	88
Şekil 4.3.	Benign, malign ve metastaz ana tanı gruplarında 5- hmC H-skor karşılaştırması	97
Şekil 4.4.	Dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevuslarda 5- hmC H-skor karşılaştırması	98
Şekil 4.5.	Nodüler tip melanom, 1 mm'den kalın yüzeysel yayımlı melanom ve akral lentiginöz melanomda 5- hmC H-skor karşılaştırması	99
Şekil 4.6.	Deri, yumuşak doku ve lenf nodu metastazı alt tanı gruplarında 5- hmC H-skor karşılaştırması	99
Şekil 4.7.	Dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevusun 5-hmC H-skorlarının tüm primer malign olgularla karşılaştırması	100
Şekil 4.8.	Benign, borderline, malign ve metastaz ana tanı gruplarında HDAC6 karşılaştırması.....	107
Şekil 4.9.	Benign ana tanı grubunun alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması.	108
Şekil 4.10.	Malign alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması	109
Şekil 4.11.	Metastaz alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması	110
Şekil 4.12.	Ana tanı grupları arasında HDAC6 nükleer boyanma yüzdelerinin karşılaştırması	111
Şekil 4.13.	Primer ve metastatik lezyonun aynı hastaya ait olduğu grupta HDAC6 H-skor karşılaştırması.....	112

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri kanseri ilişkili ölümlerin %80'inden fazlasından sorumlu olan malign melanoma en agresif deri kanseri formudur [1]. Son yıllarda malign melanomun, tüm kanser türleri içerisinde en yüksek insidansa sahip tümörlerden biri olduğu ve melanom ilişkili ölümlerin her yıl arttığı bildirilmiştir. Yüksek metastaz kapasitesi, hızlı hastalık progresyonu, kötü prognoz, yüksek mortalite malign melanomun tipik özellikleridir [2]. Primer tümör hacmi 1 mm³ kadar küçük de olsa uzak ve ölümcül metastaz yapma kapasitesine sahiptir. Biyolojik davranış açısından bu kadar agresif bir tümör olan melanom ile bazı nevuslerin histopatolojik bulguları örtüşebilir ve melanom tanısı veya melanom'un dışlanması çok zor olur. Günümüzde, benign ve malign melanositik lezyonlar arasındaki farklılığı saptamada ve bu lezyonların biyolojik davranışlarının tahmininde yararlı olacak güvenilir biyobelirteç eksikliği mevcuttur. Bu amaçla proliferasyon belirteçleri veya melanositik kök hücreler ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte sonuçlar rutin uygulamada her olguda kullanılabilecek güvenilirlikte değildir. Bu durum primer lezyonun malign potansiyelini tanımada, klinik seyir tahmininde, tedaviye cevap tahmininde kullanılacak yeni biyobelirteçler ihtiyacını doğurmuştur [3].

Nevüs ve melanom ayırımında tanısal sıkıntıların bulunduğu olgular olmaktadır. Hem bu olgularda patolojik tanıya kesinlik kazandırabilmek adına, hem de melanom olgularında tedavi seçeneklerini arttırabilmek için yeni arayışlar bulunmaktadır. Epigenetik değişiklikler de bunlardan birisidir. Epigenetik değişiklikler; DNA sekansında değişikliğe sebep olmadan gen ekspresyonlarını düzenleyen moleküler mekanizmalardır. DNA bazları ya da histon proteinlerinde kovalent modifikasyonla kromatin yapısını değiştirerek veya non-coding RNA'lar ile mRNA traslasyonunu düzenleyerek genlerin ifadesi ya da sessizleştirilmesi sağlanır. Son yıllarda çok çeşitli organ tümörlerinin tümörögenezinde özellikle üzerinde durulmaktadır. Malign melanom da, tümör gelişiminde epigenetik olayların rolünün olabileceği malign tümörlerdendir. Son birkaç yıldaki yayınlarda epigenetik değişiklik belirteçlerinden 5-hmC ve HDAC-6 ile melanositik lezyonlarda yapılmış olan çok az sayıda ve az olguda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışma;

daha geniş bir benign, malign ve borderline melanositik lezyon serisinde, ilk defa bu 2 belirtecin tanısal öneminin bir arada araştırıldığı bir çalışmadır.

Çalışmamızda benign, malign ve borderline melanositik proliferasyonlarda immünohistokimyasal yöntemler ile epigenetik belirteçler olan 5-hmC ve HDAC6 ifadesinin araştırılması ve malign melanositik lezyonlar ile benign melanositik lezyonların ayırımında tanısal değerinin araştırılması planlanmıştır. Ayrıca primer malign melanositik proliferasyonlarda 5-hmC ve HDAC6 ifadesinin histopatolojik prognostik parametreler ile ilişkisinin araştırılması; primer ve metastatik malign melanositik proliferasyonlarda 5-hmC ve HDAC6 ile ifadesinin karşılaştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Histolojisi

Deri toplam vücut ağırlığının %16'sını oluşturur ve erişkinlerde dış çevreye açık olan alanların yaklaşık 1,2-2,3 m² kadar bir kısmını meydana getirir. Çok çeşitli yaşamsal fonksiyonları bulunmaktadır. Derinin suya göreceli geçirgen olmayan dış katmanını terleme ile su kaybını önler ve karasal yaşama olanak sağlar. Çevre ile devamlı iletişim halinde olan reseptör organ olarak davranır; organizmayı çarpma ve sürtünme sonucu oluşabilecek fiziksel hasarlardan korur. Kan damarları ve bezler sayesinde ısı ayarlanmasında, vücut metabolizmasında ve çeşitli maddelerin salgılanmasında görev alır. Güneşin UV ışınlarına karşı koruyucu bir tabakadır, güneş ışınının etkisi ile organizma tarafından sentezlenen öncüllerden D3 vitamini elde edilir [4].

Dermatopatolojik tanısal yaklaşımın yapılabilmesi için normal deri histolojisinin bilinmesi oldukça önemlidir. Neoplastik veya nonneoplastik hastalıkların özelliğinden ya da sıklıkla deri biyopsisinin hastalıkların erken gelişim döneminde yapılmasından dolayı, birçok deri hastalığında çok hafif patolojik değişiklikler gözlenebilir. Normal bir deri biyopsisinde görülmesi gerekenler bilinmediği takdirde, doğru ve tekrarlanabilir tanı verilmesi imkansızdır. Normal deri histolojisi oldukça karmaşık özelliktedir. Embriyolojik olarak yüzey ektoderminden gelişen epidermis ve mezoderminden gelişen dermis olarak adlandırılan iki ayrı tabakadan oluşur. Bu iki tabaka birbiri ile fonksiyonel olarak ilişkilidir. Üçüncü tabaka olan, deri ile birlikte birçok patolojik sürece cevap gösteren deri altı yağ doku gerçekte derinin bir bölümü değildir [5].

Epidermis; yüzeyden dökülme olan deskuamasyon sürecine karşı kalınlığını koruyabilmek için dinamik olarak kendisini yenileyebilen keratinize çok katlı yassı epitel özelliğindedir. Epidermiste keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri, nöroendokrin (Merkel) hücreler ve meme başı gibi bazı özel anatomik bölgelerde Toker hücreleri bulunur. Ek olarak, ekrin kanalların ağızları ve kıl foliküllerini içerir. Son çalışmalarda Langerhans hücreleri ile iletişim halinde olan serbest aksonların da bulunduğu saptanmıştır [6].

Epidermisteki keratinositler derinden yüzeye doğru 4 tabaka şeklinde sıralanır: bazal hücre tabakası (stratum basalis, germinativum), skuamöz hücre tabakası (stratum spinosum), granüler tabaka (stratum granulosum), keratinize tabaka (stratum corneum). Avuç içlerinde ve ayak tabanlarında bu tabakalara ek olarak stratum lucidum gözlenebilir [6].

İki boyutlu kesitlerde epidermis alt yüzeyi yapısal olarak; rete olarak adlandırılan derine doğru epitel invajinasyonları ve dermal papilla adı verilen yüzeye doğru mezenşimal parmaklı çıkıntılar nedeniyle yılankavi dalgalı görünümündedir. Epidermisten bazal membran zonu ile ayrılan dermis; kollajen ve glikozaminoglikan matriks içerisinde bulunan, endotelial ve nöral hücreler, fibroblastlar, dendritik ve nondendritik monosit/makrofajlar, Faktör 13a eksprese eden dermal dendrositler, mast hücrelerini içerir. Dermisten epidermise doğru uzanım gösteren deri ekleri, kıl büyümesi için özelleşmiş hücreleri bulundurur; ısı regülasyonunu ve kök hücreler sayesinde epitelyal yenilenmeyi sağlar [5].

Subkutan doku, ince septalar içerisindeki kan damarlarıyla beslenen lipidden zengin adiposit olarak adlandırılan hücrelerden oluşur [5].

2.2. Melanositler

Epiderminin yanı sıra saç ve iriste de bulunan melanositler, insan vücudunda heterojen bir hücre grubunu oluşturur. Tüm melanositler nöral krestten köken alsa ve melanin üretme yeteneğine sahip olsa da; hedef bölgelerdeki işlevleri melanin sentezinden daha fazladır. İç kulakta, sinir sisteminde ve kalp dokusunda da melanositler bulunur [7].

2.2.1. Embriyoloji

Nöral krest, embriyogenez sırasında nöral tüpündorsumunda bulunan geçici bir yapıdır. Perifere göç eden çok çeşitli hücre grupları oluşturarak, anatomik ve fonksiyonel olarak farklı yapılar üretir [8].

Geç embriyonik dönemde (6-8. haftalar), nöral krest hücreleri gelişen dermis mezenkimine doğru göç ederler ve melanoblastalara farklılaşırlar. Bu hücreler de

dermoepidermal bileşkeye göç ederek, pigment üreten hücreler olan melanositlere dönüşürler. Melanoblastların melanositlere farklılaşması pigment granüllerinin oluşumuna neden olur. Bu süreci Wnt sinyal yolağı düzenler. Nöral krest hücrelerinin göçünden hemen sonra, melanositler gelişen embriyonal deride 40-50. günlerde gözlenmeye başlar. Melanositlerin hücre gövdeleri genellikle epidermisin bazal katmanlarında bulunur; bununla birlikte, melanositlerin dendritik uzantıları epidermal hücreler arasına uzanır. Normalde dermiste sadece birkaç tane melanin içeren hücre bulunabilir [9].

Nöral krest gelişimine uygun olarak epidermisdeki melanositlerin ortaya çıkışı kraniokaudal yönde gerçekleşir. Baş bölgesi epidermisindeki melanositler, enzim histokimyası ile üçüncü fetal ayın sonlarına doğru saptanabilirken; daha kaudal bölgelerde, dördüncü fetal ayın sonlarına doğru en erken formda melanin gözlenebilir. Çünkü melanositler fetal dermis boyunca göçleri sırasında fonksiyonel olarak immatür özelliktedir; epidermise ulaşana kadar histokimyasal yöntemlerle saptanamazlar. Bu nedenle melanositler, elektron mikroskopi ve immünohistokimyasal yöntemler ile ışık mikroskopisine göre daha erken saptanabilmektedir.

Tirozin kinaz reseptörü KIT ve ligandı kök hücre faktörü melanosit fizyolojisinde kritik bir rol oynar ve melanosit göçü, çoğalması, farklılaşmasını etkiler. Tirozinaz gibi Mikrofalmlı transkripsiyon faktörü (MITF) de melanositlerin embriyonik gelişimi ve melanin sentezinde rol alan genlerin transkripsiyonunda rol oynayan nükleer bir proteindir [5].

2.2.2. Normal Mikroanatomi

Somatik melanositlerin çoğunluğu deride, özellikle epidermis ve kıl folikülleri içerisinde bulunmakla birlikte bir kısmı dermiste, sebace bezlerin etrafında veya meme başındaki laktiferöz kanalların yakınında bulunabilir. Melanositler kıl folikülünde, papillayı sınırlayan bazal membranın epitelyal tarafında yer alırlar. Kalp, orbital kavite, leptomeninksler ve iç kulak gibi organlarda da melanositler tanımlanmıştır [8].

Epidermal melanositler derinin tüm bölgelerinde bulunur. Yetişkin bir insanda tahmini toplam melanosit hacmi 1 ile 1.5 ml arasında değişir. Melanosit yoğunluğu anatomik bölgeye göre değişir; en yoğun olduğu yerler yüz ve genital bölge iken ($2.000/\text{mm}^2$), gövde ve üst kolda en az ($800-1.000/\text{mm}^2$) yoğunluktadır. Yaşlanma ile melanosit sayısı ve melanin sentezi azalır. Melanositlerin derideki göreceli olarak yoğunluğu ırk ve cinsiyetten bağımsızdır. Deri rengindeki ırksal farklılıklar, melanosit sayısı farklılığından değil melanin üretimi ve salınımının farklı olmasından kaynaklanır [8]. Deri rengi koyu olan insanlarda epidermis bazal hücre tabakasında, hatta keratin tabakası içerisinde, üst dermiste makrofajlar içerisinde (melanofaj) melanin granülleri bulunabilir. Anatomik bölge ve etnik özelliklerin bilinmesi gerçek bir pigment patolojisi normal varyasyonlardan ayırmada önemlidir [5].

Melanositlerde üretilen melanin, dendritik uzantılarla, önce depo edileceği daha sonra degrade edileceği bazal keratinositlere transfer edilir. Özellikle rete uçlarındaki hücreler olmak üzere bazal keratinositler melanositlerden daha fazla melanin içerirler. Bazal tabaka hücrelerinin sadece %10'u melanosittir ve bir melanosit birkaç adet keratinosit melanin sağlayarak epidermal-melanin birimini oluşturur [5].

2.2.3. Melanosit Morfolojisi

2.2.3.1. Işık Mikroskopi

Epidermisteki melanositler, ışık mikroskopunda iki boyutlu düzlemde yaklaşık 4-10 bazal keratinosit başına 1 melanosit olacak şekilde, dermoepidermal bileşke boyunca düzenli bir dizilenim gösterirler. Masson'un şeffaf hücreleri olarak da adlandırılan melanositler H-E boyalı kesitlerde, epidermisin bazal tabakasında yerleşimli, soluk ya da şeffaf sitoplazmalı, küçük, yuvarlak-oval şekilli göze çarpmayan hücrelerdir. Özel histokimyasal boyalarla görünür olan ince sitoplazmik dendritler hücre gövdesinden çıkarak her yöne doğru uzanım gösterirler. Melanin ile dolu olmadığı sürece H-E boyalı parafin kesitlerde dendritik uzantılar gözlenemez. Dendritik uzantılar sayesinde, epidermal keratinositler ve dermal fibroblastlar ile hücreler arası iletişim kurulur.

Nükleolu belirsiz, uniform kromatinli, poligonal ya da girintili sınırlı olan melanosit nükleusu, komşu keratinosit nükleusundan daha küçük ve hiperkromatik özelliktedir. Yetişkinlerde, ultraviole ışığa ya da doku rejenerasyonu sırasında salgılanan büyüme faktörlerine cevap olarak melanositler sayıca artış gösterebilirler. Üç tip çoğalma paterni tanımlanmıştır. Dermoepidermal bileşke boyunca tek sıralı melanosit artışı lentijinöz hiperplazi olarak tanımlanırken; melanositlerin kümeler oluşturarak çoğalma göstermesi yuvalanma paterni olarak adlandırılır. Pagetoid çoğalma paterninde ise, epidermin üst tabakalarına doğru çıkan diskoheziv özellikte tek hücre şeklinde melanositler gözlenir. Lentijinöz hiperplazi sıklıkla çillerde ya da “lentijinöz” özellikteki melanositik nevuslarda gözlenirken; yuvalanma paterni sıradan melanositik nevuslar için tipiktir. Pagetoid çoğalma paterni karakteristik olarak melanomda daha sık olmakla birlikte; epidermal yaralanma durumunda, çocuklarda edinsel veya konjenital nevuslarda, Spitz nevusta, pigmente işçi hücreli nevusta, edinsel akral bölge nevuslarında da gözlenebilir. Benign melanositik proliferasyonlar simetrik özelliktedir ve dermise doğru vertikal büyüyerek maturasyon gösterirler [8].

2.2.3.2. Elektron Mikroskopi

Elektron mikroskobide, melanositlerin belirgin Golgi kompleksi, kaba endoplazmik retikulum ve çok sayıda mitokondri bulundurduğu izlenmektedir. Tonofilaman ve desmozom içermeyen melanositlerde intermediate filamanlar (vimentin) bulunur. Epidermal bazal laminaya tutunma bölgelerinde hemi-desmozom benzeri yapılar görülebilir. Melanosit nükleusları düzgün ya da lobüle olabilir. Nükleer lobasyon metabolik olarak aktif melanositlerin bir özelliğidir.

Melanositlerin ultrasriktürel yapıtaş melanozom olarak adlandırılan özel bir organeldir. Melanogeneze yer alan enzimleri içeren, lizozom ile benzer biyolojik özelliklere sahip melanozom, Golgi aparatından kaynaklanır [8].

Membran bağımlı bir organel olan melanozomların gelişiminde dört evreden oluşan bir matürasyon süreci ile melanosit sitoplazmasından dendritik uzantılara doğru bir hareket söz konusudur. Melanozom matürleştirirken melanin içeriği artar, melanojenik enzim konsantrasyonu azalır. Evre I melanozomlar 0.3 µm boyutunda,

yuvarlak şekildedir ve melanin içermezler. Evre II-IV melanozomlar 0.5 µm boyutunda, elipsoid şekildedir ve birbirleriyle çaprazlaşan longitudinal filamanlar içerirler. Hem membranda hem de filamanlarda enzimatik aktivite bulunur. Çaprazlaşan filamanlarda melanin depolanması evre II'de başlar. Evre III melanozomlarda çok az miktarda tirozinaz aktivitesi bulunurken, nonenzimatik polimerizasyon yoluyla melanin depolanması devam eder. Evre IV melanozomlar tamamıyla melanizedir ve tirozinaz aktivitesi göstermezler. Homojen ve elektron dens olan melanin bu evrede organelin tamamını doldurur ve internal yapılar görünmez hale gelir [5].

Olgunlaşan melanozomlar, kolaylaştırılmış bir sitoskeletal süreç ile melanosit sitoplazmasından dendritik uzantılara doğru harekete geçer. Matür melanozomlarla dolu olan dendritik uçlar komşu keratinositlerce koparılır ve endositoza uğrarlar. Burada melanozomlar lizozomlar ile kaynaşır ve hücrelerin apikal kutuplarına transloke olur [8].

2.2.4. Özel Boyalar

H-E boyalı kesitlerde melanositlerin anlaşılması zordur bu nedenle ışık mikroskopide melanositlerin tanınmasını kolaylaştıran çeşitli özel boyalar kullanılır. Fontana-Masson gibi gümüş boyaları histokimyasal olarak melanin pigmenti varlığını gösterir. Bu metodlar melanin için spesifik değildir. Melanin, hidrojen peroksit veya potasyum permanganat gibi güçlü bir oksitleyici ajan ile ağartılabilir. Bu yöntem nükleer detayın zor seçildiği yoğun melaninli tümörlerde daha spesifik bir tanıma sağlar. Fizyolojik melanin oluşumunu taklit eden DOPA reaksiyonu, melanositleri kahverenginden siyaha boyar.

Melanositlerin işaretlenmesi amacıyla immünohistokimyasal tekniklerin kullanımı giderek daha da önem kazanmaktadır ve bu amaçla parafine gömülü dokular için birkaç adet melanositik belirteç mevcuttur. Melanositlerin immünohistokimyasal olarak saptanması klasik olarak ve en yaygın olarak S100 proteinine yönelik poliklonal antikorlarla yapılmaktadır. S100 antijeni, nöral melanositik seri de dahil çok çeşitli hücrelerin sitoplazmasında ve nükleusunda

bulunur. Deride melanositlere ek olarak Langerhans hücreleri, makrofajlar, Schwann hücreleri, ter bezleri ve adipositler de S 100 ile boyanırlar.

Melanomlu hastalarda immünterapi için yeni hedefler araştırılması sonucu tanısal belirteçler bulunmuştur. Sitotoksik T hücre testlerinin kullanımıyla, otolog sitotoksik T hücreleri tarafından tanınan çeşitli antijenler tanımlanmıştır. Bu grup antijenlerin ifadeleri sadece melanositik seri hücreleri ile kısıtlı olduğu için melanositik farklılaşma antijenleri olarak adlandırılırlar. Monoklonal antikolar olan HMB45, Melan A/MART-1, tirozinaz, PNL2 parafine gömülü dokularda kullanılabilecek melanositik farklılaşma antijenlerinin reaktifleridir. HMB45 antikoru, melanom hücrelerinin çoğunluğunda nevus hücrelerinin az bir kısmında bulunan, sitoplazmik bir epitop olan premelanozom glikoprotein gp100 ile reaksiyona girer. Yetişkinlerde normal epidermal melanositler HMB45 negatifken, fetal deride, uyarılmış yetişkin melanositlerinde eksprese olabilir. Malign melanom tanısı için oldukça spesifik bir antikordur.

Daha yeni melanositik farklılaşma antijenlerinin (örn. Melan A/MART-1) avantajı; malign melanom tanısında, HMB45'e göre daha sensitif, S 100'e göre daha spesifik olmalarıdır. Melan A/MART-1 antijeni, melanozomal bir bileşen olduğuna inanılan, ayırt edici nükleotid dizileri ve genetik organizasyonu olan küçük bir sitoplazmik proteindir. Tirozinaz, melanin biyosentezinin anahtar enzimidir ve melanositik farklılaşma belitecidir. Bir murin monoklonal antikoru olan T311, parafin kesitlerdeki melanositler için güvenilir bir belirteçtir. PNL2, fiksasyona dayanıklı bir melanositik antijene karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikordur. Normal veya malign insan dokularında ve çeşitli melanositik lezyonlarda yapılan immünohistokimyasal analizlerde PNL2 antikorumun spesifitesinin yüksek olduğu saptanmıştır. Yeni bir melanositik farklılaşma belirteci olan MITF düşük sensitiviteye sahiptir ve ifadesi melanositler ile sınırlı değildir.

Yeni belirteçlerin avantajlarına rağmen, S100 ve HMB45 tümör tanısında önemini sürdürmektedir. S100, özellikle içsi hücreli lezyonlarda neoplastik melanositler için daha sensitiftir [5].

2.2.5. Melanogenez

Enzimatik melanogenez için melanojenik enzim olan tirozinaz gerekir. Tirozinaz; tirozinin DOPA'ya hidroksilasyonunu ve DOPA'nın DOPA-kinon'a oksidasyonunu katalizleyen bakır içerikli bir enzimdir. Tirozinazın tirozin üzerine etki etmesi için, tirozinazda bulunan iki kuprik atomun kupröz atoma indirgenmesi gerekir. Substrat olmasının yanısıra, DOPA'nın kofaktör gibi davranarak bu indirgenmeyi aktive ettiği düşünülmektedir. Tirozinaz ile tirozinin melanine dönüşümü çeşitli gecikme periyodları ile karakterlidir. Işık etkisi bulunmayan epidermal melanositlerde olduğu gibi, tirozinaz konsantrasyonu düşük olduğunda bu süre belirgin olarak uzundur ve tirozinaz tarafından tirozin kullanımı saptanmaz. Buna karşın ultraviyole ışığa maruz kalan deride epidermal tabakada ve kıl köklerinde, substrat olarak tirozin ile birlikte tirozinaz aktivitesi tespit edilir. Substrat olarak DOPA kullanıldığında gecikme periyodu olmadığı için, deri kesitleri tirozin yerine DOPA ile inkübe edildiğinde, ışığa maruz kalmamış deride bile tirozinaz aktivitesi kolayca gösterilebilir. Dolayısıyla dopaya etki eden enzimin dopa-oksidad yerine tirozinaz olduğu düşünülmektedir.

Melanojenik enzim olan tirozinaz, Golgi ilişkili endoplazmik retikulumda sentezlenir, burada membran bağımlı veziküller içerisinde yoğunlaşır. Daha sonra, sentezlenen tirozinaz enzimi düz endoplazmik retikulumun dilate tübüllerine aktarılır. Tirozinaz burada, filamanları da içeren yapısal bir protein matriks ile birleştirilir. Böylece evre I melanozom oluşturulmuş olur. Evre I ve II'de melanozomların az bir kısmı, melanozomların degradasyonu ve transferinde rol oynayan bir enzim olan asit fosfataz aktivitesine sahiptir, evre III'de asit fosfataz pozitif melanozom oranı artar, evre IV'de maksimuma ulaşır.

2.2.6. Melanin Transferi

Melanositlerden epidermal keratinositlere melanozom transferi, melanositik hücrelerin dendritik uzantılarının uçlarının keratinositler tarafından fagosite edilmesiyle gerçekleşir. Keratinositlere alınan melanozomlar, keratinosit nükleusu üzerinde koruyucu agregat oluştururlar. Melanin, beyaz ırkta bazal keratinositlerde yoğunken, siyah ırkta epidermis boyunca diffüz dağılım görülür. Hem melanin

oluşumu hem de melanin transferi, özellikle ultraviyole (UV) ışık maruziyeti gibi çeşitli uyarılar ile arttırılır. Verilere göre, UV ile indüklenen melanizasyonda ve patolojik hiperpigmentasyonda p53 merkezi role sahiptir. UV ile indüklenen melanizasyon (bronzlaşma) için epidermal keratinositler tarafından α -melanosit uyarıcı hormon (α MSH) sekresyonunun indüklenmesi gerekir. Bu fenomen, proopiomelanokortinin (POMC) bir ürünü olarak α -MSH üretilmesini ve pigmenter fenotip ve proliferasyon gibi melanosit fonksiyonlarına aracılık eden çok pleomorfik α -MSH reseptörü MC1R ile etkileşimini gerektirir. p53'ün, UV maruziyetine cevap olarak POMC promoterini uyardığı düşünülmektedir. Buna göre, UV ile hasarlanmış hücrelerde p53 apoptozu indüklemenin yanısıra bronzlaşmayı uyaran bir sensördür ve hatta bazı patolojik melanizasyon şekilleri için bir tetikleyici konumundadır [5].

2.3. Melanositik Tümörler

Melanositik deri tümörleri; farklı klinik, morfolojik ve genetik özelliklere sahip çok çeşitli benign ve malign neoplazileri kapsar. Klinik ve halk sağlığı açısından bakıldığında, malign melanom en önemli deri kanseridir. Bazal ya da yassı hücreli deri karsinomlarından daha az sıklıkta görülse de, lenfatik ve hematojen metastaz yapma özelliği nedeniyle daha ölümcül seyreder. Endojen faktörler ile birlikte devamlı yüksek doz UV ışık maruziyeti en önemli risk faktörüdür[10]. Melanom insidansı geçtiğimiz yıllarda hızla artmasına rağmen, mortalite erken tanı nedeniyle insidansa göre dramatik olarak daha az düzeyde artış göstermektedir.[5].

Pigmente deri tümörlerinin histopatolojik tanısı dermatopatoloji alanı için oldukça önemlidir. Nevus ve melanom dışı deri tümörlerinde de melanin pigmenti bulunabilir. Örneğin seboreik keratoz, bazal hücreli karsinom ve daha nadir olarak yassı hücreli karsinom, schwannom, dermatofibrosarkoma protuberans melanin içerebilir. Ayrıca bazı dermatozlarda da değişken hiperpigmentasyon paternleri görülebilir[11].

Melanositik çoğalma ile karakterli lezyonlar, epidermis, dermis veya nadiren subkutan dokuda bulunan, 3 hücre tipinden bir ya da daha fazlasını içerirler ki bunlar melanositler, nevus hücreleri ve melanom hücreleridir. Melanositler, genellikle diğer hücreler (keratinositler veya fibroblastlar) tarafından birbirinden ayrı bir şekilde tek

tek duran dendritik hücrelerdir. Benign ya da malign melanositik neoplazileri meydana getiren lokalize melanosit çoğalmasında, melanositlerin tümör formasyonu oluşturmak için yan yana geldikleri gözlenir. Nevüsler; melanom taklitçisi, melanomun potansiyel öncüleri ve bireylerin melanom gelişim riski için bir belirteç oldukları için oldukça önemlidir. Hem klinik hem de histolojik olarak melanoma benzediği için, nevüs ile melanom arasındaki ayırıcı kriterler kritik öneme sahiptir[5]. Tablo 2.1’de Dünya Sağlık Örgütü melanositik tümörler sınıflaması bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Melanositik tümörlerin 2006 DSÖ sınıflaması

Malign Melanom
Yüzeyel yayılan melanom
Nodüler melanom
Lentigo maligna
Akrall lentiginöz melanom
Desmoplastik melanom
Mavi nevüsten gelişen melanom
Dev konjenital nevüsten gelişen melanom
Çocukluk çağı melanomu
Nevoid melanom
Persistan melanom
Benign Melanositik Tümörler
Konjenital melanositik nevus
Dermal melanositik lezyonlar
Mavi nevus
Kombine nevus
Melanositik makül, lentigo simpleks, lentiginöz nevus
Displastik nevus
Özel bölge nevusları
Persistan melanositik nevus
Spitz nevus
Pigmente işçi hücreli nevus (Reed nevus)
Halo nevus

2.3.1. Melanositik Tümörler

Melanositik çoğalma ile karakterli lezyonlar genellikle pigmentedir ve bu nedenle “pigmente lezyonlar” olarak da isimlendirilirler. Tüm melanositik çoğalmalı lezyonlar pigmente olmadığı gibi, tüm pigmente lezyonlar da melanositik çoğalma içermezler.

Çiller, solar lentigolar, Albright Sendromu’nun melanositik makülü, Becker melanozisi, nörofibromatozisteki cafe au lait lekeleri epidermal melanositlerden oluşan benign lezyonlardır. Dermal melanositlerden kaynaklanan benign melanositik lezyonlar ise Mongol lekeleri, Ota-Ito nevus, Mavi nevustur.

Nevus hücrelerinden kaynaklanan benign melanositik tümörler “melanositik nevus” olarak adlandırılır. Melanositik nevuslar, lentigo simpleksin de dahil olduğu bileşke nevus, bileşik nevus ve intradermal nevus olarak gruplandırılabilirler; bu grup edinsel banal nevuslar olarak da isimlendirilmektedir. Spitz nevus, iğsi hücreli pigmente nevus, konjenital melanositik nevus ve displastik nevus daha önemli ve özel melanositik nevus varyantlarıdır [5].

2.3.1.1. Nevus Hücrelerinin Morfolojisi

Günümüzde kabul edilen görüşe göre; nevus hücreleri olgun melanositlerin morfolojik varyantlarıdır ve nevuslar melanosit kaynaklı hücrelerin çoğalması sonucu gelişen benign tümörlerdir. Melanositik nevuslardaki hücreler tipik olarak birbirleriyle komşuluk halinde bulunarak yuvalanmalar oluştururlar. Yuvalanma dermoepidermal bileşke boyunca (bileşke nevus), dermis içerisinde (dermal/intradermal nevus) ya da her iki komponenti de kapsayacak şekilde (bileşik nevus) gözlenebilir. Dermal komponent derinlere doğru ilerleyebilir ve deri eklerini , damarları, nöral yapıları sarabilir (konjenital özellikler gösteren melanositik nevus, konjenital paternli nevus).

Nevuslarda 3 farklı sitolojik melanosit varyasyonu gözlenir. İntraepidermal ya da intradermal melanositler, tip A olarak adlandırılan melanositler, değişken ve kaba melanin pigmenti içeren belirgin sitoplazmalı epiteloid görünüme sahiptir. Bu hücrelerde, uniform dağılık kromatinli, belirsiz nükleollu, keratinosit nükleusuna

göre hafif küçük, yuvarlak-oval nükleus bulundurlar. Lenfositleri anımsatan tip B melanositler, dar sitoplazmalı, uniform dağınık kromatinli, belirsiz nükleolu, küçük yuvarlak-oval nükleuslu hücrelerdir. Bu hücreler daha çok bileşik nevusların dermal komponentlerinde gözlenirler. Fibroblastlara ya da periferik sinir kılıfı hücrelerine benzeyen, nöral ya da tip C hücreler içsi şekillidir ve tipik olarak melanositik lezyonun en derin kısımlarında saptanırlar [8].

2.3.1.2. Nevus Hücrelerinin Histogenezi

Nevus içerisindeki melanositlerin ya da melanosit benzeri hücrelerin histogenezi tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Bir görüşe göre nevositler; nöral krestten dermise göç eden, pluripotent olduğu varsayılan kök hücrelerden gelişen nevoblastlardan kaynaklanır. Daha çok kabul gören görüş ise; nevositlerin melanositlerin sadece morfolojik varyantları olduğu teorisidir. Bu görüşe göre nevus hücrelerinin yuvalanma paterni, fonksiyonel olarak değişmiş lokal mikroçevreye ya da hasarlanmanın yol açtığı onkogen uyarımlı senesansa (yaşlanmaya) melanositik yanıt olarak ortaya çıkmaktadır.

Nöral krest kaynaklı epidermal melanositler göçleri sırasında dermisten epidermise doğru yol alırlar. Bu geçiş göz önünde bulundurulduğunda, nevus hücrelerinin dermal varlığı için iki potansiyel açıklama vardır. Birincisi; çoğalan epidermal melanositler tekrar dermise doğru yer değiştirebilirler. İkincisi; epidermise doğru olan göçlerini tamamlayamayıp dermiste duraklayabilirler. İkinci görüşe göre yolculuklarını tamamlayamayan hücrelerden konjenital nevus gelişir. Bu hipoteze göre, pluripotent periferik sinir kılıfı prekürsör hücrelerinden gelişen melanositlerin, göç yeteneklerinin azalmasıyla edinsel nevuslar oluşur. Bununla birlikte, her iki teori de spekülatif olmaya devam etmektedir. Çünkü bugüne kadar herhangi bir yönde hücre göçüne ilişkin doğrudan bir kanıt bulunamamıştır.

Son gelişmelerle moleküler kökenleri daha iyi anlaşılan edinsel melanositik nevusların; DNA hasarına yol açan UV ışık, toksik uyarım ya da inflamatuvar mediatörlere karşı oluşan cevap ile melanosit büyümesinin kronik olarak uyarılması sonucu meydana geldiği ve melanositik karsinogenezde bir başlangıç evresi olduğu anlaşılmıştır. Bu teoriyi destekler şekilde, büyüme kontrolünü yapan

mekanizmalardan kaçışı sağlayan MAP kinaz kaskadındaki BRAF ve NRAS onkogenik mutasyonları edinsel nevuslerde sıklıkla görülür. Hücrel yaşlanmaya karşı koruyucu mekanizmaların baskın hale gelmesi sonucu, onkogen aktif hücrelerde büyüme duraklaması gözlenir. RB1 (retinoblastoma) yolağındaki CDKN2 ve onun ürünü olan p16'nın artışı hücrelerin yaşlanmasına yol açan bir mekanizmadır. Bu bağlamda, melanositler p16 / RB1'in neden olduğu yaşlanmaya diğer hücre tiplerine göre daha duyarlıdır. CDKN2/ARF bölgesinin kazanılmış mutasyonu veya susturulması gibi hücrel yaşlanmayı yöneten mekanizmaların inaktivasyonu ile onkogen uyarımlı senesanst/yaşlanmadan kaçılır. Bu varsayımsal melanomagenез modelinin kesin kanıtları bulunmadığı için, alternatif olarak deri kök hücrelerinden melanom gelişimi çalışmalarına ilgi devam etmektedir[8].

2.3.1.3. Edinsel Melanositik Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Nevuslar klinik olarak çok çeşitli görünümlere sahip olabilirler. Patolojik varyantların dışında 5 klinik tip tanımlanmıştır: düz lezyonlar, sıklıkla ortası kabarık kenarları düz olan hafif kabarık lezyonlar, papillomatöz lezyonlar, kubbe şekilli lezyonlar, pedinküle/saplı lezyonlar. İlk üç tip nevuslar daima pigmentli iken, sonraki iki tip nevuslar pigmentli ya da pigmentsiz olabilirler. İstisnalar olmasına rağmen, bir nevüsün klinik görünümünden, histolojik incelemede birleşke/junctional nevüs (epidermise sınırlı), bileşik/compaund nevüs (epidermal ve dermal) veya intradermal nevüs olup olmadığı belli bir derecede öngörülebilir. Çoğu küçük düz lezyonlar lentigo simpleks ya da bileşik nevustur. Hafif eleve lezyonlar ya da bazı papillomatöz lezyonlar özellikle pigmentli ise bileşik nevusları temsil ederken; çoğu papillomatöz lezyon ile kubbe şekilli ve saplı lezyonların hemen hepsi pigmentli olmasalar dahi intradermal nevus özelliğindedir.

Melanositik nevuslar nadiren doğumda mevcuttur (konjenital nevus). Nevusların çoğu adölesan ve erken yetişkinlik döneminde ortaya çıkar. Kozmetik kaygılar dışında nevuslar, melanom için risk belirteci, taklitçi ve prekürsör olabildikleri için önemlidir.

Melanomun zaman içerisinde hızla ilerlemesine karşın; nevuslar bir noktaya kadar büyür, duraklar ve gerilemeye başlar, böylece yaşlılık döneminde genç yaşlara

göre daha az sıklıkta görülürler. Bu klinik özelliğe göre, önceden durağan olan bir nevusta boyut ya da pigmentasyon değişikliği meydana gelirse malignite şüphesi artar [5].

Histopatoloji: Melanositik nevusları oluşturan nevik hücreler, normal melanositlerden üç morfolojik özellik ile ayrılır: En azından kısmen kümeler ve yuvalar oluştururlar, dendritik hücre şekli yerine daha yuvarlak görünme eğilimindedirler ve melanini komşu keratinositlere transfer etmektense sitoplazmalarında tutmayı tercih ederler. Nevus hücreleri oldukça değişken görünümde ve pigmentasyonda olabilirler; genellikle sitolojik özelliklerinden çok kümelenme ve yuvalanma paternleri ile tanınırlar. Büzüşme artefaktına bağlı olarak, nevus hücre yuvaları çevre stromadan ayrılmış gibi görülebilirler.

Nevuslar histolojik olarak bileşke, bileşik ve intradermal olarak ayrılabilir; bu terminolojinin aslında bir nevusun yaşam döngüsündeki sırasıyla bileşke-bileşik-intradermal ve gerileme geçiş evrelerini temsil ettiği bilinmektedir [5].

2.3.1.4. Bileşke Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Bileşke melanositik nevus, klinik olarak lentigoyu hatırlatır şekilde, iyi sınırlı, kahverengi-siyah makül görünümündedir. Vücudun herhangi bir yerinde gözlenebilir. Yetişkinlerde de gözlenebilen bileşke nevus, genellikle çocukluk çağı ya da erken adölesan dönemde gelişerek, önce bileşik nevusa, sonra da intradermal nevusa matüre olur. Eng tarafından ergenlerde görüldüğü bildirilen “atipik bileşke nevus” daha önceden lentijinöz nevus olarak tanımlanan lezyon ile benzerlik gösterir [11].

Histopatoloji: Bileşke nevus, dermoepidermal bileşkede genellikle rete uçlarında bulunan, birbirinden ayrık duran melanosit yuvaları ile karakterlidir. Oval ya da küboidal şekilli hücreler, değişken düzeyde melanin içeren şeffaf sitoplazmaya sahiptir. Mitoz nadir ya da yoktur. Yuvalar bazen melanofaj ve dağınık lenfositik inflamasyon içererek dermise doğru çıkıntı yaparlar. Tırnak matriksindeki bileşke nevus, longitudinal melanonişinin bir nedenidir [11].

2.3.1.5. Bileşik Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Bileşik nevus en sık çocuk ve adölesanlarda görülür. Açık ya da koyu kahverenkli olan nevuslar, hafif kabarık lezyondan kubbe şekilli lezyona ya da polipoid konfigürasyona kadar çeşitli şekillerde gözlenir[11].

Histopatoloji: Bileşik nevus; hem dermoepidermal bileşkede hücre yuvaları ile karakterli epidermal komponenti, hem de intradermal komponenti bulundurur. Üst dermisteki hücreler daha kübodal özellikte ve melanin içerirken (tip A hücreler); derindeki hücreler daha küçüktür ve daha az melanin içerirler (tip B hücreler). Düzenli yuvalar veya kordonlar oluşturan nevik hücrelerde derinde apoptoz görülebilir. Yüzeydeki epidermis düz, akantotik ya da keratin kistleri dahi içererek seboreik keratoz benzeri görünümlere sahip olabilir. Böyle nevuslar “keratotik melanositik nevus” olarak adlandırılabilir. Papillomatöz nevuslar kadınlarda daha sıktır.

2005 yılında yapılan bir çalışma; melanom tanısı için geleneksel olarak kullanılan, düzensiz sınırlanma, asimetri, düzensiz birbirine karışan yuvalar, tek melanositin baskın olması gibi bazı özelliklerin benign nevuslarda da sıklıkla bulunabildiğini göstermiştir. Sitolojik atipi benign nevusların çok az bir kısmında bulunabilir. Mitoz ve nekroz benign lezyonlarda sık görünmemesine karşın özellikle genç yaşlarda ve hormonal duruma bağlı olarak benign nevuslarda mitoz izlenebilir [12].

Travmatize nevus, parakeratoz, ülserasyon, dermal telejiektazi, stratum korneumda melanin bulunması gibi histolojik özelliklere sahiptir. Mitoz nadirdir, pagetoid yayılım travma bölgesi ile sınırlıdır [11].

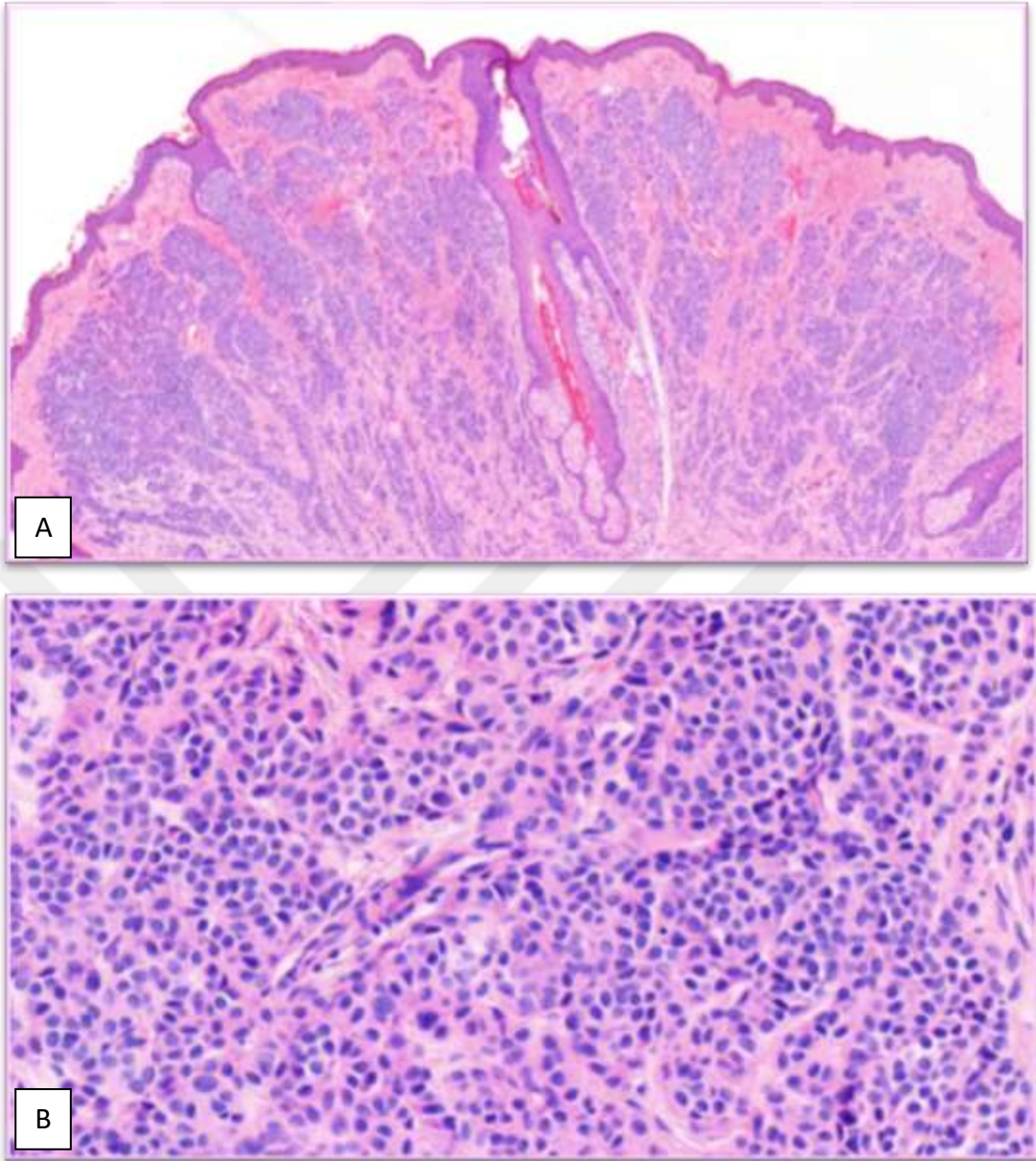
2.3.1.6. İntradermal/Dermal Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Büyük çoğunluğu erişkinlerde bulunan intradermal nevus en sık görülen melanositik nevustur. Genellikle ten renginde ya da hafif pigmente görünümde, yüzeyinde kıl yapıları bulunabilen, kubbe şekilli, nodüler ya da polipoid özelliktedir. Klinik olarak nadiren lobüle ya da serebriform görünümde olabilir.

Nevuslar bazen kozmetik nedenlerle, bazen de giysiler veya tıraş nedeniyle sürekli tahriş olduğu için cerrahi yöntemler ile çıkarılır. Ayrıca reaktivasyon, regresyon, inflamasyon ya da kıl folikülü rüptürü nevusun çıkarılma sebepleri arasındadır.

Histopatoloji: Yuvalar ya da kordonlar oluşturan nevus hücreleri dermisde bulunur. Gerçek intranükleer inklüzyonların oldukça nadir olduğu nevus hücrelerinin nükleusunda sitoplazmik invajinasyonlar sonucu gelişen intranükleer psödoinklüzyonlar sıklıkla gözlenir. Multinükleer nevus hücreleri bulunabilir. Lezyonun derin kısımlarda iğsi şekilli hücrelerde Meissner korpuskülüne benzer nöroid görünüm (nöral nevus, nörotize melanositik nevus) gözlenebilir. Shwannomu anımsatan Verocay benzeri cisimcikler de izlenebilir. Bu çeşitli paternler, periferik sinir kılıfı farklılaşmasının farklı yansımaları olabilir. Bu nöroid hücreler elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal olarak nörofibromda görülen hücrelerden oldukça farklıdır. Nörofibroma hücreleri Leu7, GFAP, MB antijenlerinin ifadesi bulunurken, nevus hücreleri bu belirteçler ile boyanmazlar. Nöral nevuslarda, sinir büyüme faktörü reseptörü ifadesi artar ve Schwann hücresi benzeri tip C hücrelerde S100A6 boyanması görülür. Lezyon yaşlandıkça dermisteki nevus hücrelerinin yerini kollajen, elastin, yağ doku alabilir. Bir çalışmaya göre intradermal nevuslarda %2.75 oranında müsin depolanması gözlenir [11].

Dermal nevus olgularımızdan bir tanesi farklı büyütmelelerde Resim 2.1’de gösterilmiştir.



Resim 2.1. A-B. Dermal nevus.(H-Ex50, H-Ex400, sırasıyla)

Nevuslardaki Sekonder Değişiklikler: Nevuslarda çok farklı ikincil değişiklikler gözlenebilir. Amiloid ya da kemik doku bulunması, epidermal spongiozun neden olduğu klinik olarak egzamatöz halo görülmesi (Meyerson nevus), psöriazis birlikteliği, elastik doku artışı, nodüler miksoid değişiklik, kıl foliküllerinin kistik dilatasyonu, folikülit, hızlı büyümeye neden olarak bazen rüptüre olabilen epidermal, dermal ya da trikolemmal kist oluşumu, psammom cismi, sebosit benzeri melanositler, granüler hücre değişikliği, regrese lezyonda granüloamatöz inflamasyon,

paramiksovirus benzeri inklüzyonlar, nevus çevresi alopesi, fokal epidermal nekroz, molluskum contagiosum varlığı, trikoepitelyoma, bazal hücreli karsinom ve siringoma birlikteliği, ter bezi lezyonları bu değişikliklerden bazılarıdır. Parafine ya da lokal anesteziye bağlı artefaktlar gözlenebilir.

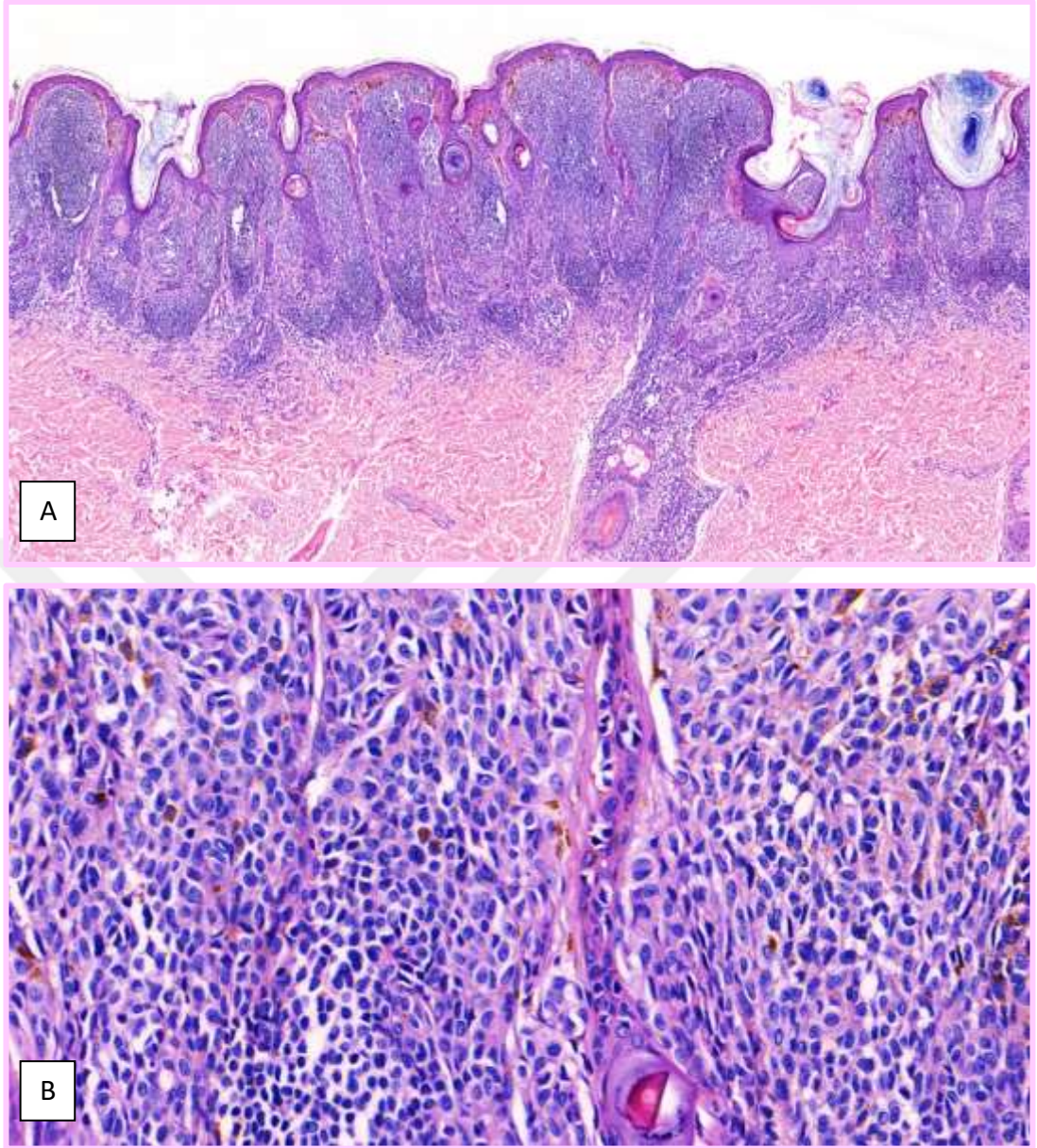
Konvansiyonel melanositik nevuslarda tipik mitoz bulunabilir. Bir çalışmada, 157 nevusun 7'sinde (%4), bir vaka hariç olmak üzere hepsi papiller dermisteki nevus hücrelerinde mitoz gözlenmiştir [11].

2.3.1.7. Konjenital Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Konjenital melanositik nevus, doğumda var olan melanositik bir çoğalmadır. Konjenital terimi, doğumda mevcut olmayan fakat klinik ve histolojik olarak konjenital melanositik nevus özellikleri gösteren lezyonlar için de kullanılabilir[10]. Yenidoğanların %1-2'sinde konjenital nevus gözlenir. Konjenital nevuslar genellikle edinsel nevuslardan büyüktür ve çapları 1.5 cm'den fazladır. En büyük uzun çapı 20 cm'den büyük olan nevuslar dev konjenital nevus olarak adlandırılır. Uzun çapı 1.5 cm'den az olan nevuslar “küçük”, 1.5-20 cm arası olan nevuslar “orta” olarak sınıflandırılırlar ve bu nevuslar genellikle hafif kabarık, sıklıkla pigmentli, yüzeyinde kıl yapıları içerir özelliktedir. Serebriform konjenital nevus, gruplaşmış noktasal pigmente nevus, konjenital akral melanositik nevus, desmoplastik kıl içermeyen hipopigmente nevus gibi çeşitli varyantlar tanımlanmıştır. Dev konjenital melanositik nevuslar, vücudun geniş alanlarını bir giysi gibi kaplarlar, koyu pigmentli görünümde ve yüzeyleri kıllarla kaplı özelliktedir. Lezyon çevresinde benign özellikte satellit lezyonlar görülebilir[5]. Özellikle büyük boyutlu konjenital nevuslarda melanom gelişim riski yaklaşık %5 oranında artmıştır, bu nedenle lezyonların yakın takibi gerekir.

Histopatoloji: Dev konjenital nevusların histolojik görünümü edinsel nevuslardan farklıdır. Küçük-orta boyutlu konjenital nevuslar da edinsel nevuslardan farklı özellikler gösterebileceği gibi edinsel nevuslarla aynı histolojik özelliklere de sahip olabilirler. Eksizyon yaşına bağlı olarak konjenital nevuslar, bileşke, bileşik ya da intradermal tipte olabilirler [5]. Dermisin alt 2/3'lük kısmında nevus hücrelerinin varlığı, nevus hücrelerinin kollajen demetleri arasında tek tek ya da “indian file”

şeklinde dizelenmesi, hücrelerin sinir, damar ve deri ekleri etrafını sarması konjenital nevuslar için oldukça karakteristik özelliklerdir [11] (Resim 2.2). Deri ekleri boyunca melanosit varlığı ve anjiosentrik dağılım tanı için önemli kriterlerdir. Sebace bezler, damarlar, sinir yapıları ya da düz kas içerisinde nevik hücreler bulunabilir [10]. Konjenital nevus hücreleri sitolojik olarak edinsel nevus hücrelerine benzerdir. Bazen konjenital nevusta, displastik nevusu anımsatır atipik özellikler görülebilir. Nevus hücreleri edinsel nevuslar gibi immünohistokimyasal melanositik belirteçler olan S100, HMB45 ve Melan A ile tipik olarak pozitifdir. Bununla birlikte konjenital nevusların genetik olarak edinsel nevuslardan farklı olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Edinsel nevuslarda BRAF mutasyonu bulunmasına karşın, konjenital nevusların çoğunda NRAS mutasyonu gözlenir: ek olarak edinsel nevuslar gibi onkogen uyarımlı yaşlanmaya uğrarlar [5].



Resim 2.2. A-B. Konjenital nevus olgusunda deri eklerini saran nevik hücreler (H-Ex40, H-Ex400, sırasıyla)

Konjenital nevuslarda, doğumda var olan ya da sonradan gelişen ve melanom ayrımını gerektiren , genellikle 5 mm'den küçük, geniş epitelioid hücrelerden oluşan hücresel/proliferatif nodüller bulunabilir. Nodülde atipik mitoz ve fokal nekroz bulunması, komşu nevus hücreleri infiltrasyonu ile karakterli düzgün sınırlanma olmaması maligniteyi, konjenital nevus zemininde melanomu düşündüren özelliklerdir. Bir immünohistokimyasal çalışmada, proliferatif nodül ve komşu konjenital nevus alanlarının; melanositik, lenfositik, hücre siklusu/proliferasyon ve

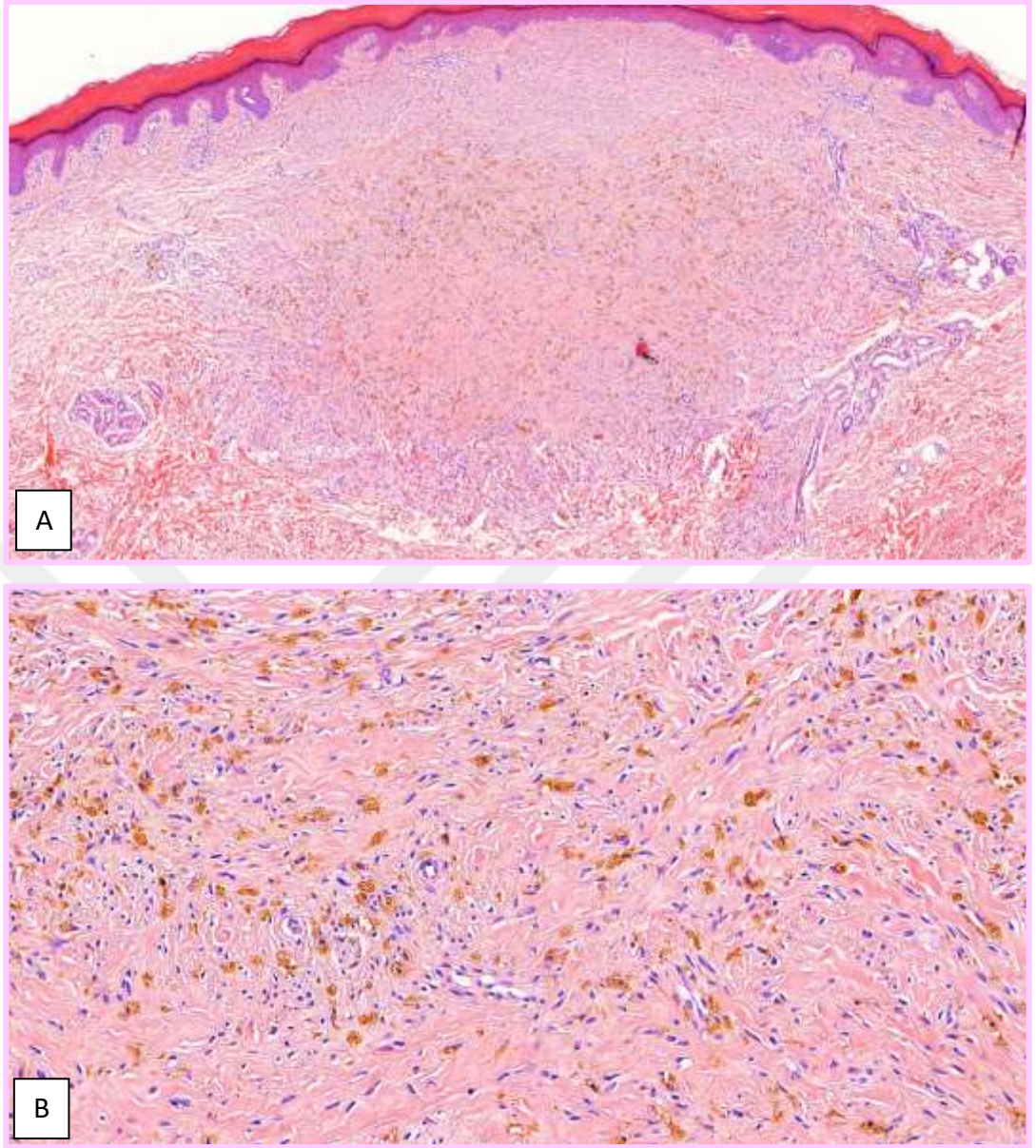
apoptotik belirteçleri benzer şekilde eksprese ettiği bulunmuştur. Fakat c-kit (CD117), tüm proliferatif nodüllerde pozitif bulunurken, komşu nevus alanlarında boyanma görülmemiştir. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ile bu proliferatif nodüllerin benign olduğu gösterilmiştir [5].

2.3.1.8. Mavi (Blue) Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Mavi nevuslar nadiren mukozal membranlarda da görülebilen lokalize pigmentli benign lezyonlardır [5]. Klasik mavi nevus genellikle ekstremiteler yerleşimli, gri-mavi ya da mavi-siyah renkli küçük makül ya da papül özeliğindedir. Hücresel/sellüler mavi nevus ise gluteal bölge başta olmak üzere baş bölgesi veya ekstremitelerde bulunan, daha büyük nodüler lezyonlardır. Erüptif, plak, hedef tahtası, amelanotik, lineer, satellit, dissemine ve familial formlar tanımlanmıştır. Klinik olarak klasik mavi nevusa benzeyen epitelooid mavi nevus, farklı histolojik görünüme sahiptir, multiple olma eğilimindedir ve Carney kompleksi ile ilişkilidir.

Yakın zamanda mavi nevuslarda GNAQ ve GNA11 mutasyonları tanımlanmıştır [11].

Histopatoloji: Klasik mavi nevus klasik olarak retiküler dermis yerleşimlidir, papiller dermise ya da subkutan dokuya uzanım gösterir. Dendritik bileşke melanositlerini içeren bileşik mavi nevus haricinde epidermis genellikle normaldir. Klasik mavi nevus değişken hücresellik gösteren, simetrik, düzensiz sınırlı tümör özeliğindedir. Deri eklerini hasarlandırmadan, etraflarında yoğunlaşması tipiktir. Az hücresel lezyonlarda tanıyı zorlaştıran belirgin sklerotik stroma bulunur. Çok az pigmentli lezyonlar nadirdir. Nevik hücreler küçük nükleuslu, iğsi şekilli ya da dendritik özellikte olup, sitoplazmada yoğun kaba melanin pigmenti içerirler. Lezyonel hücreler etrafında çok sayıda melanofaj bulunur. Sinirlere ya da damar duvarlarına nevik hücrelerin ekstansiyonu nadiren görülebilir. Mitoz nadirdir (Resim 2.3).



Resim 2.3. A-B. Mavi nevus (H-Ex50, H-Ex200, sırasıyla)

Hücresel mavi nevusun küçük büyütmedeki görünümü oldukça karakteristiktir. Retiküler dermisi dolduran, subkutan yağ dokuya da uzanım gösteren, halter şekilli multinodüler tümör özelliğindedir. Hücresellik lezyonun merkezinde daha belirgindir ve subkutan yağ dokuya uzanım varsa daha dikkat çekicidir. Çoğu vakada klasik mavi nevus benzeri alanlar bulunur. Yoğun pigmentli iğsi hücreler ile soluk sitoplazmalı oval-iğsi şekilli hücre demetleri biraradadır. Sitoplazmik melanin kaba ve granüler; nükleus düzgün ve veziküler özelliktedir; bazofilik küçük bir nükleol görülebilir. Schwann hücrelerini anımsatan kıvrımlı ince

melanositler sık rastlanan bir bulgudur. Fokal alveolar büyüme paterni, desmoplazi, miksoid ödematöz değişiklik ya da balon hücre değişikliği gözlenebilir. Mitoz, fokal nekroz, nükleer pleomorfizm ve hiperkromazi gösteren lezyonlar atipik hücreli mavi nevus olarak isimlendirilir[10]. Hücreli mavi nevuslar lokal agresif olabilir ve bölgesel lenf nodlarına nadiren metastaz yaparak yanlışlıkla melanom tanısı alabilirler [5].

Mavi nevuslar immünohistokimyasal olarak S100, HMB45, Melan A ile pozitifdir. Mavi nevuslarda derinde nevi hücre maturasyonu gözlenmez [11].

2.3.1.9. Spitz Nevus/Tümör

Tanım ve Klinik Özellikler: Spitz nevus, epidermisten başlayan bileşke ya da intradermal gelişim gösterebilen, içsi ve oval ya da geniş (epiteloid) melanositlerden oluşan benign bir proliferasyondur. İlk olarak çocukluk çağının lezyonu olarak tanımlansa da her yaş grubunda görülebilir [10].

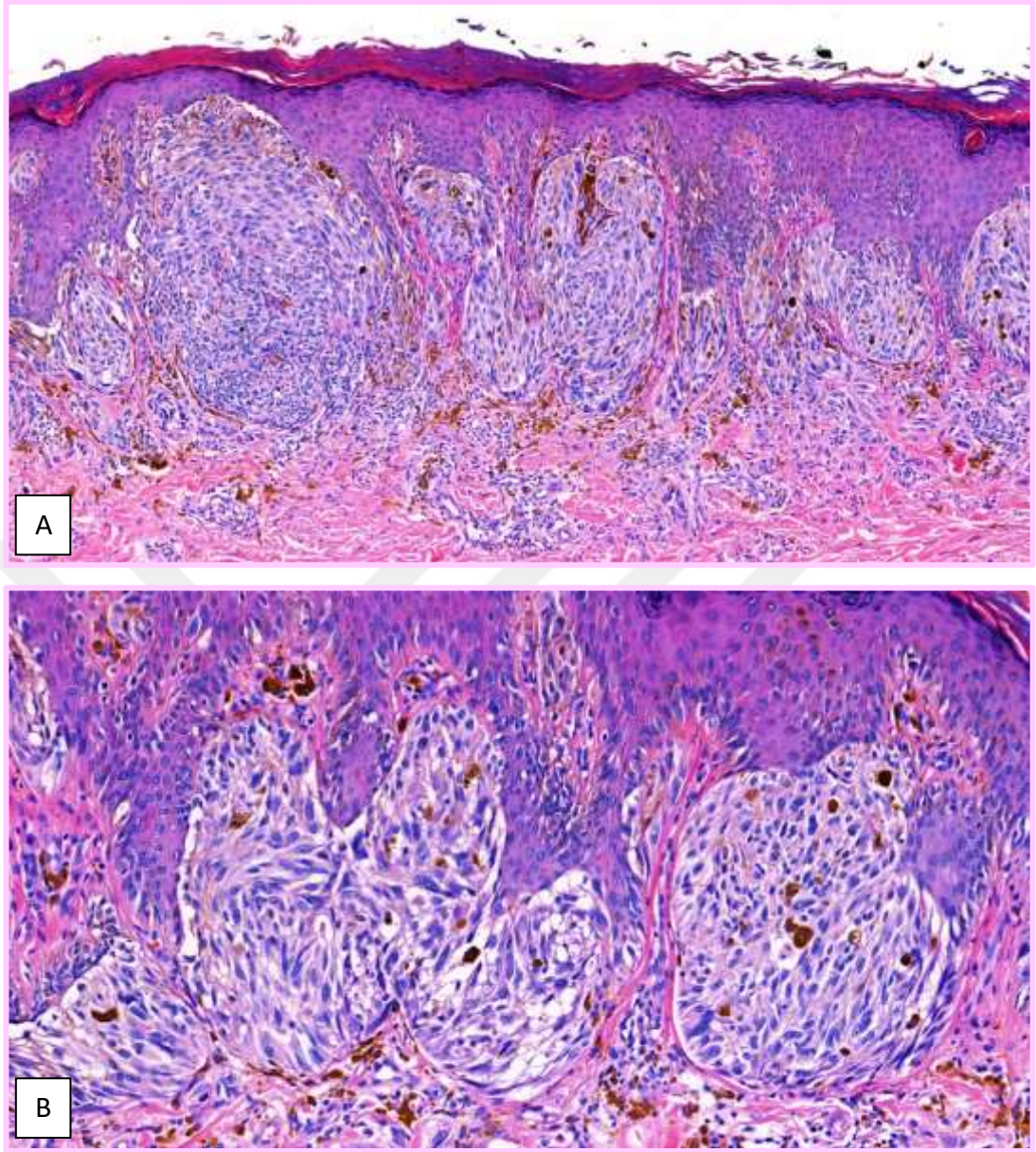
Çocuk ve genç erişkinlerde görülen tipik Spitz nevus, yüz, gövde, ekstremiteler yerleşimli, pembe ya da açık renkli papül veya nodül özelliğindedir. Çoğu vakada halo fenomeni gözlenmektedir. Spitz nevuslar genellikle 1 cm'den küçük soliter lezyonlar olmasına rağmen, dağınık ya da kümeler oluşturan çok sayıda lezyonlar da tanımlanmıştır. Klinikte sıklıkla piyogenik granülom, hemangiyoim, dermatofibrom ya da sıradan nevus gibi yanlış tanımlar alırlar.

Spitz nevusların %10-29'unda HRAS mutasyonu ve/veya 11p kazanımı bulunduğu bildirilmiştir [11]. Ayrıca BRAF ve BAP-1 mutasyonları da tanımlanmıştır [5].

Histopatoloji: Çoğunluğu bileşik nevus olan Spitz nevuslar bileşke ya da intradermal nevus formunda da olabilirler. Major ve minör olmak üzere çeşitli tanı kriterleri bulunmaktadır. Major histomorfolojik tanı kriterleri; hücre tipi, simetri, maturasyon, pagetoid yayılımın olmaması, Kamino cisim varlığı gibi parametreleri içerir. Spitz nevus epiteloid ya da daha sıklıkla içsi hücrelerden meydana gelir. Genellikle oldukça simetrik görünümündedir, epidermal komponentte dermal komponent sınırını geçecek şekilde lateral yayılım gözlenmez. Lezyonun derin

kısımlarındaki hücreler sıradan nevusa benzer şekilde maturasyon gösterirler. Epidermis içinde yukarı doğru tek tek uzanan melanositler (pagetoid yayılım) Spitz nevus'ta oldukça nadirdir, ancak transepidermal eliminasyona maruz kalan yerlerde epidermis içinde üç veya daha fazla hücreden oluşan kümeler bulunabilir. Kamino cismi dermoepidermal bileşkede, laminin, tip 4 ve 7 kollajen gibi çeşitli bazal membran komponentlerini içeren, PAS ve Masson Trikrom boyaları ile pozitif boyanan, soliter ya da biraraya gelmiş eozinofilik globüllerdir ve önemli bir tanısal işarettir.

Minör histopatolojik kriterler; dermoepidermal bileşkede nevus hücre yuvaları ile epidermis arasında ayrılma, yarıklanma bulunması, psödoepitelyomatöz hiperplazi, yüzeysel dermal ödem ve teljiktazi, dev nevus hücreleri, nükleer pleomorfizmin olmaması olarak sıralanabilir. Özellikle aktif büyüme gösteren lezyonlarda sık mitoz gözlenebilir, fakat derin kısımlarda mitoz görüldüğünde Spitz nevus tanısında dikkatli olunmalıdır. Damarların çevresinde inflamasyon gözlenebilir ve damarlanma fazladır. Anjiomatoid Spitz nevus, regrese malign melanomu taklit edebilir. Stomal fibrozis, hiyalinizasyon ve stromal müsin gözlenebilecek bulgulardandır. Anjiomatoid dışında miksoid, tübüler, desmoplastik, halo, pleksiform spitz nevus gibi histolojik varyantlar tanımlanmıştır [11] (Resim 2.4).

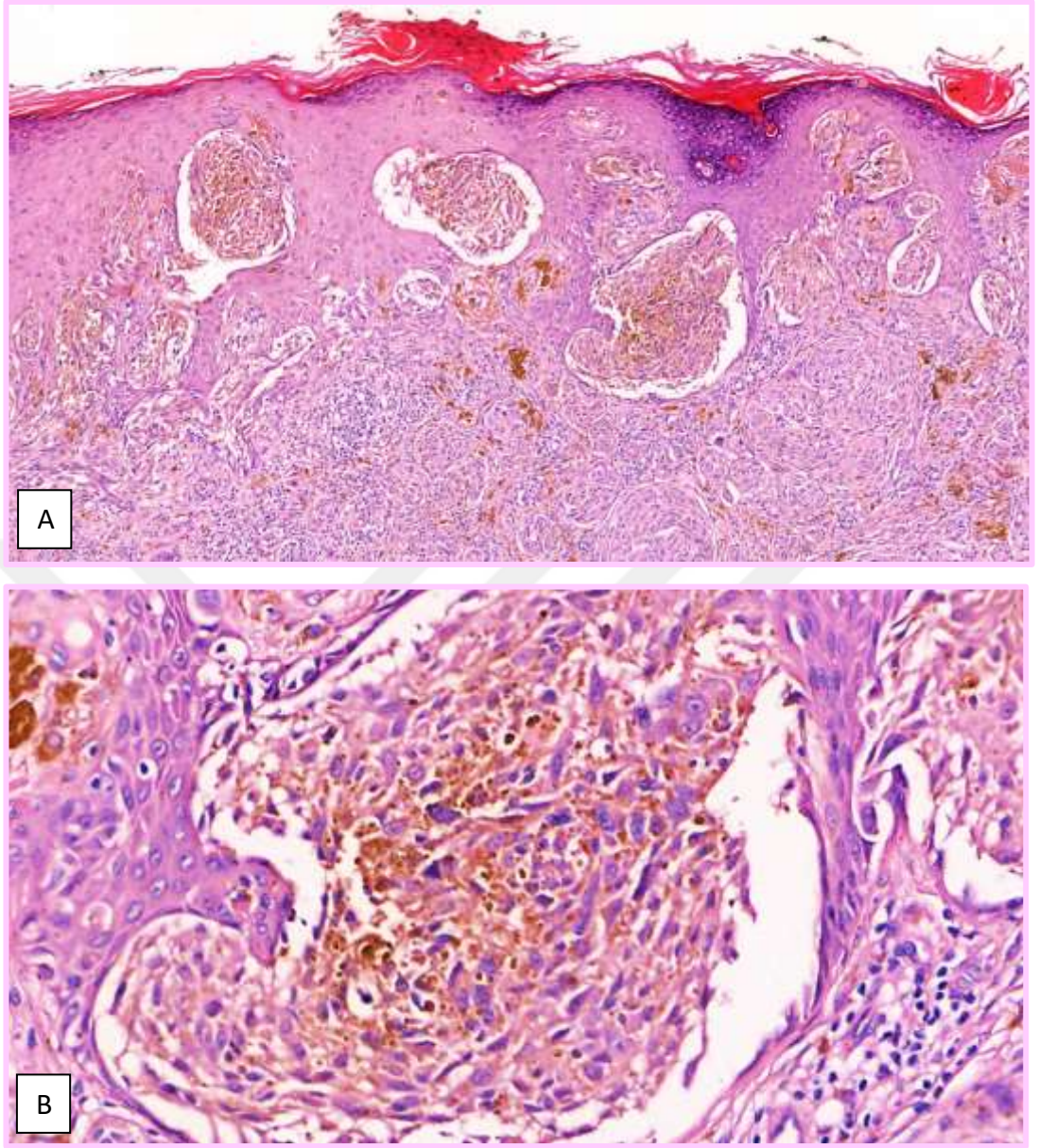


Resim 2.4. A-B. Spitz nevus (H-Ex100, H-Ex200, sırasıyla)

İmmünohistokimyasal olarak S100, Melan A ve maturasyonla uyumlu olarak yüzeyde daha fazla olmak üzere HMB45 ile boyanırlar. Melanom ile ayırıcı tanısında; Kamino cismi varlığı, lezyonun simetrik olması, hücre yuvalarının uniform olması Spitz nevusu düşündürürken, anormal mitoz, dermal komponentte mm^2 'de 2'den fazla mitoz olması, lezyonun en derin 0.25 mm'lik kısmında mitoz bulunması melanomu desteklemektedir [5].

2.3.1.10. Atipik Spitz Nevus/Tümör

Atipik spitz nevus terimi, Spitz nevusun klasik histolojik özelliklerinden sapmalar gösteren lezyonlar için kullanılır. Bu lezyonlar için STUMP (“Spitzoid tumor of uncertain malignant potential”, malignite potansiyeli belirsiz Spitzoid tümör) terminolojisi de kullanılmaktadır. Atipik Spitz nevus tanısı için belirlenmiş kesin kriterler yoktur. Spitz nevus – spitzoid melanom arasındaki lezyonlarda değişken derecede atipi görülür; atipi derecesi hafif/orta/şiddetli ya da düşük/orta/yüksek olarak sınıflandırılabilir. 10 yaşından büyük olmak, lezyon uzun çapının 10 mm’den fazla olması, ülserasyon varlığı, subkutan yağ doku invazyonu, mm²’de 6’dan fazla mitoz olması melanom yönünde düşündürür ve yüksek metastaz riski bulunduğunu gösterir [11]. Resim 2.5’te biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid tümör olgusu gösterilmiştir.



Resim 2.5. A-B. Biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid tümör (H-EX100, H-EX400, sırasıyla)

2.3.1.11. Displastik (Atipik, Clark) Nevus

Tanım ve Klinik Özellikler: Displastik nevus, artmış melanom riski taşıyan, karakteristik histolojik özellikleri olan klinik olarak diğer nevuslardan farklı bir lezyondur. Toplumda %2-18 oranında, bir ya da daha fazla displastik nevus bulunur. Bir bireyde ailesel ya da sporadik çok sayıda displastik nevus varlığı “displastik nevus sendromu” olarak tanımlanır [11].

Displastik nevus, melanom taklitçisi, risk belirtici ve öncülü olduğu için önemlidir. Vücudun herhangi bir yerinde görülebilen displastik nevuslar en çok gövde yerleşimlidir. Klinik kriterler: tüm lezyonu oluşturan ya da papüler merkezi çevreleyen maküler komponent varlığı, boyutun 5 mm ya da daha fazla olması, düzensiz-belirgin olmayan sınırlar, düzensiz pigmentasyondur. Bu şekilde tanımlandığında, klinik olarak tanınmış displastik nevus kutanöz melanom için önemli bir risk faktörüdür. Tek bir displastik nevus varlığında melanom riski 2 kat artarken, 10 ve daha fazla displastik nevus varlığında risk artışı 12 kattır [5]. Dermoskopi ile çeşitli tiplerdeki displastik nevuslar anlaşılabilir. Fakat in situ melanom ile kesin ayrımı sağlayan dermoskobik kriterler yoktur. Displastik nevusta dermoskopik olarak globüllerin varlığı melanom gelişimi için bir risk faktörüdür [11].

Histopatoloji: Displastik nevusların 3 karakteristik histopatolojik özelliği vardır: melanositlerin lentijinöz hiperplazisi, random sitolojik atipi, stromal yanıt. Dördüncü özellik olan yapısal atipi tanısal gereklilik olarak görülür. Lentijinöz hiperplazi melanositlerin bazal tabaka boyunca tek tek ya da yuvalar içerisinde çoğalmasındır. Yuvalar, rete uçlarında olduğu gibi yan kısımlarında da yer alır, rete köprüleşmesine neden olur. “Bileşke yuva karmaşası” terimi, düzensiz bileşke komponent paterni ve dağılımını ifade eder. Hücreler genellikle dar sitoplazmalı ve iğsi şekilli paterne sahip olup büzüşme artefaktı gösterirler, fakat bazı lezyonlarda kumsu pigmentli daha geniş küboidal (epiteloid) hücreler görülür.

Random sitolojik atipi; ara sıra izlenen büyük hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleol içerebilen hücrelerin bulunmasıdır. Nükleuslar keratinositlerle eşit boyutta ya da daha büyüktür. Evrensel bir kriter olmasa da atipi genellikle düşük dereceli ve şiddetli olarak derecelendirilir. Artan yaşla birlikte sıklıkla sitolojik atipi de artar. Ayrıca atipi artışının, klinik olarak pigmentasyon koyuluğu ve yoğunluğunun artışı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Sitolojik atipinin derecelendirilmesinde gözlemciler arası uyumsuzluk gözlenebilmektedir.

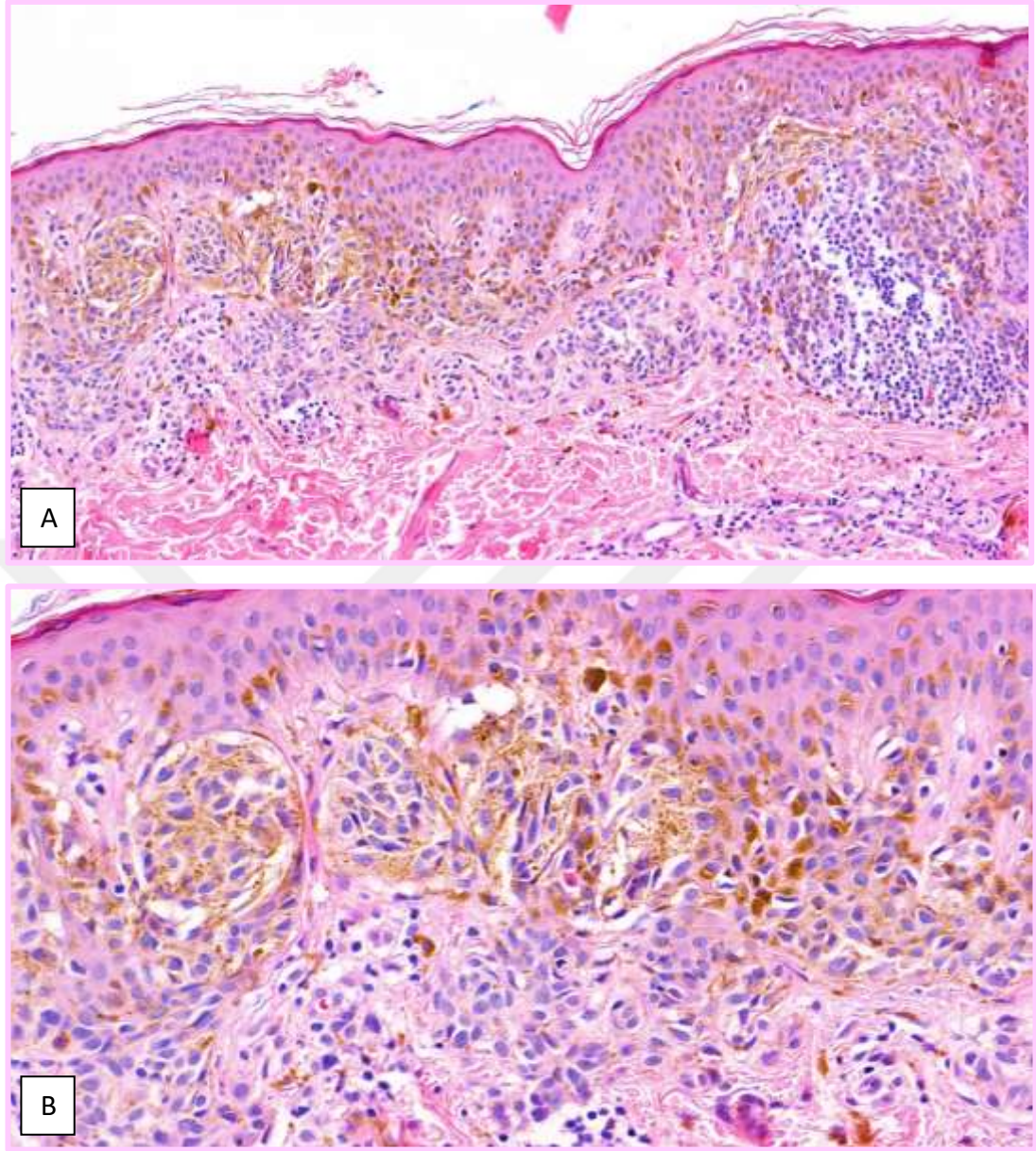
Stromal cevap, papiller dermiste lameller ya da konsantrik fiprolazi gelişimidir. Bazen retiküler dermisteki fibrozis yuvalarda daha geniş boşluklar

oluşmasına neden olur. Yamasal yüzeyel lenfositik inflamasyon ve yeni damar oluşumu da saptanabilir.

Ackerman ve bazı patologlar displastik nevus tanısında sitolojik atipiden çok yapısal atipinin üzerinde durmuşlardır. Tanıda, bileşke komponentin dermal komponentten daha perifere uzanması anlamına gelen “omuz fenomeninin” önemini vurgulamışlardır.

Displastik nevuslar, epidermal komponentinde random atipi bulunduran, periferik lentiginöz ve bileşke aktivitesi gösteren bileşik nevuslardır. Lezyonun orta kısımlarında bulunan dermal komponent, pigmenti azalmış, maturasyon gösteren küçük epiteloid hücrelerden oluşur (Resim 2.6).





Resim 2.6. A-B. Şiddetli atipi gösteren displastik nevus. (H-Ex200, H-Ex400, sırasıyla)

Yüzeyel yayımlı melanomların 1/3'ünde ya da daha fazlasında displastik nevus ile devamlılık bildirilmiştir. İn situ ya da invaziv bir melanomda displastik nevus varlığının kararında, lezyonun en lateral kenarında en az 3 retede atipik lentijinöz hiperplazi bulunması gerekliliği önerilmektedir [5, 10, 11].

Displastik nevus hücrelerinde immünohistokimyasal olarak S100 ifadesi görülür. HMB45 epidermal komponentteki ve papiller dermisteki nevus hücrelerinde

pozitifdir. Melanomlarda güçlü eksprese olan, benign nevuslarda eksprese edilmeyen proteoglikan versikan ile değişken boyanma izlenir [11].

Elektron mikroskopide, epidermal melanositler içerisinde, düzensiz lamellasyon ve pigmentasyon gösteren, küresel şekilli anormal melanozomlar bulunur. Bu anormal melanozomlar, melanizasyonu tamamen tamamlanmadan keratinositlere transfer edilirler [11].

Displastik nevus için ayırıcı tanıda en önemli durum melanomu dışlamaktır. Bileşke nevus, özel bölge nevusları ve pigmente içsi hücreli nevus da displastik nevustan ayırtililmesi gereken benign melanositik lezyonlardır.

2.3.2. Malign Melanoma

Dünya çapında melanom insidansı hızla artmaktadır. Melanom insidansı yaşanan bölge (UV ışınlarına maruziyet), yaş, cinsiyet, etnik köken, histolojik tipe (en sık yüzeysel yayımlı tip) göre değişkenlik göstermektedir. Erken evredeki lezyonların teşhisi ve tanısı nedeniyle mortalite, insidans kadar hızlı artmamaktadır [11].

2.3.2.1. Çevresel Risk Faktörleri ve Genetik Faktörler

Melanom gelişiminde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. En önemli çevresel risk faktörü UV ışınlarına maruziyettir. Yapılan çalışmalarda; polivinil klorid, insektisit, kimyasal çözücüler, arsenik, redoks aktif metal maruziyetinin, radyoterapi, levodopa ve vorikanazol kullanımının, immunsupresif tedavilerin melanom gelişim riskini arttıran diğer çevresel faktörler olduğu bildirilmiştir. UV duyarlılığı (açık ten rengi, sarı-turuncu saç rengi, güneş yanığı oluşumu, çillenme), çok sayıda nevus varlığı (edinsel, konjenital, displastik) ise konağa bağlı risk faktörleridir.

Melanom vakalarının yaklaşık %10'u ailesel ya da kalıtsaldır. Ailesel melanomların çoğunluğu otozomal dominant geçiş gösterir; aile öyküsünün bulunması melanom gelişim riskini yaklaşık 2 kat arttırır. Melanom duyarlılık genleri, hücre döngüsü, melanosit gelişimi ve melanin biyosentezinde rol oynarlar.

Bu genler yüksek, orta ve düşük riskli genler olarak sınıflandırılabilirler. Yüksek riskli genler; CDKN2A (siklin bağımlı kinaz N2A) ve CDK4 (siklin bağımlı kinaz 4) genleridir. CDKN2A mutasyonu B-K nevus sendromu ve ailesel atipik multiple nevus sendromunda gözlenir. CDKN2A mutasyonu; hücre döngüsü düzenlenmesinde görev yapan p16 ve apoptoziste etkili olan p14 tümör supresör genleri ile ilişkiliyken, CDK4 mutasyonu p16 ile ilişkili bulunmuştur. Yakın zamanda BAP-1 de, melanom gelişimi için yüksek riskli gen bölgesi olarak tanımlanmıştır. Melanin sentezi üzerine etkili olan MC1R, orta ve düşük riskli alleler bulundurmaktadır. MITF, melanin sentezi üzerine etkilidir ve orta riskli genlerdendir. TERT promotor mutasyonu, sporadik melanom olgularında daha çok görülmesine rağmen yakın zamanda melanom ailesel yatkınlığı olan bireylerde de tanımlanmıştır[11].

2.3.2.2. Melanom Gelişiminde Genetik Mekanizmalar

Günümüzde, melanosit gelişimindeki sinyal molekülleri ve yolakların tanımlanması ile melanomagenез daha iyi anlaşılmaktadır. Çevresel faktörler, mutasyonlar ve epigenetik olayların melanomagenез üzerine etkileri vardır [11].

Sinyal Yolakları

Sinyal yolakları; germline mutasyona uğrayanlar ve somatik mutasyona uğrayanlar olarak 2 gruba ayrılabilir. CDKN2A(p16)/CDK4/Rb yolağı ve BAP-1 germline mutasyona uğrayan ana bölgelerdir. Melanom gelişimindeki moleküler olayların büyük çoğunluğunu somatik mutasyonlar oluşturur. Direkt uyarım, mutasyon ya da inhibisyon kaybı ile sinyal yolaklarının aktivasyonu sonucu hücre kontrol mekanizmalarından kaçarak inhibe edilemeyen hücre büyümesi gerçekleşir.

CDKN2A(p16)/CDK4/Rb Yolağı: CDKN2A, p16 ve p14 olmak üzere 2 farklı proteini kodlar. p16, fosforilasyon ile Rb'den E2F salınımını sağlayan CDK4/6'yı inhibe eder. E2F hücre siklusunda G1 fazından S fazına geçişi sağlar. p16 inaktive olduğunda CDK4 inhibe edilemez ve hücre bölünmesi ile proliferasyonu engellenemez. p14 ise p53 degradasyonuna neden olan MDM2'yi inhibe eder. p53,

bir tümör supresör gen ve apoptozun önemli yöneticisi olduğu için; p14'ün defektif olması, p53'ün hızlı degradasyonu ile hücrenin apoptozdan ve hücre ölümünden kaçmasına neden olur. CDKN2A'daki germline kusurlar sıklıkla ailesel melanom ile ilişkili olmasına rağmen, sporadik melanomlarda da somatik mutasyonları oldukça yaygındır.

CDK4 geni, hücre siklusu ile ilgili siklinlerin ve siklin bağımlı kinazların bir parçası olan CDK4 proteinini kodlar. CDK4, Rb fosforilasyonu ile G1 → S geçişini kolaylaştırarak hücre bölünmesine/çoğalmasına yol açar. p16, CDK4 proteinini inhibe eder ve CDK4 mutasyonları en sık p16 bağlanma bölgesini etkiler. CDK4 kusurlarında p16'nın CDK4'e bağlanması engellenir, inhibe edilemeyen CDK4 sayesinde Rb'nin fosforilasyon ile aktive olması engellenemez.

BAP-1: BAP-1 (BRCA1 ilişkili protein-1) geni bir tümör supresör gendir ve deubiquitinasyon enzimi olan ubiquitin karboksi hidrolazı kodlar. BAP-1'in BRCA1 ile etkileşime girdiği bilinmektedir; deubiquitinasyon aktivitesi ve nükleer lokalizasyon yeteneği hücre siklus kontrolü ve apoptozis üzerine etkilidir. BAP-1 ayrıca histon modifikasyonu ve DNA onarımına da katılır. BAP-1 ailesel melanom için yüksek riskli bir gen olarak düşünülür ve inaktif bir alleli miras alan bireyler, yeni tanımlanan "BAP1 kalıtsal kanser yatkınlığı sendromu" bağlamında, diğer tümörlerin yanı sıra, uveal ve kutanöz melanom için risk altındadırlar. Delesyon, heterozigosite kaybı, nokta mutasyonu, metilasyon gibi somatik genetik ya da epigenetik değişikliklerle ikinci allel inaktif olur. Ailesel melanomun yanında, sporadik kutanöz melanom ve atipik Spitz tümörlerde %5-6 oranında BAP-1 mutasyonu bildirilmiştir. BAP1-inaktif melanositik lezyonlarda, HRAS mutasyonu bulunmazken, BRAF V600E mutasyonu sıklıkla bulunur.

MC1R: MC1R (melanokortin-1 reseptörü) geni, ligandı α -MSH (melanosit stimüle edici hormon) olan melanin sentezinde yer alan bir G protein bağlı reseptörü kodlar. MC1R mutasyonları ömelanin (koyu pigment) – feomelanin (kırmızı pigment) dengesini bozar. Ömelanin, deriyi UV ışınlarının zararlı etkilerinden feomelanine göre daha fazla korur. Tüm MC1R germline mutasyonları yüksek melanom riski ve BRAF-mutasyonlu tümörler ile ilişkilidir.

MAP Kinaz (RAS, RAF, MEK, ERK) Yolağı: Hücre siklusunun devamı, apoptozun düzenlenmesi ve sağkalım mekanizmaları üzerine etkileri olan MAP (mitojen aktive protein) kinaz yolağı, hücre yüzeyinden nükleusa sinyal iletimini sağlayan ana yolaklardan bir tanesidir. Sinyal iletimi Ras → Raf → MEK → ERK sırası ile gerçekleşir. Melanomların yaklaşık %90'ından fazlasında aktifleşmiş MAP kinaz yolağı bulunur.

RAS: Ras (rat sarkoma) bir G protein süperailisidir. Bu ailenin KRAS, NRAS ve HRAS genleri olmak üzere 3 adet ana üyesi vardır. Bu genler sırasıyla GTPaz K-Ras, N-Ras ve H-Ras'ı kodlarlar. Ras proteinleri plazma membranı yerleşimlidir ve hücre yüzey reseptöründen (reseptör tirozin kinaz benzeri Kit) gelen sinyalleri, MAP kinaz ve PI3K / Akt / mTOR yolaklarına iletirler. Aktive Ras proteinleri, MAP kinaz yolağındaki Raf proteinlerini aktive ederler. Ras proteinleri, hücre büyümesi, bölünmesi ve sağkalım üzerine etkilidir. NRAS (nöroblastoma rat sarkoma viral onkogen homolog) melanomagenezde KRAS ve HRAS'a göre daha önemlidir. Somatik NRAS mutasyonları, melanomda yaklaşık %15-20 oranında gözlenir. En sık nodüler melanomda gözlenen NRAS mutasyonları; yüzeyel yayımlı melanomda daha az oranda saptanırken, akral ve primer mukozal melanomlarda bulunmaz. Ayrıca in situ melanomda %40, dev konjenital nevusta %95 oranında NRAS mutasyonu gözlenir. HRAS (v-Haras Harvey rat sarkoma viral onkogen homolog) mutasyonları melanomdan çok Spitz nevuslarda bulunur.

RAF: Raf (hızlı akselere fibrosarkom) bir serin treonin protin kinaz ailesidir. BRAF (v-raf murin sarkoma viral onkogen homolog) melanomagenezdeki en önemli Raf ailesi üyesidir. BRAF geni tarafından kodlanan serin-treonin protein kinaz B-Raf molekülleri sitoplazmada dimerler halinde bulunur ve Ras tarafından aktive olmak için plazma membranına geçerler. B-Raf tarafından gerçekleştirilen MEK fosforilasyonu ile hücre proliferasyonu ve sağkalımı sağlanır. BRAF, melanomda en çok somatik mutasyona uğrayan proto-onkogenlerden birisidir. Aktive edici BRAF mutasyonlarının %95'inden fazlası V600 rezidüsünde gözlenir ve valin yerine glutamik asit geçişi meydana gelir (V600E). V600E mutasyonu katalitik domainde yapısal değişikliğe neden olarak B-Raf aktivasyonunu sağlar, böylece MAP kinaz yolağı uyarılmış olur. V600E mutasyonu tümör gelişiminin erken dönemlerindeki rolünü kanıtlayacak şekilde nevusların (edinsel, displastik, küçük-orta konjenital,

konjenital benzeri nevuslar) %82'sinde gözlenir. BRAF mutasyonu, genç bireylerde, yüzeysel yayımlı ve nodüler melanom alt tiplerinde daha sık gözlenir.

MEK ve ERK: MAP2K1/2 genleri tirozin-treonin kinaz olan MEK1/2 proteinlerini, MAPK1/3 genleri ise serin-treonin kinaz olan ERK1/2 proteinlerini kodlarlar. Raf tarafından fosforilasyona uğrayan MEK, ERK'i fosforiller. Fosforile ERK, Myc gibi hücre büyümesi ve sağkalımı etkileyen transkripsiyon faktörlerini direkt olarak etkiler.

KIT: KIT (v-kit Hardy–Zuckerman 4 kedi sarkoma viral onkogen homolog), tirozin kinaz ailesinden olan mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü Kit proteinini kodlar. Kit ligandı ile bağlandığı zaman Ras gibi molekülleri aktive ederek MAP kinaz ve PI3K / Akt / mTOR sinyal yollarını uyarır. Melanomda amplifikasyonlar ve aktive edici mutasyonlar gözlenir. Yapısal aktivasyona neden olan mutasyonlar en sık jukstamembran domaininde (ekson 11) meydana gelir. Bu bölge, Kit ligandıyla bağlanmadığında kinazın aktivasyonunu önlemekle sorumludur. Kit aşırı ifadesi tüm melanomların yaklaşık %3'ünde bulunur. KIT mutasyonları yüzeysel yayımlı ve nodüler melanomda sık gözlenmezken; amplifikasyon ve mutasyon akrall melanomlar ile primer mukozal melanomlarda daha sık gözlenir.

PI3K/Akt/mTOR/PTEN Yolağı: PI3K/Akt/mTOR yolağı; MAP kinaz yolağına paralel ve benzer şekilde, hücre büyümesi, proliferasyonu ve sağkalımı üzerine etkili olan bir aktive edici yoldur. Sinyal iletimi PI3K → Akt → mTOR sırasını izler. PTEN, PI3K üzerinden bu yolağı inhibe eder. Melanomların yaklaşık %60'ında bu yolda bozukluklar vardır.

PI3K: PI3K, PIK3CA (fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat 3 kinaz, katalitik alt ünite α) geni tarafından kodlanır. PI3K; Ras, reseptör tirozin kinaz, G protein bağlı reseptörler ya da diğer mekanizmalar ile aktive olarak Akt uyarımına neden olur. Melanomda PIK3CA mutasyonları %3'ten daha az oranda gözlenir.

Akt: Akt (v-akt murin timoma viral onkogen homolog) bir serin treonin kinaz ailesidir. AKT1, AKT2, AKT3 bu ailenin ana genleridir. Akt, PI3K tarafından uyarıldığı gibi mTOR, bcl-2 ailesi üyeleri ve NF- κ B ile de uyarılabilir. Melanomda Akt, yaklaşık %1-3 oranında somatik olarak aktive olur.

MTOR: MTOR (Rapamisinin mekanistik hedefi) geni serin-treonin protein kinaz mTOR'u kodlar. mTOR diğer moleküllerle kompleksler oluşturarak PI3K/Akt/mTOR yolağında geri bildirim mekanizmalarında rol aldığı gibi, mRNA translasyon düzenleyicilerini de içeren çeşitli molekülleri aktive eder. mTOR'un kesin rolü bilinmemektedir; ancak hücre oksidatif stres seviyesi ve nutrisyonel durumuna duyarlı olduğu ve protein sentezini kontrol ettiği düşünülmektedir. Otofajiyi inhibe eden net etkisinin yanında mTOR, melanom da dahil olmak üzere birçok kanserde aktive olduğundan potansiyel bir terapötik hedeftir.

PTEN: PTEN (fosfataz ve tensin homolog) geni hücre bölünmesini engelleyerek ve apoptozu düzenleyerek tümör supresör etki yapan PTEN'i kodlar. PTEN, PI3K'yı bloke ederek PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerine negatif etki eder. PTEN inhibisyonu anlamsız mutasyonlar, çerçeve kayması, delesyon, heterozigosite, insersiyon ve epigenetik susturma kaybı gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelebilir. PTEN'in somatik inaktivasyonu ya da ifadesinin azalması melanomların yaklaşık %10-30'unda gözlenir. Melanom patogeneğinde PTEN mutasyonlarının, MAP kinaz yolağındaki BRAF gibi diğer yolaklardaki aktive edici mutasyonlarla birlikte olduğunda önemli olduğu düşünülmektedir. Tümör progresyonundaki rolünü destekleyecek şekilde nevusların %8'inde PTEN kaybı saptanır.

Diğer Mekanizmalar

TERT (telomeraz revers transkriptaz) telomeraz kompleksinin bir alt ünitesi olan katalitik revers transkriptazı kodlar. Telomerazlar onkogeneizde bilinen bir mekanizma olan telomer uzatılmasında görev alırlar. Yakın zamanda tüm genom verilerinin analiziyle TERT promoter bölgesindeki tekrarlayıcı mutasyonlar keşfedilmiştir ve melanomların %71'inde bu mutasyonlar tanımlanmıştır. Başka bir çalışmada primer melanomlarda TERT promoter mutasyonları %33 oranında bulunmuştur. Bu güne kadar melanomda gözlenen en yaygın 4 nükleotid yer değiştirmesi BRAF bp1799A>T (V600E), NRAS bp182T>C (Q61R), TERT C228T, and TERT C250T'dir. Melanom hastalarının önemli bir kısmında ve nevuslarda, özellikle çocuklarda, mikrosatellit instabilitesi tanımlanmıştır[11].

2.3.2.3. Tümör Progresyonu

Diğer tümör modellerindeki kadar tipik olmasa da melanom için de tümör progresyon modelleri önerilmiştir. Çoğu melanom modelleri değişen sıralama ile; melanosit → nevus → displastik (atipik) nevus → in situ melanom → invaziv melanoma → metastaz şeklinde, normal melanositten metastatik melanoma progresyon motifini içerir. Bu progresyon, DNA üzerindeki mutajenik etkisinden dolayı özellikle UV maruziyeti ile gerçekleşen somatik mutasyonlar ve epigenetik olayların birikimi sonucu meydana gelir. Hücre büyümesi/sağkalımı ile duraklaması/ölümü arasındaki dengeyi sağlayan moleküler olayları anlayabilmek ve tedavi hedeflerinin belirlenebilmesi için tümör progresyon modellerini geliştirmek önemlidir.

Tümör progresyon modelleri ile birlikte, melanom gelişiminde BRAF mutasyonunun erken bir olay olduğu düşünülmüştür. Nevusların %82'sinden fazlasında V600E mutasyonu bulunması ve klonal olduklarına dair moleküler kanıtlarının elde edilmesiyle bu düşünce desteklenmiştir. Tüm nevuslar melanoma ilerlemez; melanomların 1/4-1/3'ünün nevus zemininde geliştiği düşünülmüştür. BRAF mutasyonu, MAP kinaz yolağında aktivasyona neden olur, fakat nevus oluşumunda, izole BRAF mutasyonu senesansı tetikler (onkogen uyarımlı senesans/yaşlanma). Malign transformasyon için BRAF mutasyonuna ek olarak, PI3K / Akt / mTOR gibi başka bir sinyal yolağında başka bir moleküler vuruşa ihtiyaç vardır. Aksi takdirde hücre onkogen uyarımlı senesansa uğrar. Aynı sinyal yolağında görev alan BRAF ve NRAS'ın mutasyonları melanomlarda çok sık görülse de, bu iki mutasyonun aynı tümörde görülme durumu oldukça nadirdir. N-Ras hem MAP kinaz hem de PI3K / Akt / mTOR yolağını aktive edebildiği için, NRAS mutasyonları BRAF'a göre daha fazla onkojenik etkiye sahiptir. TERT promotor mutasyonları telomeraz aktivasyonuna neden olur, prevelansı nedeniyle melanomagenезin erken bir moleküler olayı olduğu düşünülmektedir; primer tümörden çok metastazlarda gözlenir. KIT özellikle lentigo maligna, akrallentiginöz melanom ve primer mukozal melanomda tümör progresyonunda erken bir rol oynuyor olabilir. PI3K / Akt / mTOR yolağı genleri progresyonun orta aşamaları ile ilgiliyken; VEGFA, TP53, CDH1 invazyon ve metastaz gelişiminde önemlidir[11].

2.3.2.4. Melanom Sınıflaması

Melanom tümör progresyonunun fazlarına göre iki ana kategoriye ayrılır. Nontümörojenik radyal ya da horizontal büyüme fazında (radial growth phase, RGP); neoplastik melanositler epidermise sınırlıdır (in situ melanom) ya da tümör kitlesi dermal çoğalma göstermeden epidermis ve papiller dermise sınırlıdır (mikroinvaziv melanom). Bu faz, dermal çoğalma ve tümör formasyonu ile karakterli mitojenik/tümörojenik vertikal büyüme fazı (vertical growth phase, VGP) ile devamlılık gösterebilir. Böylece tam olarak gelişmiş bir melanomda iki ana lezyonel komponent bulunur; bunlar nontümörojenik, in situ ya da mikroinvaziv radyal büyüme fazı ile tümörojenik vertikal büyüme fazı komponentleridir.

2006 DSÖ'ye göre melanom sınıflaması

Radyal büyüme fazı (nontümörojenik, in situ veya mikroinvaziv melanom)

- Yüzeyel yayımlı melanom
- Lentigo maligna melanom
- Akral lentiginöz melanom
- Sınıflanamayan radyal büyüme fazı

Vertikal büyüme fazı (Tümörojenik melanom)

- Radyal büyüme fazı komponenti olmayan
= Nodüler melanom
- Radyal büyüme fazı komponenti olan
= Klasik vertikal büyüme fazı
= Desmoplastik ve nörotropik melanom
= Nörotropik olan fakat desmoplastik olmayan melanom

Melanoma alt tipleri arasında etiyoloji ve moleküler biyoloji açısından farklılıklar vardır. Fenotipik-genotipik uyumun araştırıldığı bir çalışmada, melanomların yukarıdaki şekilde klinikopatolojik sınıflandırılmasında kullanılan özellikler, tümörün mutasyon durumu ile güçlü korele bulunmuştur [5].

2.3.2.5. Tümörojenik ve Nontümörojenik Melanomlarda Morfoloji

Klinik özellikler: Major klinik tanı kriterleri “ABCD kriterleri” olarak özetlenmiştir. Bunlar lezyonel asimetri (Asymmetry), lezyonel sınır düzensizliği (Border irregularity), renk çeşitliliği (Color variegation) ve lezyon uzun çapının (Diameter) 6 mm’den fazla olmasıdır. Son rehberler, bireylerin cildini kendi kendine muayenesi esnasında, değişen veya farklı görünümlü izlenen nevuslar için "çirkin ördek yavrusu" işaretinin önemini vurgulamıştır. Bu kapsamda, değişen bir melanositik lezyonun "evrim geçiren" doğasını (Evolving nature) belirtmek için kriterlere E harfinin eklenebileceği söylenmektedir.

Klinik olarak, tümörojenik VGP nitelik bakımından plak benzeri RGP’den oldukça farklıdır. Tümör, önceden bir plak lezyonu olmadan, genişleyen bir papül olarak görülür ve balon benzeri bir şekilde üç boyutlu olarak büyür, bir nodül oluşturur. Tümör nodülü melanom için oldukça yüksek riskli olsa da; çoğunlukla simetrik, düzgün sınırlı, uniform renkli, 6 mm’den daha az uzun çaplı olabilmesi nedeniyle ABCD kriterleri uygulanamaz. Komşuluğunda nontümörojenik kompartmanı olmayan bu tehlikeli melanomların klinik olarak saptanmasında ABCD kriterlerine EFG (elevated, firm, growing for 1 month) kriterlerinin de eklenmesi gerekmektedir [5].

Histopatoloji: Nontümörojenik melanomlarda lezyonel hücrelerin büyük çoğunluğu epidermis yerleşimlidir. Mikroinvazyon kavramı “dermal tümöral kitle oluşturmada sadece papiller dermiste az sayıda lezyonel hücrelerin varlığı” olarak tanımlanmıştır. Mikroinvaziv ya da in situ olan nontümörojenik melanomlar pratik anlamda metastaz yapma yeteneğine sahip değildir. Tümörojenik melanomu ayıran başlıca histolojik özellik; dermiste kitle oluşumuna neden olan, melanom hücrelerinin çoğalma kapasitesidir. Bunun aksine; nontümörojenik melanom hücreleri epidermal komponentte çoğalabilirler, dermisi invaze edebilir fakat dermiste proliferasyon olmazlar.

Tümörojenik melanomda dermiste izlenen tümöral kitle; “en büyük intraepidermal yuvadan daha büyük dermal yuva bulunması” olarak tanımlanırken, nontümörojenik melanomda, dermiste melanom hücrelerinin oluşturduğu kitle/nodül bulunmamalıdır. Lezyon tümörojenik ise ya da tümöral büyüme için yapısal kriterler

yokluğunda dermisteki hücrelerde mitoz gözleniyorsa (mitojenik melanom) bu lezyon VGP olarak sınıflandırılmaktadır. Melanomun dermal komponentinde mitoz varlığı, dermisteki tümörün ekspansil büyüme kapasitesini temsil eder ve tümöral kitle olmasa dahi tipik vertikal büyüme fazı anlamına gelir. Lezyon nontümörojenik ise veya dermal mitoz gözlenmiyorsa RGP olarak sınıflandırılır. RGP, VGP komponenti de bulunduran kompleks primer bir melanomun bir bölümü şeklinde de gözlenebilir. En büyük intradermal yuvadan daha büyük dermal yuva olmadan melanom hücreleri dermal yığılma yapıyorsa bu durum “varyant VGP” olarak isimlendirilir. Melanomun biyolojisini anlayabilmek için VGP kavramı önemlidir. Bu kavram melanom tedavi yönetiminde kullanılan şu anki evreleme sisteminde bulunmamasına rağmen, özellikle Breslow kalınlığı gibi diğer özellikler gibi prognostik öneme sahiptir[5].

2.3.2.6. Nontümörojenik Malign Melanom (Radial Büyüme Fazı)

Melanomların yaklaşık %90’ında nontümörojenik kompartman mevcuttur; bunların yarısında aynı zamanda tümörojenik odak bulunur. Tüm melanomların yaklaşık %10’unu oluşturan “nodüler melanom”da tümörojenik kompartman mevcutken, in situ ya da invaziv RGP kompartmanı bulunmaz.

Nontümörojenik melanomlarda pagetoid ve lentiginöz olmak üzere iki ana patern gözlenir [5].

2.3.2.6.1. Yüzeyel Yayılımlı Melanom

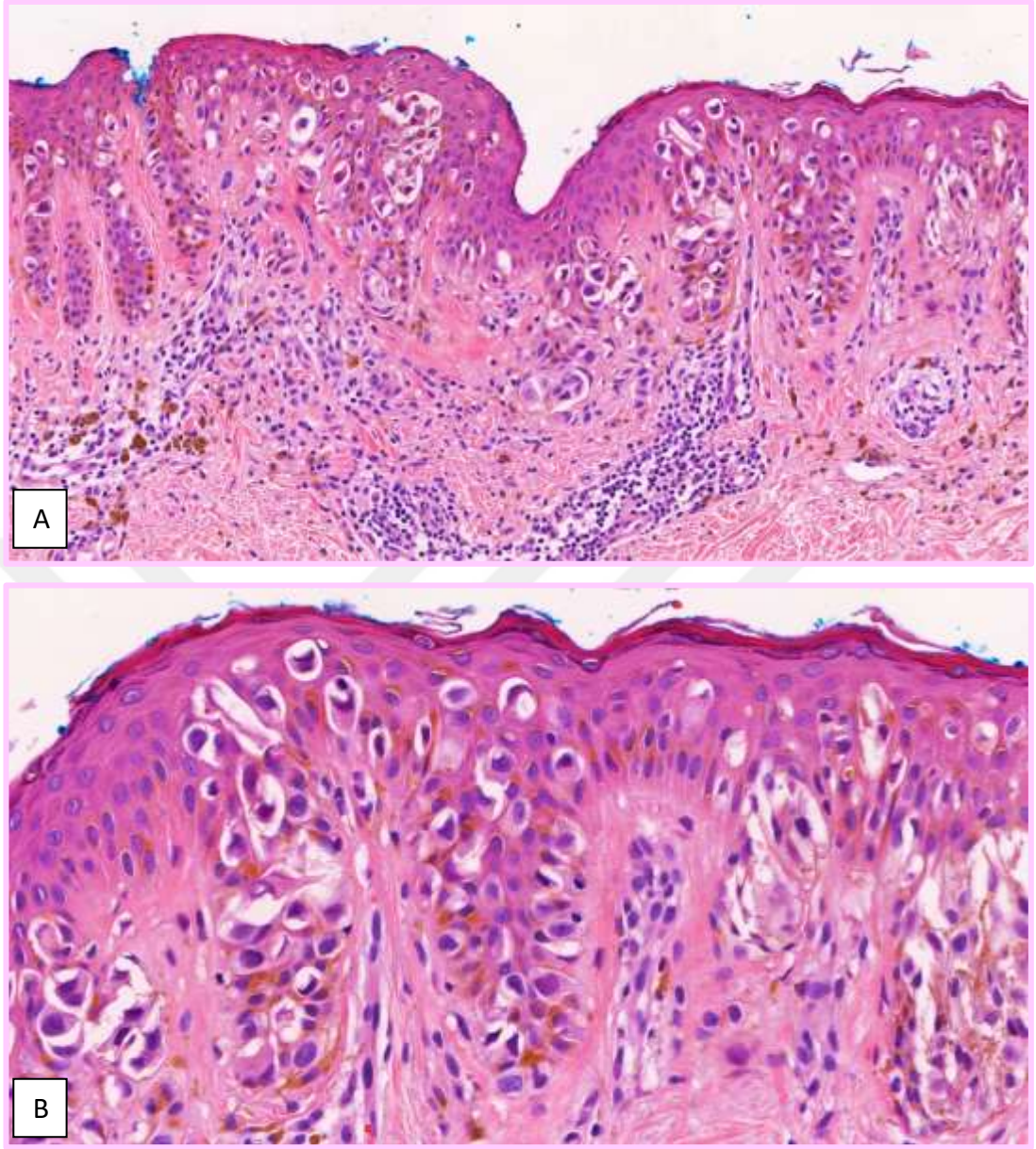
Tüm vakaların yaklaşık %70’ini oluşturan yüzeyel yayılımlı melanom ya da pagetoid melanom, en sık görülen melanom formudur [5].

Klinik Özellikler: Genç ve orta yaşlarda, erkeklerde sırt üst kısımlarda, kadınlarda alt bacak bölgelerinde görülür. Lentigo maligna melanom “kronik devamlı” güneş maruziyeti ile ilişkiliyken, yüzeyel yayılımlı melanom “akut aralıklı” maruziyet ile ilişkilidir. Çok sayıda nevus bulunması, solar keratoz sayısı, geçirilmiş güneş yanığı öyküsü, açık göz ve saç rengi, çillenme risk faktörleridir.

Klinik olarak; deriden hafif ya da belirgin kabarık, düzensiz, palpe edilebilir kenarlı, değişik renkli lezyon oluşturur. Spontan regresyondan dolayı lezyonda beyaz renkli alanlar gözlenebilir. Mikroinvazyon klinik olarak saptanamaz, tümör vertikal büyüme fazına geçtiğinde papül oluşumunu nodül gelişimi takip eder[5, 10].

Histopatoloji: Tanıda önemli olan yapısal paternler, asimetri, geniş lezyon çapı, kötü sınırlanmadır (lezyonun ucundaki son hücrenin tek, küçük ve dağınık olma eğilimi). Epidermis düzensizdir, kalın ve ince alanlar içerir. Oldukça yuvarlak, uniform, büyük melanositler epidermiste pagetoid paternde dağılırlar. Geniş hücreler alt epidermiste yuvaların içerisindeyken, üst epidermiste tek başına bulunurlar. Yuvalar boyut ve şekil bakımından farklılık gösterir ve birleşme eğilimindedir. Dermal melanofajlar ve dermal infiltrasyon genellikle bulunur. Lenfositik infiltrasyon tipik olarak yoğun ve bant şeklindedir. Fibroplazi, lenfositik infiltrasyon ve melanofajların bulunduğu parsiyel regresyon gözlenebilir.

Sitolojik olarak, lezyonel hücreler oldukça uniformdur, değişen miktarlarda küçük “kumsu” granüllerden oluşan melanin pigmenti içeren geniş sitoplazmaya sahiptirler, dendritik uzantılar seçilemez. Düzensiz nükleer membrana ve kümeleşmiş kromatine sahip olan nükleus, büyük ve hiperkromatik özelliktedir. Displastik nevustaki random atipiden farklı olan “uniform sitolojik atipi” tanısallık yaklaşım için önemlidir. Resim 2.7’de yüzeysel yayımlı melanom olgusu gösterilmiştir.



Resim 2.7. A-B. Yüzeyel yayımlı melanom olgusu (H-Ex200, H-Ex400, sırasıyla)

Yüzeyel yayımlı melanomların çoğunluğunda BRAF aktive edici mutasyonu bulunurken, NRAS ve diğer onkogenlerin mutasyonu daha az sıklıkta görülür [5, 10].

Ayrıcı Tanı: Bileşke nevus; lezyonel hücrelerde atipi olmaması (özellikle nükleer), pagetoid yayılımın bulunmaması, üst dermiste belirgin inflamatuvar infiltrasyonun olmaması, sıklıkla keskin lateral sınırlama göstermesi gibi özelliklerle radial büyüme fazındaki yüzeyel yayımlı melanomdan ayrılır. Bileşke Spitz nevus,

özellikle nadir görülen “pagetoid Spitz nevus”, yüzeysel yayımlı melanomu taklit edebilir. Daha küçük boyutlu oluşu, büyük içsi ve/veya epiteloid hücrelerin varlığı, Kamino cismi görülmesi, lezyon üzerindeki epidermiste incelme olmaması ayırt ettirici bulgulardır. Özel bölge nevusları ve rekürren nevuslar ile ayırmda biyopsi materyali dikkatli incelenmelidir. Lentigo malignada, epidermis atrofiktir; pagetoid yayılım belirgin değildir; bazal hücre tabakası yerine atipik melanositlerin devamlı şekilde dizelenmesi baskın özelliktir.

Lezyon tümörojenik vertikal büyüme fazına geçtiğinde, komşuluğundaki radial büyüme fazı hariç, diğer melanom formlarından farklı değildir. Böyle kompleks tümörojenik melanomların sınıflaması radial büyüme fazı komponentinin morfolojisine göre yapılır.

Paget hastalığı, pagetoid Bowen hastalığı gibi non-melanositik lezyonlardan morfolojik ve immünhistokimyasal olarak ayırım yapılmalıdır [5].

2.3.2.6.2. Lentigo Maligna/Lentigo Maligna Melanom

Lentigo maligna melanom, tüm melanomların yaklaşık %10'unu oluşturur[5]. “Lentigo maligna” terimi, “lentigo maligna melanom, in situ” ile eş anlamlı olarak kabul edilebilir. Lentigo malignanın, in situ melanomun bir formu olup olmadığı ya da in situ melanomun prekürsör lezyonu olup olmadığı tartışmalıdır. Bu lezyonlar diğer in situ melanomlar gibi total eksize edildiklerinde metastaz yapmazlar.

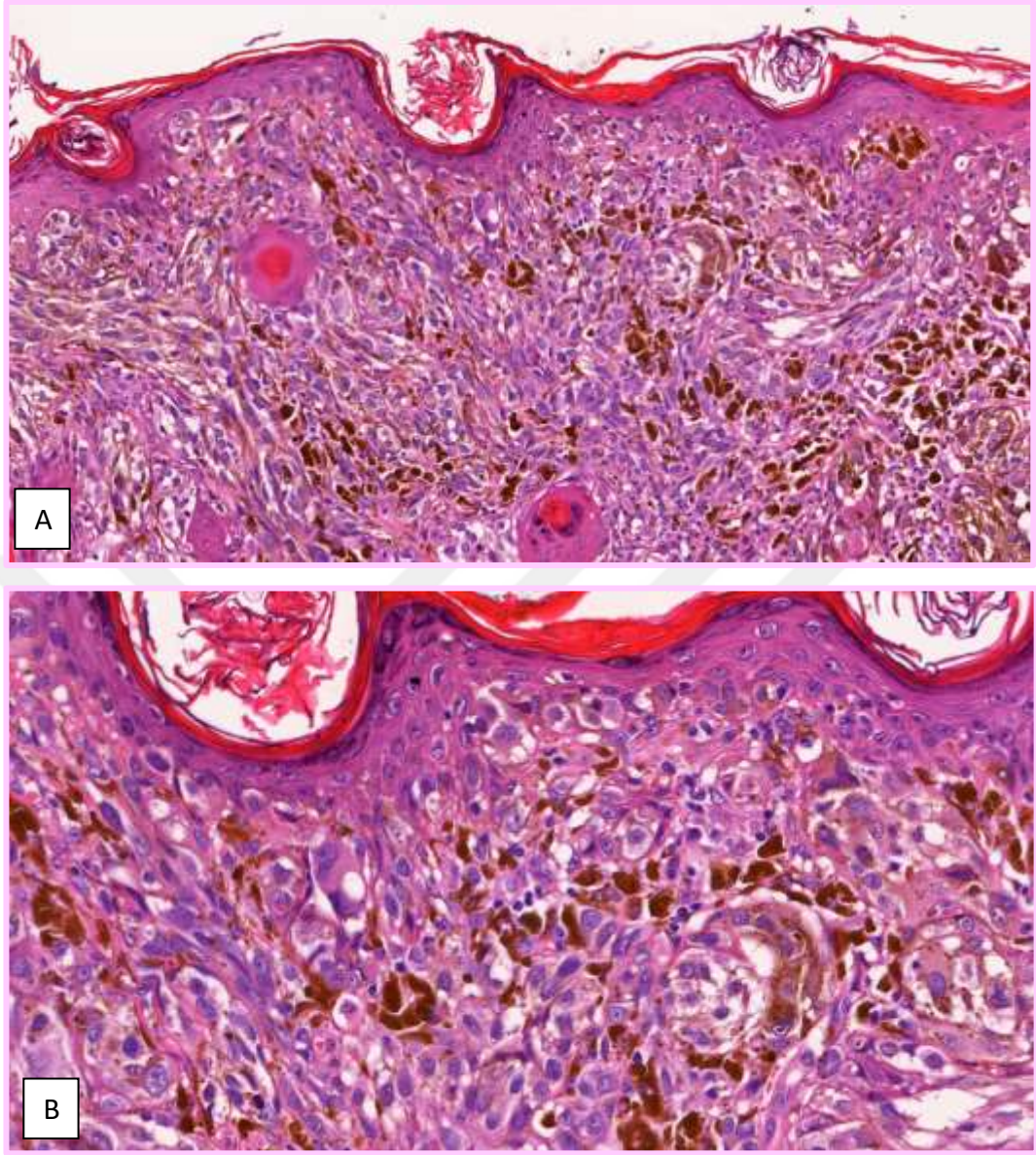
Klinik Özellikler: Lezyon tipik olarak ileri yaşlarda, UV ışınlarına kronik olarak maruz kalan bölgelerde, özellikle yüzde görülür. Melanomun bu formu yavaş ilerleme eğilimindedir; pigmentte bir makül olarak başlayıp, periferik olarak büyüyerek birkaç santimetre çapa ulaşabilir. Düzensiz sınırlıdır, spontan regresyon gösterebilir; kahverengiden siyaha değişen renklerde. Yüzeysel yayımlı melanomun aksine lezyonun sınırları belirsizdir ve palpe edilemez; hatta amelanotik olabilir. Lentigo maligna olan bir lezyonun lentigo maligna melanoma progresyon riski %5 olarak bildirilmektedir.

Özellikle yaşlı insanlarda, lentigo maligna melanomda olduğu gibi, yuvalanma yapmayan ve pagetoid yayılım göstermeyen lezyonlarda BRAF

mutasyonu daha az sıklıkta bulunmaktadır. Kronik güneş hasarı zemininde gelişen melanomların %28'inde KIT mutasyonu bulunmaktadır [5].

Histopatoloji: Lentigo malignada epidermal bazal tabaka boyunca atipik melanositlerin lentiginöz çoğalması bulunmaktadır; kıl folikül tutulumu da eşlik eder. Yuvarlak bileşke nevus hücrelerinden köken alan yüzeysel yayımlı melanomdan farklı olarak, iğsi şekilli bileşke melanositlerinden köken aldıkları düşünülmektedir. Epidermis atrofiktir; bazal tabakada yuvalanmalar gözlenebilir; dermiste aktinik/solar elastoz bulunur. Üst dermiste melanofajlar ve sıklıkla inflamatuvar infiltrasyon bulunur. Hücreler kıvrımlı ve iğsi şekillidir. Nükleus atipik, hiperkromatik, büyük ve pleomorfiktir. Orta düzeyde melanin içerebilirler. Pagetoid yayılım görülebilir. Lentigo maligna melanomda, lentigo maligna ile ilişkili olan dermal invazyon söz konusudur. İnvazyonu oluşturan hücreler sıklıkla iğsi şekilli atipik melanosit özelliğinde olmakla birlikte, epiteloid, küçük nevoid ya da dev hücre özelliğinde de olabilirler. Bazı lentigo maligna melanom vakalarının in situ komponenti displastik nevus ile oldukça benzerlik gösterebilir. Daha büyük boyut, daha fazla atipi bulunması, daha fazla değişkenlik, yapısal olarak daha az simetri, fokal pagetoid yayılım, dermiste daha fazla aktinik/solar elastoz bulunması ayırt ettirici özelliklerdir.

Lentigo maligna melanomun epidermal komponentinde mitoz nadir görülür; eğer dermiste mitoz gözleniyorsa vertikal büyüme fazının göstergesidir. Tümörojenik vertikal büyüme, desmoplastik ya da nörotropik melanom gibi varyantların oluşumuna neden olan iğsi hücre tipinde olur [5, 10]. Resim 2.8'de lentigo maligna melanoma olgusu gösterilmiştir.



Resim 2.8. A-B. Lentigo maligna melanoma (H-Ex200, H-Ex400, sırasıyla)

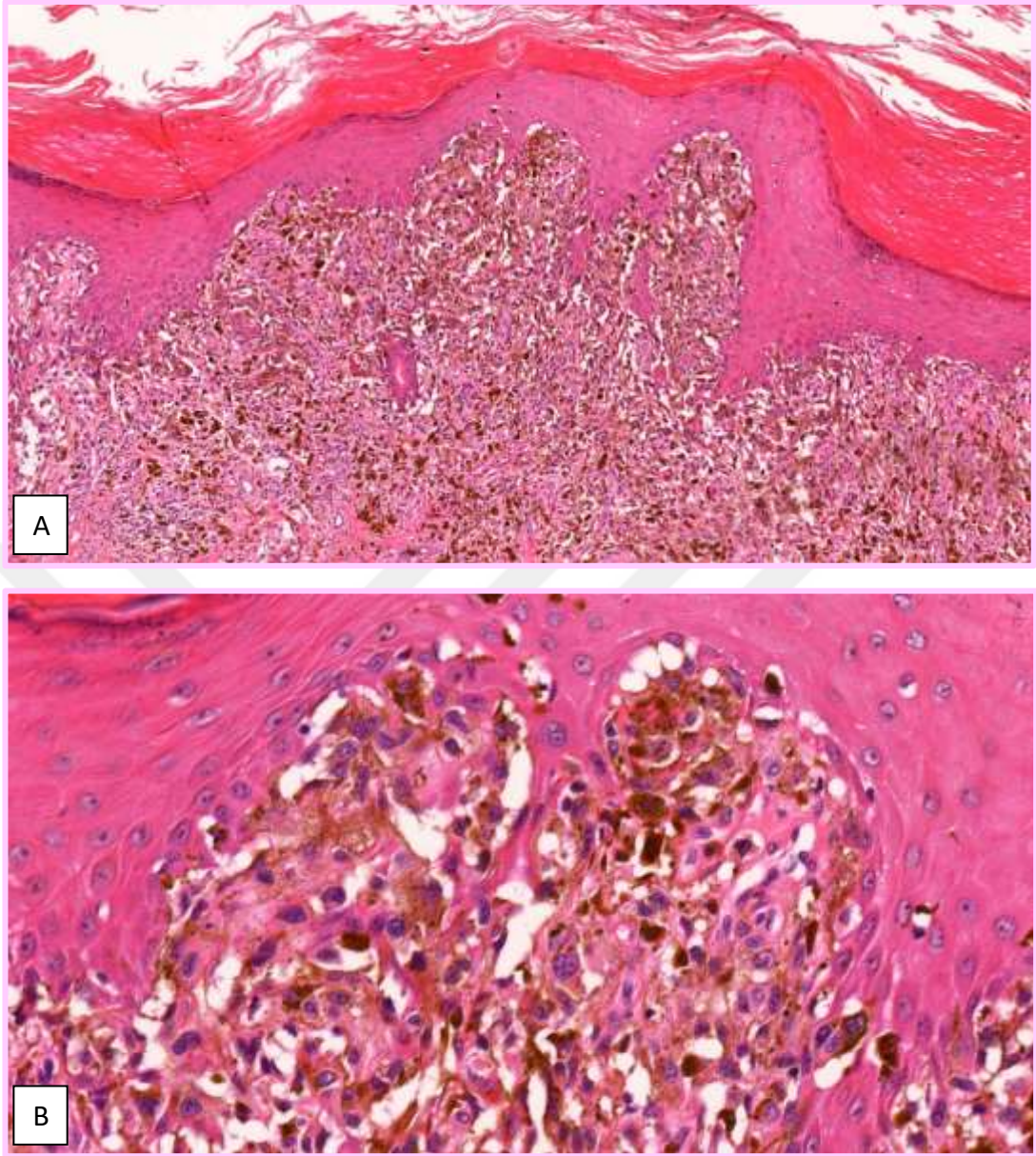
Ayırıcı tanı: Lentigo maligna ile ayırıcı tanı gerektiren ana lezyonlar: atipili aktinik lentigo, atipik lentijinöz nevus, displastik nevusdur. Aktinik lentigoda düzensiz rete uçları, bazal keratinositlerde hiperpigmentasyon, melanosit belirginliği gözlenirken, melanositlerin kesintisiz proliferasyonu bulunmaz, atipi bulunsa dahi uniform değil, random özelliktedir. Lentijinöz bileşke nevus, lentigo malignaya göre daha çok pigment bulundurur. Bileşkede yuva oluşumu bulunan lentigo malignalar, yüzeysel displastik nevuslar ile karıştırılabilir. Hastalık yönetimi aynı olduğu için yüzeysel yayımlı melanomdan ayırım daha az önem taşır [5].

2.3.2.6.3. Akral Lentijinöz Melanom

Akral melanom avuç içi, ayak tabanı, tırnak bölgesinde ortaya çıkan farklı bir kutanöz melanom varyantıdır. İnvaziv akral melanomun prognozu kötüdür[10]. İnsidansı etnik gruplar arasında farklılık gösterir. Kutanöz melanomların; Kafkas ırklarında %2'sini, siyahi ırklarda %80'ini akral lentijinöz melanom oluşturmaktadır [10].

Klinik Özellikler: Melanom insidansının düşük olduğu Asyalı, Hispanik, Polinezyalı, Afrikalı gibi ırklarda gözlenen melanomların çoğu akral lentijinöz melanom tipindedir. Erken dönemlerde düzensiz pigmentasyonlu, belirsiz ve düzensiz sınırlı makül özelliğinde olan akral melanom, vertikal büyüme fazına geçtiğinde papül ya da nodül görünümü kazanabilir. Ülserasyon sık gözlenir. Tırnak yatağında olan lezyonlar lineer pigmentasyona neden olur [5,10]. Akral melanomlarda BRAF mutasyonu genellikle gözlenmezken, %25 oranında KIT mutasyonu tanımlanmıştır. Daha az sıklıkta NRAS mutasyonu bulunduğu da bildirilmektedir [5].

Histopatoloji: Radyal büyüme fazında; belirgin akantoz, genişlemiş keratin tabakası, retelerde düzensizlik, tümör sınırlarında atipik melanositlerin lentijinöz çoğalması ve yayılması mevcuttur. Epidermisdeki komponent, sitoplazması melanin granülleriyle dolu, büyük, bizar nükleuslu büyük atipik melanositleri içerir. Bazal tabakadaki bu melanositler genellikle uzun dendritik uzantılara sahiptir. Atipik melanositler ter bezleri boyunca derin dermise doğru ilerleyebilir. Vertikal büyüme fazında, tümör nodülü genellikle iğsi hücrelerden oluşur ve desmoplastik reaksiyon gözlenir [10]. Resim 2.9'da akral lentijinöz melanom olgusu gösterilmiştir.

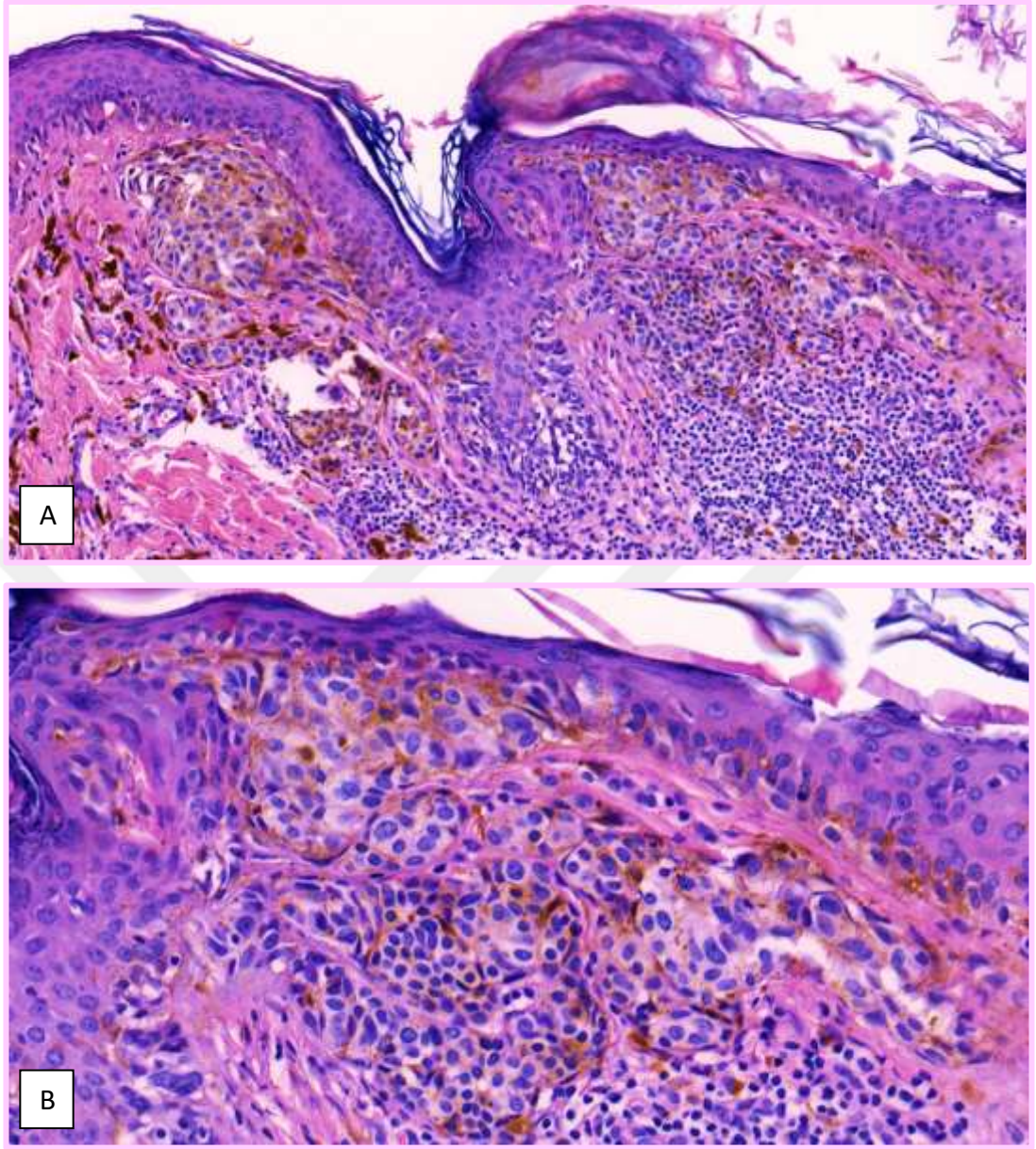


Resim 2.9. A-B. Akral lentijinöz melanom (H-Ex100, H-Ex200, sırasıyla)

Ayırıcı Tanı: Benign akral lentijinöz nevus; küçük boyutlu ve simetrik olması, pagetoid yayılım bulunmaması, uniform atipinin olmaması, özellikle dermal komponentte mitotik aktivitenin bulunmaması, dermal nevik farklılaşma, maturasyon göstermesi gibi özellikleriyle akral lentijinöz melanomdan ayrılır [5].

2.3.2.6.4. Önemi Belirsiz Yüzeyel Atipik Melanositik Proliferasyon (SAMPUS)

Melanom tanısında histoloji altın standart olsa da, çelişkili, belirsiz veya güvenilir kriterler nedeniyle nevuslar ve melanomlar arasında mutlak ayırım yapmak her zaman mümkün değildir. Displastik nevus ile erken in situ melanom ya da invaziv fakat nontümörojenik melanom ayırımı ortak problemdir. Kıvrım bölgeleri, meme derisi vb gibi özel bölgelerde bu problem daha da zorlaşmaktadır. Lezyon tamamen in situ özelliğindeyse “atipik intraepidermal melanositik proliferasyon (AIMP)” ya da “önemi belirsiz intraepidermal atipik melanositik proliferasyon (IAMPUS)” terimleri kullanılabilir. Dermiste de atipik hücre bulunması durumunda “önemi belirsiz yüzeyel atipik melanositik proliferasyon (SAMPUS)” terimi kullanılabilir. Bu terimler kesin tanımlar değil, deskriptif tanı gruplarıdır, ayırıcı tanımlar bildirilmelidir. Lezyon tümörojenik ve/veya mitojenik dermal komponent içeriyorsa, dolayısıyla metastaz yeteneğine sahipse “malign potansiyeli belirsiz melanositik tümör (MELTUMP)” terimi kullanılabilir [5]. Resim 2.10’da SAMPUS olgusu gösterilmiştir.



Resim 2.10. A-B. Önemi belirsiz yüzeysel atipik melanositik proliferasyon (SAMPUS) (H-Ex200, H-Ex400, sırasıyla)

2.3.2.7. Tümörojenik Malign Melanom (Vertikal Büyüme Fazı)

Kompleks bir primer melanom oluşumunda, tüm radial büyüme fazındaki lezyonlardan tümörojenik vertikal büyüme fazı gelişebilir. Böyle durumlarda tümöral kompartman, nontümöral kompartmanın komşuluğunda ya da içerisinde bulunur. Nodüler melanom; nontümörojenik kompartman bulundurmaması, sadece tümörojenik kompartmandan oluşmasıyla kompleks primer melanomlardan farklıdır.

Melanomlar nadir olarak tanı karışıklığına neden olan farklı paternler sergileyebilirler; bunların arasında: desmoplastik, nörotropik, polipoid, verrüköz, balon hücreli, taşlı yüzük hücreli, miksoid, “animal-type”, nevoid, minimal deviasyon, küçük hücreli, adenoid/papiller, pleomorfik (fibrohistiyositik), rabdoid, osteojenik melanomlar bulunur [5].

2.3.2.7.1. Nodüler Melanom

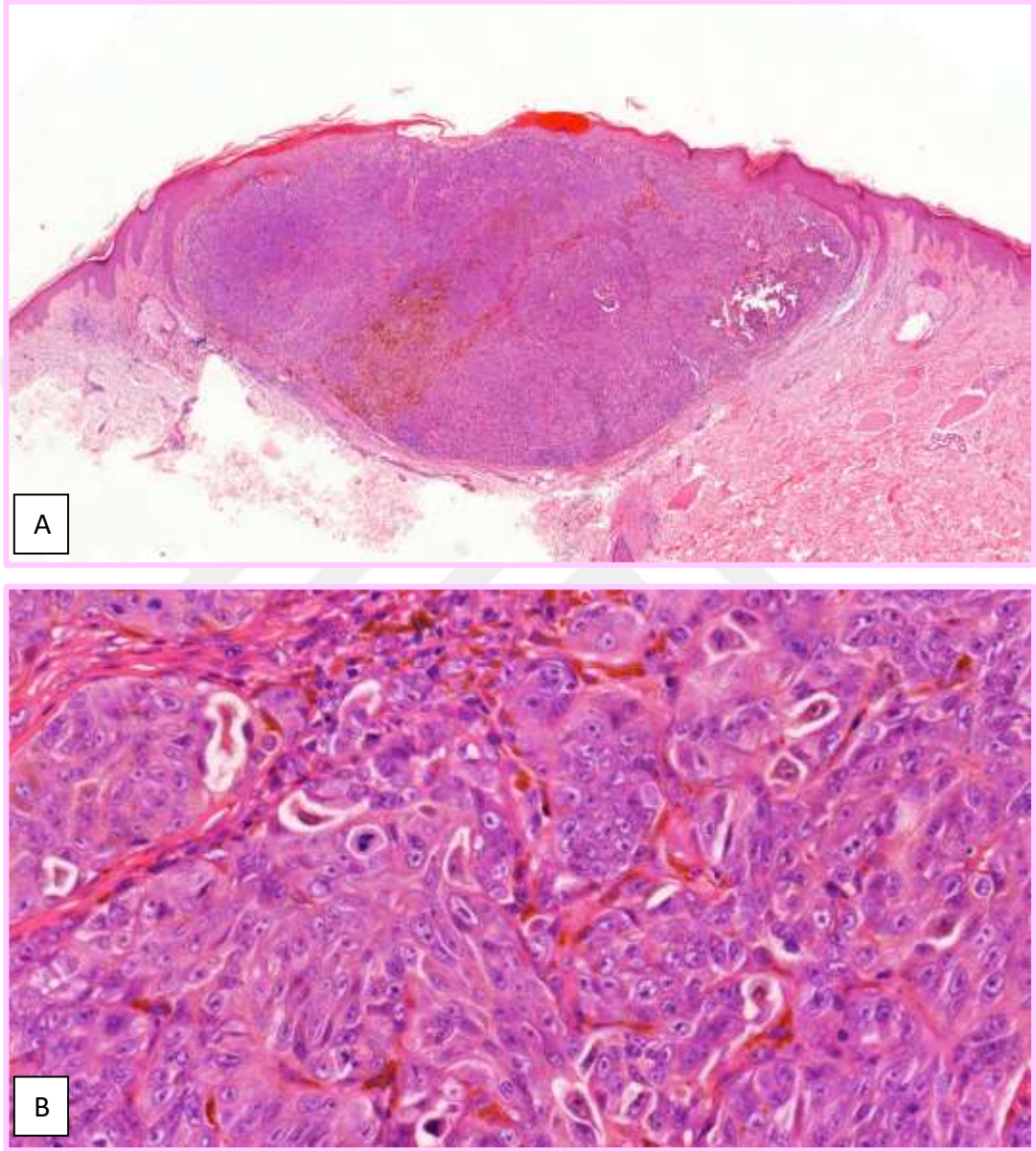
Nodüler melanom sadece vertikal büyüme fazına sahip bir melanom alt tipidir. Tüm melanomların yaklaşık %10-15’ini oluşturur ve 2. sıklıkta görülen melanom türüdür [10].

Klinik Özellikler: Nodüler melanom, yüzeysel yayımlı melanoma göre daha yaşlı bireylerde gözlenir, daha kötü prognozludur. Değişken pigmentli kabarık bir papül olarak başlar, boyutu hızla büyüyerek nodül oluşumu meydana gelir ve ülserasyon gelişir. Küçük, simetrik, düzgün sınırlı nodül oluşturduğu için ABCD kriterleri nodüler melanom için uygulanamaz. Lezyonlar belirgin pigmentli, oligomelanotik ya da amelanotik olabilir. Yüzeysel yayımlı melanomlara benzer şekilde BRAF ve NRAS mutasyonları bulundurulur [5,10].

Histopatoloji: Küçük büyütmede kubbe şeklinde veya polipoid görünüme sahip olan tümör, bazen asimetri gösterebilir. Lezyon üzerindeki epidermis incelmış ya da ülser olabilir. Tümöral kitle, mitotik aktivite gösteren uniform atipik hücrelerin oluşturduğu yuva ya da tabakalardan meydana gelir. Tümör genellikle papiller dermisi doldurarak retiküler dermisi invaze eder. Tümör hücrelerinin epidermise yayılımı genellikle mevcut değildir; yayılım var ise alttaki tümöral kitlenin lateral sınırlarını geçmez. İnflamatuvar infiltrasyon oldukça değişkendir. “Tümörü infiltre eden lenfositlerin (TIL)” bağımsız prognostik önemi vardır.

Tümör hücreleri genellikle epiteloid özelliktedir, fakat iğsi, nevik hücre benzeri küçük epiteloid, mononükleer ya da multinükleer dev hücreler de bulunabilir. Tümöral hücreler; bazen kumsu, bazen değişken boyutlarda melanin granülleri içeren eozinofilik sitoplazmalı, belirgin nükleollu, hiperkromatik, değişken şekil ve boyutlu nükleuslu, yüksek nükleo-sitoplazmik orana sahip, büyük hücre özelliğindedir. Lezyonel hücrelerde dermiste maturasyon bulunmaz, fakat bazı lezyonlarda küçük

hücre değişikliğinin bulunması psödomaturasyon görünümüne neden olur[5, 10]. Resim 2.11’de nodüler melanom olgusu gösterilmiştir.



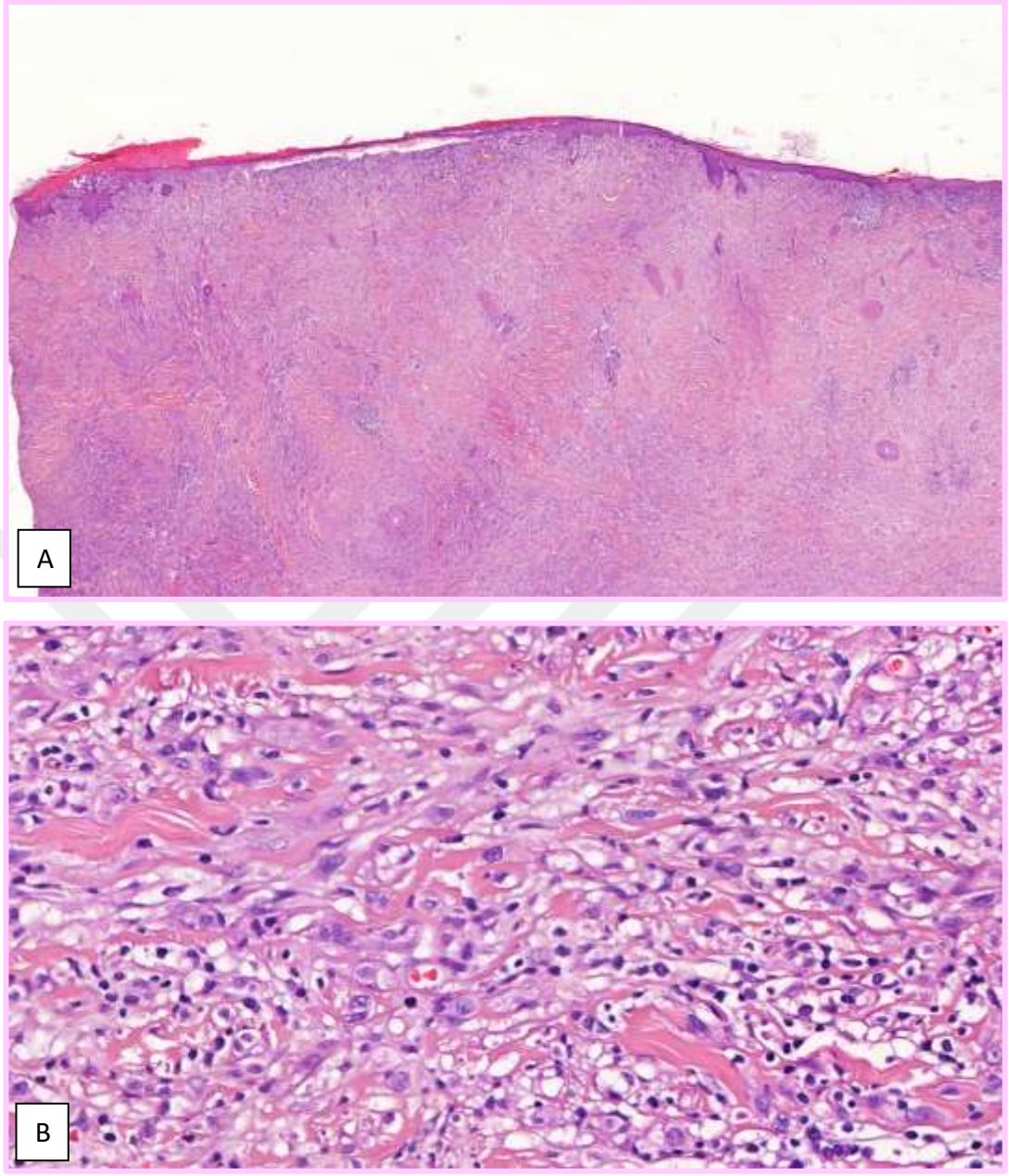
Resim 2.11. A-B. Nodüler melanom (H-Ex25, H-Ex400, sırasıyla)

Ayırıcı Tanı: Nevoid maturasyon, hafif derecede sitolojik atipi, düşük mitotik aktivite varlığında atipik dermal ya da bileşik nevustan ayırım zordur. Bu durumda ayırıcı tanıları açıkça belirtilerek tedaviye yön verilmelidir. Spitz nevus ayırıcı tanıda yer alması gereken önemli bir lezyondur. Yüksek derecede andiferansiye melanomları tanımak, diğer malign tümörlerden ayırmak zor olabilir.

Böyle lezyonlarda melanin pigmentinin gösterilmesi ya da uygun immünohistokimyasal çalışma yapılması gerekir [5]. İmmünohistokimyasal olarak; S-100, HMB-45, Melan A/MART-1, MAGE-1, tirozinaz, melanom hücre adezyon molekülü (Mel CAM), NKI/C3, MUC18, MITF çoğu melanomda eksprese olur. Melanom hücreleri aynı zamanda Bcl2, NSE ve vimentin de boyanırlar. Ki67, p53, proliferasyon nükleer antijen (PCNA), Siklin D1, p21 gibi proliferasyon belirteçleri nevuslara göre melanomlarda daha yüksek oranda saptanırlar. CDKN2A kaybı ve β 3 integrin artışı melanomlarda vertikal büyüme ve daha invaziv seyir ile ilişkilidir [10].

2.3.2.7.2. Desmoplastik Melanom ve Desmoplastik Nörotropik Melanom

Genellikle baş boyun bölgesinde gözlenen, tüm melanomların %1-4'ünü oluşturan desmoplastik melanom, kollajen lifler ya da fibröz stroma ile birbirinden ayrılan malign içsi melanositik hücrelerden oluşan bir lezyondur. İçsi tümöral hücrelerin perinöral ya da intranöral dizelenmesi anlamına gelen nörotropizm, vakaların yaklaşık %30'una eşlik eder, bu durumda lezyon “desmoplastik nörotropik melanom” olarak isimlendirilir. Desmoplastik melanom, diğer melanom tiplerinin rekürrensi ya da metastazı şeklinde de ortaya çıkabilir. Sıklıkla ağrısız, endüre plak şeklindedir. Değişen derecelerde sitolojik atipi, hücresellik ve stromal fibrozis içerirken; genellikle bileşke komponenti eşlik etmez (Resim 2.12.). Tümör genellikle retiküler dermisi infiltre eder, hatta subkutan yağ doku, fasiya, periost, perikranium, kemik invazyonu da yapabilir. Lezyon kalınlığı 1.5 mm'den fazla olup invazyon Clark IV ya da V seviyesindedir. Karakteristik olarak, tümörün içinde ve/veya kenarında lenfositler ve plazma hücrelerinden oluşan küçük odaklar vardır. Mitotik oran değişken olmakla birlikte genellikle düşüktür [10].



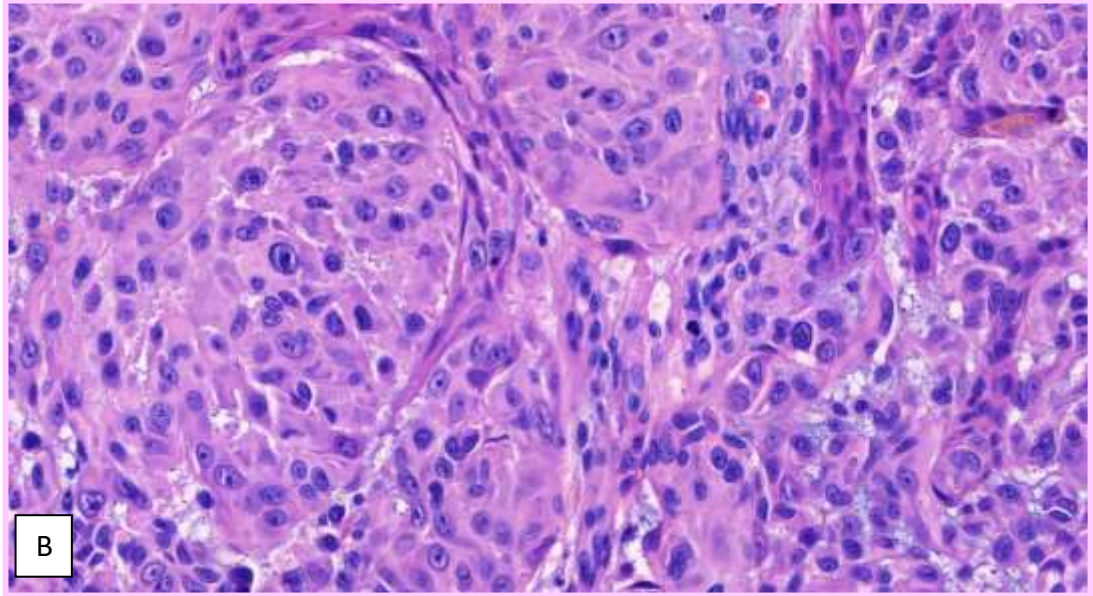
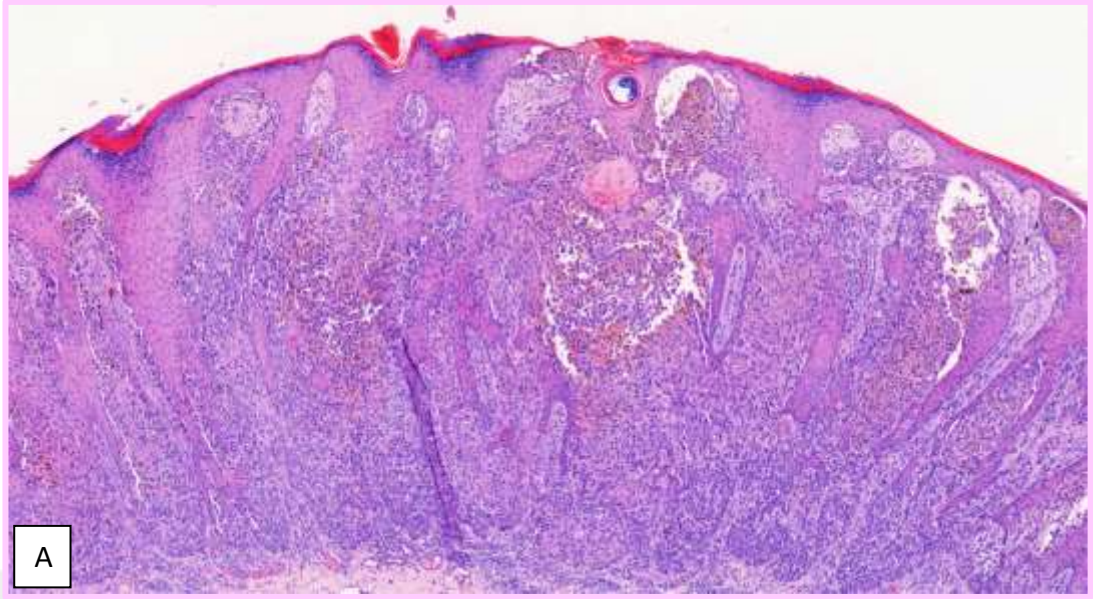
Resim 2.12. A-B. Desmoplastik tip melanom olgusu (H-Ex15, H-Ex400, sırasıyla)

İmmünohistokimyasal olarak iğsi hücreler S100 ile pozitif boyanırlar. Epiteloid hücre odakları dışında HMB45 ve Melan A negatiftir. NSE, NKI/C-3, SMA pozitif olabilir. MITF duyarlı ya da özgün bir belirteç değildir. Vimentin pozitifdir fakat ayırıcı tanıda işlevsel değildir. Genellikle kollajen IV ve laminin ifadesi görülür. Ayırıcı tanıda desmoplastik nevus, desmoplastik Spitz nevus, skleroze hücresel mavi nevus, immatür skar dokusu, dermatofibrom, fibrosarkom,

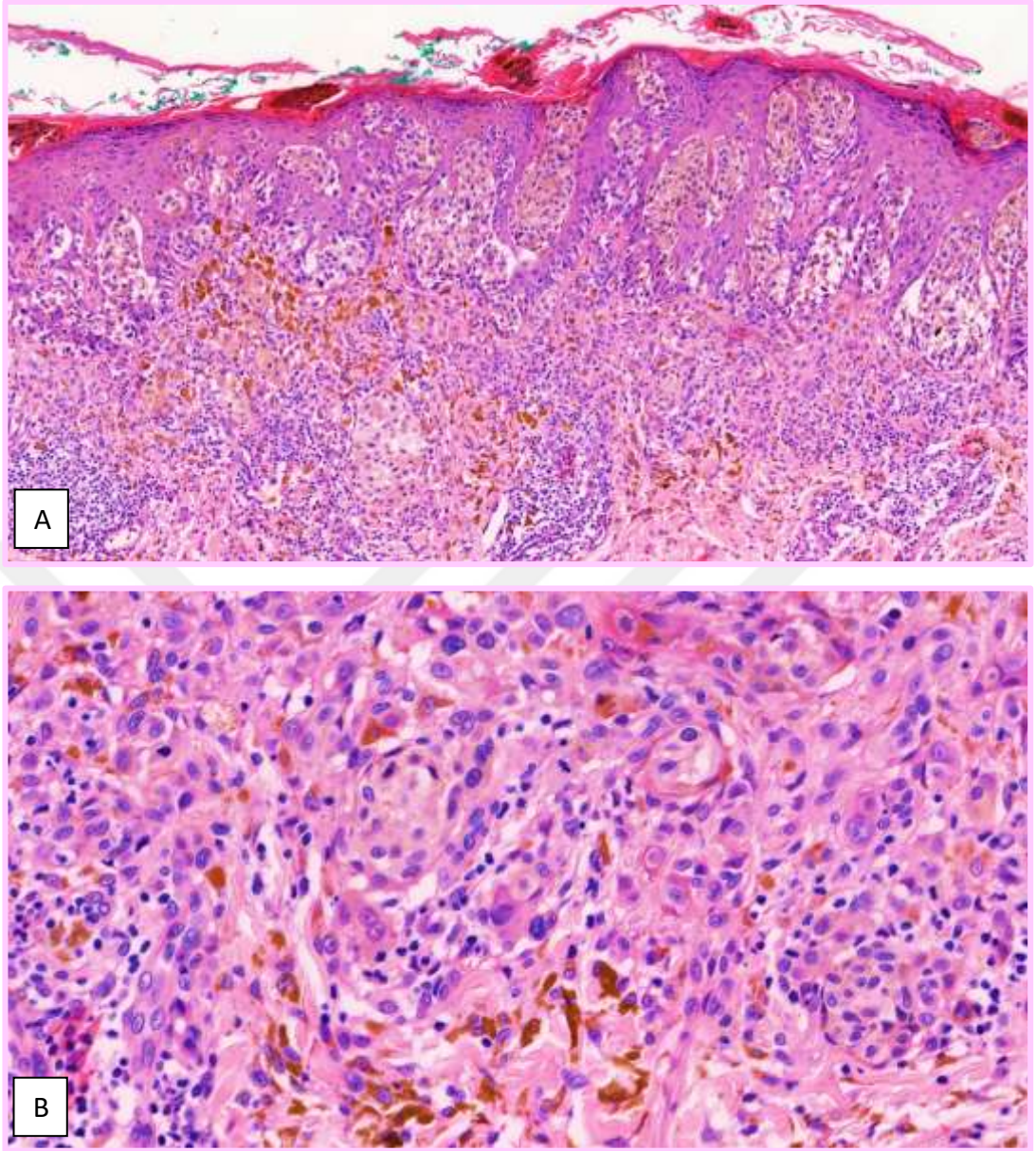
malign fibröz histiyositom, malign periferik sinir kılıfı tümörü, leiomyosarkom göz önünde bulundurulmalıdır[10].

2.3.2.7.3. Nevoid (ve Spitzoid) Melanoma

Nevoid melanomlar, yapısal olarak nevoid özellikte, histolojik olarak benign nevusları taklit eden lezyonlar şeklinde tanımlanırlar. Nevoid melanomun iki histolojik varyantı tanımlanmıştır: nevus benzeri küçük hücrelerden oluşan (Resim 2.13), Spitz nevustaki hücreleri anımsatan büyük hücrelerden oluşan (Spitzoid melanom, Resim 2.14). Nevoid melanomun küçük hücreli varyantı için genellikle “küçük hücreli melanom” terimi kullanılır.



Resim 2.13. A-D. Nevroid melanom (H-Ex50, H-Ex400, sırasıyla)



Resim 2.14. A-B. Spitzoid melanom (H-Ex100, H-Ex400, sırasıyla)

Spitzoid varyantta akantoz ile birlikte verrüköz büyüme paterni görülebilir. Bazal tabaka boyunca melanosit dizelenmesi ile Spitz nevustan ayrılabilir. Küçük büyütmede; radyal büyümenin bulunmaması, yuvalanma paterni ve simetrik olması nedeniyle yeterli dikkat edilmediği takdirde nevüs olarak yanlış tanı alabilir. Tabakalar şeklinde büyüme, yüksek hücresellik, sitolojik atipi, mitoz, deri eklerinde infiltrasyon, derin dermise doğru infiltratif büyüme, maturasyonun bulunmaması gibi özellikler nevoid melanomları benign melanositik lezyonlardan ayırmaktadır. En önemli prognostik faktör tümör kalınlığıdır. Dermal komponentte HMB45 pozitifliği

ve Ki67 proliferasyon indeksi tanıda yardımcıdır. Diğer melanomların aksine, Spitzoid melanomların patogeneğinde BRAF ve NRAS mutasyonları bulunmaz [5, 11].

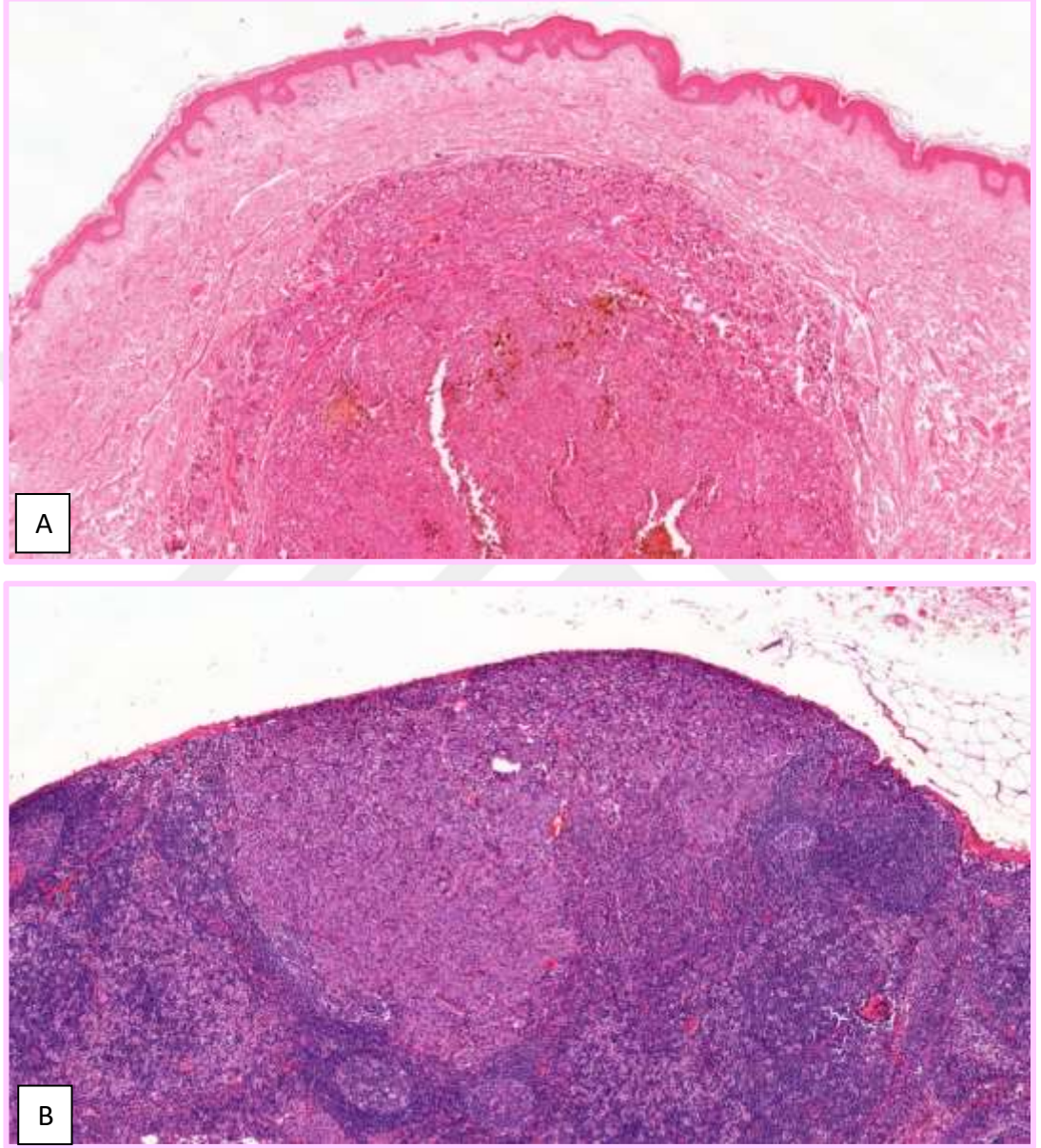
2.3.2.8. Metastatik Melanom

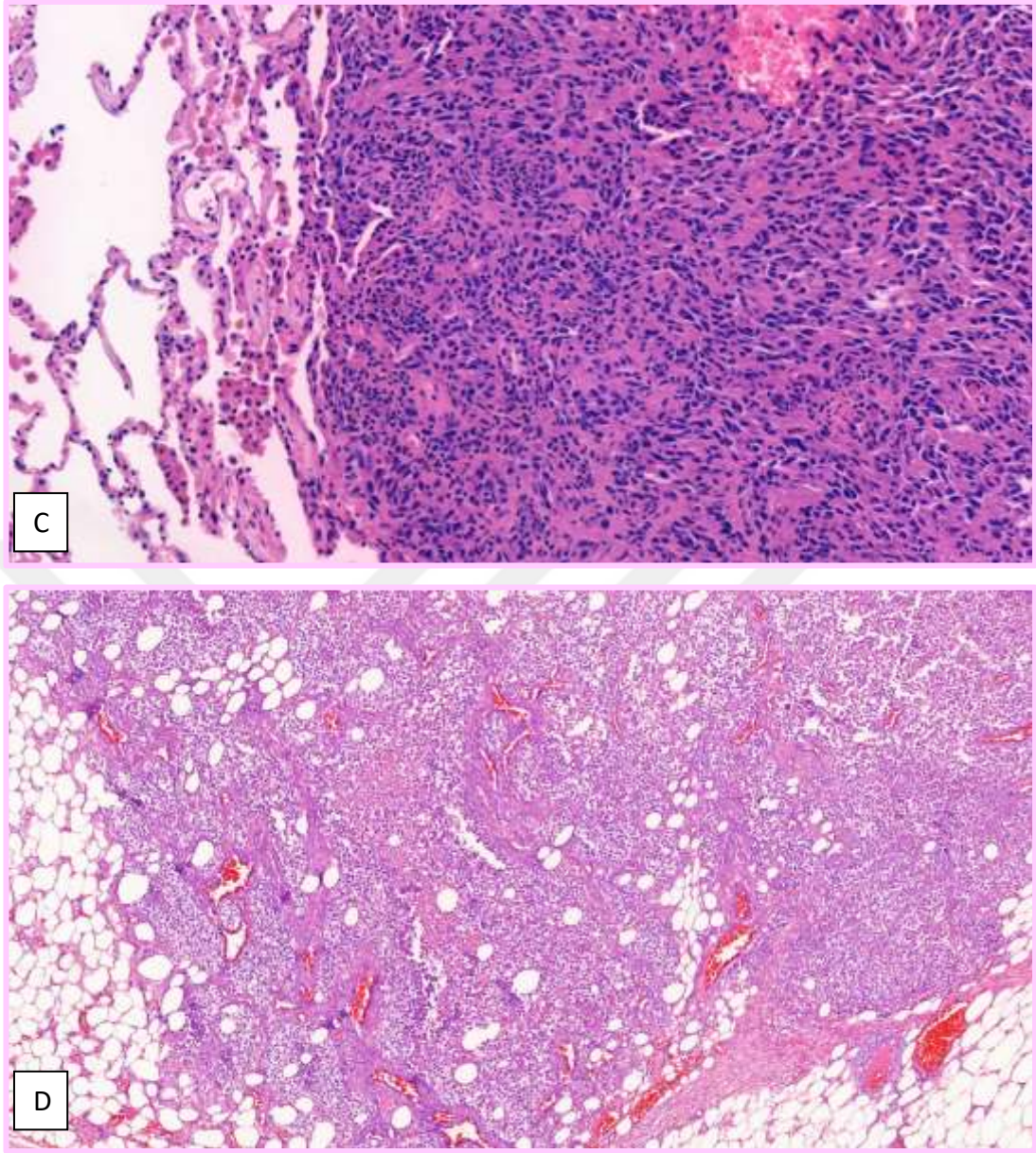
Metastatik yayılım genellikle 2 mm'den kalın melanomların özelliğidir [5]. Lenf nodülleri, deri-derialtı doku, akciğerler, beyin, gastrointestinal sistem, tonsiller, kalp, karaciğer, adrenal bez metastazın gözlenebileceği yerlerdir. Genellikle bölgesel deri ve lenf nodlarına lenfatikler aracılığıyla metastaz gelişimi, hematojen yayılımdan önce meydana gelir. Sıklıkla ilk tanıdan sonra yaklaşık 5 yıl içerisinde metastaz gözlenirse de, özellikle ince melanomlarda geç metastazlar da izlenebilir [5, 11]. Kalınlığı 1 mm'den az olan lezyonlarda nodal metastaz oldukça nadir gözlenirken, 4 mm'den kalın lezyonlarda bu oran %50'ye ulaşmaktadır[13]. İğsi melanomların kalınlıklarına rağmen lenf nodülü metastazı yapma eğilimlerinin oldukça düşük olduğu ileri sürülmüştür [14]. Lenf nodülündeki metastatik depozitlerin gösterilmesinde rutin immünohistokimyasal belirteçlerin duyarlılığını araştıran 2004 yılında yapılan bir çalışmaya göre; S100 ile vakaların %98'inde, NKI/C-3 ile %93'ünde, Melan A ile %82'sinde, HMB45 ile %72'sinde pozitif boyanma bulunduğu açıklanmıştır [15].

Deride izlenen metastatik nodül, primer tümörün çevresinde 2 cm'lik bir alan içerisindeyse “satellit nodül” adını alır; bu sınırın uzağındaysa fakat hala bölgesel ise “in-transit metastaz” terimi kullanılır [16]. Uzak metastaz bulunan hastaların prognozu oldukça kötüdür. Bir çalışmada, metastatik hastalıkta genel sağkalım 7.5 ay, kutanöz, nodal ya da gastrointestinal metastaz varlığında ortalama sağkalım 12.5 ay, tahmini 5 yıllık sağkalım %14 bulunmuştur [17].

Deri metastazının histopatolojik görünümü, primer bir melanomun tümörojenik vertikal büyüme fazını anımsatır, fakat genellikle inflamatuvar infiltrat ve bileşke aktivitesi bulundurmaz. Normal doku ile primer tümör kitlesinden ayrılan ve uzun çapı 0.05 mm'den fazla olan depozitler “mikroskopik satellit” olarak isimlendirilir. Bazı deri metastazları nevoid özelliktedir, primer nevoid melanomdan hatta nevustan ayırabilmek için klinikopatolojik korelasyon gerekir. Mitotik aktivite

ve apoptotik hücreler nevoid metastazı düşündürür [5]. Çeşitli metastatik melanom olguları Resim 2.15'te gösterilmiştir.





Resim 2.15. A-D. Metastatik melanom olguları (A- Deri metastazı H-Ex50, B- Lenf nodu metastazı H-Ex75, C- Akciğer metastazı H-Ex200, D- Yumuşak doku metastazı H-Ex50)

2.3.2.9. Melanomda Evreleme

Melanom hastalarının prognozunu hastanın klinik ve patolojik evresi belirler. Bu evreler uluslararası sağkalım verilerine göre tanımlanmış ve AJCC Kanser Evreleme Kılavuzu, 2017, sekizinci baskı ile yayımlanmıştır. Klinik evre, metastatik hastalık için klinik, radyolojik ve laboratuvar bulgular ile birlikte primer tümörün

mikro evrenlenmesine bağlıdır. Patolojik evre; primer tümörün mikro evrenlenmesi ve sentinel lenf nodülü/bölgesel lenf nodüllerinin incelenmesiyle belirlenir [11].

AJCC-8'e göre tanımlanan TNM sınıflaması 2.2, 2.3 ve 2.4'te, Patolojik evreleme ise Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.2. AJCC-8'e Göre Melanom İçin Primer Tümör Sınıflaması (T)

T Kategorisi	Kalınlık	Ülserasyon durumu
TX: primer tümör kalınlığı değerlendirilemeyen (örn. Küretaj materyali)	Uygulanamaz	Uygulanamaz
T0: primer tümör izlenmeyen (primeri bilinmeyen ya da tamamen regrese melanom)	Uygulanamaz	Uygulanamaz
Tis (in situ melanom)	Uygulanamaz	Uygulanamaz
T1	≤1.0 mm	Bilinmeyen ya da değerlendirilemeyen
T1a	<0.8 mm	Ülserasyon yok
T1b	<0.8 mm 0.8 – 1.0 mm	Ülserasyon var Ülserasyon var ya da yok
T2	>1.0 – 2.0 mm	Bilinmeyen ya da değerlendirilemeyen
T2a	>1.0 – 2.0 mm	Ülserasyon yok
T2b	>1.0 – 2.0 mm	Ülserasyon var
T3	>2.0 – 4.0 mm	Bilinmeyen ya da değerlendirilemeyen
T3a	>2.0 – 4.0 mm	Ülserasyon yok
T3b	>2.0 – 4.0 mm	Ülserasyon var
T4	>4.0 mm	Bilinmeyen ya da değerlendirilemeyen
T4a	>4.0 mm	Ülserasyon yok
T4b	>4.0 mm	Ülserasyon yok

Tablo 2.3. AJCC-8'e Göre Melanom İçin Bölgesel Lenf Nodu Sınıflaması (N)

Bölgesel lenf nodu yayılımı ve/veya lenfatik metastaz		
N Kategorisi	Bölgesel lenf nodu sayısı	İn-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastaz varlığı
NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemeyen (örn. Sentinel lenf nodu biyopsisi yapılmayan, bölgesel lenf nodları daha önce başka bir nedenle çıkarılan)	Yok
N0	Bölgesel metastaz bulunmayan	Yok
N1	Metastatik 1 adet lenf nodülü ya da metastatik lenf nodülü olmadan in-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastaz	
N1a	Klinik olarak saptanamayan metastatik 1 adet lenf nodülü (örn. Sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanan)	Yok
N1b	Klinik olarak saptanan metastatik 1 lenf nodülü	Yok
N1c	Bölgesel lenf nodüllerinde hastalık bulunmayan	Var
N2	Metastatik 2 veya 3 adet lenf nodülü ya da metastatik 1 adet lenf nodülü ile birlikte in-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastaz	
N2a	Klinik olarak saptanamayan metastatik 2 ya da 3 adet lenf nodülü (örn. Sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanan)	Yok
N2b	Klinik olarak en az 1 tanesi saptanan metastatik 2 veya 3 adet lenf nodülü	Yok
N2c	Klinik olarak saptanamayan veya saptanan metastatik 1 adet lenf nodülü	Var
N3	Metastatik 4 adet ya da daha fazla sayıda lenf nodülü veya metastatik 2 adet ya da daha fazla sayıda lenf nodülü ile birlikte in-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastaz veya herhangi sayıda konglomere lenf nodülleri	
N3a	Klinik olarak saptanamayan metastatik 4 ya da daha fazla sayıda lenf nodülü (örn. Sentinel lenf nodu biyopsisi ile saptanan)	Yok
N3b	Klinik olarak en az 1 tanesi saptanan metastatik 4 veya daha fazla sayıda lenf nodülü ya da herhangi sayıda konglomere lenf nodülleri	Yok
N3c	Klinik olarak saptanamayan veya saptanan metastatik 2 veya daha fazla sayıda lenf nodülü ve/veya herhangi sayıda konglomere lenf nodülleri	Var

Tablo 2.4. AJCC-8'e Göre Melanom İçin Uzak Metastaz Sınıflaması (M)

M Kategorisi	Anatomik Bölge	LDH seviyesi
M0	Uzak metastaz yok	Uygulanamaz
M1	Uzak metastaz var	
M1a	Deri, yumuşak doku ve/veya bölgesel olmayan lenf nodüllerine uzak metastaz var	Kayıt edilmeyen ya da değerlendirilemeyen
M1a (0)	Deri, yumuşak doku ve/veya bölgesel olmayan lenf nodüllerine uzak metastaz var	Yüksek olmayan
M1a (1)	Deri, yumuşak doku ve/veya bölgesel olmayan lenf nodüllerine uzak metastaz var	Yüksek
M1b	M1a bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan akciğer metastazı	Kayıt edilmeyen ya da değerlendirilemeyen
M1b (0)	M1a bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan akciğer metastazı	Yüksek olmayan
M1b (1)	M1a bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan akciğer metastazı	Yüksek
M1c	M1a veya M1b bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan santral sinir sistemi dışı visseral organ metastazı	Kayıt edilmeyen ya da değerlendirilemeyen
M1c (0)	M1a veya M1b bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan santral sinir sistemi dışı visseral organ metastazı	Yüksek olmayan
M1c (1)	M1a veya M1b bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan santral sinir sistemi dışı visseral organ metastazı	Yüksek
M1d	M1a, M1b veya M1c bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan santral sinir sistemi metastazı	Kayıt edilmeyen ya da değerlendirilemeyen
M1d (0)	M1a, M1b veya M1c bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan santral sinir sistemi metastazı	Yüksek olmayan
M1d (1)	M1a, M1b veya M1c bölgeleri ile birlikte olan veya olmayan santral sinir sistemi metastazı	Yüksek

Tablo 2.5. AJCC-8’e Göre Patolojik Evreleme (pTNM)

T Kategorisi	N Kategorisi	M Kategorisi	Patolojik Evre
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b ya da N3c	M0	IIIC
T1a/b - T2a	N1a ya da N2a	M0	IIIA
T1a/b - T2a	N1b/c ya da N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a – N2b	M0	IIIB
T1a – T3a	N2c ya da N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Herhangi N $\geq$ N1	M0	IIIC
T4b	N1a – N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Herhangi T, Tis	Herhangi N	M1	IV

2.3.2.10. Prognostik Faktörler

2.3.2.10.1. Evreleme İçin Gerekli Olan Prognostik Faktörler

Geniş eksizyonda, reeksizyonda veya parsiyel biyopside pT sınıflaması için tümörün maksimum kalınlığı ve ülserasyon durumu belirtilmelidir. Patolojik lenf nodu durumu sınıflaması için; değerlendirilen lenf nodu sayısı, metastatik lenf nodu sayısı, metastatik en büyük lenf nodülünün uzun çapı ve ektranodal yayılım varlığı bildirilmelidir. Evre I ve II hastalar; bölgesel ve uzak metastaz bulunmayan, sentinel lenf nodu biyopsisi ile metastaz olmadığı kanıtlanan primer invaziv melanom

bulunan hastalardır. Evre III hastalar; bölgesel lenf nodu ve/veya mikrosatellit/satellit/in-transit metastaz bulunan fakat uzak metastaz bulunmayan hastalardır. Evre IV melanom hastalarında klinik (cM1) ya da patolojik (pM1) olarak bir ya da daha fazla bölgeye uzak metastaz vardır [16].

Breslow Tümör Kalınlığı: Tümör kalınlığı; epidermisin granüler tabakasından başlayarak tümör tabanında en derindeki invaziv hücreye kadar ölçüm yapılması ile saptanır. Yüzeyde ülserasyon varlığında ölçüm ülser tabanından başlanarak yapılır. İnsizyonel ya da parsiyel biyopsi yapılmış ise pT sınıflaması için izlenebilen tümörün en kalın olduğu alandan ölçüm yapılır. Parsiyel regresyon varlığında kalınlık ölçümü standart tarife göre yapılırken, tam regresyon varlığında T0 sınıflaması kullanılmalıdır. Reeksizyon materyalinde, eğer ilk biyopsideki tümör kalınlığı biliniyorsa gerçek tümör kalınlığı için iki materyaldeki ölçülen kalınlıklar toplanmalıdır. Patolojik evreleme için belirlenen T sınıflaması eşik değerleri Tablo 2.2’de gösterilmiştir [16].

Ülserasyon: T sınıflamasının kararlaştırılmasında ikinci kriter olarak kullanılan ülserasyon; fibrin birikimi, nötrofil ya da granülasyon dokusu varlığı ile birlikte lezyon üzerindeki epidermisin tam kat kaybı anlamına gelir. İlk biyopside ya da reeksizyon materyalinde ülserasyon var ise evreleme için tümör ülsere kabul edilmelidir [16].

Mikrosatellit: Mikrosatellit; patolojik incelemede primer tümör odağının derininde ya da komşuluğunda bulunan kutanöz veya subkutanöz mikroskobik metastaz olarak tanımlanmaktadır. Mikrosatellit tanımında primer tümörden uzaklık ya da minimal boyut eşiği bulunmamaktadır, değerlendirme esnasında regresyon açısından dikkatli olunmalıdır. Melanomların çoğunluğu düzgün sınırlanma göstermediği için ya da periadneksiyel yayılım da gösterebilmesinden dolayı mikrosatellit terimini kullanabilmek için, gözlenen odağın seviyeli kesitlerle primer tümör ile devamlılığının olmadığını göstermek gereklidir. Mikrosatellit varlığı, klinik olarak satellit ya da in-transit metastaz saptanan duruma göre nispeten kötü prognoz göstergesidir. Klinik olarak lenf nodu metastazı ya da makroskobik satellit veya in-transit metastaz bulunmadığı durumda, bir ya da daha fazla mikrosatellit varlığı klinik olarak Evre III hastalığı temsil eder [16].

Bölgesel Lenf Nodu Metastazı: Tanı anında bölgesel metastazlı hastaların çoğunluğunu, klinik ya da radyolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı bulunmayan, histopatolojik inceleme sonrasında mikroskobik olarak nodal metastazı saptanan hastalar oluşturur. Bu nedenle önceden bu hastalar “mikroskobik” lenf nodu metastazlı olarak tanımlanırken yeni AJCC sınıflamasında “klinik olarak gizli” hastalık olarak tanımlanmıştır. Klinik olarak gizli lenf nodu metastazı bulunan hastalar; mikrosatellit, satellit ya da in-transit metastaz olmadığı sürece, metastatik lenf nodülü sayısına göre N1a,N2a veya N3a olarak sınıflandırılırlar. Mikrosatellit, satellit ya da in-transit metastaz varlığında, metastatik lenf nodülü sayısına göre N1c, N2c veya N3c olarak sınıflandırılır. Mikroskobik olarak tümör içeren sentinel lenf nodülünün prognostik önemine dair kanıtlar artmaktadır. H-E ya da immünohistokimyasal boyalı kesitlerde sentinel lenf nodülünde tümör hücresi gözleniyorsa hücre sayısından bağımsız olarak bu lenf nodülü metastatik olarak kabul edilmelidir. Lenf nodülü içerisindeki ya da komşuluğundaki lenfatik kanalların içerisinde tümör hücresi gözleniyorsa bu lenf nodülü de metastatik kabul edilmelidir. Sentinel lenf nodu pozitifliğinden sonra tamamlayıcı lenfadenektomi yapılan ve diğer lenf nodüllerinde metastaz bulunmayan hastalar pN1 olarak sınıflandırılırken, tamamlayıcı lenfadenektomi yapılmayan hastalar pN1(sn) olarak bildirilmelidir. Klinik olarak bölgesel lenf nodüllerinde metastaz saptanan hastalar, metastatik lenf nodülü sayısına göre N1b, N2b veya N3b olarak sınıflandırılmalıdır. Klinik olarak gizli bölgesel metastaz bulunan hastalar, klinik olarak saptanabilir metastaz bulunan hastalara göre daha iyi prognozludur. Lenf nodülünün içerisinde bulunabilen benign nevus hücreleri, melanom metastazı ile karıştırılabilir; bu konuda dikkatli olunmalıdır.

Genellikle büyük, klinik olarak saptanabilen metastatik lenf nodüllerinde gözlenen tümörün ektranodal yayılımı kötü prognostik bir bulgudur. Ektranodal yayılım ve konglomere lenf nodülü varlığı patoloji raporunda belirtilmelidir [16].

Nodal Olmayan Bölgesel Metastazlar (Mikrosatellit, Satellit ve İn-transit metastaz): Mikrosatellit, satellit ya da in-transit metastaz varlığı N kategorisi kriterleridir. İntralenfatik ya da anjiotropik tümör yayılımı sonucu meydana gelmektedir. Patolojik incelemede primer tümör odağının derininde ya da komşuluğunda bulunan kutanöz veya subkutanöz mikroskobik metastazlar

mikrosatellit olarak tanımlanmaktadır. Primer tümörün çevresinde kutanöz ya da subkutanöz 2 cm'lik alan içerisinde, makroskobik olarak saptanabilen metastaz varlığı “satellit” olarak tanımlanırken; 2 cm'den uzak alanlarda primer tümör ile ilk bölgesel lenf nodülü arasındaki metastazlar “in-transit metastaz” olarak isimlendirilir. Klinik ya da makroskobik olarak saptanan satellit veya in-transit metastaz varlığı nispeten kötü prognoza işaret eder. Metastatik lenf nodülü sayısına göre, mikrosatellit, satellit ya da in-transit metastaz bulunan hastalar N1c, N2c veya N3c olarak sınıflandırılırlar [16].

Uzak Metastaz: M kategorisi uzak metastazın bulunduğu anatomik bölgeye göre 4 alt gruba ayrılır: M1a, M1b, M1c ve M1d. Deri, subkutan doku, kas ve uzak lenf nodu metastazı bulunan hastalar M1a olarak sınıflandırılır ve diğer anatomik bölgelerde uzak metastaz bulunan hastalara göre nispeten daha iyi prognozludur. Akciğerde metastaz bulunan hastalar M1b, diğer visseral organlarda metastaz bulunan hastalar M1c ve santral sinir sisteminde metastaz bulunan hastalar M1d olarak sınıflandırılırlar. M1d grubu en kötü prognoza sahiptir.

AJCC 8. baskı melanom evreleme sistemine göre serum LDH seviyesi M sınıflaması için önemli bir faktör olarak kalmaya devam etmektedir, fakat artık M1c hastalığı tanımlamak yerine yükselen LDH seviyesi için her bir M kategorisi modifiye edilmiştir [16].

2.3.2.10.2. Klinik Takip İçin Önerilen Ek Prognostik Faktörler

Serum LDH Seviyesi: Serum LDH seviyesi, Evre IV hastalık bulunan hastalarda sağkalım için bağımsız bir prediktördür. Sistemik ilaç tedavisi alan hastalarda; tedaviye yanıt, progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım için en etkili faktörlerden birisidir. BRAF-mutant ileri evre melanom bulunan ve kombine BRAF ve MEK inhibitörü tedavisi alan hastalarda serum LDH seviyesi progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımı etkileyen en önemli faktördür; LDH seviyesi normal olan hastalarda 2 yıllık sağkalım %67 iken, LDH seviyesi yüksek olan hastalarda %25'tir. İmmünoterapi odaklı çalışmalarda; LDH seviyesinin, ipilimumab ve anti-PD1 tedavisi için genel sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[16].

Tümör Mitotik Oranı: Prognozun ana belirleyicilerinden olan mitotik oran AJCC evreleme sistemi 8. baskıda artık T sınıflamasında kullanılmamaktadır. Tüm primer invaziv melanom vakalarında raporda mitotik oran bildirilmelidir. Dermal komponentteki en yoğun mitoz bulunan alan seçilerek, bu alanın hemen çevresindeki toplam 1 mm²'lik alandaki mitoz sayısı değerlendirilmelidir [16].

İnvazyon Seviyesi: Dr. Wallace Clark tarafından tanımlanan invazyon seviyesi 40 yılı aşkın süredir çeşitli melanom evreleme sistemlerinde kullanılmaktadır. Clark invazyon seviyeleri şu şekildedir:

Seviye I: Melanom hücreleri epidermis ile sınırlı (in situ melanom)

Seviye II: Melanom hücreleri papiller dermisi invaze etmekte fakat doldurmamakta

Seviye III: Melanom hücreleri papiller dermisi doldurmakta ve genişletmekte, papiller-retiküler dermis sınırına uzanmakta

Seviye IV: Melanoma hücreleri retiküler dermisi infiltre etmekte

Seviye V: Melanoma hücreleri subkutan yağ dokuyu infiltre etmekte

Prognostik önemi olmasına rağmen Clark invazyon seviyesi; patologlar arasında tekrarlanabilirliği düşük olması ve tümör kalınlığı kadar prognozu yansıtmaması nedeniyle artık TNM evrelemesinde kullanılmamaktadır. Fakat primer tümör özelliği olarak raporda belirtilmelidir [16].

Tümör İnfiltre Eden Lenfositler: Tümör infiltre eden lenfositler (TILs); tümör yuvalarını infiltre eden ve/veya direkt olarak tümör hücreleriyle temas halindeki lenfositler olarak tanımlanmaktadır. TILs için en sık kullanılan derecelendirme şeması şu şekildedir:

1. TIL infiltrasyonu yok: Lenfositler yoktur ya da var fakat tümör hücreleri ile temas halinde değildir.
2. Yoğun olmayan TIL infiltrasyonu: Tümörde fokal alanlarda tümör hücreleri ile temas halinde lenfositik infiltrasyon mevcuttur.

3. Yoğun TIL infiltrasyonu: Tümör tabanının tümünde ya da tümör içinde, tümör hücreleri ile temas halinde diffüz olarak TIL infiltrasyonu bulunmasıdır.

TIL infiltrasyonunun, primer kutanöz melanom için iyi bir prognostik faktör olduğunu açıklayan çok sayıda çalışma mevcuttur. TIL infiltrasyonu daha az sıklıkta sentinel lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Raporlamada, derecelendirme şemasına göre TIL varlığı ve yoğunluğu bildirilmelidir [16].

Lenfovasküler İnvazyon: Lenfovasküler invazyon; kan damarları, lenfatikler ya da her ikisinin lümeninde melanom hücrelerinin bulunmasıdır. Raporda lenfovasküler invazyon var ya da yok şeklinde bildirilmelidir. Lenfatik ve vasküler invazyon varlığı tüm çalışmalarla kesin olarak doğrulanmasa da genelde kötü prognostik bulgu olarak kabul edilmektedir [16].

Nörotropizm: Nörotropizm; sinir kılıfına bitişik (perinöral invazyon) ya da sinir içerisinde (intranöral invazyon) melanom hücreleri varlığını ifade eder. Nörotropizm en iyi şekilde tümör periferinde değerlendirilebilir. Desmoplastik melanomda sıklıkla gözlenen nörotropizmin varlığı ya da yokluğu raporda belirtilmelidir. Sinir kılıfı boyunca infiltrasyon bulunması artmış lokal nüks ile ilişkilidir [16].

Regresyon: Parsiyel regresyon melanomlarda sık olarak gözlenir. Sıklıkla nontümörojenik RPG kompartmanında gözlenen regresyon; çevre epidermis ya da papiller dermiste melanom bulunan, papiller dermiste ödematöz fibroplazi, dilate vasküler yapıların proliferasyonu, melanofaj ve lenfosit varlığı ile karakterli fokal alanlar olanlar tanımlanır. Daha önemli bir dermal bileşen mevcut olma ihtimali ve gerilemeden önce metastaz yapma olasılığı nedenleriyle regresyon kötü prognoz ile ilişkilendirilir [5].

2.3.2.11. Melanom ve Epigenetik Mekanizmalar

Benign-malign hücresel proliferasyon ayırımında, genomik düzeyde DNA sekansındaki değişiklikler patobiyolojik farklılıkları yeterli bir şekilde açıklamamaktadır. Fenotipik, morfolojik ve patobiyolojik farklılıkları anlamada

epigenetik değişiklikler anahtar rolündedir. Epigenetik değişiklikler; DNA sekansında değişikliğe sebep olmadan gen ifadesini düzenleyen moleküler mekanizmalardır. DNA bazları ya da histon proteinlerinde kovalent modifikasyonla kromatin yapısını değiştirerek veya non-coding RNA'lar ile mRNA traslasyonunu düzenleyerek genlerin ifadesi ya da sessizleştirilmesi sağlanır. Malign melanom genetik ve epigenetik olaylar arasındaki etkileşimin incelenebileceği başlıca kanser türlerindendir. Spesifik genomik mutasyonları (BRAF v.b) hedef alan tedaviler geliştirilmesine rağmen, melanom insidansı ve mortalitesi artmaktadır. Düzensiz DNA metilasyonu/demetilasyonu/hidroksimetilasyonu, histon modifikasyonu, non-coding RNA'lar gibi epigenetik değişikliklerin kanser patogeneğinde ve melanoma biyolojik davranışında etkilerinin araştırılması ve anlaşılması, yeni patolojik mekanizmaların ortaya konmasını sağlamakta; potansiyel tanısal biyobelirteçler ve tedavi hedefleri sunmaktadır[18].

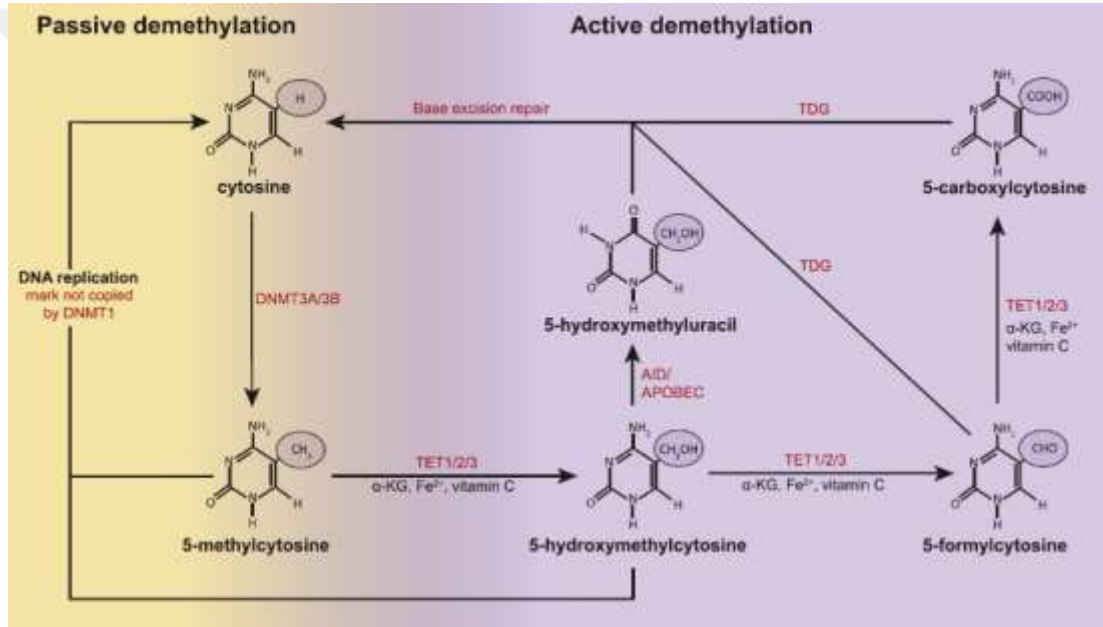
2.3.2.12. Çalışmamızda Kullanılan Epigenetik Belirteçler

2.3.2.12.1. 5-Hidroksimetilsitozin

DNA metilasyonu; hücre farklılaşması, embriyolojik gelişim, çevresel adaptasyon, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, imprinting, X kromozomu inaktivasyonu, egzojen genetik materyalin invazyonuna karşı defans gibi birçok süreçte rol oynar [19]. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından gerçekleştirilir ve çoğunlukla CpG dizilerinde bulunan sitozin bazında meydana gelir. DNMT3A ve DNMT3B de novo metilasyondan sorumlu iken, DNMT1 esas olarak DNA replikasyonu sırasında yeni sentezlenen zincire metil grubu ekler ve böylece kalıp zincirdeki metilasyon profilinin yeni zincire akarılmasını sağlar [19-21].

6. DNA bazı olarak da bilinen 5-metilsitozin, çoğunlukla CpG dizilerinde bulunan sitozin bazının 5. pozisyonundaki karbonuna DNMT aracılığıyla S-adenozilmetiyoninden metil grubu transferi ile oluşturulur[22]. Gen promotor bölgelerinde 5-metilsitozin varlığı sıklıkla transkripsiyonun baskılanması ile ilişkilidir [23].

DNA demetilasyonu; replikasyon sırasında DNMT1 tarafından yürütülen metilasyon idamesi sağlanmadığında pasif olarak ya da Ten-Eleven Translocation (TET1, TET2, TET3) proteinleri aracılığıyla ve deaminasyon reaksiyonları ile aktif olarak gerçekleşebilir. TET proteinleri; α -ketoglutarat, demir ve askorbik asit kofaktörlüğünde 5-metilsitozinin ardışık oksidatif reaksiyonlar ile 5-hidroksimetilsitozin, 5-formilsitozin, 5-karboksilsitozine dönüşümünü sağlarlar. 5-formilsitozin ve 5-karboksilsitozin, timin DNA glikozilaz tarafından tanınırlar. Timin DNA glikozilaz, modifiye sitozinin unmodifiye sitozin ile değiştirildiği baz eksizyon tamir yolacağını aktifler (Şekil 2.1) [24-26].

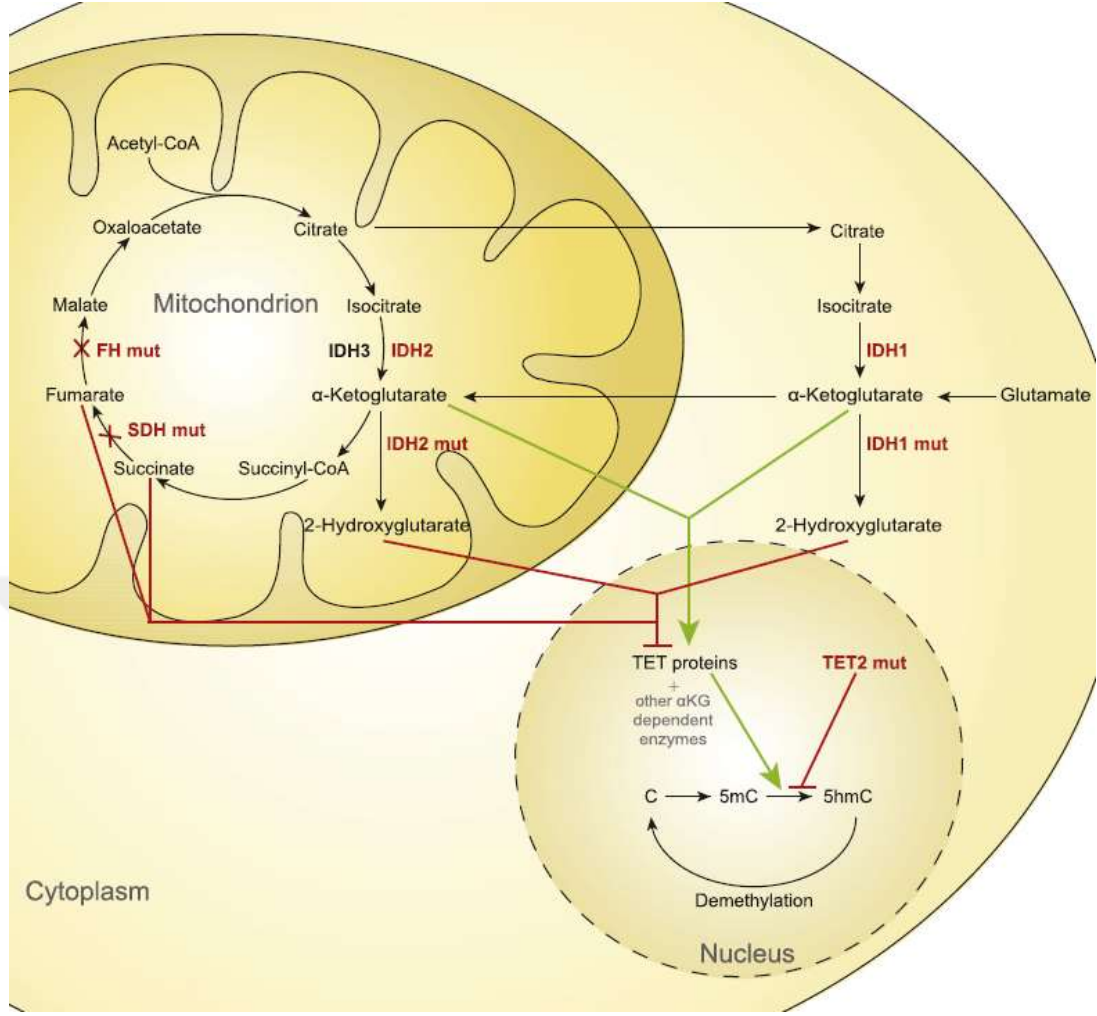


Şekil 2.1. Sitozin 5. pozisyonundaki karbon metilasyonu ve demetilasyonu [21].

5-hidroksimetilsitozinin memeli dokularındaki varlığı ilk olarak 1970'li yıllarda rapor edilmiş olsa da, 2009 yılında TET enzimlerinin keşfiyle memeli dokularında bulunduğu kesinlik kazanmıştır. Günümüzde, en yüksek oranda beyin dokusunda bulunduğu gösterilen 5-hidroksimetilsitozin seviyelerinin farklı hücre tipleri ve dokularda çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir[27]. 5-hidroksimetilsitozin çoğu dokuda DNA demetilasyon yolağında açığa çıkan basit bir ara maddeden beklenebilecek seviyenin oldukça üzerinde miktarlarda bulunmaktadır. Bu nedenle kendine özgü biyokimyasal fonksiyonları olan bir epigenetik birim olduğu

düşünülmektedir. 5-hidroksimetilsitozin, üretim sürecinde gerçekleşen metil grubu oksidasyonu olmadığı takdirde 5-metilsitozin ile etkileşime girecek proteinlerin metil grubuna bağlanmasını engelleyerek ya da eğer var ise kendisine spesifik olarak bağlanan proteinler ile farklı fonksiyonlar gösteriyor olabilir. Bazı proteinlerin (UHRF1, MBD3, MeCP2 vb) 5-hidroksimetilsitozini tanıdığı in vitro olarak gösterilmiştir, fakat bu proteinler 5-hidroksimetilsitozine spesifik değildir ve 5-hidroksimetilsitozin ile bağlanmalarının biyolojik rolü henüz bilinmemektedir[28-31].

Metilasyon ve demetilasyon arasındaki denge birçok protein ve kofaktör ile sağlanır. Kanserde bu dengenin bozulması metilasyon paternlerinde değişikliğe sebep olur. Metilasyondaki bu değişiklikler tümör supresor genlerin baskılanmasına ve onkogenlerin aktive olmasına neden olabilir. Son zamanlarda çeşitli kanser türlerinde hidroksimetilasyon seviyelerinin de değiştiği gösterilmiştir[21]. 5-hidroksimetilsiztozin seviyelerindeki bu değişikliklerin oluşumunda birkaç mekanizma düşünülmektedir. Birinci mekanizma; proliferen olan kanser hücrelerinde hemimetile sitozinli alanları tanıyarak yeni sentezlenen DNA zincirine metil grubu ekleyen DNMT1'in, hemihidroksimetil sitozinli alanları tanımadığı ve yeni zincire hidroksimetil grubu eklenemediği için yeni üretilen hücrelerde 5-hidroksimetilsitozinin düşük olduğudur. Diğer bir mekanizma; oksidasyonda rol alan TET proteinlerinin tümör dokusunda çeşitli sebeplerle çevre normal dokuya göre düşük olmasıdır. Son mekanizma ise; TET enzim aktivitesi için gerekli olan α -ketoglutaratın sağlandığı metabolik yollarda bozukluk bulunmasıdır[27]. α -ketoglutarat; trikarboksilik asit döngüsünde (Krebs siklusu) yer alan izositratın izositrat dehidrogenaz enzimi (IDH) ile oksidatif dekarboksilasyonu sonucu elde edilir. IDH1 mutasyonu sonucu α -ketoglutarat yerine 2-hidroksiglutarat sentezlenir. 2-hidroksiglutarat, TET enzimleri gibi α -ketoglutaratın ko-substrat olduğu enzimatik reaksiyonları inhibe eder. Krebs siklusunda bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) ve fumarat hidrataz (FH) enzimlerinin mutasyonu sonucu biriken süksinat ile fumarat yapısal olarak α -ketoglutarata benzerler ve α -ketoglutarat-bağımlı enzimleri inhibe ederler (Şekil 2.2)[21].



Şekil 2.2. TET, IDH, SDH, FH mutasyonlarının 5-hidroksimetilsitozin dönüşümüne etkileri [21]

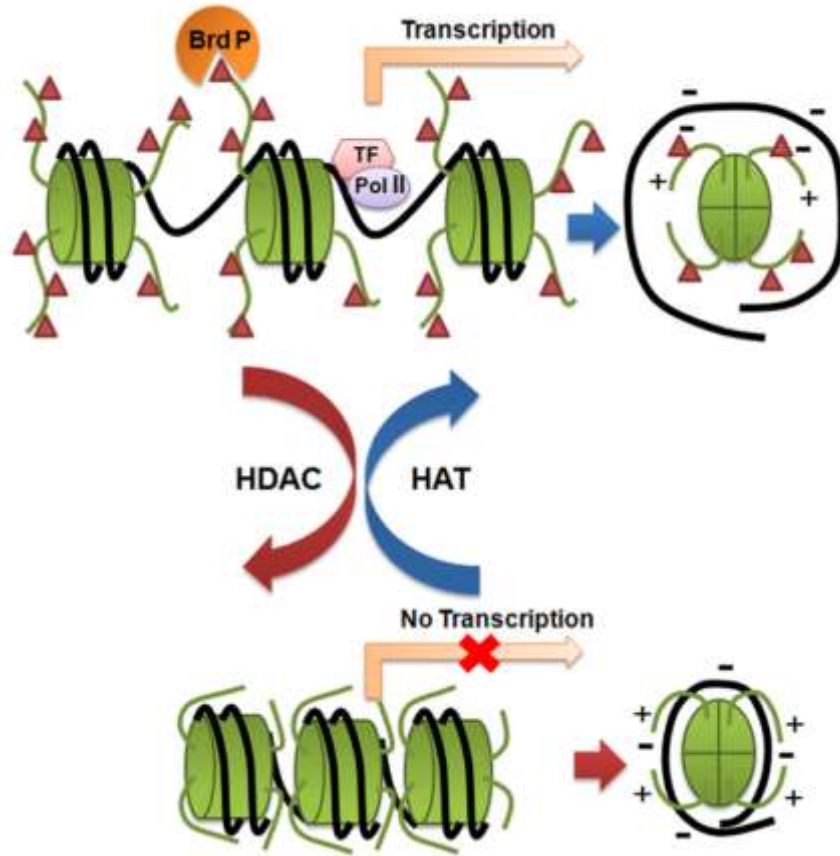
Glioblastom, melanom, meme, prostat, hepatik, gastrik ve renal kanserler gibi çeşitli malignitelerde 5-hidroksimetilsitozin seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir [32-38] (Tablo2.6). Lian ve ark. 5-hidroksimetilsitozin kaybının, melanomun en önemli epigenetik değişikliği olduğunu açıklamış ve melanomda kötü prognoz ile ilişkili bulmuşlardır [32]. Liu ve ark. hepatik kanserde 5-hidroksimetilsitozin seviyelerinin azaldığını ve düşük 5-hidroksimetilsitozin seviyelerinin genel sağkalım ve rekürrens zamanı için bağımsız prognostik belirleyici olduğunu öne sürmüşlerdir[36]. Birçok çalışma renal hücreli karsinom, gastrik ve ovarian kanserlerde düşük 5-hidroksimetilsitozin ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu ortaya çıkartmıştır [35, 37, 39].

Yapılan çalışmalarda matür melanositlerde immünohistokimyasal olarak 5-hmc düzeyi yüksek bulunurken, melanom tümör hücrelerinde kayıp saptanmıştır. Benign edinsel dermal nevüs-yüksek dereceli displastik nevüs-borderline melanositik neoplazi-melanom sekansında displazi arttıkça 5-hmc kaybının da arttığı saptanmıştır. Tümör kalınlığı, mitoz sayısı ve patolojik evre ile 5-hmc kaybının şiddeti korele bulunmuş; ekspresyon kaybı daha fazla olan hastalarda sağkalım düşük saptanmıştır. Deneysel hayvan modellerinde 5-hmc seviyesi artırılarak tümör büyümesinin engellendiği görülmüş; hastalık tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir terapötik ajan olabileceği açıklanmıştır. Ayrıca sentinel lenf nodu biyopsilerinde melanom metastazı ile nodal nevüs ayırıcı tanısında ve benign nevüs zemininde gelişen melanomların mikroevelemesinde oldukça yararlı olduğu belirtilmiştir. Tüm bu bulgularla 5-hmc, yeni bir diagnostik, prognostik, prediktif, terapötik bir biyobelirteç olarak öne sürülmektedir [18, 40-44].

2.3.2.12.2. Histon Deasetilaz 6

Transkripsiyonu düzenleyici mekanizmalardan bir tanesi kromatin yapısının modifikasyonudur. Kromatin yapısını etkileyen ana faktör, nükleozom yapısını ve gen transkripsiyonunu düzenleyen çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar için hedef görevi gören histon kuyruklarındaki aminoasit rezidülerinin durumudur [45, 46]. Asetilasyon en yaygın histon modifikasyon yöntemlerinden bir tanesidir. Histon kuyruklarında bulunan lizin rezidülerinin asetillenmesiyle pozitif yükleri nötralize olur ve kromatin yapısı gevşer. Böylece transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerine ulaşabilirliği artar [47]. Bunun tersi olarak histon deasetilasyonu daha kompakt bir kromatin yapısına neden olarak transkripsiyonu baskılar [48]. Direkt olarak transkripsiyon faktörlerinin asetilasyonu ya da deasetilasyonu da gen transkripsiyonu üzerine pozitif ve negatif etkiler gösterir [49].

Histon asetilasyonu, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri ile kontrol edilen dinamik bir süreçtir. Bu enzimlerin arasındaki denge, gen ekspresyonu için önemli bir düzenleyici mekanizma görevi görür ve birçok gelişimsel süreç ve hastalık durumunu yönetir [50] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Histon asetilasyonu ile transkripsiyon uyarılırken, deasetilasyon ile baskılanır [51].

HDAC ailesi yapsal benzerliklerine göre 4 ana gruba ayrılır: sınıf I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8) , sınıf II (sınıf IIa: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, sınıfIIb: HDAC6, HDAC10), sınıf III (SIRT1-SIRT7), sınıf IV (HDAC11) [52]. Sınıf I, II ve IV HDAClar asetillizin hidrolizi için benzer katalitik korlar içerirler ve aktiviteleri için çinko (Zn) iyonuna ihtiyaç vardır. Sınıf III HDAClar ise enzimatik aktiviteleri için nikotinamid adenin dinükleotidlerine ihtiyaç duyarlar. Sınıf I HDAClar tüm dokularda ve nükleuslarda bulunurken, sınıf II HDAClar dokulara spesifiktir ve protein kinazların fosforilasyonu ile nükleus-sitoplazma arasında geçiş göstermektedirler. Sınıf IIb HDAClar farklı olarak iki adet deasetilaz domaini içerirler [53].

Transkripsiyonu baskılayıcı etkilerinin yanında HDAC enzimleri proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunda da görev alırlar. HDAC enzimleri transkripsiyon faktörleri (E2F, p53, c-Myc ve NFkB) ve hücrel homeostazı

düzenleyen sinyal proteinleri (Stat3, Stat7, β -Katenin) gibi non-histon proteinleri de deasetile ederler[54].

Son zamanlardaki çalışmalarda; HDAClar malign fenotip kazanımı ile ilişkili bulunmuş ve malign hücrelerde çoğu HDAC enziminin arttığı gösterilmiştir. HDAC1 ekspresyonu; gastrointestinal, prostat ve meme kansinomlarında artmış bulunmuştur[55-58]. Uterin, servikal ve gastrik kanserlerde aberan artmış olan HDAC2'nin, kolorektal kansinomlarda APC ekspresyon kaybından sorumlu olduğu düşünülmektedir[59-61]. HDAC3 ekspresyonu kolon, HDAC6 ekspresyonu meme kansinomlarında yüksek bulunmuştur[56, 62](Tablo 2.6).

HDACların aberan aşırı ekspresyonunun fonksiyonel önemi alt tipler arasında farklılık göstermektedir. Sınıf I HDAClar hücre proliferasyonunu arttırmaktadır; ayrıca HDAC1 ve HDAC2 kanser hücrelerinde apoptozu azaltmaktadır. HDAC3, HDAC4, HDAC5 ve HDAC8 diferansiasyonu inhibe etmekte iken, HDAC4, HDAC6, HDAC9 ve HDAC10 anjiyogenez ile ilişkili bulunmuştur. Sınıf IIb üyeleri olan HDAC6 ve HDAC10, metastaz gelişimine katkı sağlayan hücre motilitesini arttırmaktadır. Proliferasyon, diferansiasyon, anjiyogenez ve migrasyonu hedefleyen HDAC inhibitörleri kanser tedavisi için potansiyel oluşturmaktadır[53].

Tablo 2.6. Sınıf I, II ve IV HDAC enzimlerinin özellikleri [63]

Class	Member	Localization ^{5,8}	Expression ^{8,68}	In vivo phenotypes (knockout)	Association with cancer entities ⁶
I	HDAC 1	Nucleus	Ubiquitous	Embryonic deletion lethal ⁶⁸ Upregulation of p21 and p27 ⁶⁸ Defects in kidney development ⁶⁸ Proliferation defects ⁶⁹ Growth retardation ⁶⁹	Cutaneous T-cell lymphoma Gastric cancer Colon cancer Prostate cancer
	HDAC 2	Nucleus	Ubiquitous	Defects in kidney development ⁶⁸ Lethal ⁶⁸ Cardiac aberrations ⁶⁹	Cutaneous T-cell lymphoma Gastric cancer Colon cancer Prostate cancer
	HDAC 3	Nucleus Cytoplasm	Ubiquitous	Lethal ⁶⁹ Gastric defects ⁶⁹	Gastric cancer Colon cancer Prostate cancer
	HDAC 8	Nucleus	Ubiquitous Smooth muscle differentiation	Lethal before birth, due to skull imbalance ⁶⁹	Unknown
IIa	HDAC 4	Nucleus Cytoplasm	Heart muscle Skeletal muscle Brain	Lethal, due to ossification of cartilage ⁶⁹	Non-small-cell lung cancer
	HDAC 5	Nucleus Cytoplasm	Heart muscle Skeletal muscle Brain	Cardiac hypertrophy ⁸	Non-small-cell lung cancer
	HDAC 7	Nucleus Cytoplasm	Heart muscle Placenta Pancreas Skeletal muscle	Reduced bone mass ⁶⁸	Non-small-cell lung cancer
	HDAC 9	Nucleus Cytoplasm	Brain Skeletal muscle	Cardiomegaly ⁸	Unknown
IIb	HDAC 6	Cytoplasm	Heart muscle Liver Kidney Pancreas	Unknown	Breast cancer Cutaneous T-cell lymphoma Non-small-cell lung cancer
	HDAC 10	Cytoplasm	Liver Spleen Kidney	Unknown	Non-small-cell lung cancer
IV	HDAC 11	Nucleus	Brain Heart muscle Skeletal muscle Kidney	Enhanced tumor growth ⁶⁸	Unknown

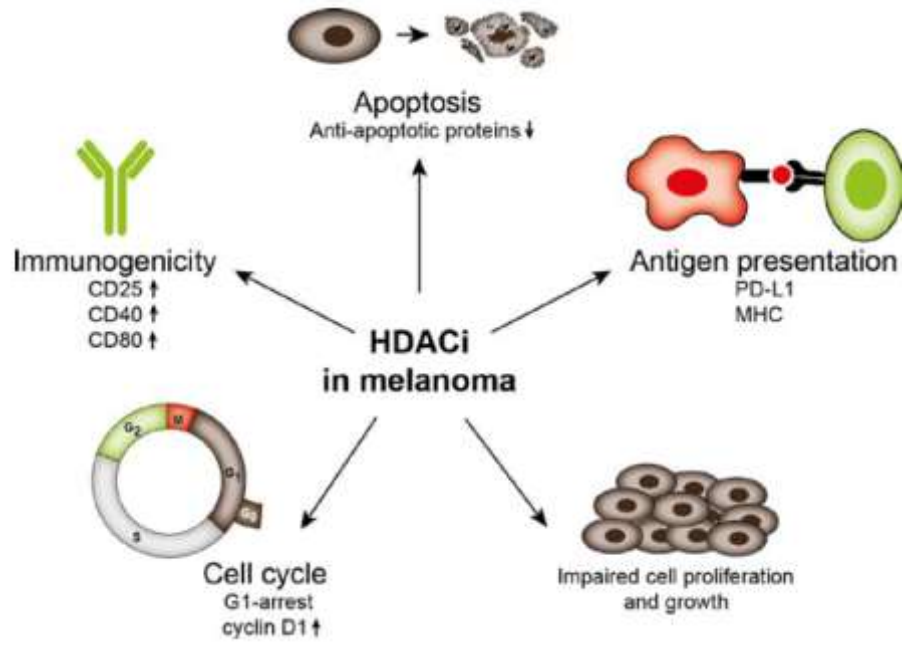
İnsan melanom hücre serilerinde hangi HDAC subtiplerinin eksprese olduğunu araştıran bir çalışmada HDAC5 ve HDAC6 seviyeleri yüksek bulunmuştur. HDAC5 ve HDAC6 inhibisyonuyla proliferasyonun azaldığı, apoptozun arttığı, metastaz yeteneğinin azaldığı, hücre siklus arrestinin gerçekleştiği saptanmıştır. Daha önce melanom tanısı almış insan tümör dokularında da immünohistokimyasal olarak HDAC5 ve HDAC6 seviyeleri yüksek bulunmuştur [2]. Başka bir çalışmada melanom hücre serilerinde ve deneysel hayvan modellerinde, HDAC6'nın spesifik inhibisyonuyla tümör hücre proliferasyonunun azaldığı ve tümör spesifik immünojenik sinyallerin arttığı saptanmış; selektif HDAC6 inhibitörlerinin potansiyel terapötik anti-melanom ajanı olabileceği belirtilmiştir [64].

Sınıf IIb üyesi olan HDAC6, diğer HDAClardan farklı olarak 2 adet deasetilaz domaini ve bir adet C-terminal çinko parmak domaini bulundurur [65]. HDAC6 asıl olarak sitoplazma yerleşimlidir fakat nükleusta bulunduğu da gözlenmiştir. HDAC6 sitoplazmada α -tubulin, kortaktin, hsp90'ı deasetilleyerek, hücre motilitesi, silya hareketi, hücre adezyonu, immün sinapslar, makropinositoz, glukokortikoid reseptör olgunlaşmasını sağlar[66-69]. Nükleustaki varlığına göre histonları deasetilleyebilir [70]. Ubiquitin ile bağlanarak yanlış katlanan proteinlerin eliminasyonunu sağlar [66, 71].

Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACİ) farklı kanser türlerinde büyüme arresti ve apoptozu indükleyen ajanlardır [72]. Günümüzde FDA onaylı 4 adet HDACİ ilaç bulunmaktadır: vorinostat, romidepsin, belinostat, panobinostat. Vorinostat ve romidepsin; kutanöz T hücreli lenfoma, romidepsin ve belinostat periferik T hücreli lenfoma tedavisinde, panobinostat multiple myelom tedavisinde kullanılabilir [53]. Pan-HDAC inhibitörleri tüm HDAC subtiplerini inhibe ederler, tek bir HDAC'ye spesifik değildir; birden fazla HDAC'nin inhibisyonu komplike sonuçlar doğurabilir [2].

Malign melanom oluşumunda ve progresyonunda HDAC enzimlerinin rolü tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, HDACİ'nin etkilerine yönelik çok sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Melanomda HDAC inhibisyonu ile antijen ekspresyonun (PD-L1 ve PD-L2) ve immünojenitenin arttığı gösterilmiştir[73-76]. Pan-HDACİ (panobinostat, valproik asit, trichostatin A) ile tedavi edilen ve bir çalışmada HDAC6'nın farmakolojik olarak inhibe edildiği melanoma hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve G1 fazı hücre siklus arresti olduğu gözlenmiştir [64,76-78] (Şekil 2.4). BRAFV600E mutasyonu gösteren fakat BRAF inhibitör tedavisine dirençli hücre serilerinde, HDACİ eklenmesi ile nekroz ve apoptozun indüklendiği gösterilmiştir [79, 80].

Malign melanomda kombine tedavilerde HDAC inhibitörlerinin kullanıldığı klinik çalışmalar çeşitli faz aşamalarında devam etmektedir.



Şekil 2.4. HDAC inhibitörlerinin melanom hücrelerine etki mekanizmaları [63]

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Olgu Seçimi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2005-2018 yılları arasında incelenmiş olan primer ve metastatik melanom tanısı almış tüm olgular "Avicenna" hastane bilgi yönetimi sistemi patoloji kayıtlarından taranmıştır. Olguların arşivimizde bulunan tüm H-E boyalı lamaları tekrar gözden geçirilmiştir. Primer malign melanom grubu; nodüler melanom, 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom, 1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom, akrall lentijinöz melanom, lentigo maligna melanom ve özel tip melanomlar (spitzoid, nevoid, desmoplastik, iğsi hücreli) olarak 6 alt gruba ayrılmıştır. Metastatik melanom grubu ise deri metastazı, yumuşak doku metastazı, lenf nodu metastazı ve visseral metastaz olarak 4 alt gruba ayrılmıştır. Yapılacak immünohistokimyasal boyamalar için tespit ve takibi uygun, lezyonu en iyi temsil eden, pigment yoğunluğu nisbeten az olan lamalar seçilmiş ve bu lamaların arşivimizde bulunan parafin blokları çıkartılarak yeterli doku varlığı değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucu; 24'ü nodüler melanom, 12'si 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom, 12'si 1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom, 22'si akrall lentijinöz melanom, 22'si lentigo maligna melanom ve 18'i özel tip melanom (spitzoid, nevoid, desmoplastik, iğsi hücreli) olmak üzere 110 primer malign melanom olgusu ile 30'u deri metastazı, 30'u yumuşak doku metastazı, 30'u lenf nodu metastazı ve 10'u visseral metastaz olmak üzere 100 metastatik melanom olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Borderline (SAMPUS, biyolojik davranışı belirlenemeyen spitzoid lezyon) ve benign melanositik lezyonlar (dermal nevus, displastik nevus, konjeital nevus, spitz nevus, mavi nevus) için de hastane bilgi yönetimi sistemi patoloji kayıtlarından tarama yapılarak, immünohistokimyasal boyamalar için yeterli doku bulunan bloklar seçilmiştir. Buna göre; 5'i SAMPUS, 3'ü biyolojik davranışı belirlenemeyen spitzoid lezyon olmak üzere 8 borderline melanositik lezyon ile 22'si dermal nevus, 22'si displastik nevus, 22'si konjeital nevus, 22'si spitz nevus, 22'si mavi nevus olmak üzere 110 benign melanositik lezyon olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada toplam 328 melanositik lezyon olgusu incelenmiştir (Tablo 3.1).

Tüm olguların yaşı, cinsiyeti, lezyonun lokalizasyonu ile primer malign melanom olgularında histopatolojik prognostik parametreler (Breslow tümör kalınlığı, Clark invazyon seviyesi, mitoz varlığı ve sayısı, lenfovasküler invazyon varlığı, perinöral invazyon varlığı, regresyon varlığı, tümör yüzeyinde ülserasyon varlığı, tümör infiltre eden lenfositlerin varlığı ve yoğunluğu) değerlendirilmiştir. Displastik nevus olgularında mitoz varlığı ve sayısı ile hücrel atipi derecesi, Spitz nevus ve borderline olgularda mitoz varlığı ve sayısı değerlendirilmiştir. Displastik nevus olgularında, sitolojik atipi hafif (nükleolu olmayan ya da küçük nükleolu, boyutu yaklaşık keratinosit nükleusu ile eşit büyüklükte hafif pleomorfik ve hiperkromatik nükleus, dar veya bazen geniş kumsu pigmentli sitoplazmalı), orta (nükleolu olmayan ya da küçük nükleolu, boyutu keratinosit nükleusunun yaklaşık 1 veya 2 katı büyüklükte, orta derecede pleomorfik ve hiperkromatik veya veziküler nükleus, dar veya bazen geniş kumsu pigmentli sitoplazmalı), şiddetli (belirgin büyük nükleolu, boyutu keratinosit nükleusunun yaklaşık 2 katı veya daha fazla büyüklükte belirgin pleomorfik ve veziküler nükleus, sıklıkla geniş sitoplazmalı) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

Tablo 3.1. Tanı grupları ve olgu sayıları

TANI	OLGU SAYISI (n)
Benign melanositik lezyonlar	110
- Dermal nevus	22
- Displastik nevus	22
- Konjenital nevus	22
- Spitz nevus	22
- Mavi nevus	22
Borderline melanositik lezyonlar	8
- SAMPUS	5
- Biyolojik davranışı belirlenemeyen spitzoid lezyon	3
Primer malign melanom	110
- Nodüler melanom	24
- 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom	12
- 1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom	12
- Akral lentiginöz melanom	22
- Lentigo maligna melanoma	22
- Özel tip melanom	18
Metastatik melanom	100
- Deri metastazı	30
- Yumuşak doku metastazı	30
- Lenf nodu metastazı	30
- Visseral metastaz	10
TOPLAM	328

Çalışmamızda aynı hastaya ait farklı alt tanı gruplarına dağılmış lezyonlar bulunabilmektedir. Bu durum göz önüne alınarak; alt tip gözetmeksizin primer malign lezyonu ve metastatik lezyonu çalışma kapsamında olan olgular belirlenerek 24 olguluk bir grup oluşturulmuştur. Bu grupta aynı hastaya ait primer malign lezyonlar (nodüler, akral lentiginöz, yüzeysel yayımlı) ile metastatik lezyonlar (deri, yumuşak doku, lenf nodu) arasında HDAC6 H-skor, HDAC6 nükleer boyanma yüzdesi ve 5- hmC H-skor karşılaştırılmıştır.

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Olgulara ait seçilmiş parafin bloklardan elde edilen 4 mikrometre kalınlığında kesitlerde, anti-5- hmC ve anti-HDAC6 primer antikorları kullanılarak, Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle Ventana otomatik immünohistokimya boyama cihazında (BenchMark ULTRA, Ventana Medical Systems) boyamalar gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın direktiflerine uygun olarak; antijenik özelliklerin ortaya çıkartılmasında (retrieval) CC2 (Sitat, pH:6) solüsyonu (Ventana Medical Systems), zemin boyaması için Mayer hematoksilen, kromojen olarak ‘ultraView Red Detection Kit’ kullanılmıştır.

Her boyama seansında üretici firma tarafından önerilen pozitif kontrol dokusu olan testis dokusu da boyanmış, bunlar “pozitif kontrol” olarak değerlendirilmiştir. İmmünohistokimya değerlendirmeleri sırasında “iç-kontrol” negatifliği ya da yetersizliği, lezyonda dökülme, homojenizasyon sorunu saptanan olgularda boyamalar tekrarlanmıştır. Primer antikorlara ve immünohistokimyasal boyama yöntemine ilişkin bilgiler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan antikorlara ve boyama tekniğine ilişkin bilgiler

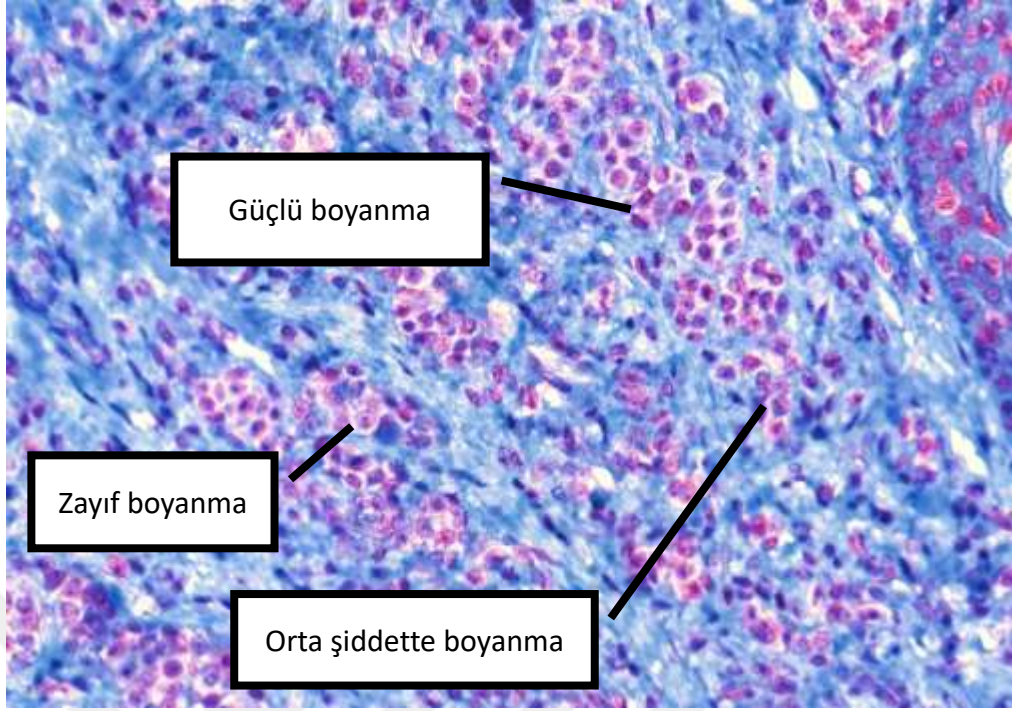
Antikor	Ticari İsim	Klon	Konsantrasyon	Tampon/Antijen Retrieval Süresi	Antikor İnkübasyon Süresi	Pozitif Kontrol Dokusu
5- hmC	Sigma-Aldrich	Poliklonal	1:200	Sitat/68 dakika	40 dakika	Testis
HDAC6	Sigma-Aldrich	Poliklonal	1:200	Sitat/68 dakika	40 dakika	Testis

HDAC6 antikoru ile tüm vakalar çalışılmıştır, fakat 5- cmC antikoru ile teknik nedenlerden dolayı 214 vaka (22 dermal nevus, 22 konjenital nevus, 22 displastik nevus, 24 nodüler melanom, 22 akral lentiginöz melanom, 12 1mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom, 30 deri metastazı, 30 yumuşak doku metastazı, 30 lenf nodu metastazı) çalışılabilmiştir.

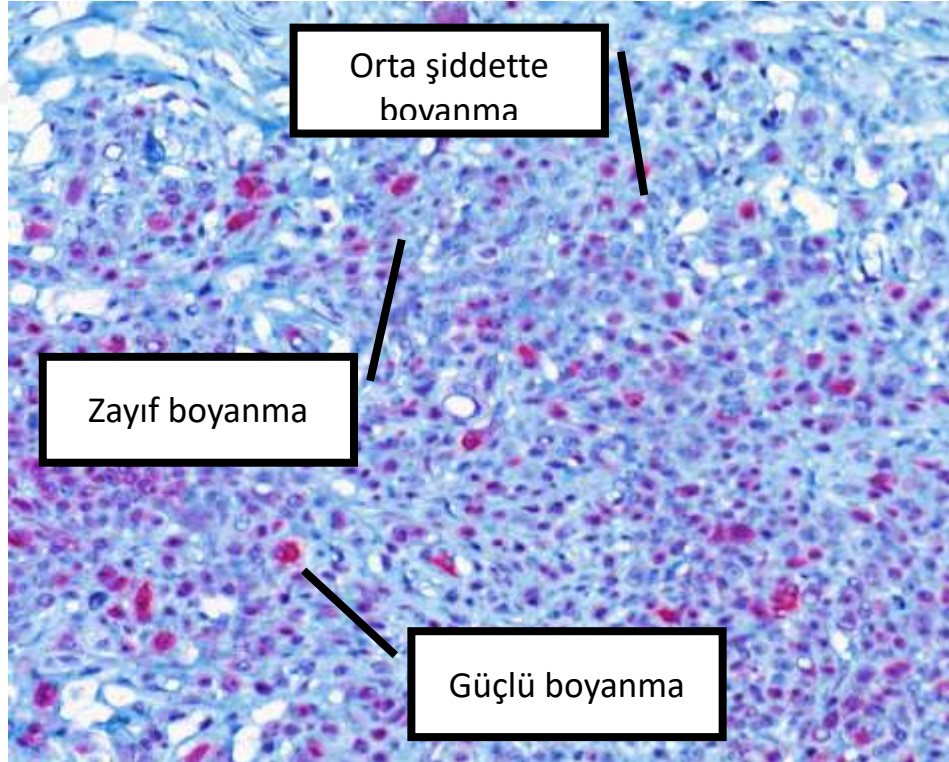
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal boyama yapılan tüm lamalar Ankara Üniversitesi BAP 14A0230003 nolu altyapı projesi kapsamında bölümümüze alınmış olan slayt tarayıcı (Pannoramic 250 Flash III, 3DHitech) ile taranmış ve değerlendirmeler CaseViewer programı kullanılarak dijital ortamda gerçekleştirilmiştir. Her iki antikor için de, boyanan kesitte bulunan lezyonun tamamındaki boyanma yaygınlığı ve şiddeti belirlenerek her bir olgu için H-skoru hesaplanmıştır. Boyanma yaygınlığı; hafif/orta/kuvvetli boyanan lezyonel hücrelerin tüm lezyonu oluşturan hücrelere oranına göre yüzdelik değerler şeklinde ifade edilmiştir. Boyanma şiddeti ise; negatif: 0, hafif şiddette: 1, orta şiddette: 2 ve kuvvetli: 3 olacak şekilde skorlanmıştır (Resim 3.1-2). H-skoru; her bir boyanma şiddeti için boyanma yaygınlığı yüzdesi ve boyanma şiddeti skorunun çarpılıp, tüm boyanma şiddetlerinin çarpımlarının toplanmasıyla elde edilmiştir ($H\text{-skoru} = \%negatif \times 0 + \%hafif \times 1 + \%orta \times 2 + \%kuvvetli \times 3$). Böylece her olgu için 0 ile 300 arasında H-skoru verilmiştir [41].

5- hmC antikoru için literatüre uygun şekilde nükleer boyanma gözlenmiş ve bu boyanma paterni spesifik kabul edilmiştir [3, 41, 43]. HDAC6 antikoru ise çoğu literatürde bahsi geçer şekilde sitoplazmik boyanmanın yanı sıra bizim olgularımızda nükleer boyanma da saptanmıştır. HDAC6; grup II histon deasetilazlar grubunda bulunmaktadır ve sitoplazma nükleus arasında geçiş gösterebilmektedir [51, 81]. Bu nedenle HDAC6 antikoru ile sitoplazmik ve nükleer boyanma ayrı ayrı değerlendirilmiş; literatürde daha çok kabul gören sitoplazmik boyanma için H-skoru verilmiş, nükleer boyanma için boyanma şiddetinden bağımsız olarak pozitif boyanan hücrelerin lezyonu oluşturan tüm hücrelere oranı yüzde olarak belirlenmiştir. Her iki antikor için de kesitlerde epidermis, deri eki hücrelerinin ve lenfositlerin de pozitif boyanma gösterdiği izlenmiş, bu hücreler pozitif iç kontrol olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.1. Nükleer 5-hmC boyanma şiddetinin değerlendirilmesi (5-hmCx400)



Resim 3.2. Sitoplazmik HDAC6 boyanma şiddetinin değerlendirilmesi (HDAC6x400)

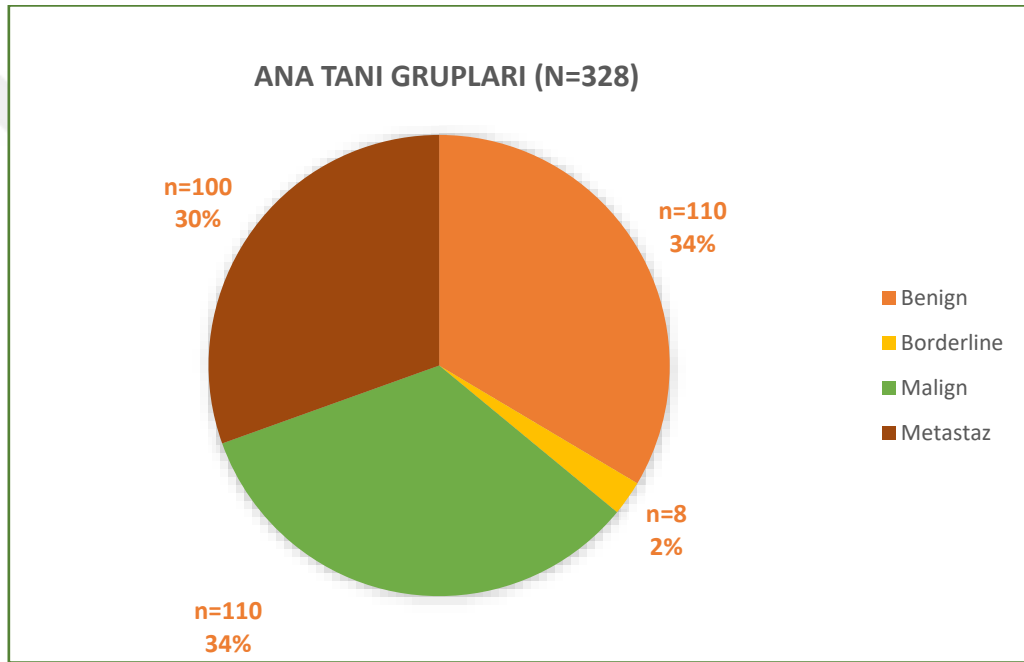
3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi “SPSS version 20” paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda, verilerin dağılımlarının normalitesini değerlendirmek için Shapiro Wilk testi kullanılmıştır. Buna göre normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama±standart sapma, normal dağılım göstermeyen değişkenler için ise ortanca (min-maks) değerleri tanımlayıcı olarak gösterilmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenlerde, karşılaştırılan grup sayısı 2 ise Student T test, grup sayısı 2’den fazla ise One Way ANOVA parametrik testleri kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde, karşılaştırılan grup sayısı 2 ise Mann Whitney U, grup sayısı 2’den fazla ise Kruskal Wallis nonparametrik testleri kullanılmıştır. Antikorlar için hesaplanan H skoru ile histopatolojik prognostik parametrelerinin korelasyonunu değerlendirmek için Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

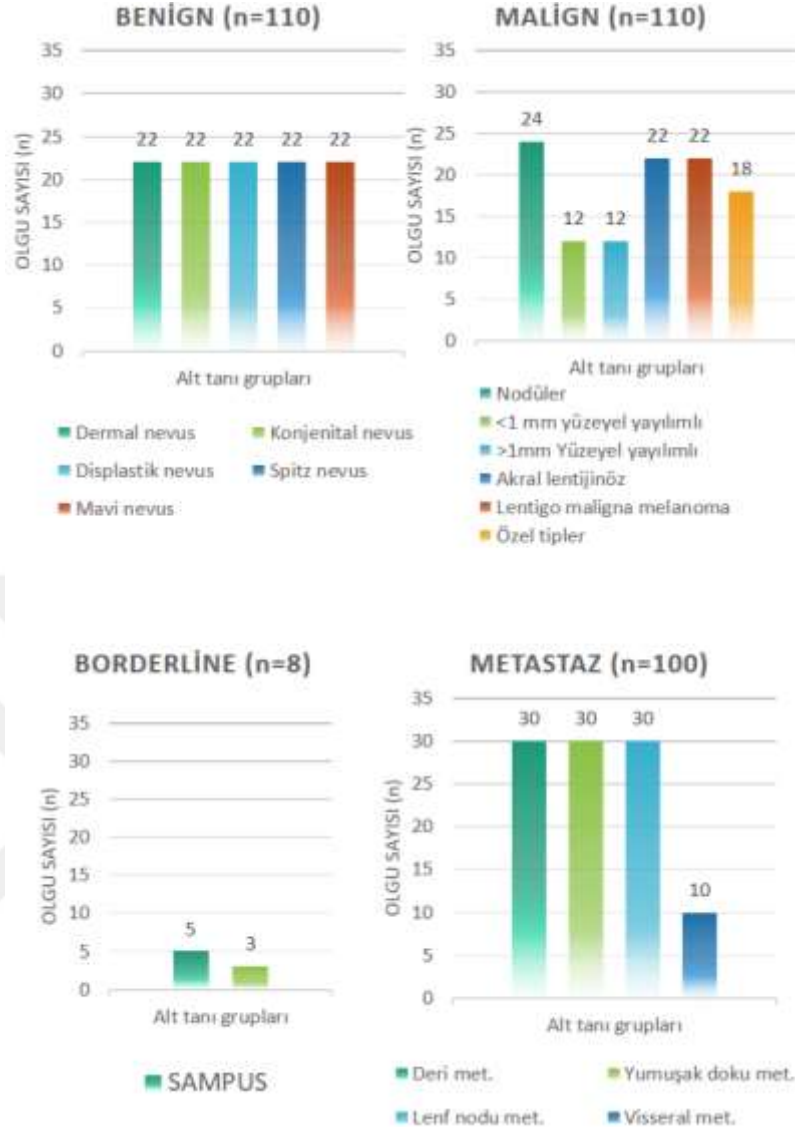
4.1. Olgulara Ait Tanımlayıcı Bulgular

Tüm olgular (n:328) 4 ana tanı grubuna ayrılmıştır: benign melanositik lezyonlar (n:110), borderline lezyonlar (n:8), malign melanositik lezyonlar (n:110) ve metastatik melanom (n:100). Olguların ana gruplarına göre dağılımı Şekil 4.1 gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Olguların ana tanı gruplarına göre dağılımı

Bu ana tanı grupları materyal-metod bölümünde bahsedildiği gibi alt tanı gruplarına ayrılmıştır. Alt tanı gruplarında bulunan olgu sayıları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Olguların alt tanı gruplarına göre dağılımı

4.1.1. Genel Bulgular

Tüm olguların yaş ortalaması 49.4 (min:6-mak:92) olarak bulunmuştur. Benign, borderline, malign ve metastaz ana tanı grupları yaş dağılımları açısından karşılaştırıldığında; benign ve borderline ana tanı gruplarındaki olgular ile malign ve metastaz ana tanı gruplarındaki olguların yaş dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmıştır (p:0.000). Benign ve borderline lezyonlara sahip olan olguların yaşları malign ve metastatik lezyonlara sahip hastalardan daha küçüktür. Benign ile borderline ana tanı grupları arasında ve malign ile metastaz ana tanı grupları arasında yaş dağılımları açısından fark saptanmamıştır (p:1.000).

Tüm olguların (n=328) %52.1'i kadın (n=171), %47.9'u erkek (n=157) cinsiyete sahiptir. Ana tanı gruplarındaki olguların cinsiyet dağılımları açısından fark saptanmamıştır (p:0.156).

Lezyonların lokalizasyon (baş-boyun, gövde, ekstremiteler) dağılımlarına bakıldığında; benign, malign ve metastaz (deri, yumuşak doku) ana tanı gruplarındaki lezyonların lokalizasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir (p<0.05). Benign lezyonlar sıklık sırasına göre gövde ve baş boyun yerleşimli, malign lezyonlar ekstremiteler yerleşimli, metastatik lezyonlar ekstremiteler ve gövde yerleşimli olarak izlenmiştir.

Ana tanı grupları yaş dağılımlarının ortanca, en küçük, en büyük, standart sapma değerleri, cinsiyet ve lokalizasyon dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Ana tanı gruplarına göre yaş, cinsiyet ve lokalizasyon dağılımı

TANI	ORTANCA YAŞ (MİN- MAKS)	CİNSİYET (n)		LOKALİZASYON (n)		
		KADIN	ERKEK	BAŞ- BOYUN	GÖVDE	EKSTREMİTE
Benign	31.50 (6-77) ±16.490	%58.2 (64)	%41.8 (46)	%31.8 (35)	%49.1 (54)	%19.1 (21)
Borderline	23.50 (7-34) ±8.288	%37.5 (3)	%62.5 (5)	%12.5 (1)	%50 (4)	%37.5 (3)
Malign	60 (21-92) ±17.327	%54.5 (60)	%45.5 (50)	%27.3 (30)	%23.6 (26)	%49.1 (54)
Metastaz	58.58 (27-92) ±15.412	%44 (44)	%56 (56)	%10 (6)	%40 (24)	%50 (30)

Benign ana tanı grubundaki alt tanı grupları (dermal, displastik, konjenital, Spitz, mavi nevus) yaş dağılımları açısından karşılaştırıldığında; Spitz nevus olgularının yaş dağılımlarının dermal, displastik ve mavi nevus olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır (p:0.001, 0.003, 0.000, sırasıyla). Spitz nevus grubu ile konjenital nevus grubu arasında yaş dağılımı açısından fark saptanmamıştır (p:0.222). Ayrıca konjenital nevus olgularının yaş dağılımlarının mavi nevus olgularına göre küçük olduğu gözlenmiştir (p:0.026). Diğer alt tanı grupları arasında fark saptanmamıştır (Tablo 4.2).

Alt tanı gruplarında lezyonların lokalizasyonlarının dağılımı incelendiğinde; literatüre uygun şekilde displastik ve konjenital nevusların çoğunlukla gövde, mavi nevusların ekstremiteler, lentigo maligna melanomların baş-boyun yerleşimli olduğu gözlenmiştir. Dermal nevusların çoğunlukla baş-boyun yerleşimli olması eksizyon tercihinin kozmetik nedenlerle olabileceğini düşündürmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Alt tanı gruplarında yaş, cinsiyet, lezyonların lokalizasyonu dağılımı

TANI	ORTANCA YAŞ (MİN- MAK) STD. SAPMA	CİNSİYET (n)		LOKALİZASYON (n)		
		KADIN	ERKEK	BAŞ- BOYUN	GÖVDE	EKSTREMİTE
Dermal nevus	40 (13-73) ±17.912	%59.1 (13)	%40.9 (9)	%90.9 (20)	%9.1 (2)	%0
Konjenital nevus	29 (8-61) ±14.786	%54.5 (12)	%45.5 (10)	%22.7 (5)	%77.3 (17)	%0
Displastik nevus	33.50 (21-66) ±10.998	%40.9 (9)	%59.1 (13)	%0	%100 (22)	%0
Spitz nevus	17 (6-65) ±13.154	%63.6 (14)	%36.4 (8)	%22.7 (5)	%40.9 (9)	%36.4 (8)
Mavi nevus	42.50 (17-77) ±14.835	%72.7 (16)	%27.3 (6)	%22.7 (5)	%18.2 (4)	%59.1 (13)
Nodüler melanom	62 (34-79) ±14.192	%54.2 (13)	%45.8 (11)	%29.2 (7)	%29.2 (7)	%41.7 (10)
<1 mm yüzeysel yayımlı melanom	57 (32-69) ±12.047	%75 (9)	%25 (3)	%0	%41.7 (5)	%58.3 (7)
>1 mm yüzeysel yayımlı melanom	58.5 (25-92) ±22.248	%33.3 (4)	%66.7 (8)	%16.7 (2)	%58.3 (7)	%25 (3)
Akral lentiginöz melanom	68 (32-92) ±15.045	%50 (11)	%50 (11)	%0	%0	%100 (22)
Lentigo maligna melanoma	66 (48-88) ±12.024	%54.5 (12)	%45.5 (10)	%81.8 (18)	%18.2 (4)	%0
Özel tipler	39 (21-88) ±19.379	%61.1 (11)	%38.9 (7)	%16.7 (3)	%16.7 (3)	%66.7 (12)
SAMPUS	20 (7-30) ±8.264	%60 (3)	%40 (2)	%20 (1)	%60 (3)	%20 (1)
Biy. Dav. Bel. A. Spitzoid L.	28 (25-34) ±4.582	%0	%100 (3)	%0	%33.3 (1)	%66.7 (2)
Deri met.	58.5 (32-92) ±16.227	%46.7 (14)	%53.3 (16)	%10 (3)	%26.7 (8)	%63.3 (19)
Yumuşak doku met.	61 (32-86) ±15.113	%40 (12)	%60 (18)	%10 (3)	%53.3 (16)	%36.7 (11)
Lenf nodu metastazı	57.7 (27-79) ±15.294	%43.3 (13)	%56.7 (17)	Bkz. Tablo 4.3		
Visseral metastaz	56.5 (39-77) ±14.430	%50 (5)	%50 (5)	Bkz. Tablo 4.4		

Lenf nodu metastazı grubundaki dağılım incelendiğinde olguların çoğunlukla (%56.6) inguinal lenf nodu metastazı olduğu izlenmiştir (Tablo 4.3).

Visseral metastaz grubunda ise olguların çoğunlukla (%60) akciğer metastazı olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Lenf nodu metastazı grubunun tutulan anatomik bölgeye göre dağılımı

LENF NODU METASTAZI	
Anatomik Bölge	% (n)
Servikal LN	%16.7 (5)
Aksiller LN	%6.7 (2)
İliak LN	%13.3 (4)
İnguinal LN	%56.7 (17)
Femoral LN	%3.3 (1)
İntraabdominal LN	%3.3 (1)

Tablo 4.4. Visseral metastaz grubunun tutulan organa göre dağılımı

VİSSERAL METASTAZ	
Organ	% (n)
Akciğer	%60 (6)
Beyin	%10 (1)
Over	%20 (2)
Tükrük bezi	%10 (1)

4.1.2. Histopatolojik Prognostik Parametreler

Malign, benign ve borderline ana tanı gruplarında histopatolojik prognostik parametreler incelenmiştir.

Malign ana tanı grubunda; Breslow tümör kalınlığı, Clark invazyon seviyesi, 1 mm²'deki mitoz varlığı ve sayısı, lenfovasküler invazyon varlığı, perinöral invazyon varlığı, regresyon varlığı, ülserasyon varlığı ile tümör infiltrate eden lenfosit varlığı ve yoğunluğu histopatolojik prognostik parametreler olarak incelenmiştir.

Nodüler melanom, yüzeysel yayımlı melanom, akral lentiginöz melanom, lentigo maligna melanom ve özel tip melanomlar Breslow tümör kalınlığı açısından

karşılaştırıldığında; nodüler melanom ile yüzeysel yayımlı melanom (p:0.001) ve lentigo maligna melanom (p:0.000) arasında, akral lentiginöz melanom ile lentigo maligna melanom (p:0.001) arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Nodüler melanom, yüzeysel yayımlı melanom ve lentigo maligna melanoma göre daha kalın olma eğilimindedir. Aynı şekilde akral lentiginöz melanom, lentigo maligna melanomlardan daha fazla Breslow kalınlığına sahiptir. Alt tanı gruplarına göre Breslow kalınlığı ortanca ve standart sapma değerleri Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Malign alt tanı grupları Breslow kalınlığı

TANI	Breslow kalınlığı ortanca değerleri (mm)	Standart sapma
Nodüler melanom	3.337	20.204
Yüzeysel yayımlı melanom	1.005	2.361
Akral lentiginöz melanom	2.75	4.321
Lentigo maligna melanom	0.46	3.032
Özel tip melanom	1.65	2.024

Alt tanı grupları 1 mm²’deki mitoz sayılarına göre karşılaştırıldığında; nodüler melanom ile yüzeysel yayımlı melanom (p: 0.001), lentigo maligna melanom (p:0.000) ve özel tip melanomlar (p:0.041) arasında anlamlı düzeyde fark olduğu saptanmıştır. Nodüler melanom söz konusu 3 tanı grubundan daha fazla mitoz bulundurmaktadır. Diğer alt tanı grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Malign alt tanı gruplarında mitoz sayısı

TANI	1 mm ² ’deki mitoz sayısı ortanca değeri	Standart sapma
Nodüler melanom	11 (1-35)	8.141
Yüzeysel yayımlı melanom	2 (1-20)	5.281
Akral lentiginöz melanom	5 (0-23)	6.020
Lentigo maligna melanom	1 (0-12)	3.019
Özel tip melanom	3 (1-15)	4.113

Breslow kalınlığı ile mitoz sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde pozitif korelasyon mevcuttur (p:0.000, r:0.741). Breslow kalınlığı arttıkça mitoz sayısının da arttığı saptanmıştır.

Ayrıca displastik nevus, spitz nevus, SAMPUS ve biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid lezyon olgularında tüm lezyonda mitoz varlığı ve sayısı değerlendirilmiştir. Buna göre ortalama mitoz sayısı; displastik nevus olgularında 0.23 (ss:0.685), Spitz nevus olgularında 0.86 (ss:1.356), SAMPUS olgularında 0.40 (ss:0.548) ve biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik Spitzoid lezyon olgularında 2.33 (ss:2.082) olarak bulunmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Primer malign melanom dışındaki olgularda ortalama mitoz sayıları

TANI	TÜM LEZYONDAKİ MİTOZ SAYISI	STANDART SAPMA
Spitz nevus	0.86	1.356
Displastik nevus	0.23	0.685
SAMPUS	0.40	0.548
Biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid tümör	2.33	2.082

Displastik nevus olgularındaki atipi derecesi hafif/orta/şiddetli olarak sınıflandırılıp mitoz varlığı ile korelasyon analizi yapıldığında; atipi derecesi ile mitoz arasında orta düzeyde pozitif korelasyon bulunduğu saptanmıştır (p:0.019, r:0.497). Hafif ve orta şiddette atipi bulunduran displastik nevuslarda mitoz izlenmemekle birlikte; şiddetli atipi bulunduran 3 olguda mitoz saptanmıştır. Buna göre; atipi arttıkça lezyondaki mitoz varlığı ve sayısının arttığı saptanmıştır.

Malign ana tanı grubundaki olguların sıklık sırasına göre Clark III (%30.9, n:34), Clark II (%27.3, n:30), Clark IV (%24.5, n:27), Clark V (%16.4, n:18) ve Clark I (%0.9, n:1) invazyon seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir. Alt tanı gruplarına göre ayrıntılı Clark invazyon seviyeleri Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Alt tanı gruplarına göre Clark invazyon seviyesi dağılımı

TANI	CLARK İNVAZYON SEVİYESİ % (n)				
	I	II	III	IV	V
Nodüler melanom	%0	%4.2 (1)	%20.8 (5)	%50 (12)	%25 (6)
<1 mm yüzeysel yayımlı melanom	%0	%50 (6)	%50 (6)	%0	%0
>1 mm yüzeysel yayımlı melanom	%0	%0	%58.3 (7)	%25 (3)	%16.7 (2)
Akral lentijinöz melanom	%0	%13.6 (3)	%31.8 (7)	%22.7 (5)	%31.8 (7)
Lentigo maligna melanoma	%4.5 (1)	%63.6 (14)	%18.2 (4)	%9.1 (2)	%4.5 (1)
Özel tipler	%0	%33.3 (6)	%27.8 (5)	%27.8 (5)	%11.1 (2)

Tüm primer malign lezyonların %8.2'sinde (n:9) lenfovasküler invazyon, %6.4'ünde (n:7) perinöral invazyon, %30'unda (n:33) ülserasyon, %5.5'inde (n:6) regresyon varlığı izlenmiştir. Lenfovasküler invazyon, nodüler melanom (%20.8) ve akral lentijinöz melanom (%13.6) olgularında daha fazla izlenirken; tüm alt tanı gruplarında oldukça az olguda perinöral invazyon izlenmiştir. Ülserasyon, en fazla nodüler melanom (%58.3) ve akral lentijinöz melanom (%36.4) olgularında olmak üzere tüm tanı gruplarında mevcuttur. Regresyonun en fazla bulunduğu grup yüzeysel yayımlı melanom (%16.7) olgularıdır. Bu parametrelerin alt tanı gruplarına göre dağılımı Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Alt tanı gruplarına göre lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, ülserasyon ve regresyon dağılımı

TANI	Lenfovasküler invazyon %(n)	Perinöral invazyon %(n)	Ülserasyon %(n)	Regresyon %(n)
Nodüler melanom	%20.8 (5)	%4.2 (1)	%58.3 (14)	%0
Yüzeysel yayımlı melanom	%4.2 (1)	%4.2 (1)	%16.7 (4)	%16.7 (4)
Akral lentijinöz melanom	%13.6 (3)	%9.1 (2)	%36.4 (8)	%4.5 (1)
Lentigo maligna melanoma	%0	%4.5 (1)	%18.2 (4)	%4.5 (1)
Özel tipler	%0	%11.1 (2)	%16.7 (3)	%0

Tümör infiltre eden lenfositler yok, yoğun olmayan ve yoğun şeklinde sınıflandırılmıştır. Buna göre tüm malign lezyonların %36.4'ünde (n:40) tümör infiltre eden lenfositler gözlenmezken, %45.5'inde (n:50) yoğun olmayan ve %18.2'sinde (n:20) yoğun şekilde tümör infiltre eden lenfositlerin bulunduğu izlenmiştir. Tanı grupları arasında tümör infiltre eden lenfosit varlığı ve yoğunluğu açısından anlamlı fark saptanmamıştır (p:0.104). Alt tanı gruplarına göre tümör infiltre eden lenfositlerin varlığı Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Lenfovasküler invazyon ile perinöral invazyon arasında ve regresyon ile tümör infiltre eden lenfositler arasında korelasyon saptanmamıştır (p>0.05).

Tablo 4.10. Alt tanı gruplarına göre tümör infiltre eden lenfositlerin varlık durumu

TANI	TÜMÖR İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLER %(n)		
	Yok	Yoğun olmayan	Yoğun
Nodüler melanom	%33.3 (8)	%54.2 (13)	%12.5 (3)
Yüzeyel yayımlı melanom	%25 (6)	%45.8 (11)	%29.2 (7)
Akral lentijinöz melanom	%59.1 (13)	%36.4 (8)	%4.5 (1)
Lentigo maligna melanoma	%45.5 (10)	%36.4 (8)	%18.2 (4)
Özel tipler	%16.7 (3)	%55.6 (10)	%27.8 (5)

Yüzeyel yayımlı melanom olguları 1 mm'den kalın ve ince olarak sınıflandırılıp histopatolojik prognostik parametreler açısından karşılaştırıldığında; mitoz sayısının 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom olgularında, 1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom olgularına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (p:0.01). 1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom olgularında lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve ülserasyon bulunmadığı, 3 olguda regresyon bulunduğu izlenmiştir. 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom olgularında ise 1 olguda lenfovasküler invazyon, 1 olguda perinöral invazyon, 4 olguda ülserasyon, 1 olguda regresyon izlenmiştir. Bu parametreler açısından pozitif olgu sayısı oldukça az olduğu için istatistiksel karşılaştırma yapılamamıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. 1 mm'den ince ve kalın yüzeyel yayımlı melanomlarda histopatolojik prognostik parametreler

TANI	Mitoz sayısı ortanca değeri (min-maks)	Standart sapma	LVİ % (n)	PNİ % (n)	Ülserasyon % (n)	Regresyon % (n)
1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom	5.50 (1-20)	6.257	%8.3 (1)	%8.3 (1)	%33.3 (4)	%8.3 (1)
1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom	1.00 (1-6)	1.782	%0	%0	%0	%25 (3)

1 mm'den ince ve kalın yüzeyel yayımlı melanom olguları tümör infiltre eden lenfosit varlığı ve yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. 1 mm'den ince ve kalın yüzeyel yayımlı melanomlarda tümör infiltre eden lenfosit varlığı ve yoğunluğu

TANI	TÜMÖR İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLER %(n)		
	Yok	Yoğun olmayan	Yoğun
1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom	%8.3 (1)	%50 (6)	%41.7 (5)
1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom	%41.7 (5)	%41.7 (5)	%16.7 (2)

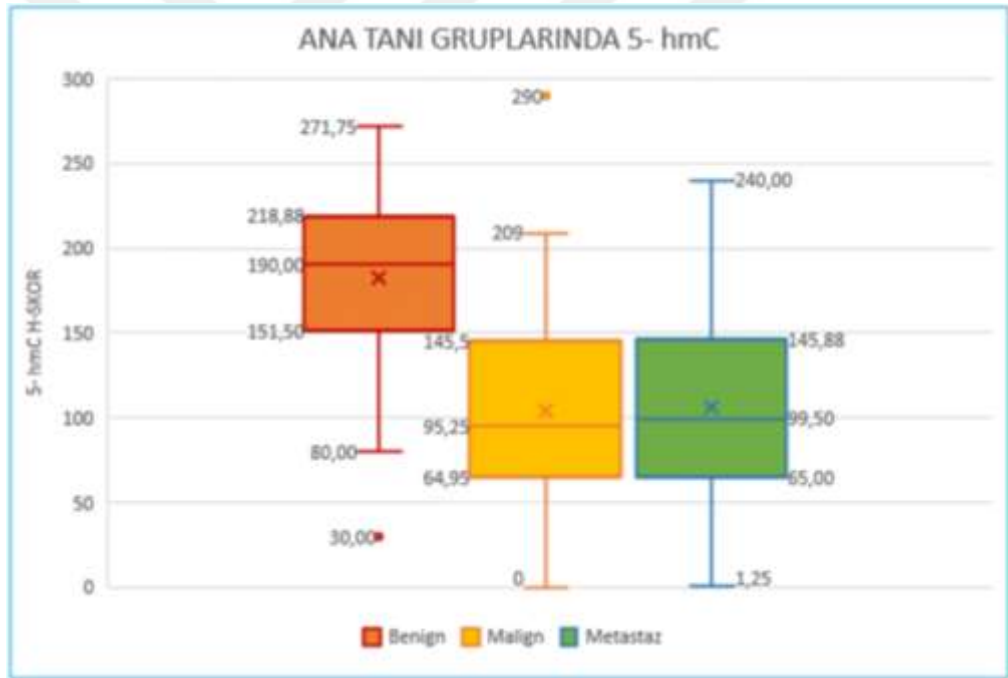
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

HDAC6 antikoru ile tüm vakalarda immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. 5- hmC antikoru ile teknik nedenlerden dolayı 214 vaka (22 dermal nevus, 22 konjenital nevus, 22 displastik nevus, 24 nodüler melanom, 22 akral lentijinöz melanom, 12 1mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom, 30 deri metastazı, 30 yumuşak doku metastazı, 30 lenf nodu metastazı) çalışılabilmiştir.

4.2.1. 5- hmC ekspresyonu

5- hmC antikoru ile çalışılan tüm olguların (n:214) H-skoru ortalama değeri 129.104 (ss:64.906) bulunmuştur.

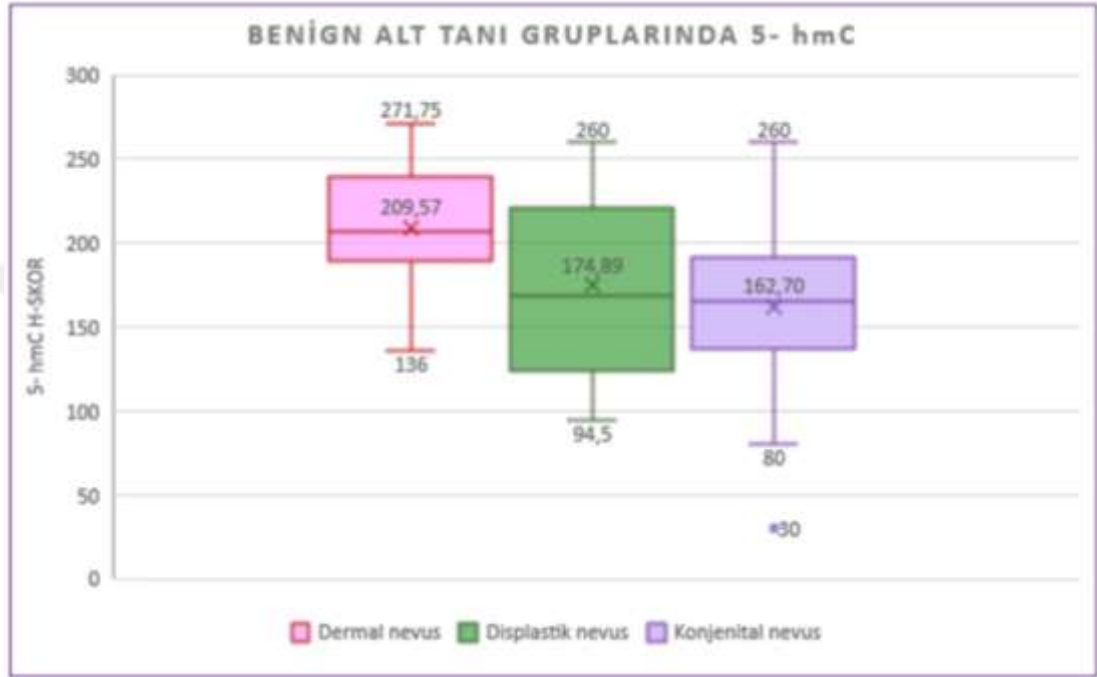
Ana tanı gruplarında en yüksek, en düşük ve ortanca 5- hmC H-skor değerleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Benign, malign ve metastaz ana tanı gruplarının H-skorları birbirleri ile karşılaştırıldığında; benign ana tanı grubu H-skorunun, malign ve metastaz ana tanı gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır (p:0.000). 5- cmC ekspresyonu malign ve metastaz olgularında azalmaktadır. Malign ve metastaz grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p:1.000).



Şekil 4.3. Benign, malign ve metastaz ana tanı gruplarında 5- hmC H-skor karşılaştırması

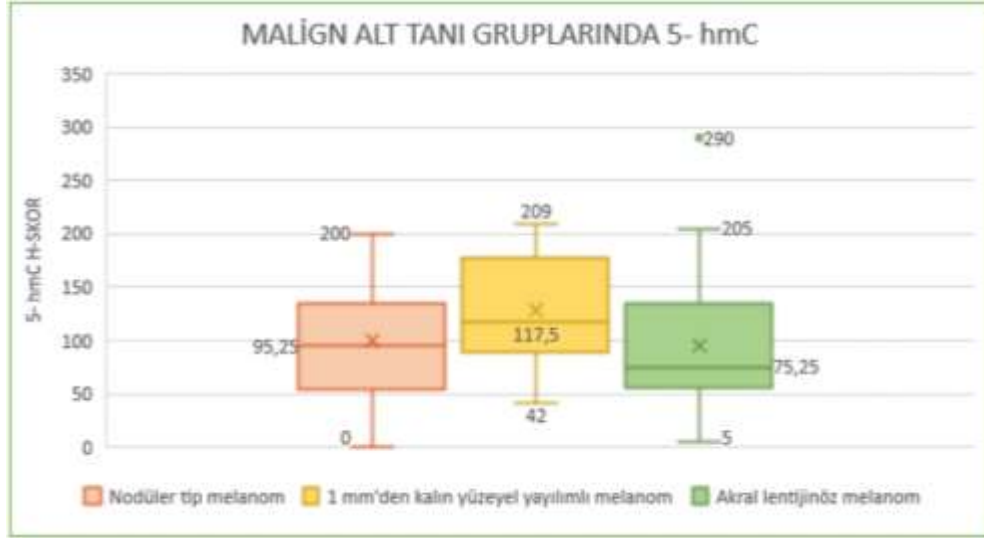
Benign ana tanı grubunun alt tanı gruplarında en yüksek, en düşük ve ortalama 5- hmC H-skor değerleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Benign ana tanı grubundaki alt tanı grupları (dermal nevus, displastik nevus, konjenital nevus) birbirleri ile karşılaştırıldığında dermal nevus olguları ile displastik nevus ve

konjenital nevus olguları arasında anlamlı düzeyde fark bulunduğu saptanmıştır (p:0.043, p:0.004, sırasıyla). Dermal nevuslarda 5- hmC ekspresyonu displastik nevus ve konjenital nevuslara göre anlamlı olarak daha yüksektir. Displastik nevus ve konjenital nevus olguları arasında fark saptanmamıştır (p:0.665).



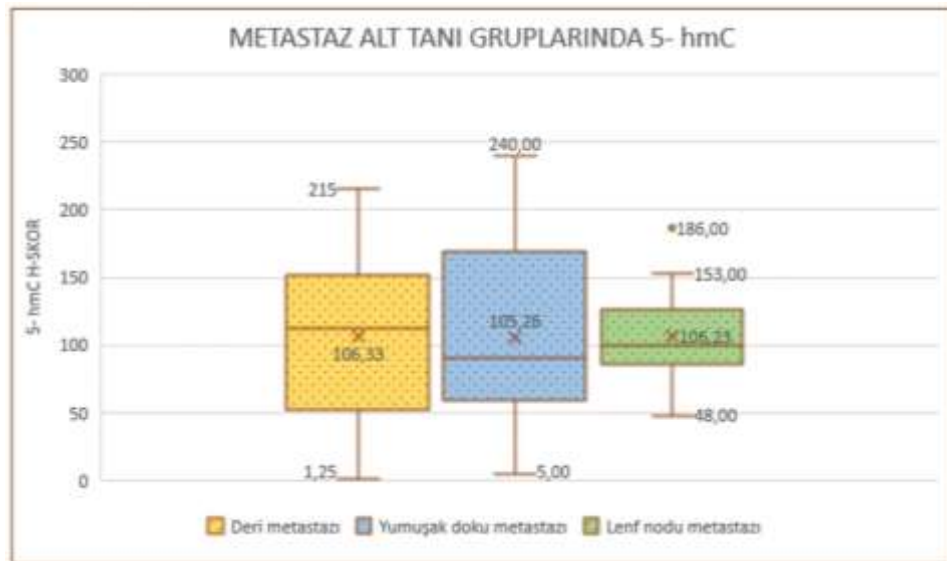
Şekil 4.4. Dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevuslarda 5- hmC H-skor karşılaştırması

Malign ana tanı grubunun alt tanı gruplarında en yüksek, en düşük ve ortanca 5- hmC H-skor değerleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Malign ana tanı grubundaki alt tanı grupları (nodüler tip melanom, 1 mm'den kalın yüzeysel yayımlı melanom, akrallentiginöz melanom) birbirleri ile karşılaştırıldığında 5- hmC ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p:0.144).



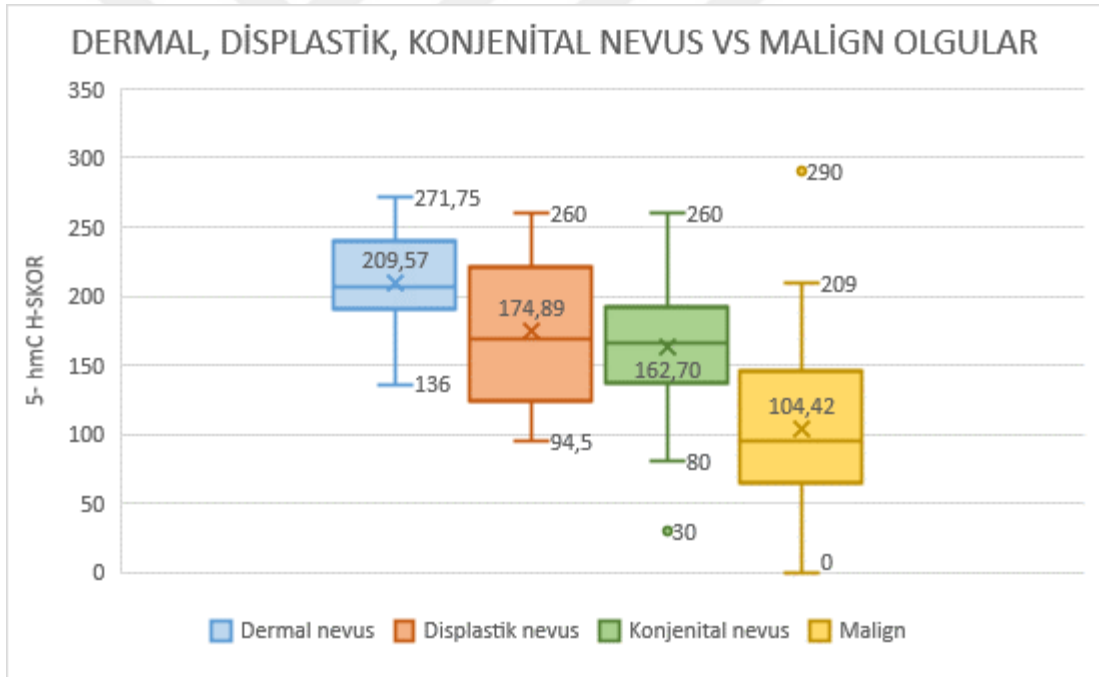
Şekil 4.5. Nodüler tip melanom, 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom ve akral lentiginöz melanomda 5- hmC H-skor karşılaştırması

Deri, yumuşak doku ve lenf nodu metastazı gruplarında en yüksek, en düşük ve ortalama H-skor değerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Metastaz ana tanı grubunda bulunan deri, yumuşak doku ve lenf nodu metastazı alt tanı grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında; 5- hmC H-skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı olabilecek bir fark saptanmamıştır (p:0.996).



Şekil 4.6. Deri, yumuşak doku ve lenf nodu metastazı alt tanı gruplarında 5- hmC H-skor karşılaştırması

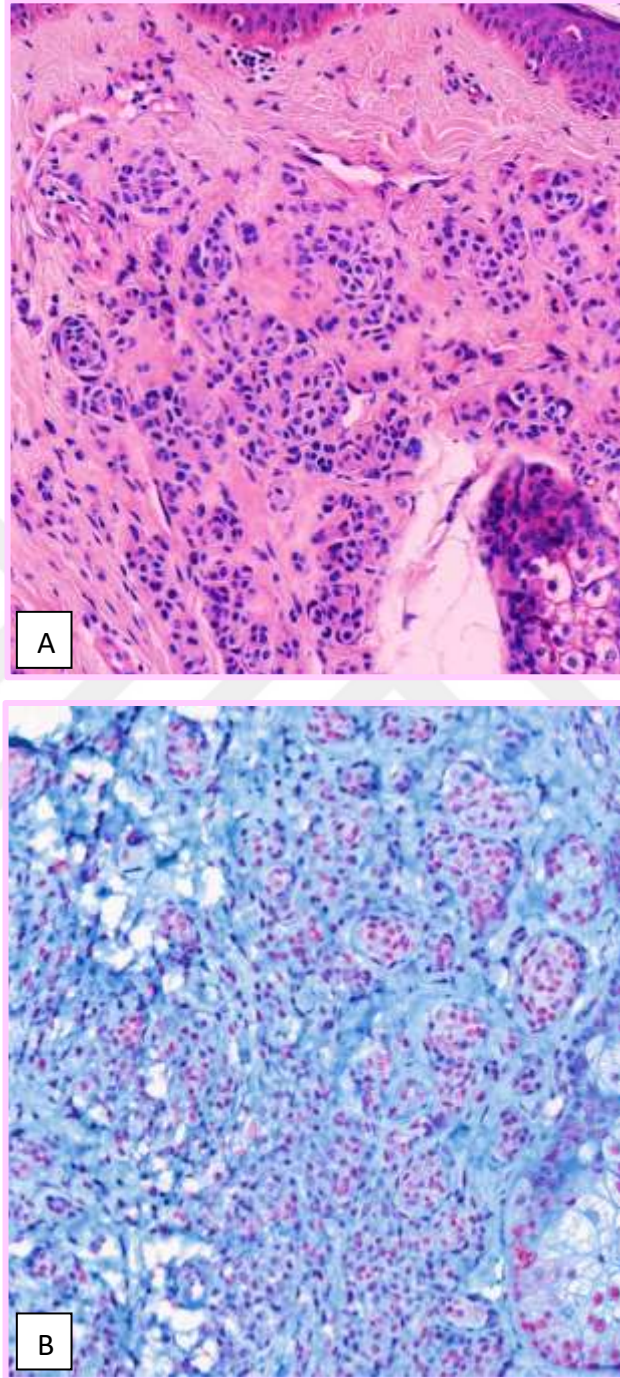
Benign ana tanı grubunda olan dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevus olguları; 5- hmC ekspresyonu açısından malign ana tanı grubu olguları ile ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Buna göre; bu 3 benign alt tanı grubu olguları, malign olgulardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek 5- hmC H-skoru bulundurmaktadır ($p<0.00001$, $p<0.00001$, $p:0.0001$, sırasıyla). Ayrıca dermal nevus-displastik nevus-malign melanom sekansında malign fenotipe doğru gidildikçe 5- hmC ekspresyonunun progresif bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Displastik nevuslarda atipi derecesi hafif/orta/şiddetli olarak sınıflandırılmış, 5- hmC ile atipi derecesi arasında korelasyon saptanmamıştır ($p:0.577$). Dermal nevus, displastik nevus, konjenital nevus ve malign olguların en düşük, en yüksek, ortalama 5- hmC H-skor değerleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



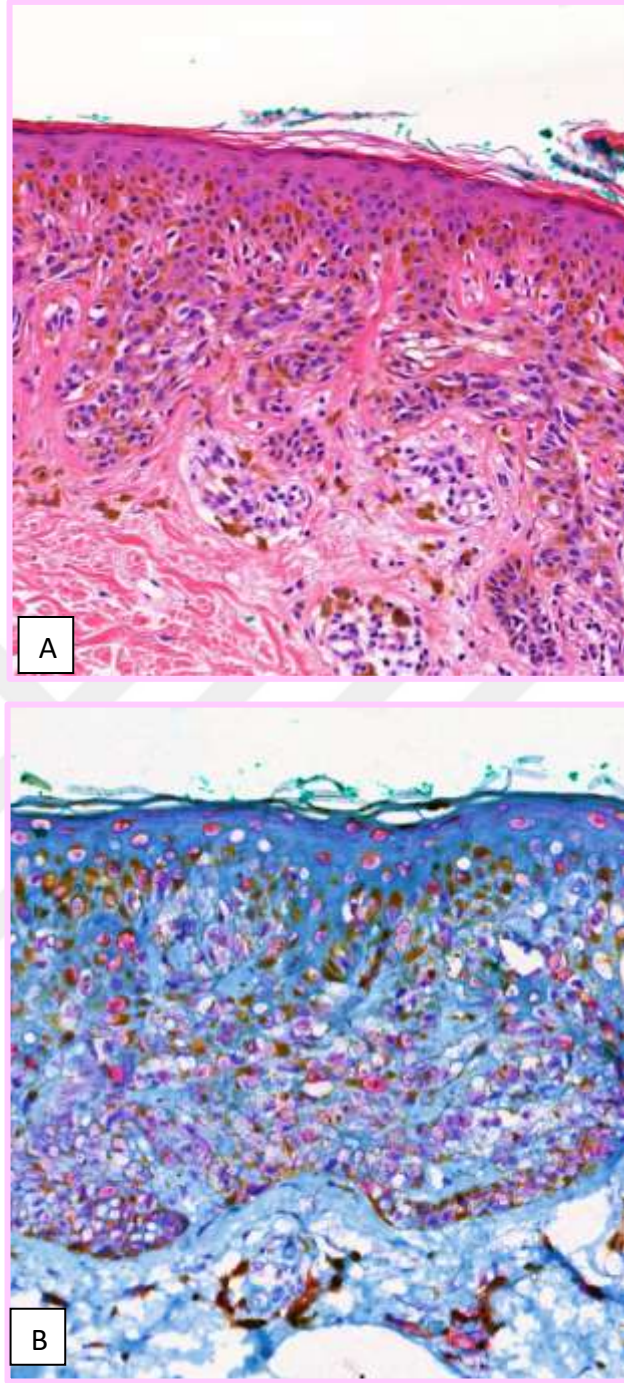
Şekil 4.7. Dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevusun 5-hmC H-skorlarının tüm primer malign olgularla karşılaştırması

Ayrıca alt tanı tipinden bağımsız olarak primer malign ve metastatik lezyonun aynı hastaya ait olduğu 24 olguluk farklı bir grup tanımlanmıştır. Bu olgularda primer malign-metastaz grupları arasında anlamlı 5- hmC ekspresyon farkı izlenmemiştir ($p:0.351$).

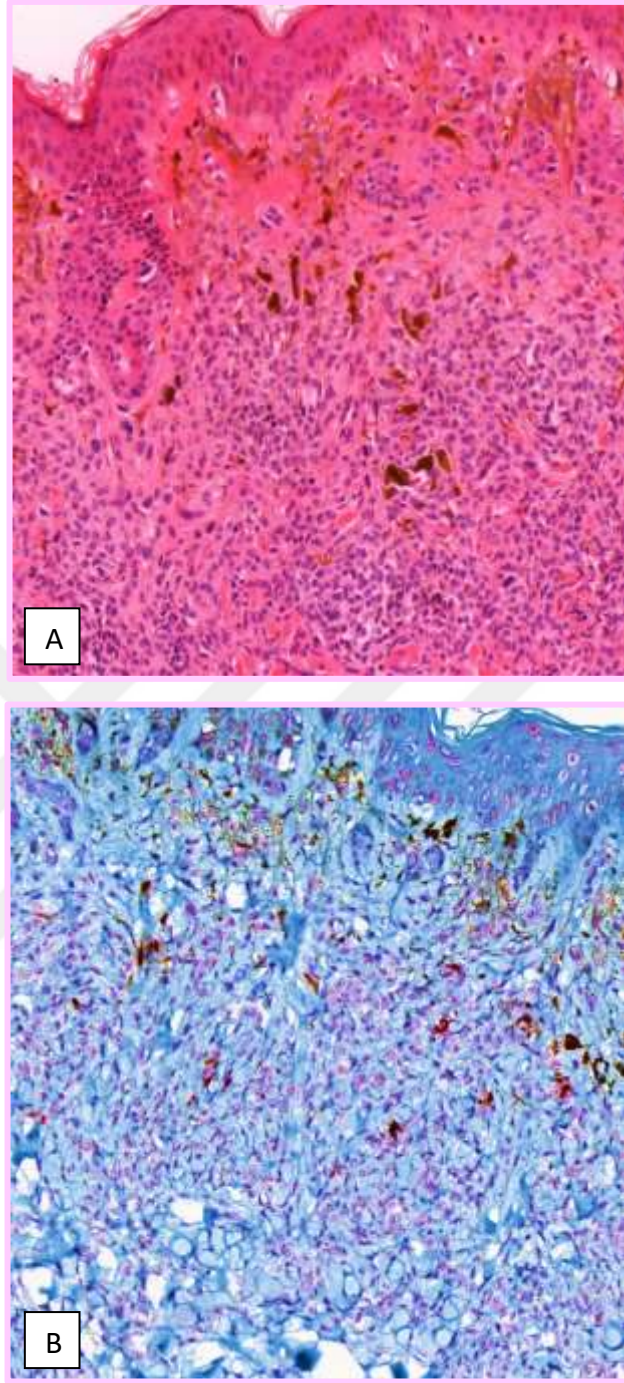
Histomorfolojik özellikleri ve 5- hmC immünohistokimyasal boyaları ile farklı tanı gruplarından olgu örnekleri aşağıda sunulmaktadır (Resim 4.1-6).



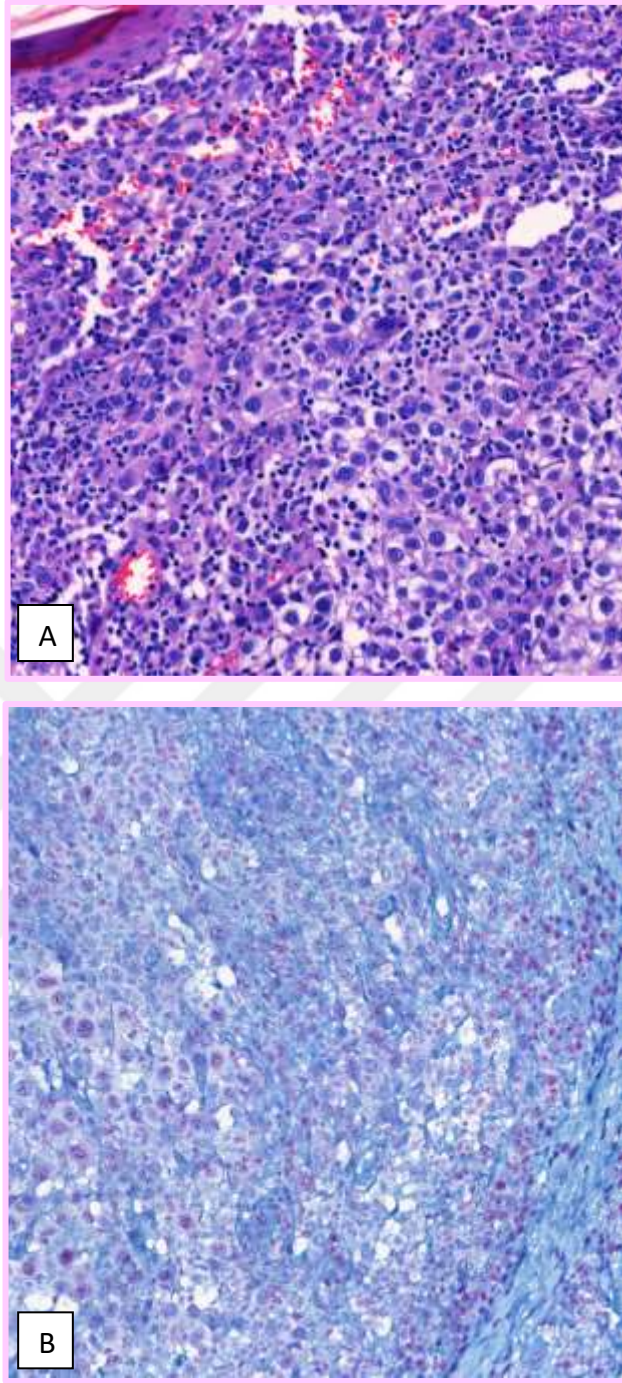
Resim 4.1. A-B. Dermal nevus olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu (%95 pozitiflik, %60 güçlü, %20 orta, %20 zayıf, H-skor:228) (H-Ex200, 5-hmCx200)



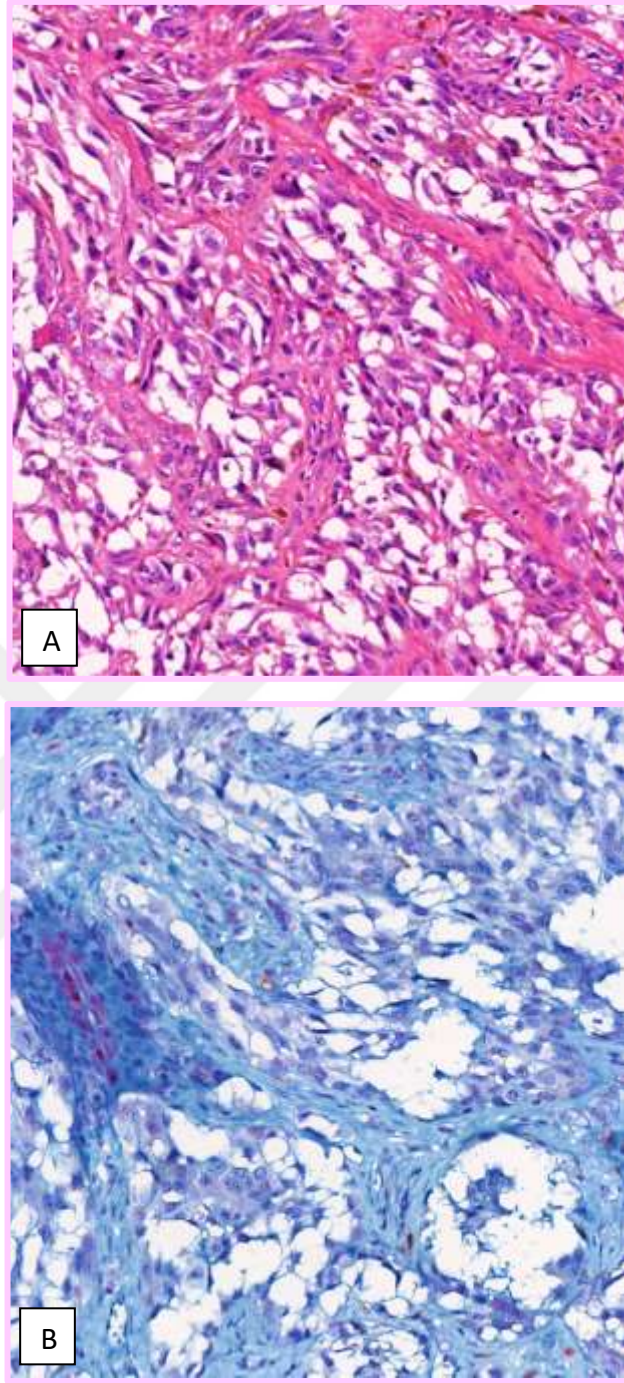
Resim 4.2. A-B. Displastik nevus olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu (%100 pozitiflik, %90 zayıf, %5 orta, %5 güçlü, H-skor:115) (H-Ex200, 5-hmCx300)



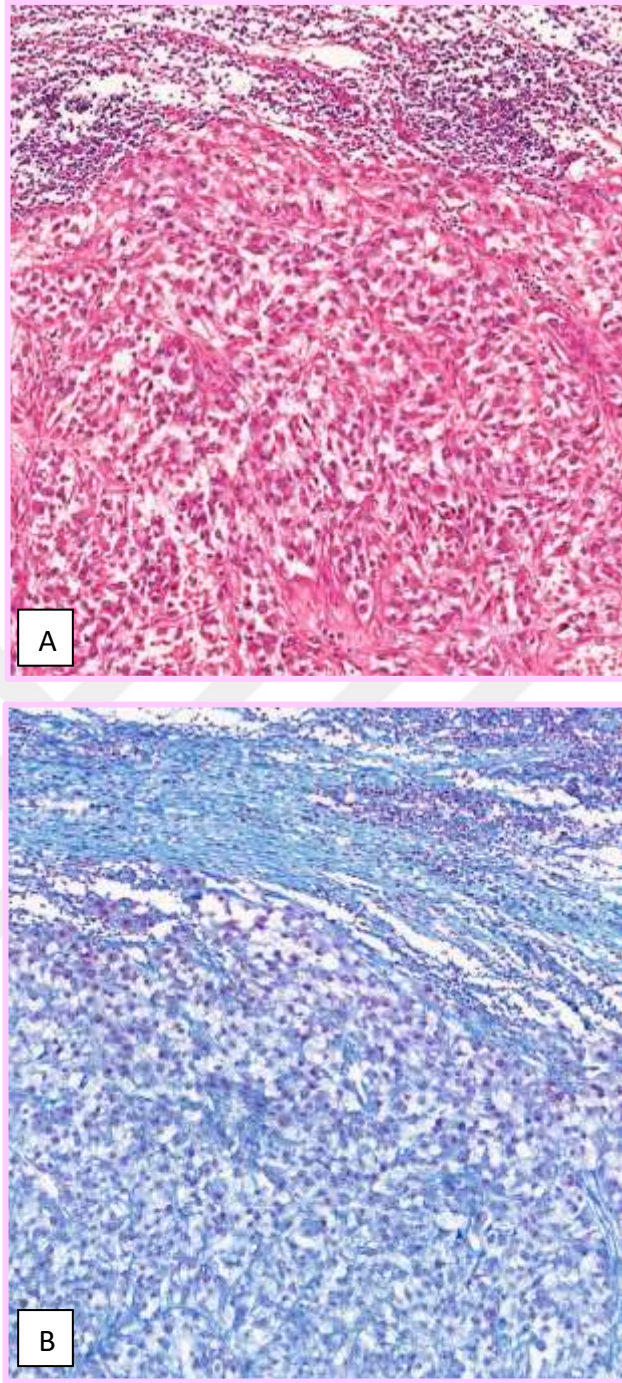
Resim 4.3. A-B. Konjenital nevus olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu (%100 pozitiflik, %65 zayıf, %30 orta, %5 güçlü, H-skor:140) (H-Ex200, 5-hmCx200)



Resim 4.4. A-B. Nodüler melanom olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu (%30 pozitiflik, %85 zayıf, %10 orta, %5 güçlü, H-skor:36) (H-Ex200, 5-hmCx200)



Resim 4.5. A-B. Akral lentiginöz melanom olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu (%50 pozitiflik, %100 zayıf, H-skor:50) (H-Ex200, 5-hmCx200)

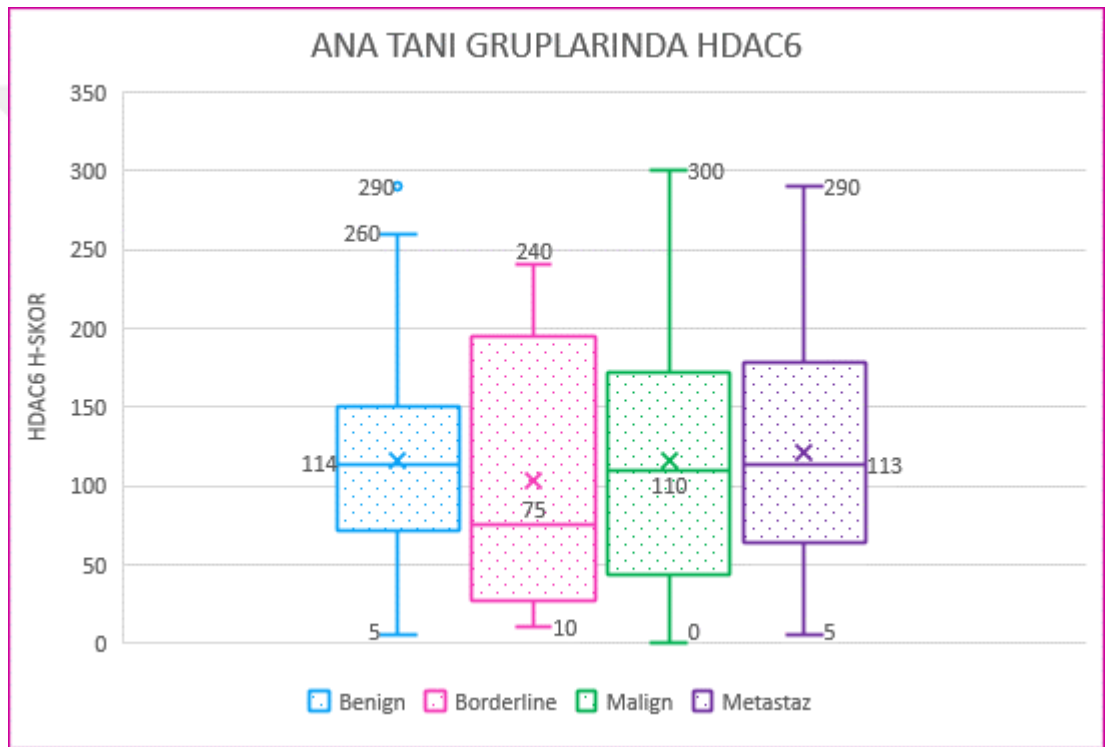


Resim 4.6. A-B. Lenf nodu metastazı olgusunun H-E kesiti ve 5- hmC ekspresyonu (%40 pozitiflik, %85 zayıf, %10 orta, %5 güçlü, H-skor:48) (H-Ex100, 5-hmCx100)

4.2.2. HDAC6 Ekspresyonu

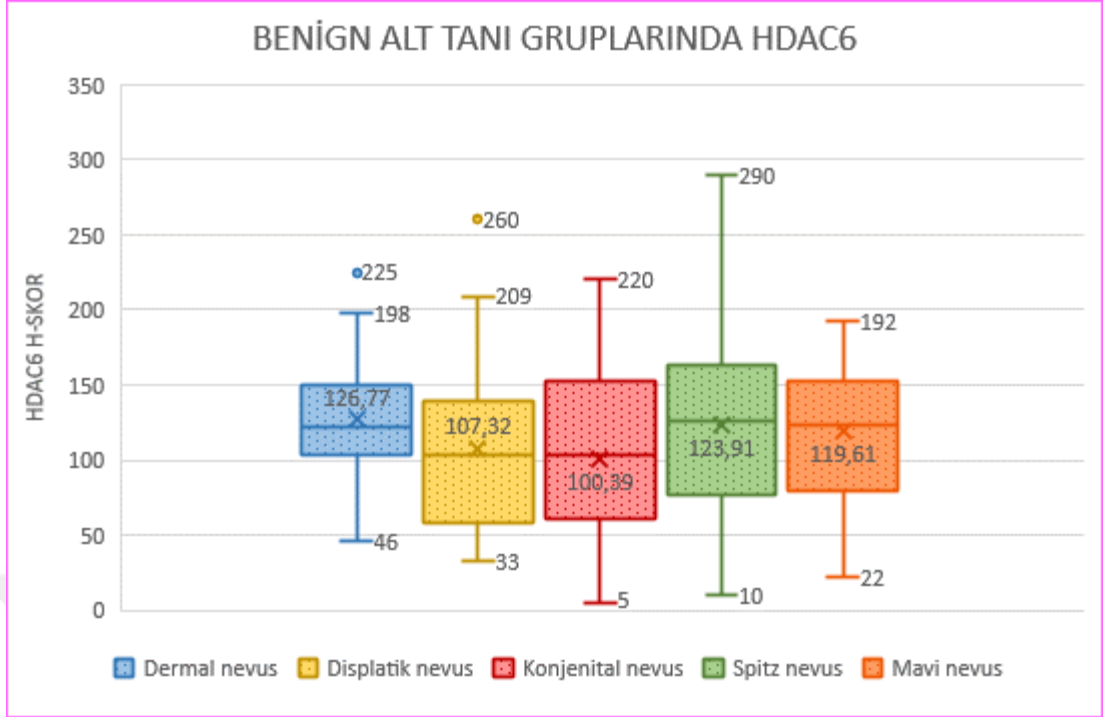
HDAC6 ile çalışılan tüm olguların (n:328); sitoplazmik boyanmaları değerlendirildiğinde ortalama H-skoru 117.019 (ss:69,600) bulunmuştur.

Ana tanı gruplarına ait en yüksek, en düşük ve ortanca H-skoru değerleri Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Benign, borderline, malign ve metastaz ana tanı grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır (p:0.801).



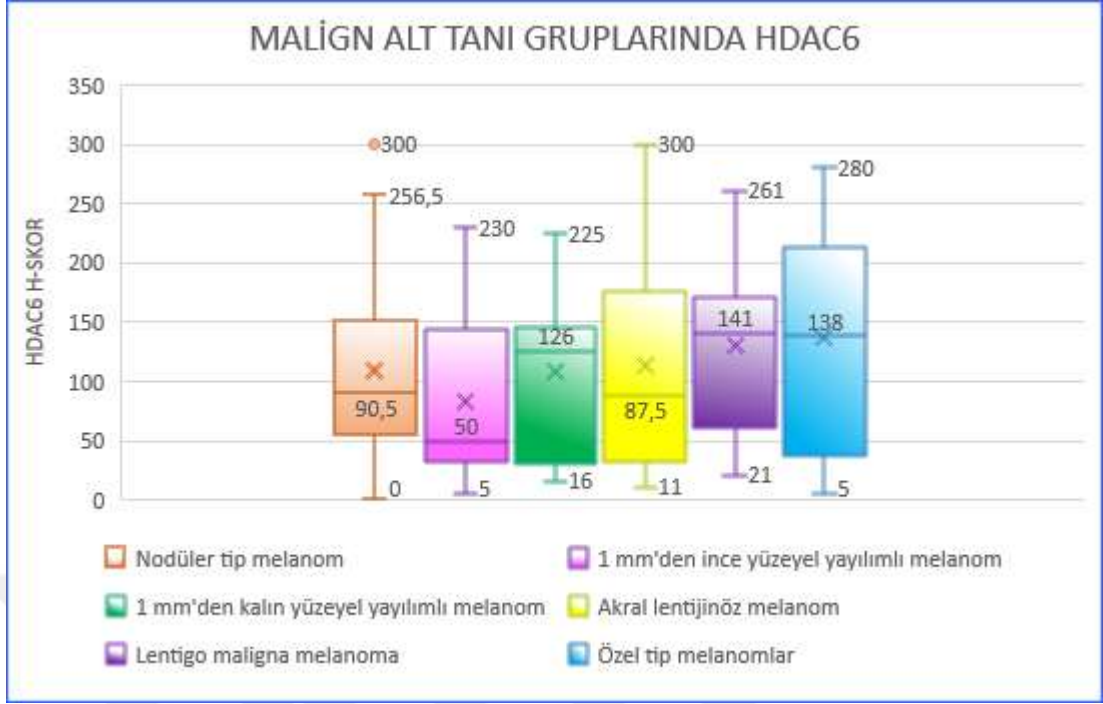
Şekil 4.8. Benign, borderline, malign ve metastaz ana tanı gruplarında HDAC6 karşılaştırması

Benign ana grubunun alt tanı gruplarında en yüksek, en düşük ve ortalama HDAC6 H-skor değerleri Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Benign ana tanı grubundaki alt tanı gruplarına (dermal nevus, displastik nevus, konjenitel nevus, spitz nevus, mavi nevus) ait olgular, HDAC6 H-skorları açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p:0.454).



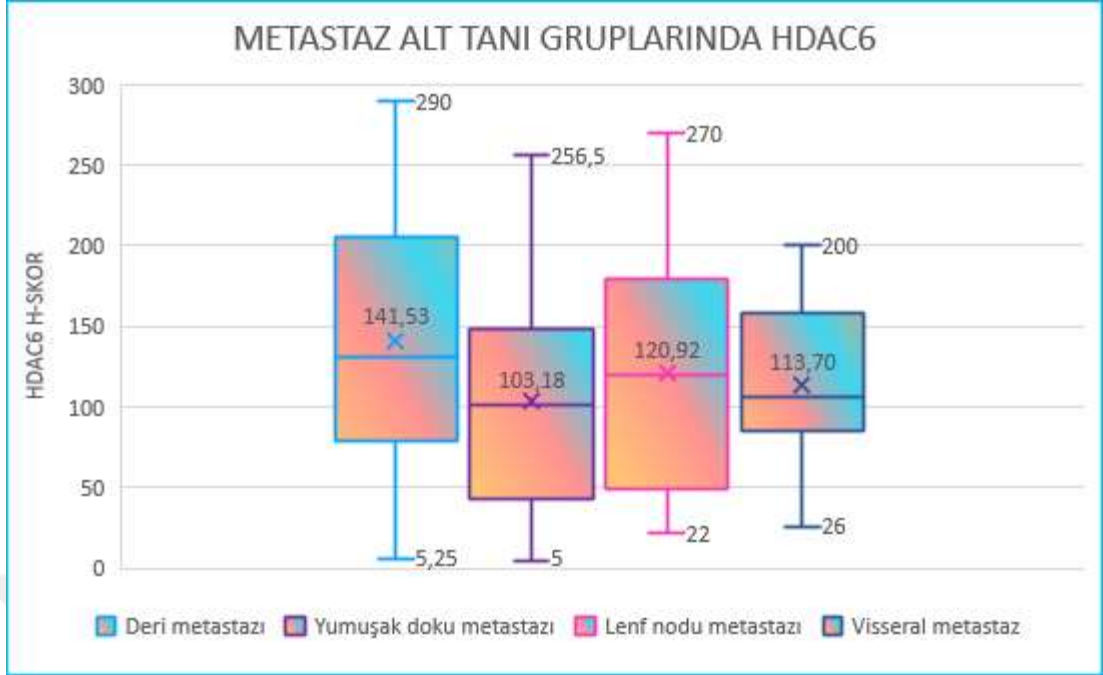
Şekil 4.9. Benign ana tanı grubunun alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması.

Malign ana tanı grubunu alt tanı gruplarına göre en büyük, en küçük ve ortalanca HDAC6 H-skor değerleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Malign ana tanı grubunda bulunan alt tanı grupları (nodüler melanom, 1 mm'den ince yüzeysel yayımlı melanom, 1 mm'den kalın yüzeysel yayımlı melanom, akral lentiginöz melanom, lentigo maligna melanoma, özel tip melanom) birbirleri ile karşılaştırıldığında HDAC6 H-skor açısından istatistiksel farklılık saptanmamıştır (p: 0.535).



Şekil 4.10. Malign alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması

Metastaz ana tanı grubundaki deri, yumuşak doku, lenf nodu ve visseral metastaz olgu grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p:0.223$). Alt tanı gruplarında en düşük, en yüksek ve ortalama HDAC6 H-skor değerleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



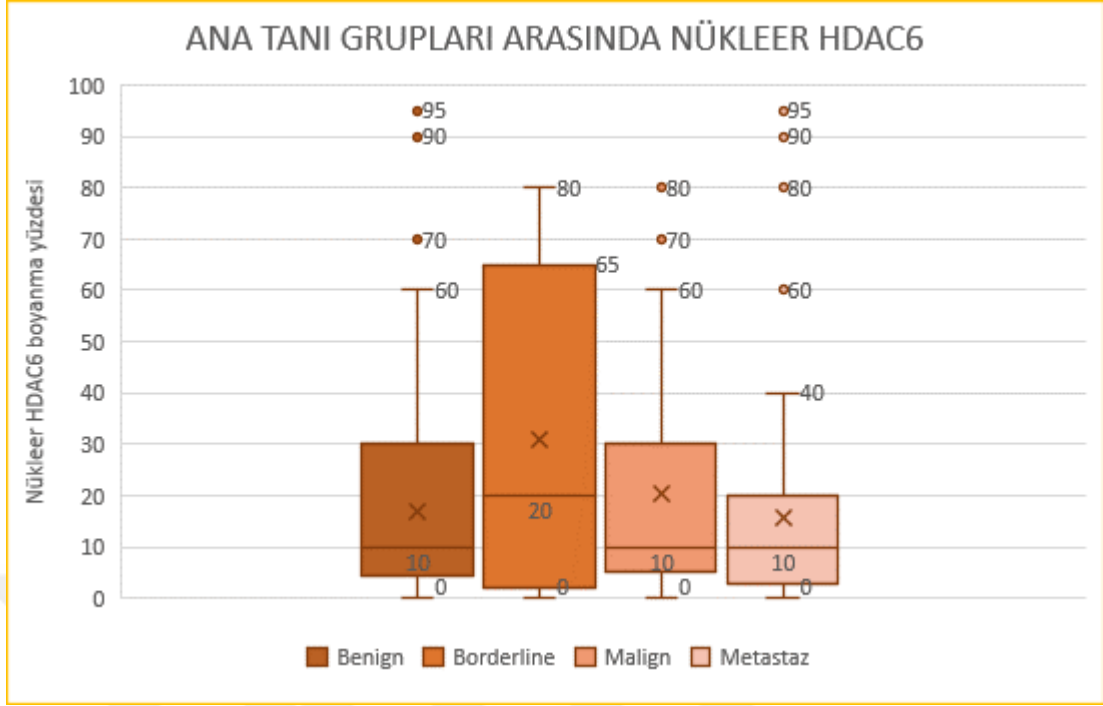
Şekil 4.11. Metastaz alt tanı grupları arasında HDAC6 H-skor karşılaştırması

Borderline ana tanı grubundaki SAMPUS ve biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid lezyon olguları birbirleri ile karşılaştırıldığında farklılık saptanmamıştır (p:0.393).

Ayrıca dermal nevus ile nodüler melanom, yüzeysel yayımlı melanom ve akral lentiginöz melanom alt tanı grupları ayrı ayrı karşılaştırılmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p: 0.340, p: 0.405, p: 0.551, sırasıyla).

Spitz nevus ile spitzoid melanom olguları arasında da HDAC6 ekspresyonu açısından fark bulunmamıştır (p:0.225).

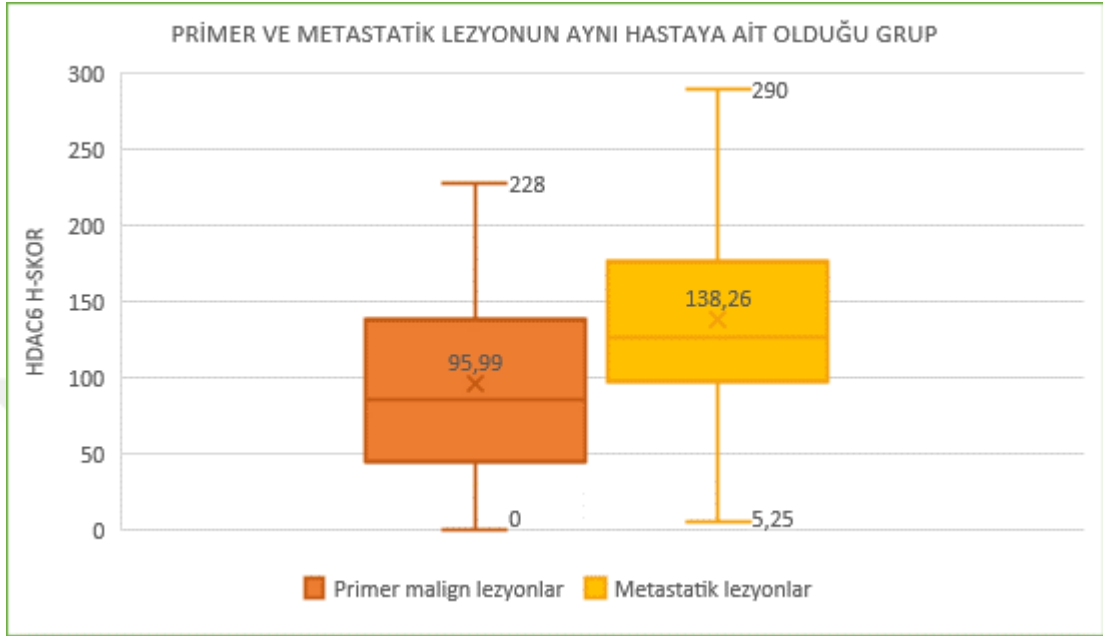
Olgularımızda HDAC6 antikoru ile sitoplazmik boyanmanın yanısıra nükleer boyanma da izlenmiştir. Ana tanı grupları boyanma şiddetinden bağımsız olarak nükleer HDAC6 boyanma yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p:0.329). Gruplarda oldukça çeşitli yüzdelerde nükleer HDAC6 boyanması bulunduğu saptanmıştır. Ana tanı gruplarının minimum, maksimum ve ortanca boyanma yüzdeleri ve aykırı değerler Şekli 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Ana tanı grupları arasında HDAC6 nükleer boyanma yüzdelерinin karşılaştırması

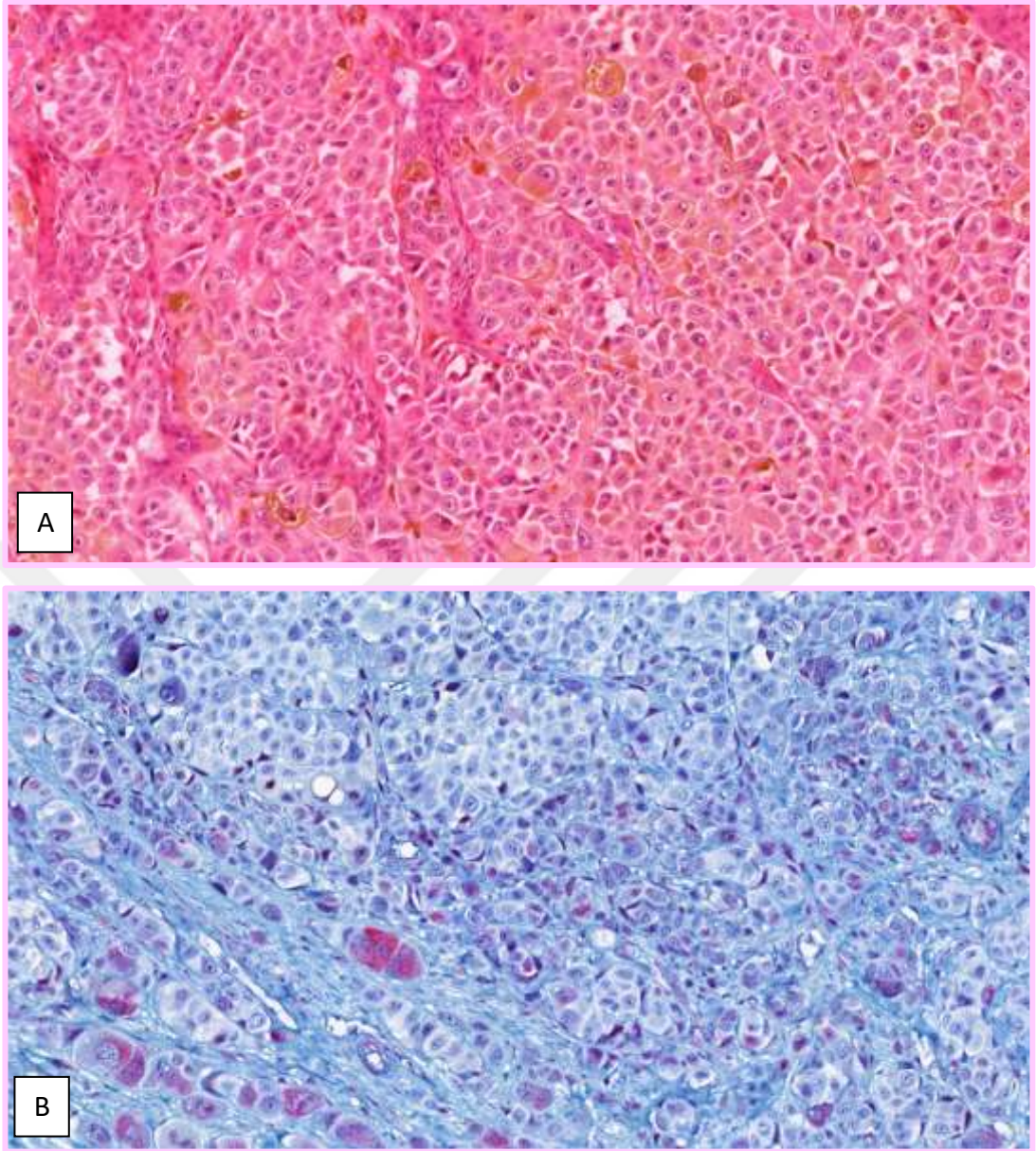
Arşivimizden rastgele seçilen malign ana tanı grubu ve metastaz ana tanı grubu olarak sınıfladığımız olguların HDAC6 H-skorları arasında fark bulunmadığı Şekil 4.8’de gösterilmişti. Çalışmamızda aynı hastaya ait farklı alt tanı gruplarına dağılmış lezyonlar bulunabilmektedir. Bu durum göz önüne alınarak; alt tip gözetmeksizin primer malign lezyonu ve metastatik lezyonu çalışma kapsamında olan olgular belirlenerek 24 olguluk bir grup oluşturulmuştur. Bu grupta aynı hastaya ait primer malign lezyonlar (nodüler, akral lentiginöz, yüzeysel yayımlı) ile metastatik lezyonlar (deri, yumuşak doku, lenf nodu) arasında HDAC6 H-skor, HDAC6 nükleer boyanma yüzdesi ve 5- hmC H-skor karşılaştırılmıştır. Yeni oluşturulan grupta malign ve metastaz olgularında HDAC6 H-skor açısından, malign ve metastaz ana tanı grupları karşılaştırmasından farklı olarak, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p: 0.029). Aynı hastaya ait metastatik lezyonun, primer malign lezyondan daha yüksek HDAC6 H-skoruna sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.13). HDAC6 nükleer boyanma yüzdesi ve 5- hmC H-skor açısından, malign ve metastaz ana tanı gruplarının karşılaştırmasında olduğu gibi, yeni oluşturulan

gruptaki olgular arasında da istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır (p: 0.351, p: 0.240, sırasıyla).

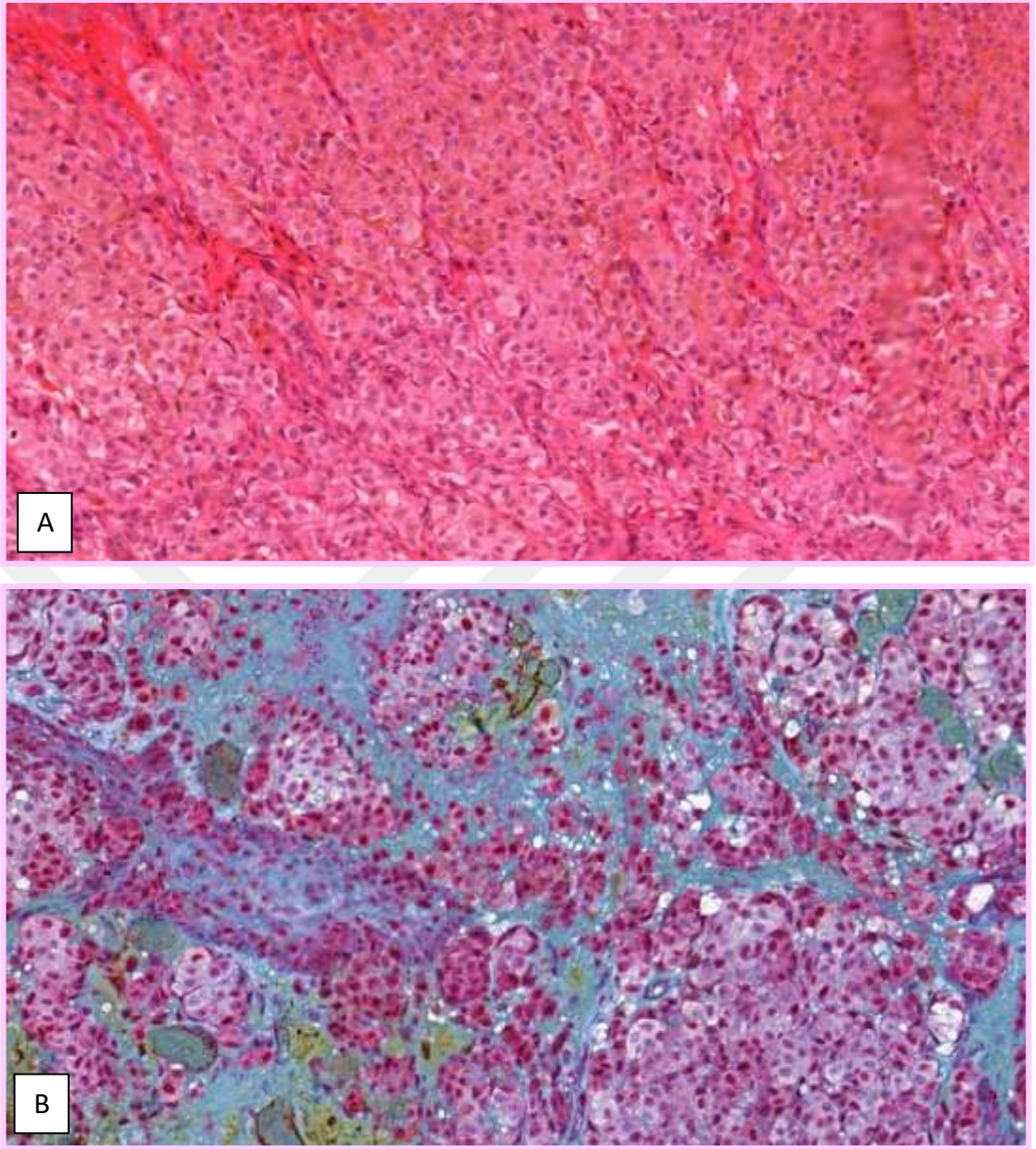


Şekil 4.13. Primer ve metastatik lezyonun aynı hastaya ait olduğu grupta HDAC6 H-skor karşılaştırması

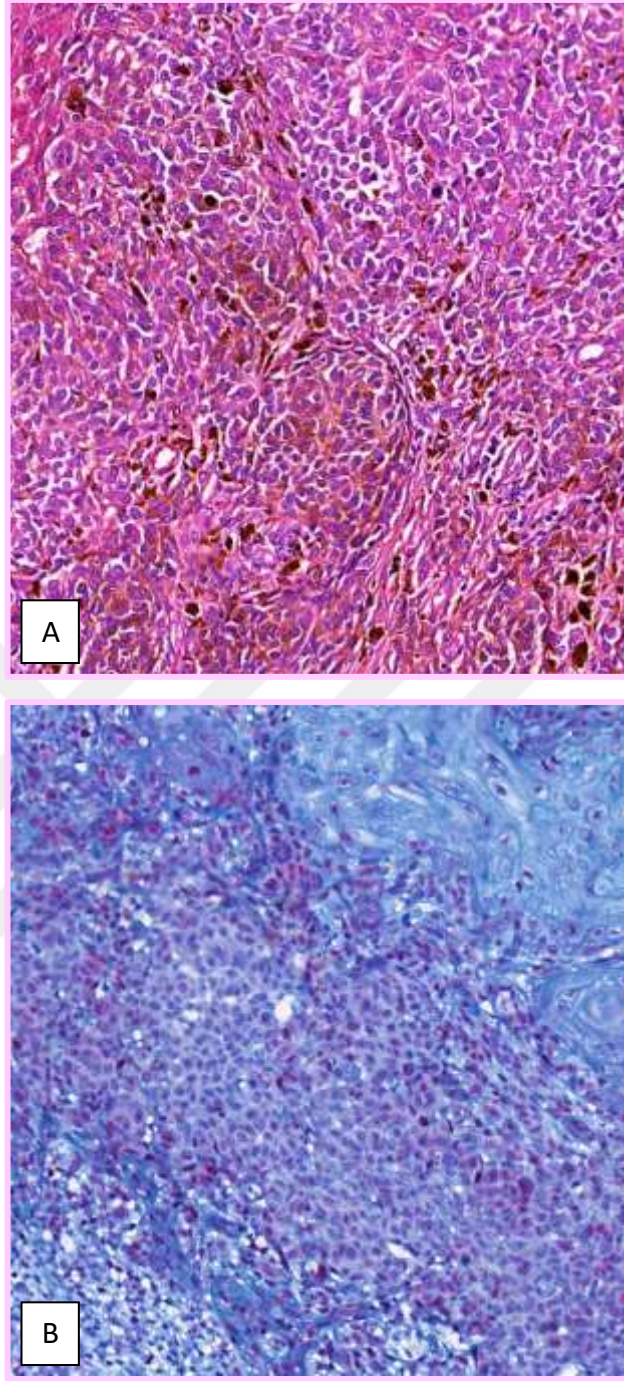
Histomorfolojik özellikleri ve HDAC6 immünohistokimyasal boyaları ile farklı tanı gruplarından olgu örnekleri aşağıda sunulmaktadır (Resim 4.7-10).



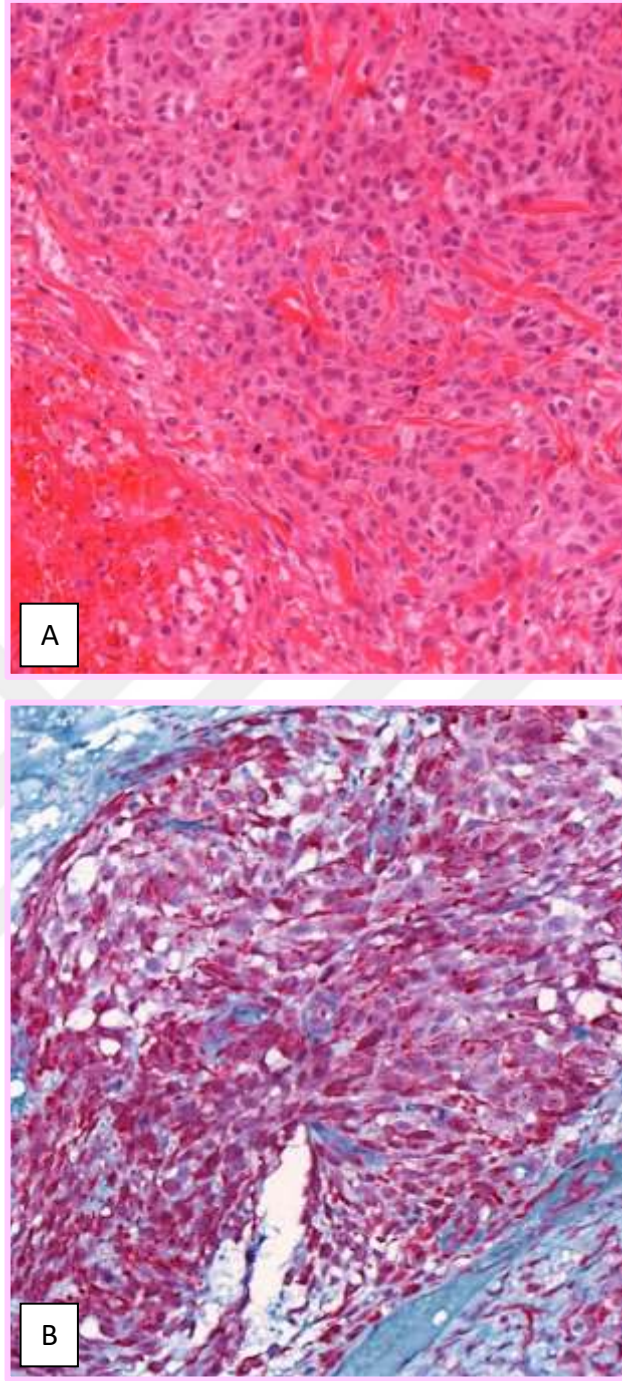
Resim 4.7. A-B. Nodüler melanom olgusunda HDAC6 ekspresyonu (%20 pozitiflik, %40 zayıf, %10 orta, %50 güçlü HDAC6 H-skor:42) (H-Ex200, HDAC6x200)



Resim 4.8. A-B. Deri metastazı olgusu-Resim 4.7’de ki nodüler melanomun metastazında HDAC6 ekspresyonu (%100 pozitiflik, %25 zayıf, %35 orta, %40 güçlü HDAC6 H-skor:215) (H-Ex200, HDAC6x200)



Resim 4.9. A-B. Yüzeyel yayımlı melanom olgusunda HDAC6 ekspresyonu (%70 pozitiflik, %60 zayıf, %30 orta, %10 güçlü HDAC6 H-skor:105) (H-Ex200, HDAC6x200)



Resim 4.10. A-B. Deri metastazı olgusu-Resim 4.9'daki yüzeysel yayımlı melanomun metastazında HDAC6 ekspresyonu (%90 pozitiflik, %25 zayıf, %25 orta, %50 güçlü HDAC6 H-skor:202.5) (H-Ex200, HDAC6x200)

4.2.3. 5- hmC ve HDAC6 ekspresyonları ile histopatolojik parametrelerin ilişkisi

Malign ana tanı grubunda; 5- hmC ve HDAC6 antikorlarının Breslow tümör kalınlığı, Clark invazyon seviyesi, mitoz, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, ülserasyon, regresyon, tümör infiltre eden lenfositler ile korelasyonunun olup olmadığı araştırılmıştır.

Tüm malign olgular birarada değerlendirildiğinde; HDAC6 H-skoru hiçbir histopatolojik prognostik parametre ile korele bulunmamıştır ($p>0.05$).

Bununla birlikte malign olgularda 5- hmC H-skoru, Breslow tümör kalınlığı ile negatif korelasyon göstermektedir ($p: 0.004$, $r: -0.369$). Breslow tümör kalınlığı arttıkça 5- hmC ekspresyonu azalmaktadır.

Tüm primer malign olgular birarada değerlendirildiğinde; 5- cmC H-skorunun Clark invazyon seviyesi ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($p:0.000$, $r: -0.465$). Clark invazyon seviyesi arttıkça 5- cmC H-skoru azalmaktadır.

Primer malign lezyonlarda 5- hmC H-skoru ile mitoz arasında negatif korelasyon izlenmiştir ($p: 0.000$, $r: -0.509$). Mitoz sayısı arttıkça 5- hmC ekspresyonu düşmektedir. Ayrıca displastik nevus grubunda da 5- hmC H-skoru ile mitozun negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($p: 0.032$, $r: -0.457$).

5- hmC H-skoru ile lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, ülserasyon ve regresyon parametreleri arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır ($p:>0.05$).

Tümör infiltre eden lenfositler ile 5- hmC H-skor arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p: 0.021$, $r: 0.303$). 5- hmC ekspresyonu fazla olan olgularda tümör infiltre eden lenfositler daha yoğun bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA

Dermatopatolojide en sık karşılaşılan zorluklardan bir tanesi pigmente lezyonların yorumlanmasıdır [82]. Melanositik deri tümörleri, farklı klinik, morfolojik ve genetik profillere sahip oldukça çeşitli benign ve malign neoplazileri içerir. Malign melanomlar; bazal ve skuamöz hücreli karsinomlara göre daha az sıklıkta gözlenmesine rağmen daha ölümcül seyretmesi nedeniyle deri kanserlerinin en önemli grubunu oluşturur [10]. Melanomun gelişimi ve ilerlemesi, bağımsız veya kombine şekilde genetik ve epigenetik olaylarla ilişkilidir. Melanom patogenezi anlamada genetik değişiklikler açısından kayda değer ilerleme kaydedilmiştir. Bununla birlikte, yakın zamandaki çalışmalar, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde epigenetik mekanizmaların karmaşık bir katılımını ortaya koymuştur; bunlar arasında metilasyon, kromatin modifikasyonu, non-coding RNA'ların çeşitli aktiviteleri yer almaktadır [83].

5. pozisyonundaki sitozinin metillenmesi ile oluşan anormal DNA metilasyonu çeşitli patolojik ve biyolojik süreçler için önemli bir epigenetik değişikliktir. 5-metilsitozin, DNA hidroksilaz ailesinden olan Ten-Eleven Translocation (TET) enzimi ile 5-hidroksimetilsitozine (5-hmc) dönüştürülür [32]. Son zamanlarda, melanositik lezyonlarda yapılan çalışmalarda 5-hidroksimetilsitozinin yeni bir diagnostik, prognostik, prediktif, terapötik bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmektedir.

Histon modifikasyonu, kromatin yapısının düzenlenmesinde rol alan bir epigenetik mekanizmadır. Histon deasetilazlar (HDAC) ve histon asetil-transferazlar (HAT) birçok hastalıkta gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde zıt ve dengeli rol oynarlar. HDAC ailesinin bir üyesi olan HDAC6'nın malign melanomda arttığını, proliferasyonu ve metastaz yeteneğini arttırdığını ve selektif HDAC6 inhibitörlerinin potansiyel terapötik anti-melanoma ajanı olabileceğini belirten az sayıda çalışma mevcuttur.

Çalışmamızda; benign, malign, metastatik toplam 214 olguda DNA demetilasyon ürünü olan 5-hidroksimetilsitozin ile benign, borderline, malign ve

metastatik 328 olguda kromatin modifikasyonunda görev alan histon deasetilaz-6'nın immünohistokimyasal yöntemle ekspresyonları değerlendirilmiştir.

5.1. 5-Hidroksimetilsitozin

Çalışmamızda 66 benign melanositik lezyonda (22 dermal, 22 displastik, 22 konjenital nevus), 58 malign melanositik lezyonda (24 nodüler, 12 yüzeysel yayımlı, 22 akral lentijinöz melanom) ve 90 melanom metastazlı (30 deri, 30 yumuşak doku, 30 lenf nodu) olguda immünohistokimyasal yöntemle 5-hidroksimetilsitozin ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Ana tanı grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında benign ana tanı grubunda, malign ve metastaz ana tanı gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek 5-hmC ekspresyonu saptanmıştır (p:0.000). Malign ve metastaz ana tanı grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p:1.000). Bu bulgu, malign melanom gelişiminde 5- hmC kaybının önemli bir epigenetik olay olduğunu desteklemekte ve diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. 5- hidroksimetilsitozin kaybının malign melanom için “epigenetik mihenk taşı” olarak açıklandığı Lian ve ark.'nın yaptığı çalışmada (2012); immünfloresan ve immünohistokimyasal yöntem ile epidermal bazal hücre tabakasındaki melanositlerde yüksek 5- hidroksimetilsitozin seviyelerinin gösterilmesinin yanında nevuslarda (n:30) güçlü ekspresyon gözlenmiş, primer (n:15) ve metastatik (n:10) malign melanomlarda parsiyel ya da total kayıp saptanmıştır. Sekanslama yöntemleri ile nevuslarda, malign lezyonlara göre genomik DNA'da da yüksek 5- hidroksimetilsitozin seviyeleri bulunduğunu gözlemlemişlerdir [3]. Benign-malign melanositik lezyonlar arasındaki 5-hmC ekspresyon farkı sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir [40, 41, 43, 44, 84-86].

Benign ana tanı grubunda bulunan dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevus birbirleriyle karşılaştırıldığında; dermal nevusun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek 5- hmC ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır (p:0.043, p:0.004, sırasıyla). Displastik nevus ve konjenital nevus arasında fark saptanmamıştır (p:0.665). Literatürde edinsel nevuslar ile displastik nevusların 5- hmC ekspresyonlarını karşılaştıran az sayıda çalışma olmasına karşın, bu 3 tanı grubunu karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Gambichler ve ark.'nın yaptığı çalışmada

(2013) bileşik nevuslar (n:17) ile displastik nevuslar (n:15) arasında 5- hmC ekspresyon farkı bulunmamıştır[41]. Uchiyama ve ark. (2014) edinsel nevus (n:10) ve displastik nevusların (n:10) benzer 5- hmC ekspresyonu gösterdiğini açıklamışlardır [85]. Larson ve ark. ise (2016) edinsel nevuslar (n:18) ile düşük derecede atipi gösteren displastik nevus (n:10) arasında anlamlı fark bulmazken; yüksek derecede atipi gösteren displastik nevuslar (n:10) ile edinsel nevuslar arasında anlamlı ekspresyon farkı saptamışlardır[40]. Çalışmalardaki bu farklılıklar kısıtlı vaka sayısından, çalışmaya dahil edilen edinsel nevusların alt tip farklılıklarından ya da displastik nevuslarda bulunan atipi derecesinden kaynaklanıyor olabilir. Keratinositlerde de 5- hmC ekspresyonu gözleendiği için bileşke yerleşimli veya lentijinöz komponenti bulunan lezyonlarda keratinosit-nevik hücre ayrımı değerlendirmede güçlük yaratmaktadır. Çalışmamızda edinsel nevus olarak dermal nevus olguları seçildiğinden ve displastik nevuslarda da dermal komponenti olan olgular çalışmaya dahil edildiğinden bu 2 tanı grubu arasındaki fark daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmiştir.

Çalışmamızda displastik nevuslarda atipi derecesi hafif/orta/şiddetli olarak 3 gruba ayrılmıştır. Displastik nevuslarda atipi derecesi ile 5-hmC ekspresyonu korele bulunmamıştır (p:0.577). Larson ve ark.'nın (2016) çalışmasında, displastik nevus grubunda atipi derecesi düşük ve yüksek dereceli olarak sınıflandırılmış ve bu iki grup arasında istatistiksel farklılık gözlenmiştir. Ayrıca ölçümü yapılarak, düşük ve yüksek dereceli displastik nevuslarda farklı olduğu saptanan nükleus boyutu; 5- hmC ile negatif korele bulunmuştur [40]. Atipi derecesi nispeten gözlemci bağımlı bir parametre olduğu için ve bu sınıflamada net bir standardizasyon bulunmadığından atipi derecesi ile 5- hmC ekspresyonu korelasyon analizleri farklı sonuçlar gösteriyor olabilir. Displastik nevuslarda atipinin derecelendirilmesinin daha objektif ve standart kriterlerle ile yapılması bu konuda yarar sağlayabilir.

Edinsel nevuslardan farklı histolojik ve moleküler özellikler gösteren konjenital nevuslarda (özellikle dev konjenital nevuslarda), edinsel nevuslara göre artmış malign melanom gelişim riski bulunduğu bilinmektedir[87]. Literatürde konjenital nevuslardaki 5- hmC ekspresyonu ile edinsel nevuslar ve displastik nevuslardaki ekspresyonu karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda konjenital nevusların, displastik nevuslara benzer ve dermal nevuslardan daha düşük

5- hmC ekspresyonu bulundurduğu gözlenmiştir. Bu bulgu edinsel nevuslardan farklı olarak konjenital nevus gelişiminde metilasyon mekanizmalarında düzensizliklerin etkili olduğunu gösteriyor olabilir. Fakat konjenital nevus grubunda bulunan birkaç olguda yüzeyin papiller projeksiyonlardan ve keratinden zengin olmasından dolayı immünohistokimyasal boyamada homojenizasyon problemi yaşanmıştır. Böyle olguların boyamaları tekrar edilmiştir ve değerlendirme lezyonu en iyi yansıtan alanlardan yapılmıştır. Kısmen değerlendirme güçlüğü yaşanan bu tanı grubunda edinsel nevuslara göre düşük ve displastik nevuslara benzer 5- hmC ekspresyonu varlığının daha geniş olgu serilerinde ve moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Malign ana tanı grubumuzda bulunan nodüler melanom, yüzeysel yayımlı melanom ve akral lentiginöz melanom grupları arasında 5- hmC ekspresyonu açısından fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Çalışmaların çoğu malign melanom subtipleri arasında karşılaştırma yapmaktan ziyade subtipten bağımsız olarak malign lezyonlar ile benign lezyonları karşılaştırmak üzere kurgulanmıştır. Melanom subtipleri arasındaki 5- hmC ekspresyon farkını analiz eden 2 çalışmada; 1 mm'den kalın yüzeysel yayımlı melanom (n:19) ile 4 mm'den kalın yüzeysel yayımlı melanom (n:18) arasında ve nodüler melanom (n:4), yüzeysel yayımlı melanom (n:10), lentigo maligna melanom (n:6) ile akral lentiginöz melanom (n:2) arasında bizim çalışmamızla uyumlu şekilde anlamlı 5- hmC ekspresyon farkı bulunmadığı açıklanmıştır [41, 86]. 5- hmC ekspresyonu malign melanom olgularında benign olgulara göre subtipten bağımsız olarak azalma göstermektedir.

Dermal nevus, displastik nevus ve konjenital nevus olguları; 5- hmC ekspresyonu açısından malign ana tanı grubu olguları ile ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Buna göre; bu 3 benign alt tanı grubu olguları, malign olgulardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek 5- hmC H-skoru bulundurmaktadır ($p<0.00001$, $p<0.00001$, $p:0.0001$, sırasıyla). Edinsel nevus ve displastik nevus ile malign olguların karşılaştırıldığı çalışmalarda benzer sonuçlar mevcuttur[41, 85]. Konjenital nevuslar ile malign olgularda 5- hmC ekspresyon farkının incelendiği çalışma bulunmamakla birlikte; Pavlova ve ark. (2016) dev konjenital nevus zemininde gelişen proliferatif nodül (n:12) ve melanom (n:13) odakları ayırıcı tanısında bu belirtecin kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Proliferatif nodüllerde çevre

konjenital nevus hücrelerine benzer ekspresyon izlerken, malign transformasyon gösteren alanlarda çevre nevusa göre belirgin azalma saptamışlar ve 5- hmC'nin benign-malign proliferasyon ayrımında sensitif bir biyobelirteç olduğunu ortaya koymuşlardır[86]. Çalışmamızda böyle olgu bulunmamasına rağmen konjenital nevus ile malign olgular arasında bulduğumuz ekspresyon kaybı varlığı 5- hmC immünohistokimyasının bu amaçla kullanılabileceğini destekler özelliktedir.

Ayrıca çalışmamızda dermal nevus-displastik nevus-malign melanom sekansında malign fenotipe doğru gidildikçe 5- hmC ekspresyonunun progresif bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi bazı çalışmalarda edinsel nevus-displastik nevus arasında ekspresyon farkı saptanmasa da edinsel nevus-malign melanom, displastik nevus-malign melanom arasında ekspresyon farkı gözlenmiştir[41, 85]. Hatta Larson ve ark.'nın çalışmasında (2014) edinsel nevus-yüksek derecede atipi gösteren displastik nevus-borderline lezyonlar(SAMPUS, atipik Spitzoid tümör)-malign melanom sekansında 5- hmC ekspresyon kaybının displastik sitomorfolojik özellikler ve tümör progresyonu ile korele olduğunu açıklanmıştır. Borderline lezyonlarda, biyolojik olarak farklı bir melanositik lezyon sınıfı olmalarını destekler şekilde boyanma çeşitliliğinin fazla olduğunu söylemişlerdir[40]. Bizim bulgularımız da bu korelasyonu desteklemektedir. Borderline lezyonların çalışmamıza dahil edilmesi planlanmış fakat teknik nedenlerden dolayı bu lezyonlarda 5- hmC immünohistokimyasal boyaması gerçekleştirilememiştir.

Çalışmamız metastatik malign melanom olgu sayısının en yüksek olduğu ve metastatik lezyonların deri, yumuşak doku, lenf nodu metastazı olarak sınıflandırılıp 5- hmC ekspresyonlarının incelendiği ilk çalışmadır. Benign olgularla metastatik olgular arasında anlamlı ekspresyon farkı gözlenirken; primer malign olgular ile metastatik olgular arasında fark saptanmamıştır. Metastatik lezyonları benign ve primer malign lezyonlar ile karşılaştıran 2 çalışmada benzer sonuçlar mevcuttur[41, 43]. Metastaz alt tanı grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında da anlamlı fark gözlenmemiştir. Özellikle sentinel lenf nodu biyopsilerinde ve mikrometastaz varlığında nodal nevustan ayırım için 5- hmC ekspresyon kaybının saptanmasının yararlı olabileceği gösterilmiştir [42, 43].

Yoğun pigment içeren lezyonlar, değerlendirme güçlüğüne neden olabileceği için çalışmamız dışında bırakılmıştır. Fakat Lee ve ark. (2016) 5- hmC ekspresyon kaybının yoğun pigmentli lezyonların ayırıcı tanısında da yararlı olabileceğini açıklamışlardır. Kombine nevus, epiteloid özellikler gösteren mavi nevus ve derin penetran nevus olgularını içeren benign lezyon grubunda; atipik derin penetran nevus, malign potansiyeli belirsiz melanositik lezyon, pigmente epiteloid melanositoma ve mavi nevus benzeri melanoma olgularını içeren borderline-malign lezyon grubuna göre daha yüksek 5- hmC ekspresyonu bulunduğu saptanmıştır[84].

Çalışmamızda ana tanı grupları ve subtipler arasında 5- hmC H-skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptansa da tanı grupları arasında örtüşen skorlar mevcuttur ve tek bir tanı grubu kendi içerisinde olgudan olguya çeşitlilik gösterebilmektedir. Bu nedenle tanısal yaklaşımda 5- hidroksimetilsitozin kaybının, tek başına değil, morfolojik ve diğer immünohistokimyasal bulgular ile birlikte kullanılması gerektiği düşünülmüştür. 5- hmC immünohistokimyasının tanısal yararını inceleyen Rodic ve ark.'nın 171 melanositik lezyon içeren çalışmasında (2015); sensitivite %92.74, spesivite %97.78 olarak bulunmuş, ortalama İHK skoru nevus-melanom olguları arasında farklı olsa da, bizim çalışmamızda olduğu gibi tanı grupları içerisinde önemli çeşitlilikler göstermiştir. Nevus zemininde gelişen melanomlarda nevik komponentte daha güçlü 5- hidroksimetilsitozin boyanması izlenirken, malign komponentte kayıp saptamışlardır. Bu nedenlerle zorlayıcı vakalarda İHK panele dahil edilebileceğini fakat tek başına yetersiz bir belirteç olduğunu, kesin eşik değerler verilmesinden bir lezyonun kendi içindeki 5- hidroksimetilsitozin değişikliklerinin tanısal yaklaşımda daha fazla bilgi verici olabileceğini açıklamışlardır[43]. Ayrıca başka bir çalışmada; küçük/nevoid hücreli melanom (n:24) ve nevus zemininde gelişen melanomlarda (n:28), nevik hücreler ile konvansiyonel melanomun küçük hücreleri arasında fark bulunduğu gösterilmiş, 5-hmC immünohistokimyasının tanısal yarar sağlayabileceği, küçük/nevoid hücre komponenti bulunduran ve nevus zemininde gelişen melanomların Breslow mikroevelemesinde faydalı olabileceği bildirilmiştir[44].

5- hmC ekspresyon farkının çeşitli tanı gruplarında incelendiği çalışmalar Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Tablo 5.1. Farklı tanı gruplarında 5- hmC ekspresyonunun incelendiği çalışmalar

Çalışma	Olgular	Yöntem	Sonuçlar
Lian ve ark. (2012)[32]	30-benign nevus 15-primer melanom 10-metastatik melanom	İFM İHK Glukozilasyon array Anti-5-hmC antibody-based dot blot İmmünpresipitasyon+ sekanslama	- Epidermis bazal tabakasında bulunan melanositlerde yüksek 5- hmC ekspresyonu - Benign olgularda güçlü nükleer ekspresyon, primer malign ve metastatik olgularda parsiyel ya da total kayıp - Genomik DNA saflaştırılmasıyla benign nevuslarda yüksek 5- hmC seviyeleri - Melanomlarda genome-wide progresif 5- hmC kaybı - 5- hmC mealomun “epigenetik mihenk taşı”
Gambichler ve ark. (2013)[41]	17-bileşik nevus 15-displastik bileşik nevus 19-<1 mm yüzeysel yayımlı melanom 18->4 mm yüzeysel yayımlı melanom 24-kutanöz metastaz	İHK	- Bileşik nevus ve displastik nevuslarda yüzeysel yayımlı (ince ve kalın) melanom ve kutanöz metastazlara göre yüksek 5- hmC - Bileşik nevus ile displastik nevus arasında fark yok - Yüzeysel yayımlı ve metastaz arasında fark yok - Melanom gelişimi ve progresyonunda 5- hmC önemli rol oynuyor olabilir
Uchiyama ve ark. (2014)[85]	10-edinsel nevus 10-displastik nevus 10-spitz nevus 35-malign melanom	İHK	- Melanomda diğer tanı gruplarına göre belirgin 5- hmC azalması - Edinsel nevus, displastik nevus ve spitz nevuslarda benzer ekspresyon - 5- hmC melanositik lezyonların ayırıcı tanısında umut vadetmekte
Larson ve ark (2014)[40]	18-edinsel nevus 20-displastik nevus (10-düşük, 10- yüksek dercede) 10-atipik Spitz nevus 20-borderline lezyon 102-primer melanom	İHK Nükleus boyut ölçümü	- Edinsel nevus-yüksek derecede atipili displastik nevus-borderline lezyon-malign melanom sekansında progresif 5- hmC kaybı - Borderline lezyonlarda çeşitli boyanma paternleri - Nükleus boyutu arttıkça 5- hmC ekspresyonu azalmakta - 5- hmC kaybı displastik sitomorfolojik özellikler ve tümör progresyonu ile ilişkili
Rodic ve ark. (2015)[43]	45-nevus 48-primer melanom	İHK	- Melanomlarda 5-hmC kaybı - Sensitivite %92.74, Spesivite %97.78

	78-metastatik 8-nevus zemininde melanom		- Tanı grupları içinde skor çeşitliliği - Nevus zemininde gelişen melanomlarda bifazik boyanma paterni - Lezyonun kendi içindeki ekspresyon değişikliği tanıda daha bilgi verici olabilir
Lee ve ark. (2015)[44]	28- nevus zemininde melanom 24- küçük/nevoid hücreli melanom	İHK	- Nevus zemininde gelişen melanomdaki nevik hücreler ile konvansiyonel melanomun küçük hücreleri arasında belirgin fark - Böyle lezyonlarda Breslow mikrovorelmesinde kullanılabilir
Lee ve ark. (2015)[42]	18-metastatik melanom 10-nodal nevus	İHK İFM	- Melanom metastazında MART1 pozitif hücrelerin tamamında total 5-hmC kaybı - Nodal nevusta MART1 pozitif hücrelerin tamamında 5- hmC boyanması - Sentinel lenf nodu biyopsisinde metastatik hastalık değerlendirilmesinde yararlı olabilir
Pavlova ve ark. (2016)[86]	34-benign melanositik lezyon 33-malign melanositik lezyon (11-metastaz, 6-LMM, 4-nodüler, 2-ALM, 10-yüzeysel yayımlı) Dev konjenital nevus zemininde: 12-proliferatif nodül, 13-melanom	İHK	- Benign-malign olgular arasında anlamlı 5- hmC ekspresyon farkı - Melanom subtipleri arasında 5-hmC ekspresyon farkı yok - Proliferatif nodüllerde çevre konjenital nevusa benzer 5- hmC ekspresyonu - Malign alanlarda çevre konjenital nevusa göre önemli 5- hmC ekspresyon kaybı - Dev konjenital nevusta benign-malign proliferasyon ayrımında 5-hmC sensitif bir biyobelirteç
Lee ve ark. (2016)[84]	12-kombine nevus 4-epiteloid özellikler gösteren mavi nevus 5-derin penetran nevus 7-atipik derin penetran nevus 10-MELTUMP 8-PEM 8-mavi nevus benzeri özellikler gösteren melanom	İHK	- Benign lezyonlarda güçlü 5- hmC nükleer aktivitesi - Borderline ve malign lezyonlarda belirgin 5- hmC ekspresyon kaybı - 5- hmC yoğun pigmentli lezyonların ayırıcı tanısında kullanılabilecek bir belirteçtir

Çalışmamız	22-dermal nevus 22-displastik nevus 22-konjenital nevus 22-spitz nevus 22-mavi nevus 24-nodüler melanom 24-yüzeyel yayımlı 22-akral lentiginöz 22-lentigo maligna melanom 18-özel tip melanomlar 8-borderline lezyonlar 30-deri metastazı 30-yumuşak doku metastazı 30-lenf nodu metastazı 10-visseral metastaz	İHK	- Benign lezyonlarda daha fazla ve yoğun 5- hmC ekspresyonu bulunurken, primer malign ve metastatik lezyonlarda parsiyel ya da total kayıp mevcut - Dermal nevus; displastik nevustan ve konjenital nevustan daha fazla 5- hmC ekspresyonu göstermekte - Konjenital nevus, displastik nevusa benzer 5- hmC ekspresyonu sergilemekte - Dermal, displastik, konjenital nevus grupları ayrı ayrı olacak şekilde primer malign grubu ile karşılaştırılmış, 3 grubun da malign olgulardan daha yüksek 5- hmC skoruna sahip olduğu görülmüştür. - Primer malign ve metastaz olguları arasında ve alt tanı grupları arasında 5- hmC farkı yok - 5-hmC; Breslow kalınlığı, Clark invazyon seviyesi ve mitoz ile negatif korele iken TİL ile pozitif korele - Primeri ve metastazlarının aynı hastaya ait olduğu grupta metastatik lezyonlarda daha yüksek HDAC6 ekspresyonu - 5- hmC melanositik lezyonlarda tanısal ve prognostik değeri olabilecek bir belirteçtir. - HDAC6'nın metastaz kolaylaştırıcı etkileri olabilir.
-------------------	---	------------	--

Çalışmamızda 5- hmC kaybının çeşitli histopatolojik prognostik parametrelerle ilişkili olduğu saptanmıştır. Primer malign lezyonlarda ve displastik nevuslarda; mitoz sayısı arttıkça 5-hmC ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Ayrıca Breslow tümör kalınlığı ve Clark invazyon seviyesi ile 5- hmC ekspresyonu arasında da negatif korelasyon saptanmıştır; tümör kalınlığı arttıkça 5- hmc ekspresyonu azalmaktadır. Bu durumda 5- hmC kaybının daha agresif fenotip ve daha kötü prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Histopatolojik parametreler açısından literatüre bakıldığında bulgularımızla uyumlu şekilde; Breslow kalınlığı, Clark invazyon seviyesi, mitoz ile 5- hmC

ekspresyonu arasında negatif korelasyon bulunduğunu ve prognostik bir belirteç olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur[32, 86, 88].

Bu çalışmada sağkalım verilerine sağlıklı bir şekilde erişilemediğinden bu konuda karşılaştırma yapılamamıştır. Bununla birlikte doğrudan prognostik önemi olduğu bilinen ve TNM evrelemesinde de önemli yeri olan tümör kalınlığı, invazyon seviyesi, mitoz sayısı ile negatif bir korelasyon saptanmış olması 5- hmC skorlarının dolaylı şekilde sağkalım ile negatif bir korelasyon gösterebileceğini düşündürmüştür. Lian ve ark (2012) 5- hmC kaybı arttıkça yaşam şansının azaldığını, Saldanha ve ark (2017) 5- hmC kaybının sağkalımla ilişkili olduğunu ve bağımsız bir prediktör olabileceğini açıklamışlardır[3, 88].

Prognoz ile ilişkili çalışmalar Tablo 5.2’de özetlenmiştir.

Tablo 5.2. Malign melanomda 5- hmC ile prognostik parametrelerin korelasyonunu inceleyen çalışmalar

Çalışma	Olgular	Yöntem	Sonuçlar
Lian ve ark (2012)[3]	70- yüzeysel yayımlı ve nodüler melanom	İHK	- Breslow kalınlığı, tümör evresi, mitoz, ülserasyon ile negatif korelasyon - 5- hmC ekspresyonu yüksek olgularda yaşam şansı daha yüksek
Pavlova ve ark (2016)[86]	34- benign 22- primer malign 11- metastaz	İHK	- Breslow kalınlığı ile Clark invazyon seviyesi arasında negatif korelasyon
Saldanha ve ark (2017)[88]	200- melanom	İHK	- Breslow kalınlığı, mitoz, ülserasyon, tümör evresi, yaş, lokalizasyon ile negatif korelasyon - Cinsiyet ve mikrosatellit ilişkisi - 5-hmC metastazsız, melanom özgün ve genel sağkalım için bağımsız prediktör

5- hmC ekspresyonu ile tümör infiltrate eden lenfositler arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (p: 0.021 r: 0.303). H-skoru yüksek olan vakalarda daha yoğun tümör infiltrate eden lenfositler bulunduğu saptanmıştır. Bu durum melanom hücrelerindeki 5- hmC ekspresyon durumu ile tümör inflamatuvar mikroçevre ve tümör antijenitesi arasında bir ilişki olabileceğini ve geniş vaka serilerinde araştırılmasının yarar sağlayabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızın sonuçları ile paralel olacak şekilde, malign melanomların büyük çoğunluğunda, bilinen en önemli epigenetik anormalliğin 5 hidroksimetilsitozin (5-hmC) rezidülerinin azalması olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. 5- hmC kaybının sebebi ve melanom patogenezinde bir sebep mi yoksa sonuç mu olduğu henüz netleştirilememiştir. Bu konuda iki hipotez akla gelmektedir: 1) 5- metilsitozinin hidroksillenerek 5- hmC'e dönüştürülmesinde bozukluklar olabilir. Bu dönüşümü gerçekleştiren TET enzimlerinin inhibisyon ya da mutasyonu 5- hmC azlığına neden oluyor olabilir. Bu reaksiyon krebs siklusundan sağlanan α -ketoglutarat kofaktörlüğünü gerektirmektedir. Krebs siklusu enzimlerinden olan izositrat dehidrogenazda (IDH) fonksiyon arttırıcı mutasyonlar meydana geldiğinde α -ketoglutarat yerine, TET enzimlerini inhibe eden hidroksiglutarat sentezlenmektedir[21]. Böyle bir inhibisyonun varlığı da 5- hmC kaybına neden oluyor olabilir. 2) TET ya da IDH enzim aktivitelerinden bağımsız olarak 5- metilsitozin seviyeleri düşük olduğu için 5- hmC düşük olarak saptanıyor olabilir. 5-metilsitozin; DNA metiltransferazlar aracılığıyla S-adenozilmetiyoninden (SAM), sitozinin 5. pozisyonundaki karbonuna metil grubu transferi ile meydana gelir[89]. Bu yolaktaki bozukluklar 5- metilsitozin azlığına, dolaylı olarak da 5- hmC azlığına neden oluyor olabilir. Bu hipotezleri araştırmak üzere çalışmalar yapılmıştır.

Lian ve ark.'nın yaptığı çalışmada, işaretlenmiş hidroksimetile DNA immünpresipitasyonu sonrası sekanslama ile 5- hmC'nin malign melanomda kaybı moleküler olarak gösterilmiş ve kaybın lokus spesifik değil genom çaplı olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca 5- metilsitozin seviyelerinde hafif azalma bulunduğunu fakat benign-malign olgular arasında anlamlı fark bulunmadığını açıklamışlardır. RT-qPCR ile malign olgularda özellikle TET2 olmak üzere tüm TET ailesi enzimlerinin ve IDH2'nin seviyelerinin düşük olduğunu saptamışlardır. Xenograft modellerinde TET2 ve IDH2 seviyeleri arttırılan malign melanomlarda 5- hmC seviyesinin de

arttığını ortaya koymuşlardır [32]. İHK temelli bir çalışmada 5- metilsitozin benign-malign lezyonlarda farklı bulunmazken TET2 benignlerde yüksek bulunmuştur [41]. Pavlove ark.'nın yaptığı çalışmada PCR yöntemiyle edinsel nevus (n:6) ve konjenital nevus proliferatif nodüllerinde (n:6), melanom (n:5) olgularına göre yüksek TET1, TET2, TET3, IDH1, IDH2 bulunduğu öne sürülmüştür [86].

Primer sorun dönüştürücü enzimlerde ise 5- hmC kaybına 5- metilsitozin artışının eşlik etmesinin gerektiği fakat malign olgularda 5- metilsitozin seviyelerinde hafif azalma tariflendiği için Micevic ve ark. primer defektin 5- metilsitozin kaybı olabileceğini düşünerek yakın zamanda bir çalışma yayınlamışlardır. 5- metilsitozin azalmasının malign melanomların büyük çoğunluğunda immünohistokimya ile kolaylıkla tespit edilebildiğini, bu bulgunun malign melanom epigenomunun nevuslara göre hipometile DNA özelliğinde olduğu yorumunu desteklediğini ve hücre kültüründe SAM ile 5-mC seviyelerinin artırılması sonucu melanoma hücrelerinin büyümesini engellediklerini açıklamışlardır. Melanomda global DNA hipometilasyonu bulunduğunu söylemişlerdir[89].

Memelilerde metilasyon çoğunlukla CpG dinükleotidlerinde gerçekleşir. CpG dinükleotidleri dağınık olarak intergenik bölgelerde ya da gruplar halinde CpG adalarında bulunurlar. Metile CpG dinükleotidlerinin çoğu protein kodlaması yapmayan intergenik bölgelerde bulunurlar. İntergenik bölgelerdeki metile CpG dinükleotidlerinin görevi tam olarak bilinmese de tekrarlayıcı DNA (özellikle retrotranspozon) inaktivasyonunda rolü oldukları düşünülmektedir. Buna karşılık CpG adaları genlerin promoter bölgelerindedir ve genellikle metile değildir. Promoter ilişkili CpG adalarındaki DNA metilasyonu, transkripsiyonel başlatmayı inhibe ederek protein kodlayan gen transkripsiyonunun susturulmasında rol oynar[90-92]. Karsinogenezde global DNA hipometilasyonu varlığı ile özellikle tümör supresor genlerin (CDKN2A, VHL, PB1, BRCA1 v.b) promoter bölgesindeki CpG adalarında hipermetilasyon varlığı gösterilmiştir[93-96]. Karsinogenezdeki global DNA hipometilasyonunun sebebi bilinmemekle birlikte; DNMT3A aktivite kaybının ve DNA metilasyon düzenleyicisi UHRF1 aşırı ifadenmesinin global DNA hipometilasyonuna yol açtığı gösterilmiştir[97-99].

Bu bilgiler ile melanomda primer epigenetik anormalliğin 5- hmC kaybı olduğunu açıklayan çalışmalar olduğu gibi 5- metilsitozin kaybı olduğunu savunan çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmada 5-metil sitozin araştırılmamış olmakla birlikte malign ve benign melanositik lezyonlarda 5- hmC ekspresyon farklılığının gösterilmiş olması 5-hmC kaybının melanom için temel bir epigenetik anormallik olabileceğini desteklemektedir. Malign melanomda 5- hm ve 5- hmC kaybının nedenlerinin ve sonuçlarının açığa çıkarılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Böylece hipermetile olan tümör supresor genlerin CpG adalarını hedefleyen hipometile ajanlar ile global DNA hipometilasyonuna çözüm olabilecek hipermetile edici ajanlar kombine şekilde kullanılabilir.

5.2. Histon deasetilaz 6

Çalışmamızda benign, borderline, malign ve metastaz ana tanı grupları birbirleri ile sitoplazmik HDAC6 ekspresyonları açısından karşılaştırılmış; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır (p:0.801). Benign ana tanı grubundaki alt tanı gruplarına (dermal nevus, displastik nevus, konjenitel nevus, spitz nevus, mavi nevus) ait olgular, malign ana tanı grubunda bulunan alt tanı grupları (nodüler melanom, 1 mm'den ince yüzeyel yayımlı melanom, 1 mm'den kalın yüzeyel yayımlı melanom, akral lentijinöz melanom, lentigo maligna melanoma, özel tip melanom), metastaz ana tanı grubundaki deri, yumuşak doku, lenf nodu ve visseral metastaz olgu grupları ve borderline ana tanı grubundaki SAMPUS ve biyolojik davranışı belirlenemeyen atipik spitzoid lezyon olguları ana tanı grupları içerisinde birbirleri ile karşılaştırıldığında farklılık saptanmamıştır (p>0.05).

Ayrıca dermal nevus ile nodüler melanom, yüzeyel yayımlı melanom ve akral lentijinöz melanom alt tanı grupları ayrı ayrı karşılaştırılmıştır, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p: 0.340, p: 0.405, p: 0.551, sırasıyla).

Spitz nevus ile spitzoid melanom olguları arasında da HDAC6 ekspresyonu açısından fark bulunmamıştır (p:0.225).

Olgularımızda oldukça çeşitli yüzdelerde beklenmeyen nükleer HDAC6 boyanması saptanmıştır. HDAC6; grup II histon deasetilazlar grubunda bulunmaktadır ve sitoplazma nükleus arasında geçiş gösterebilmektedir[51, 81]. Bu nedenle HDAC6 antikoru ile sitoplazmik ve nükleer boyanma ayrı ayrı değerlendirilmiş; literatürde daha çok kabul gören sitoplazmik boyanma için H-skoru verilmiş, nükleer boyanma için boyanma şiddetinden bağımsız olarak pozitif boyanan hücrelerin lezyonu oluşturan tüm hücrelere oranı yüzde olarak belirlenmiştir.

Literatürde bazı HDAC inhibe edici ajanların (sodyum butirat, fenil butirat, trubitirin, trikostatın A) normal melanositlere göre melanom hücrelerinde kromozom remodellingi, hücre siklus arresti ve selektif toksisite gösterdiği bildirilmiştir[100-102]. Melanom proliferasyonunda ve metastazında hangi HDAC tiplerinin etkili olduğunu araştıran Liu ve ark. (2016) melanom hücrelerinde Western blot yöntemiyle yüksek HDAC5 ve HDAC6 ekspresyonu saptamışlardır. Hücre kültürü ve xenograft çalışmasıyla HDAC5 ve HDAC6 inhibisyonunda melanom proliferasyonunun ve metastaz yeteneğinin azaldığını, apoptozun arttığını açıklamışlardır. Ayrıca insan melanom dokusunda Western blot ve İHK ile normal deri örneklerine göre yüksek seviyelerde HDAC5 ve HDAC6 bulunduğunu bildirmişlerdir[2].

Woan ve ark. (2015) hücre kültüründe in vitro olarak hem genetik hem de farmakolojik HDAC6 inhibisyonunun melanoma hücrelerinde G1 arresti yaptığını ve proliferasyonu azalttığını saptamışlardır. Bu molekülün hedeflenmesiyle tümör ilişkili antijenlerin (gp100, MART1, TYRP1, TYRP2) ve MHC sınıf I ekspresyonlarının arttığını saptamışlardır; tümör-spesifik immünojenik sinyallerin arttırılmasında potansiyel olabileceğini belirtmişlerdir[64]. Aynı çalışma grubu 2016'da yayınladıkları çalışmada HDAC6'nın melanom hücrelerinde STAT3 aktivasyonunu modüle ederek PD-L1 ekspresyonu üzerine etkili olduğunu, HDAC6 inhibisyonuyla in vivo olarak farelerde tümör büyümesinin ve PD-L1 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir[103].

Bir melanom hücre kültürü çalışmasında histon modifiye edici aktivitesinde bağımsız olarak HDAC6'nın, melanomda daha önce çalışılmamış olan dokuya göre

onkojenik ya da tümör supresor fonksiyon gösteren PTPN1 (tirozin-protein fosfataz non-reseptör tip 1) ile direk etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Melanom olgularında İHK ile HDAC6 ve PTPN1'in pozitif korelasyonunu göstermişlerdir. PTPN1'in, ERK1/2 (ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2) aktivasyonu ile melanom hücrelerinin apoptozunu azalttığını, proliferasyonu, koloni formasyonunu ve migrasyonu arttırdığını açıklamışlardır. Ayrıca HDAC6/PTPN1/ERK1/2 aksı aktivasyonu ile, melanom invazyonu ve metastazından sorumlu olabilecek MMP9 (matriks metalloproteinaz 9) artışını göstermişlerdir [104].

Histonlardan asetil gruplarını uzaklaştırarak daha gevşek bir kromatin yapısına neden olan HDAC ailesinin hedefleri arasında non-histon proteinlerin de bulunduğu gösterilmiştir[105]. Sınıf IIb HDAC üyesi olan HDAC6'nın α -tubulin, HSP90 α ve EGFR gibi çeşitli substratları deasetilize ettiği açıklanmıştır[106, 107]. Son yıllarda kromozom remodellingi, hücre siklus arresti, apoptoz ve selüler toksisite üzerine etkili olan HDAC inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [108, 109]. Onkojenik transformasyon ve metastazda rolü olduğu düşünülen HDAC6 ilaç dizaynlarının hedefleri arasındadır [110]. HDAC6 inhibisyonunun melanomda yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini bildiren deneysel çalışmalar mevcuttur [111, 112].

Pan-HDAC inhibitörleri yerine tümör spesifik olan HDAC subtipleri bulunabilirse bu ilaçların klinik yan etkileri de azaltılabilecektir. Diğer kemoterapötik ve immünmodülatör ajanlarla sinerjistik etki oluşturabilecek, toksisitesi daha az olabilecek HDAC inhibitör çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Yukarıda da anlatıldığı gibi melanom ve melanositik lezyonlarda mevcut HDAC çalışmaları daha çok hedefe yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacı ile yapılmıştır. Çalışmamız immünohistokimyasal yöntem ile çok geniş bir melanositik lezyon serisinde HDAC6 ekspresyonunu araştıran ilk çalışmadır. Literatürde yukarıda bahsedildiği gibi HDAC'ın melanom hücrelerinde metastaz yeteneğini artırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle alt tip farklılığı gözetmeksizin hem primer malign lezyonu hem de metastatik lezyonu çalışma kapsamında olan olgular belirlenerek 24 olguluk bir grup oluşturulmuştur. Bu grupta aynı hastaya ait primer

malign lezyonlar (nodüler, akral lentijinöz, yüzeysel yayımlı) ile metastatik lezyonlar (deri, yumuşak doku, lenf nodu) arasında HDAC6 H-skor, HDAC6 nükleer boyanma yüzdesi ve 5- hmC H-skor karşılaştırılmıştır. Aynı hastalara ait metastatik lezyon grubunun, primer malign lezyon grubundan daha yüksek HDAC6 H-skoruna sahip olduğu görülmüştür (p:0.029). Bu bulgu dolaylı olarak melanomda HDAC'ın metastazı kolaylaştırdığını düşündürmektedir. Ancak literatürde iddia edildiği gibi melanom hücrelerinde HDAC'ın invazyon, proliferasyon kapasitesini artırdığına dair bir veri elde edilememiştir. Primer malign lezyonu ve metastazı aynı hastaya ait olan lezyonlardaki sonuçlar HDAC6'nın metastazı kolaylaştırıcı etkileri olabileceğini, HDAC6'yı hedef alan terapötik ajanların melanom tedavisinde faydasının olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu sonuçların farklı ve büyük hasta serilerinde de desteklenmesi faydalı olacaktır.

6. SONUÇLAR

- ❖ Çalışmamızda immünohistokimyasal yöntem ile benign, borderline, primer malign ve metastatik melanositik proliferasyonlarda epigenetik değişiklik belirteçleri 5-hidroksi metil sitozin ve histon deasetilaz-6'nın tanısal değeri ve histopatolojik prognostik parametrelerle ilişkisi araştırılmıştır.
- ❖ HDAC6 antikoru ile 328 vaka, 5- hmC antikoru ile 214 vaka immünohistokimyasal olarak boyanmıştır.
- ❖ Benign lezyonlarda daha fazla ve yoğun 5- hmC ekspresyonu bulunurken, primer malign ve metastatik lezyonlarda parsiyel ya da total kayıp mevcuttur.
- ❖ Dermal nevus; displastik nevustan ve konjenital nevustan daha fazla 5- hmC ekspresyonu göstermektedir.
- ❖ Konjenital nevus, displastik nevusa benzer 5- hmC ekspresyonu sergilemektedir. Konjenital nevusların 5-hmC ekspresyonu açısından displastik nevuslara benzer bir profil sergilemesi konjenital nevusların diğer benign melanositik lezyonlardan biyolojik farklılığını vurgulamaktadır. Konjenital nevusların melanom riskini arttırdığı bilinmektedir. O nedenle konjenital nevuslarda metilasyon mekanizmaları daha ileri çalışmalarla irdelenmelidir.
- ❖ Dermal, displastik, konjenital nevus grupları ayrı ayrı olacak şekilde primer malign grubu ile karşılaştırılmış, 3 grubun da malign olgulardan daha yüksek 5- hmC skoruna sahip olduğu görülmüştür. Hatta dermal nevus-displastik nevus-malign melanom sekansında 5- hmC ekspresyonu progresif olarak azalmaktadır. Bu bulgu metilasyon mekanizmalarındaki bozuklukların melanom patogenezinde oldukça erken aşamalarda meydana gelmeye başladığını düşündürmektedir.
- ❖ Primer malign ve metastaz olguları arasında ve alt tanı grupları arasında 5- hmC farkı bulunmamaktadır.

- ❖ 5-hmC; Breslow kalınlığı, Clark invazyon seviyesi ve mitoz ile negatif korele iken TİL ile pozitif korelasyon göstermektedir. Dolaylı olarak düşünülürse; bu prognostik parametrelerle ilişkisine göre 5- hmC kaybının kötü sağkalımla ilişkili olabileceği sonucu çıkartılabilir.
- ❖ Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre 5- hmC'nin disregülasyonunun melanom patogenezinde erken aşamalarda meydana geldiği düşünülebilir.
- ❖ 5- hmC azlığının sebebi ve sonuçları henüz net olarak bilinmese de 5- hmC melanositik lezyonlarda tanısal ve prognostik değeri olabilecek bir belirteçtir.
- ❖ HDAC6 H-skoru hiçbir prognostik parametre ile ilişkili değildir.
- ❖ HDAC6 ile ilgili olan çalışmalar daha çok HDAC inhıbe edici ajanların in vitro ya da xenograft modelleri üzerine etkileri ile ilgilidir. Çalışmamız immünohistokimyasal yöntem ile çok geniş bir melanositik lezyon serisinde HDAC6 ekspresyonunu araştıran ilk çalışmadır.
- ❖ Primer malign lezyonu ve metastazı aynı hastaya ait olan lezyonlardaki sonuçlar HDAC6'nın metastazı kolaylaştırıcı etkileri olabileceğini, HDAC6'yı hedef alan terapötik ajanların melanom tedavisinde faydasının olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu sonuçların farklı ve büyük hasta serilerinde de desteklenmesi faydalı olacaktır.

ÖZET

Benign ve Malign Melanositik Proliferasyonlarda Epigenetik Değişiklik Belirteçleri 5-Hidroksi Metil Sitozin ve Histon Deasetilaz-6'nın Tanısal Değeri ve Histopatolojik Prognostik Parametrelerle İlişkisi

Amaç: Melanositik deri tümörleri, oldukça çeşitli klinik, histopatolojik ve genetik özelliklere sahip benign ve malign neoplazileri içeren geniş bir spektrumdur. Melanositik lezyonların yorumlanması, benign-malign ayrımı dermatopatolojide sık karşılaşılan zorluklardan bir tanesidir. Çok agresif bir tümör olan malign melanom ile benign melanositik lezyonların ayırıcı tanısında ve bu lezyonların biyolojik davranışlarının tahmininde yararlı olacak güvenilir biyobelirteç eksikliği mevcuttur. Melanomun gelişimi ve ilerlemesinde genetik olayların yanında epigenetik mekanizmalar da rol almaktadır. Çeşitli patolojik ve biyolojik süreçler için önemli bir epigenetik değişiklik olan 5. pozisyonundaki sitozinin metillenmesi ile oluşan anormal DNA metilasyonu son zamanlarda üzerinde oldukça durulan bir mekanizmadır. Kromatin yapısının düzenlenmesinde rol alan diğer bir epigenetik mekanizma histon modifikasyonudur. Histon deasetilazlar (HDAC) ve histon asetil-transferazlar (HAT) birçok hastalıkta gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde rol oynarlar.

Bu çalışmada epigenetik belirteçler olan 5-hmC ve HDAC6 ifadesinin malign, borderline ve benign melanositik lezyonların ayrımında tanısal yararının; primer melanomda histopatolojik prognostik parametreler ile ilişkisinin araştırılması planlanmıştır; ayrıca primer ve metastatik melanomlarda karşılaştırarak, bu epigenetik değişikliklerin tümör progresyonundaki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal Metod: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2005-2018 yılları arasında incelenmiş olan 110 benign (22 dermal nevus, 22 konjenital nevus, 22 displastik nevus, 22 Spitz nevus, 22 mavi nevus), 110 primer malign (24 nodüler melanom, 24 yüzeysel yayımlı melanom, 22 akral lentiginöz melanom, 22 lentigo maligna melanom, 18 özel tip melanom [spitzoid, nevoid, desmoplastik, iğsi hücreli]), 8 borderline melanositik lezyon ve 100 melanom metastazı (30 deri, 30 yumuşak doku, 30 lenf nodu ve 10 visseral metastaz) olgusu

olmak üzere toplam 328 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca bu olgular arasından alt tiplerden bağımsız olarak hem primer lezyonun hem de metastatik lezyonun aynı hastaya ait olduğu 24 olguluk bir grup oluşturulmuştur. Hastaların yaşı, cinsiyeti, lezyon lokalizasyonu not edilerek olgulara ait H-E boyalı kesitler yeniden incelenmiş ve histopatolojik parametreler değerlendirilmiştir. Histopatolojik parametreler primer melanom olgularında Breslow tümör kalınlığı, Clark invazyon seviyesi, mm²’ de mitoz sayısı, ülserasyon, regresyon, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon durumu ve tümör infiltre eden lenfositlerin (TİL) varlığı ve yoğunluğu; benign lezyonlardan displastik nevuslarda atipi derecesi ve tüm lezyonda mitoz sayısı; Spitz nevus ve borderline grubunda ise tüm lezyonda mitoz sayısıdır. İmmünohistokimyasal analizlerde tüm olgularda anti-HDAC6 boyanmasına rağmen, teknik nedenlerden dolayı anti-5-hmC 214 olguya uygulanabilmiş; değerlendirmeler preparatlar dijital olarak taranarak dijital görüntüler üzerinden, boyanma yüzdesi ve şiddetini içeren H-skoru ile yapılmıştır. Verilerin analizi “SPSS version 20” paket programı kullanılarak yapılmış, p<0.05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Tüm olguların yaş ortalaması 49.4’tür (6-92). Olguların %52.1’i (n:171) kadın, %47.9’u (n:157) erkektir. Primer malign ve metastaz ana tanı gruplarının yaş ortalaması benign ve borderline ana tanı gruplarından yüksektir (p<0.05). En küçük yaş ortalaması Spitz nevus olgularına aittir; dermal, displastik ve mavi nevus olgularından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür (p<0.05). Displastik ve konjenital nevuslar gövde, mavi nevuslar ekstremiteler, lentigo maligna melanomlar ağırlıklı olarak baş-boyun yerleşimlidir. Lenf nodu metastazı grubunda en fazla inguinal lenf nodu metastazı, visseral metastaz grubunda ise en çok akciğer metastazı bulunmaktadır. Histopatolojik prognostik parametreler açısından; nodüler melanom, akral lentiginöz melanom hariç, diğer tip melanomlara kıyasla daha fazla Breslow tümör kalınlığına sahiptir (p<0.05). Nodüler melanom, yüzeysel yayımlı melanom, lentigo maligna melanoma ve özel tip melanomlara göre daha fazla mitoz içermektedir (p<0.05). Displastik nevuslarda, atipi derecesi ile mitoz arasında pozitif korelasyon vardır (p<0.05, r:0.497). Lenfovasküler invazyon daha çok nodüler (%20.8) ve akral lentiginöz melanomlarda (%13.6) gözlenirken, perinöral invazyon açısından melanom tipleri arasında farklılık saptanmamıştır. Ülserasyon en sık nodüler (%58.3) ve akral lentiginöz (%36.4) melanomda mevcuttur. Regresyon en

fazla yüzeyel yayımlı melanomdadır (%16.7). Primer melanom grupları arasında TİL açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Epigenetik belirteçlerin analizlerinde benign lezyonlarda daha fazla ve yoğun 5- hmC ekspresyonu bulunurken, primer malign ve metastatik lezyonlarda parsiyel ya da total kayıp mevcuttur. Dermal nevus, displastik nevustan ve konjenital nevustan daha fazla 5- hmC ekspresyonu göstermiştir; konjenital nevus, displastik nevusa benzer 5- hmC ekspresyonu sergilemiştir. Dermal, displastik, konjenital nevus grupları, primer melanom olgularından daha yüksek 5- hmC H-skoruna sahiptir. Primer melanom ve melanom metastazı olguları arasında hem ana gruplarda hem de alt tanı grupları arasında 5- hmC farkı bulunmamaktadır. 5-hmC; Breslow kalınlığı, Clark invazyon seviyesi ve mitoz ile negatif korelasyon, TİL ile pozitif korelasyon göstermiştir. HDAC6 H-skoru ile prognostik parametreler arasında istatistiksel anlamlı düzeyde ilişki saptanmamıştır. Primeri ve metastazlarının aynı hastaya ait olduğu grupta metastatik lezyonlarda daha yüksek HDAC6 ekspresyonu saptanmış; 5-hmC ekspresyonu farklılık göstermemiştir.

Sonuç: Bu çalışmada elde edilen bulgular 5- hmC'nin disregülasyonunun melanom patogenezinde erken aşamalarda meydana geldiğini ve benign ve malign melanositik lezyonlarda faydalı bir tanısal ve prognostik marker olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca konjenital nevusların 5-hmC ekspresyonu açısından displastik nevuslara benzer bir profil sergilemesi konjenital nevusların diğer benign melanositik lezyonlardan biyolojik farklılığını vurgulamaktadır. Çalışma immünohistokimyasal yöntem ile çok geniş bir melanositik lezyon serisinde parafin takipli insan dokularında HDAC6 ekspresyonunu araştıran ilk çalışmadır. Primer malign lezyonu ve metastazı aynı hastaya ait olan lezyonlardaki sonuçlar HDAC6'nın metastazı kolaylaştırıcı etkileri olabileceğini, HDAC6'yı hedef alan terapötik ajanların melanom tedavisinde faydasının olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu sonuçların farklı ve büyük hasta serilerinde de desteklenmesi faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler: melanositik lezyonlar, prognostik histopatolojik parametreler, epigenetik belirteçler, 5-hidroksi metil sitozin (5-hmC), histon deasetilaz (HDAC6)

SUMMARY

Diagnostic value of epigenetic biomarkers, 5-hydroxy methyl cytosine and histone deacetylase-6 and the relationship with histopathological parameters in benign and malignant melanocytic proliferations

Aim: Melanocytic skin tumors show a broad spectrum including benign and malignant neoplasms with a wide variety of clinical, histopathological and genetic features. Interpretation of melanocytic lesions is one of the most common difficulties in dermatopathology. Malignant melanoma is the most aggressive form of skin cancer which shows high metastatic capacity, rapid progression and high mortality. There is lack of a reliable biomarker which can be useful in the differential diagnosis of malignant melanocytic lesions which is almost the most aggressive form of skin cancer and benign ones and also can be useful in predicting the biological behavior of these lesions. In addition to genetic events, epigenetic mechanisms also play a role in the development and progress of melanoma. Abnormal DNA methylation, formed by the methylation of the cytosine in position 5, an important epigenetic change for various pathological and biological processes, is a mechanism that has been recently elaborated on. Another epigenetic mechanism involved in the regulation of chromatin structure is histone modification. Histone deacetylases (HDAC) and histone acetyltransferases (HAT) play a role in the epigenetic regulation of gene expression in many diseases.

The aim of this study is, to investigate the diagnostic utility of epigenetic markers, 5-hmC and HDAC6 in distinguishing malignant, borderline and benign melanocytic lesions; to analyze the relationship between these epigenetic markers and histopathological prognostic parameters in primary melanoma; and to compare the role of these epigenetic changes in tumor progression by comparing them between primary and metastatic melanomas.

Material and method: 110 benign (22 dermal nevus, 22 congenital nevi, 22 dysplastic nevi, 22 Spitz nevi, 22 blue nevi), 110 primary malign melanoma (24 nodular melanomas, 24 superficial spreading melanomas, 22 acral lentiginous melanomas, 22 lentiginous maligna melanomas, 18 special types of melanomas

[spitzoid, nevoid, desmoplastic, spindle cell]), 8 borderline melanocytic lesions and 100 melanoma metastases (30 skin, 30 soft tissue, 30 lymph nodes and 10 visceral metastases) were included in the study, and a group of 24 patients with both primary lesions and metastatic lesions were included in the study, independently of the subtypes. Besides age and sex of the patients, localisation of the lesions were noted; H-E stained sections of the cases were reexamined and histopathological parameters were evaluated. Histopathological parameters were Breslow tumor thickness, Clark level, number of mitosis per mm², presence or absence of ulceration, regression, lymphovascular invasion and perineural invasion, presence and density of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in primary malignant melanoma cases; degree of atypia in dysplastic nevi and number of mitosis for whole lesion in both dysplastic nevi, Spitz nevi and borderline lesions. In immunohistochemical analyzes, anti-HDAC6 antibody could be applied to all cases, but due to technical reasons anti-5-hMC antibody could be applied to the 214 cases; evaluations were made on digital images by digitally scanned slides with the H-score which includes the percentage and density of staining. The analysis of the data was made using the "SPSS version 20" package program and the results for $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results: The mean age of all cases is 49.4 years (6-92). 52.1% (n: 171) of the cases were female and 47.9% (n: 157) were male. The mean age of the primary malignant and metastatic diagnosis groups was higher than the borderline and benign diagnostic groups ($p < 0.05$). The youngest average age was found in Spitz nevus cases, which were statistically significantly lower than dermal, dysplastic and blue nevus cases ($p < 0.05$). Dysplastic and congenital nevi were located preferentially on trunk; blue nevi were found on extremities and lentigo malignant melanomas were on head and neck region. The most common metastized lymph node region was inguinal lymph nodes in the lymph node metastasis group and lung metastasis was the most frequent among visceral metastasis group. Among histopathologic prognostic parameters; nodular melanomas were found to have higher Breslow tumor thickness than other types of melanomas except acral lentiginous melanoma ($p < 0.05$). It was found that nodular melanomas have more mitosis than all of the superficial spreading melanomas, lentigo malignant melanomas and special type

melanomas ($p < 0.05$). There was a positive correlation between degree of atypia and mitosis in dysplastic nevi ($p < 0.05$, $r: 0.497$). Lymphovascular invasion was more frequent in nodular (20.8%) and acral lentiginous melanomas (13.6%), whereas there was no difference between primary melanoma subtypes according to perineural invasion. Ulceration was present more frequent in nodular (58.3%) and acral lentiginous melanomas (36.4%). Regression was found highest in superficial spreading melanoma (16.7%). There was no statistically significant difference between primary melanoma subtypes according to TILs.

In epigenetic marker analysis, benign lesions showed more and intense 5-hmC expression, while partial or total loss was found in primary malignant and metastatic melanomas. Dermal nevi showed more 5-hmC expression than dysplastic and congenital nevi; congenital nevi exhibited 5-hmC expression similar to dysplastic nevi. Dermal, dysplastic and congenital nevi had higher 5-hmC H-scores than primary melanoma and metastatic melanoma cases. There was no difference between primary malignant and metastatic cases and also between their subdiagnostic groups according to 5-hmC expression. In primary melanoma cases, H-scores of 5-hmC was correlated negatively with Breslow thickness, Clark level, mitosis and was correlated positively with TIL. In primary melanoma, benign melanocytic proliferation and borderline lesion groups, the HDAC6 H-score was not found to be related with any prognostic parameter statistically. Higher HDAC6 expression was higher in metastatic lesions in the group in which the primary and metastases were from the same patient; but 5-hmC showed no difference.

Conclusion: The results of our study, suggesting that dysregulation of 5-hmC may be occurring early in the pathogenesis of melanoma and 5-hmC may be a diagnostic and prognostic valuable marker in melanocytic lesions. In terms of similar expression profile of 5-hmC in congenital nevi to dysplastic nevi emphasizes the biological differences of congenital nevi from other benign melanocytic lesions. This is the first study which investigates HDAC6 expression in paraffin-embedded human tissues in a wide range of melanocytic lesions by immunohistochemical method. The results of the group which includes primary and metastatic lesions of same patients suggested that HDAC6 has promoting effects on melanoma metastasis and also therapeutic agents targeting HDAC6 may be beneficial in the treatment of

melanoma. However, it would be beneficial to support these results in different and large patient series.

Key words: melanocytic lesions, prognostik histopathological parameters, epigenetic markers, 5-hydroxy methyl cytosine (5-hmC), hyston deacetylase-6 (HDAC6)

KAYNAKLAR

1. Manzano, J.L., et al., *Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma*. Annals of translational medicine, 2016. **4**(12).
2. Liu, J., et al., *Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells*. J Transl Med, 2016. **14**: p. 7.
3. Lian, C.G., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1135-46.
4. Junqueira, L.C.U. and J. Carneiro, *Basic Histology: Text & Atlas*. 2003: Lange Medical Books, McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
5. Elder, D.E. and W. Lever, *Lever's histopathology of the skin*. 2015, Philadelphia [u.a.]: Wolters Kluwer.
6. Mills, S.E., *Histology for Pathologists*. 2012: Wolters Kluwer Health.
7. Cichorek, M., et al., *Skin melanocytes: biology and development*. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii, 2013. **30**(1): p. 30.
8. Barnhill, R.L., M.W. Piepkorn, and K.J. Busam, *Pathology of Melanocytic Nevi and Melanoma*. 2014: Springer Berlin Heidelberg.
9. Moore, K.L., T.V.N. Persaud, and M.G. Torchia, *The Developing Human E-Book: Clinically Oriented Embryology*. 2015: Elsevier Health Sciences.
10. LeBoit, P.E., *Pathology and Genetics of Skin Tumours*. 2006: IARC Press.
11. Patterson, J.W., *Weedon's Skin Pathology E-Book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
12. Urso, C., et al., *Histological features used in the diagnosis of melanoma are frequently found in benign melanocytic naevi*. Journal of clinical pathology, 2005. **58**(4): p. 409-412.

13. Wanebo, H.J., J. Woodruff, and J.G. Fortner, *Malignant melanoma of the extremities: a clinicopathologic study using levels of invasion (microstage)*. Cancer, 1975. **35**(3): p. 666-676.
14. Thelmo, M.C., et al., *Evaluation of sentinel lymph node status in spindle cell melanomas*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2001. **44**(3): p. 451-455.
15. Zubovits, J., et al., *HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma*. Human pathology, 2004. **35**(2): p. 217-223.
16. Amin, M.B., et al., *AJCC cancer staging manual*. 2017.
17. Barth, A., L.A. Wanek, and D.L. Morton, *Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases*. Journal of the American College of Surgeons, 1995. **181**(3): p. 193-201.
18. Lee, J.J., G.F. Murphy, and C.G. Lian, *Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines*. Lab Invest, 2014. **94**(8): p. 822-38.
19. Aran, D., et al., *Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes*. Human molecular genetics, 2010. **20**(4): p. 670-680.
20. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-257.
21. Kroeze, L.I., B.A. van der Reijden, and J.H. Jansen, *5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2015. **1855**(2): p. 144-154.
22. Ooi, S.K., A.H. O'Donnell, and T.H. Bestor, *Mammalian cytosine methylation at a glance*. Journal of cell science, 2009. **122**(16): p. 2787-2791.
23. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends in biochemical sciences, 2006. **31**(2): p. 89-97.
24. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-935.

25. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1300-1303.
26. Maiti, A. and A.C. Drohat, *Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine potential implications for active demethylation of CpG sites*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(41): p. 35334-35338.
27. Pfeifer, G.P., S. Kadam, and S.-G. Jin, *5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer*. Epigenetics & chromatin, 2013. **6**(1): p. 10.
28. Jin, S.-G., S. Kadam, and G.P. Pfeifer, *Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine*. Nucleic acids research, 2010. **38**(11): p. e125-e125.
29. Frauer, C., et al., *Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain*. PloS one, 2011. **6**(6): p. e21306.
30. Yildirim, O., et al., *Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells*. cell, 2011. **147**(7): p. 1498-1510.
31. Mellén, M., et al., *MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system*. Cell, 2012. **151**(7): p. 1417-1430.
32. Lian, C.G., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1135-1146.
33. Tsai, K.-W., et al., *Reduction of global 5-hydroxymethylcytosine is a poor prognostic factor in breast cancer patients, especially for an ER/PR-negative subtype*. Breast cancer research and treatment, 2015. **153**(1): p. 219-234.
34. Strand, S.H., et al., *High levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is an adverse predictor of biochemical recurrence after prostatectomy in ERG-negative prostate cancer*. Clinical epigenetics, 2015. **7**(1): p. 111.

35. Du, C., et al., *Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer*. Gastric cancer, 2015. **18**(3): p. 516-525.
36. Liu, W.-R., et al., *High expression of 5-hydroxymethylcytosine and isocitrate dehydrogenase 2 is associated with favorable prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2014. **33**(1): p. 32.
37. Chen, K., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer*. Cell research, 2016. **26**(1): p. 103.
38. Orr, B.A., et al., *Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma*. PloS one, 2012. **7**(7): p. e41036.
39. Zhang, L.-y., et al., *Prognostic values of 5-hmC, 5-mC and TET2 in epithelial ovarian cancer*. Archives of gynecology and obstetrics, 2015. **292**(4): p. 891-897.
40. Larson, A.R., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine correlates with increasing morphologic dysplasia in melanocytic tumors*. Mod Pathol, 2014. **27**(7): p. 936-44.
41. Gambichler, T., M. Sand, and M. Skrygan, *Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma*. Melanoma Res, 2013. **23**(3): p. 218-20.
42. Lee, J.J., et al., *5-Hydroxymethylcytosine expression in metastatic melanoma versus nodal nevus in sentinel lymph node biopsies*. Mod Pathol, 2015. **28**(2): p. 218-29.
43. Rodic, N., et al., *Diagnostic utility of 5-hydroxymethylcytosine immunohistochemistry in melanocytic proliferations*. J Cutan Pathol, 2015. **42**(11): p. 807-14.
44. Lee, J.J., et al., *Loss of the epigenetic mark, 5-Hydroxymethylcytosine, correlates with small cell/nevoid subpopulations and assists in microstaging of human melanoma*. Oncotarget, 2015. **6**(35): p. 37995-8004.

45. Cheung, W.L., S.D. Briggs, and C.D. Allis, *Acetylation and chromosomal functions*. Current opinion in cell biology, 2000. **12**(3): p. 326-333.
46. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature, 1997. **389**(6649): p. 349.
47. Shahbazian, M.D. and M. Grunstein, *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*. Annu. Rev. Biochem., 2007. **76**: p. 75-100.
48. Ruthenburg, A.J., et al., *Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(12): p. 983.
49. Kouzarides, T., *Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?* The EMBO journal, 2000. **19**(6): p. 1176-1179.
50. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(1): p. 32.
51. Parbin, S., et al., *Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2014. **62**(1): p. 11-33.
52. Seto, E. and M. Yoshida, *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2014. **6**(4): p. a018713.
53. Yoon, S. and G.H. Eom, *HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases*. Chonnam medical journal, 2016. **52**(1): p. 1-11.
54. Eom, G.H. and H. Kook, *Posttranslational modifications of histone deacetylases: implications for cardiovascular diseases*. Pharmacology & therapeutics, 2014. **143**(2): p. 168-180.
55. Choi, J.H., et al., *Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues*. Cancer science, 2001. **92**(12): p. 1300-1304.
56. Wilson, A.J., et al., *Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in*

- human colon cancer*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(19): p. 13548-13558.
57. Halkidou, K., et al., *Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer*. The Prostate, 2004. **59**(2): p. 177-189.
 58. Zhang, Z., et al., *Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. Breast cancer research and treatment, 2005. **94**(1): p. 11-16.
 59. Huang, B., et al., *Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21 Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1*. Cell death and differentiation, 2005. **12**(4): p. 395.
 60. Song, J., et al., *Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer*. Apmis, 2005. **113**(4): p. 264-268.
 61. Zhu, P., et al., *Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis*. Cancer cell, 2004. **5**(5): p. 455-463.
 62. Zhang, Z., et al., *HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(20): p. 6962-6968.
 63. Hornig, E., et al., *Inhibition of histone deacetylases in melanoma—a perspective from bench to bedside*. Experimental dermatology, 2016. **25**(11): p. 831-838.
 64. Woan, K.V., et al., *Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation*. Mol Oncol, 2015. **9**(7): p. 1447-1457.
 65. Seigneurin-Berny, D., et al., *Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(23): p. 8035-8044.
 66. Yang, X.-J. and E. Seto, *The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(3): p. 206.

67. Zhang, X., et al., *HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin*. Molecular cell, 2007. **27**(2): p. 197-213.
68. Zhang, Y., et al., *HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo*. The EMBO journal, 2003. **22**(5): p. 1168-1179.
69. Kovacs, J.J., et al., *HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor*. Molecular cell, 2005. **18**(5): p. 601-607.
70. Yoshida, N., et al., *Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes*. Cancer science, 2004. **95**(6): p. 496-502.
71. Rodriguez-Gonzalez, A., et al., *Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation*. Cancer research, 2008. **68**(8): p. 2557-2560.
72. Balliu, M., et al., *HDAC-inhibitor (S)-8 disrupts HDAC6-PP1 complex prompting A375 melanoma cell growth arrest and apoptosis*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(1): p. 143-54.
73. Woods, D.M., et al., *HDAC inhibition upregulates PD-1 ligands in melanoma and augments immunotherapy with PD-1 blockade*. Cancer immunology research, 2015. **3**(12): p. 1375-1385.
74. Lisiero, D.N., et al., *The histone deacetylase inhibitor, LBH589, promotes the systemic cytokine and effector responses of adoptively transferred CD8⁺ T cells*. Journal for immunotherapy of cancer, 2014. **2**(1): p. 8.
75. Vo, D.D., et al., *Enhanced antitumor activity induced by adoptive T-cell transfer and adjunctive use of the histone deacetylase inhibitor LAQ824*. Cancer research, 2009. **69**(22): p. 8693-8699.
76. Woods, D.M., et al., *The anti-melanoma activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) is mediated by direct tumor cytotoxicity and increased tumor immunogenicity*. Melanoma research, 2013. **23**(5): p. 341.

77. Valentini, A., et al., *Valproic acid induces apoptosis, p16INK4A upregulation and sensitization to chemotherapy in human melanoma cells*. Cancer biology & therapy, 2007. **6**(2): p. 185-191.
78. Peltonen, K., et al., *Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2005. **18**(3): p. 196-202.
79. Lai, F., et al., *Histone deacetylases (HDACs) as mediators of resistance to apoptosis in melanoma and as targets for combination therapy with selective BRAF inhibitors*, in *Advances in pharmacology*. 2012, Elsevier. p. 27-43.
80. Hohenauer, T., et al., *The neural crest transcription factor Brn3a is expressed in melanoma and required for cell cycle progression and survival*. EMBO molecular medicine, 2013. **5**(6): p. 919-934.
81. Liu, Y., et al., *Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(34): p. 29168-29174.
82. Busam, K.J., *Dermatopathology E-Book: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology*. 2009: Elsevier Health Sciences.
83. Sarkar, D., et al., *Epigenetic regulation in human melanoma: past and future*. Epigenetics, 2015. **10**(2): p. 103-121.
84. Lee, J.J., et al., *5-Hydroxymethylcytosine is a nuclear biomarker to assess biological potential in histologically ambiguous heavily pigmented melanocytic neoplasms*. J Cutan Pathol, 2017. **44**(3): p. 249-255.
85. Uchiyama, R., et al., *5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi*. Journal of dermatological science, 2014. **73**(2): p. 161-163.
86. Pavlova, O., S. Fraitag, and D. Hohl, *5-Hydroxymethylcytosine Expression in Proliferative Nodules Arising within Congenital Nevi Allows Differentiation from Malignant Melanoma*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(12): p. 2453-2461.

87. Tannous, Z.S., et al., *Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2005. **52**(2): p. 197-203.
88. Saldanha, G., et al., *5-Hydroxymethylcytosine is an independent predictor of survival in malignant melanoma*. Mod Pathol, 2017. **30**(1): p. 60-68.
89. Micevic, G., et al., *Attenuation of genome-wide 5-methylcytosine level is an epigenetic feature of cutaneous malignant melanomas*. Melanoma Res, 2017. **27**(2): p. 85-96.
90. Li, E. and Y. Zhang, *DNA methylation in mammals*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2014. **6**(5): p. a019133.
91. Howard, G., et al., *Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice*. Oncogene, 2008. **27**(3): p. 404.
92. Toyota, M., et al., *Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification*. Cancer research, 1999. **59**(10): p. 2307-2312.
93. Little, M. and B. Wainwright, *Methylation and p16: suppressing the suppressor*. Nature medicine, 1995. **1**(7): p. 633.
94. Kuzmin, I., et al., *Analysis of aberrant methylation of the VHL gene by transgenes, monochromosome transfer, and cell fusion*. Oncogene, 1999. **18**(41): p. 5672.
95. Greger, V., et al., *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. Human genetics, 1989. **83**(2): p. 155-158.
96. Dobrovic, A. and D. Simpfendorfer, *Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer*. Cancer research, 1997. **57**(16): p. 3347-3350.
97. Gao, Q., et al., *Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(44): p. 18061-18066.

98. Raddatz, G., et al., *Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation*. PLoS genetics, 2012. **8**(12): p. e1003146.
99. Mudbhary, R., et al., *UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma*. Cancer cell, 2014. **25**(2): p. 196-209.
100. Peng, Y., et al., *The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate inhibits baculovirus-mediated transgene expression in Sf9 cells*. Journal of biotechnology, 2007. **131**(2): p. 180-187.
101. Kuwajima, A., et al., *The histone deacetylase inhibitor butyrate inhibits melanoma cell invasion of Matrigel*. Anticancer research, 2007. **27**(6B): p. 4163-4169.
102. Munshi, A., et al., *Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(13): p. 4912-4922.
103. Lienlaf, M., et al., *Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma*. Molecular oncology, 2016. **10**(5): p. 735-750.
104. Liu, J., et al., *HDAC6 interacts with PTPN1 to enhance melanoma cells progression*. Biochemical and biophysical research communications, 2017.
105. Choudhary, C., et al., *Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions*. Science, 2009. **325**(5942): p. 834-840.
106. Seidel, C., et al., *Histone deacetylase 6 in health and disease*. Epigenomics, 2015. **7**(1): p. 103-118.
107. Krämer, O.H., S. Mahboobi, and A. Sellmer, *Drugging the HDAC6–HSP90 interplay in malignant cells*. Trends in pharmacological sciences, 2014. **35**(10): p. 501-509.
108. Qu, K., et al., *Chromatin Accessibility Landscape of Cutaneous T Cell Lymphoma and Dynamic Response to HDAC Inhibitors*. Cancer cell, 2017. **32**(1): p. 27-41. e4.
109. Clawson, G.A., *Histone deacetylase inhibitors as cancer therapeutics*. Annals of translational medicine, 2016. **4**(15).

110. Hai, Y. and D.W. Christianson, *Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition*. Nature chemical biology, 2016. **12**(9): p. 741.
111. Bergman, J.A., et al., *Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth*. Journal of medicinal chemistry, 2012. **55**(22): p. 9891-9899.
112. Bai, J., et al., *Down-regulation of deacetylase HDAC6 inhibits the melanoma cell line A375. S2 growth through ROS-dependent mitochondrial pathway*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121247.

