

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZ ÜNİVERSİTESİ
SALIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**MALİGN MELANOM OLGULARINDA MOLEKÜLER
SİTOGENETİK ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVGİ İK

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

OCAK 2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sevgi IŞIK' ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Malign Melanom Olgularında Moleküler Sitogenetik Çalışmalar " başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

23.01.2014

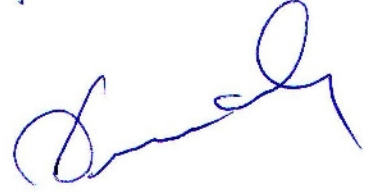
Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



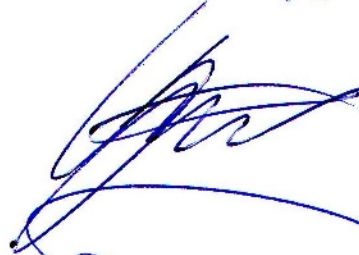
Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Hüseyin ASLAN



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.01.2014 tarih ve 987/4585 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr.Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

G R : Melanositler melanin üreten hücreler olup, bu hücrelerin malign de i imi ile malign melanom olu ur. Dünya sa lık örgütüne göre her yıl 132000 yeni tanı malign melanom vardır ve bu sayının, ozon tabakasının UV'ye kar ı koruma özelli i azaldıkça artaca ı dü ünülmektedir.

AMAÇ: Malign melanom ve melanositik nevüslerin histopatolojik olarak ayırımını yapmakta bazı zorluklar söz konusu olup, bazen tanı a amasında kararsızlık ya anmaktadır. Biz çalı mamızda malign ve benign olgular arasındaki genetik de i iklikleri ortaya koyarak, klinikte tanı, tedavi ve takip süreçlerinde FISH yönteminin etkisini göstermeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM: Histopatolojik olarak tanı konmu 18 malign melanom ve 24 melanositik nevüs olgusuna ait, deparafinize edilmi doku preparatları, FISH yöntemi ile, CCND1, MYB, RREB1, ve sentromer 6 bölgelerine ili kin problemler kullanılarak, kopya sayısı de i iklikleri incelenmi tir.

BULGULAR: Elde etti imiz sonuçlara göre 18 melanom olgusundan 15'inde (%83,33) aberasyon saptanmı olup, 5 olguda en az iki aberasyon gözlenmi tir. Melanositik olgulardan 20 tanesi normal olup, geriye kalan 4 olgudan 3'ünde sadece bir aberasyon pozitif de erlendirilirken, geriye kalan bir olguda üç aberasyon gözlenmi tir.

SONUÇ VE TARTI MA: Malign melanom olgularında en fazla CCND1 ve RREB1 gen amplifikasyonları (%44,44) gözlenmi tir. Malign melanom ve melanositik nevüs olgularında elde etti imiz sonuçları kar ıla tırdı mızda CCND1, RREB1 ve RREB1/CEP6 açısından anlamlı sonuçlar elde edilmi , ancak MYB gen delesyonu için istatistiksel olarak anlamlı sonuç alınamamı tır. Elde etti imiz sonuçlara göre, MYB delesyonu haricinde saptanan di er aberasyonlar ayırıcı tanı kriteri olarak kullanılabilce ini ve FISH analizi ile aberasyon saptanan melanositik nevüs olgularının, malign melanomla ayırımının histopatolojik yöntemlerle zor yapılması ve malign melanoma öncül olmalarından dolayı, bu örneklerin patologlar tarafından tekrar de erlendirilmesi gerekti ini dü ünülmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Malign melanom, melanositik nevüs, FISH

SUMMARY

BACKGROUND: Melanosits are cells which generating melanine and if these cells have malign mutation, they cause to Malign Melanom. World Health Organization says there are 132000 new diognasis malignant melanoma determined every year and the rate going to increase because of decareasing of UV protection of Ozone.

A M: There is instability between pathologists sometimes, because of some kind of difficulties of histopathologic discrimination between malignant melanoma and melanocytic nevi. Thinking of using FISH at diagnosis of malignant melanoma is useful, we purposed to analyze copy number alterations cases of malignant melanoma, and melanocytic nevi by FISH.

METHODS: We analized 42 preparat deparaffined, included cases of 18 malignant melanoma, and 24 melanocytic nevi by FISH targeting CCND1, MYB, RREB1, CEP6 region.

RESULTS: As results of our study, 15 cases of malignant melanoma (%83,33) shown copy number alterations. Five cases of them have least two abnormalities. On the other hand, of 24 melanocytic nevi cases 20 have no aberations, but one of four cases shown abnormalities about 3 criters, and remained 3 cases have only single aberations.

CONCLUSION: RREB1 ve CCND1 gene amplifications were the most frequent abnormalities (%44,44) among our study. We compared the results of malignant melanoma and melanocytic nevi, and obtained significant inequality for CCND1, RREB1 and RREB1/CEP6 criters. Although result of MYB gene deletion was no statistically significant. The cases with melanocytic nevi shown pozitif results by FISH were diagnosed with properties similiar to malignant melanoma as histopathologically and these subtype may turn into malignant melanoma, so we support these cases must re-analyzed by patologists.

Key Word: Malignant melanoma, melanocytic nevi, FISH

Ç NDEK LER

ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
Ç NDEK LER.....	VI
TABLolar D Z N	X
EK LLER D Z N	XII
S MGE VE KISALTMALAR D Z N	XIV

1. G R VE AMAÇ.....	1
2. GENEL B LG	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Kanser türleri.....	3
2.3. Melanositik Proliferasyonlar.....	3
2.3.1. Melanositik nevüsler.....	5
2.3.1.1. Junctional (lentijinöz) nevüs.....	6
2.3.1.2. Bile ik (kom pound) nevüs.....	7
2.3.1.3. Dermal melanositik nevüs.....	7
2.3.1.4. Displastik nevüs.....	7
2.3.2. Malign melanoma.....	8
2.3.2.1. Malign melanoma alt tipleri.....	9
2.3.2.1.1. Yüzeyel yayılan malign melanoma.....	10
2.3.2.1.2. Lentigo malign melanom.....	11
2.3.2.1.3. Nodüler malign melanom.....	11
2.3.2.1.4. Akral Lentijinöz malign melanom.....	11
2.3.3. Malign melanom ve melanositik nevüslerin histopatolojik farkları...	12

2.4. Melanom ve Genetik.....	13
2.4.1. RAS yola ı ve melanom.....	13
2.4.2. BRAF ve melanom.....	15
2.4.3. MEK ve melanom.....	15
2.4.4. KIT ve melanom.....	15
2.4.5. PI3K/AKT/mTOR yola ı ve melanom.....	16
2.4.6. CDKN2A, P53 ve melanom.....	17
2.5. Melanom ve FISH	18
2.6. Ras- Responsive Element Binding Protein 1 (RREB1).....	19
2.7. MYB v-MYB Avian Melanoblastosis Viral Onkogene Homolog.....	19
2.8. Siklin D1 (CCND1).....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç.....	21
3.1.1. Ara tırma grubu bireyleri.....	21
3.1.2. Kullanılan araçlar.....	21
3.1.3. Kullanılan cam malzemeler.....	22
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.1.5. Kullanılan problemler.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Materyal alımı.....	23
3.2.2. FISH analizi.....	23
3.2.2.1. FISH tekni inin uygulanması.....	23
3.2.2.1.1. Preparatların ön yıkanması ve denatürasyonu.....	23

3.2.2.1.2. Prob denatürasyonu.....	24
3.2.2.1.3. Hibridizasyon.....	24
3.2.2.1.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar.....	24
3.2.2.1.5. Hibridize olan bölgelerin görünür kılınması.....	24
3.2.2.1.6. Preparatların mikroskopta incelenmesi.....	25
3.2.2.1.7. De erlendirme.....	25
3.2.2.1.8. Kullanılan stok solüsyonlar.....	26
3.3. statiksel De erlendirme.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. FISH Analiz Sonuçları.....	28
4.1.1. CCND1 gen bölgesi için FISH sonuçları.....	34
4.1.2. MYB gen bölgesi için FISH sonuçları.....	37
4.1.3. RREB1 gen bölgesi için FISH sonuçları.....	40
4.1.4. RREB1/CEP6 kriteri için FISH sonuçları.....	43
4.2. statiksel De erlendirme Sonuçları.....	47
5. TARTI MA.....	48
5.1. Olgularda Aberasyon Görülme Oranlarının Kar ıla tırılması ve FISH	
Etkinli inin De erlendirilmesi.....	48
5.2. Melanom Olgularında RREB1 ve RREB1/CEP6 Yeniden Düzenlenme	
Oranlarının Kar ıla tırılması	53
5.3. Melanom Olgularında MYB Yeniden Düzenlenmelerinin Görülme Oranlarının	
Kar ıla tırılması.....	54

5.4. Melanom Olgularında CCND1 Yeniden Düzenlenme Oranlarının

Karşılaştırılması..... 55

6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 57

7. KAYNAKLAR..... 59

TABLolar D Z N

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Melanositik nevüslerin sınıflandırılması (WHO 2002).....	4
Tablo 2.2. Malign melanomların sınıflandırılması (WHO 2002)	5
Tablo 2.3. Melanosit, benign ve melanom hücre özelliklerinin karşılaştırılması.....	13
Tablo 3.1. Carnoy's fiksatif solüsyonu.....	26
Tablo 3.2. Preparatları ön yıkama solüsyonu.....	26
Tablo 3.3. Preparatların denatürasyon solüsyonu.....	26
Tablo 3.4. Hibridizasyon sonrası kullanılan solüsyonlar	26
Tablo 3.5. Görüntüleme sistemi solüsyonu	27
Tablo 4.1. Malign melanom olgularına ait cinsiyet, yaş ve tanı bilgileri	29
Tablo 4.2. Melanositik nevüs olgularına ait cinsiyet, yaş ve tanı bilgileri	30
Tablo 4.3. Malign melanom olgularına ait FISH sonuçları.....	31
Tablo 4.4. Melanositik nevüs olgularına ait FISH sonuçları	32
Tablo 4.5. Malign melanom ve melanositik nevüs olgularının CCND1 gen bölgesi açısından FISH sonuçları.....	35

TABLULAR D Z N (devam ediyor)

Tablo 4.6 Malign melanom ve melanositik nevüs olgularının MYB gen bölgesi açısından FISH sonuçları	38
Tablo 4.7 Malign melanom ve melanositik nevüs olgularına ait RREB1 gen bölgesi açısından FISH sonuçları.....	41
Tablo 4.8 Malign melanom ve melanositik nevüs olguları için RREB1/CEP6 için FISH sonuçları	44
Tablo 5.1. Bulgularımızın literatür bilgileri ile karşılaştırılması	52

EK LLER D Z N

ekil	Sayfa
ekil 2.1. Deri kanseri çe itleri ve sıklıkları	8
ekil 2.2. Amerika Birle ik Devletlerindeki Yıllık Tüm Kanser nsidansı	9
ekil 2.3. Malign melanomun cinsiyete göre vücutta da ılımı	10
ekil 2.4. Ras sinyal iletim yola ı	14
ekil 2.5. PTEN, PI3K/AKT yola ı	17
ekil 4.1. CCND1, MYB, RREB1 ve CEP6 bölgeleri için normal sinyal paternine sahip olan olgu 38'in FISH görüntüsü	34
ekil 4.2 CCND1 gen bölgesi için amplifikasyon saptanan, RREB1, MYB ve CEP6 bölgeleri normal gözlenen olgu 5'e ait FISH görüntüsü	37
ekil 4.3. MYB gen bölgesinde delesyon, CCND1, RREB1 ve CEP6 bölgelerinde normal sinyal paterni gözlenen olgu 17'ye ait FISH görüntüsü	40
ekil 4.4. CCND1, MYB genleri ve CEP6 için normal sinyal paterni, RREB1 geni amplifikasyonu gözlenen olgu 1'in FISH görüntüleri	43
ekil 4.5. MYB ve CEP6 sinyalleri açısından normal, CCND1, RREB1/CEP6, RREB1 amplifikasyonu için pozitif de erlendirilen olgu 8'e ait FISH görüntüsü	46
ekil 4.6. CCND1, RREB1, RREB1/CEP6 amplifikasyonu ve MYB delesyonu pozitif gözlenen olgu 16'ya ait FISH görüntüsü	46

ekil 4.7. Malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında CCND1, MYB, RREB1 ve RREB1/CEP6 aberasyonlarının görülme oranlarının karşılaştırılması..... 47

S İMGE VE KISATMALAR DİZİNİ

S İMGELER

AÇIKLAMA

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
DAPI	4' 6' – diamino-2-fenilindol
PBS	Phosphate Buffered Saline
SSC	Saline-Sodium Citrate
CEP	Sentromer
GTP	Guanin tri Fosfat
GDP	Guanin di Fosfat
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
MAP	Mitogen-activated protein kinases
CCND1	Siklin D1
MYB	V-MYB Avian Myeloblastosis Viral Onkogene Homolog
RREB1	Ras Responsive Element Binding Protein 1
CT	Kalsitonin

1. G R ve AMAÇ

Melanosit hücrelerinden köken alan malign melanom, kanser türleri arasında insidansı ve mortalitesi en yüksek olan kanser türüdür. Her ya ta görülebilece i gibi ilerleyen ya larda görülme sıklı ı artmaktadır.

Melanositik lezyonlar, malign melanom ve melanositik nevüsler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu iki grupta kendi içlerinde gruplara ayrılır ve her birinin histopatolojik özellikleri farklıdır. Ancak, bu farklılıklara ra men sadece histopatolojik yöntemlerle tanı konulmasının, lezyonun benign veya malign karakter açısından ayrımının yapılmasının zor oldu u bilinmektedir.

Çalı mamızda, malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasındaki genetik de i ikliklerin FISH yöntemi ile ortaya konulmasını ve benign ve malign lezyonların ayrımının yapılmasında FISH yönteminin etkinli ini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL B LG LER

Kanser sık görülen ve ciddi bir hastalıktır. istatistiksel çalı malara göre toplumların yüzde üçte birinden fazlasında kanser görülmektedir ve ölümlerin yüzde yirmiden fazlasına kanser sebep olmaktadır (37). Her yıl Dünya’da on iki milyondan fazla kanser görülmekte olup, kanserin sebep oldu u ölümler yedi milyondan fazladır. Böyle devam etmesi halinde 2030 yılında her yıl kanserden ölen sayısı 13 milyona, her yıl görülen yeni kanser sayısı 21 milyona ula acaktır (21).

2.1. Kanser

Kanser çok hücreli organizmalarda hücrenin ço alması, farklılaşması ve sa kalımını kontrol eden mekanizmaların bozulmasından kaynaklanan bir hastalıktır. Bu sebeple kanserin özellikle moleküler ve hücresel düzeyde incelenmesi gerekir (8).

Kanser klonal geli im göstermekte olup, tümörler anormal ço almaya ba layan bir tek hücreden geli ir. Tümörün klonal özellik gösteriyor olması, ba langıçtaki anormal hücrenin, kanserli bir hücrenin tüm özelliklerini taşıdığı anlamına gelmez. Kanser geli imi birbirini izleyen çok a amalı bir süreçtir. Bir tek hücrede meydana gelen genetik de i iklik sonucu hücrenin anormal ço almaya ba lamasıyla tümör oluşumu ba lar. Tümörün ilerlemesi ise bu ço alan hücrelerde yeni mutasyonların meydana gelmesiyle gerçekleşir. Bu mutasyonlar hücrelere yeni özellikler kazandırır. Böylece gerek ço alma hızı, gerekse sa kalım, invazyon ve metastaz yetene i gibi özellikler açısından avantajlı tümör hücre klonu ortaya çıkar ve bu i leme klonal seçilim denir (8).

2.2. Kanser Türleri

Kanser patolojisinde en önemli konu selim ve malign tümörleri birbirinden ayırt etmektir. Deride görülen basit siller gibi selim tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan olurlar. Ancak malign tümörler hem çevredeki dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparlar.

Tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılırlar;

1. Karsinomlar (epitelyum hücrelerden kaynaklanırlar)
 2. Sarkomlar (kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokudan köken alırlar)
 3. Lösemi veya lenfomalar (kan ve immün sistem hücrelerinden gelirler)
- (8).

2.3. Melanositik Proliferasyonlar

Deri, vücudun en büyük organıdır. Deri, organizma için koruyucu bir örtü olup, aynı zamanda çevreye sinyal gönderip, çevreden sinyal alır. Sıvı-elektrolit dengesi ve ısının düzenlenmesinde, mikroorganizmaların, toksinlerin, ultraviyole ışınlarının ve yerel olarak uygulanan ajanların sistemik emilimine karşı bariyer oluşturmada, travmaya karşı korumada ve temas duyusunun sağlanmasında rol oynar (42).

Melanositler pigment üretimini sağlayan özelleşmiş hücreler olup (11), derinin bazal tabakasında, kıl folliküllerinde, skuamöz mukozal membranların çöğünde ve leptomeninkslerde yer alan nöral krest kökenli hücrelerdir (2).

Melanositlerin fonksiyonu melanin pigmentini üretmek ve melanini komşu epitelyal hücrelere transfer etmektir (42). Melanositlerin melanin sentezleyen organellerine melanozom adı verilir. Melanositlerin immatür ekli melanoblastlarıdır. Melanini fagosite etmiş dermal makrofajlara ise melanofaj denir (2).

Melanin pigmentasyondan sorumlu olup, bu durum genetik kontrol altındadır. Melaninler iki tip olarak sınıflandırılır; eumelanin (kahverengi-siyah) ve pheomelanin (kırmızımsı sarı). Bu iki tip melaninin fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirinden farklı olup pheomelanin, eumelanine göre daha fotolabilidir. İkili pheomelaninin üzerine etki ederek toksik hidroksil radikallerin açığa çıkmasına sebep olur ve bu durumun karsinogeneizde önemli olduğu düşünülmektedir (12).

Melanositik proliferasyonlar bir veya daha fazla tipte hücreden oluşurlar.

Melanositler soliter dendritik hücrelerdir. Genel olarak keratinositler ve fibroblastlar arasında da bulunurlar. Nevüs hücreleri ve melanoma hücreleri melanositlerden gelişir ve oluşurları yerden aşağıya doğru proliferasyon olurlar (2).

Melanositlerin benign tümörleri melanositik nevüs, maligniteleri malign melanom olarak isimlendirilir (12).

Tablo 2.1. Melanositik nevüslerin sınıflandırılması (*WHO 2002*)

Melanositik nevüsler
Konjenital nevüs
Dermal melanositik nevüs
Blue nevüs
Kombine nevüs
Melanositik maküller, basit lentigo, lentiginöz nevüs
Displastik nevüs
Bölge spesifik nevüsler
Persistan melanositik nevüs
Spitz nevüs
Halo nevüs

Dünya sa lık örgütü (WHO)'nun 2002 yılında melanositik nevüsleri sınıflandırması tablo 2.1'de, malign melanom sınıflandırması tablo 2.2.'de yer almaktadır.

Tablo 2.2. Malign melanomların sınıflandırılması (*WHO 2002*)

Malign melanom
Yüzeyel yayılan malign melanom
Nodüler malign melanom
Lentigo maligna
Akral lentiginöz malign melanom
Blue nevüsten malign melanom
Çocukluk ça ı melanom
Nevoid melanom
Persistan melanom
Dermoplastik melanom

2.3.1. Melanositik nevüsler

Melanositik nevüs melanositlerden olu an konjenital veya edinilmi benign tümörlerdir. Melanositik, nevosellüler ve pigmente sıfatları aynı anlamı ta ıtmaktadırlar (12). Melanositik nevüsler klinik olarak kahverengi veya ten rengi, uniform pigmente görünümde, genellikle yarıçapı 6 mm'den az, deriden hafifçe kabarık, düzgün sınırlı lezyonlardır (2).

Melanositik nevüsler klinik olarak düz, hafif yüksek, papillomatöz, kubbeli ve saplı olmak üzere be farklı tipe ayrılırlar. Bunlardan ilk üçü daima pigmente iken son iki tip pigmentli olmayabilir. Klinik görünümü birbirinden açık bir ekilde ayrılan melanositik nevüsler histopatolojik olarak junctional nevüs, compound nevüs ve intradermal nevüs olmak üzere üç gruba ayrılır. Klinik olarak düz lezyonların çapı 5

mm'den büyükse, sınırları düzensiz ve belirsiz ise ve de lezyonda pigment düzensizli i varsa displastik nevüs olarak isimlendirilirler (2).

Nevüsler erkeklerde kadınlara, beyazlarda di er etnik gruplara göre daha sık olup, ten rengi açık, sarı ın veya kızıl saçlı çocuklarda daha yaygındır (12).

Malign melanom alt ekstremitelerde daha çok yerle me göstermesine kar ın, nevüsler ba , boyun ve gövde derisinde daha sık gözlenirler (12).

Edinilmi melanositik nevüsler, lezyonun ya ı ilerledikçe, progresif bir maturasyon gösterirler. Junctional nevüs flat maküler bir lezyon olup, proliferen melanosit yuvalarının dermoepidermal bile keye sahip olması ile karakterizedir. Nevüs hücreleri dermise dü tü ünde papülo/nodüler bir lezyon olan kompond (bile ik) nevüse dönü ür. Maturasyon ilerledikçe sadece intradermal nevüs halini alır ve daha az pigmente olur.

2.3.1.1. Junctional (lentiginöz) nevüs

Junctional nevüsler, dermis-epidermis sınırından dermise do ru uzanırlar ve sınırları belirgin olarak yuvalar eklindedir. Nadiren i si görünümde olup, farklı oranlarda melanin içerebilirler. Basit lentigo, melanositik nevüslerin erken ekli olup, nevoid yuvaları bulunmamaktadır (12). Basit lentigo, çil ve lentiginöz nevüs arasında geçi formu olarak kabul edilir. Lezyonlar basit lentigo ve junctional nevüsün ortak özelliklerini ta ıyorsa lentiginöz nevüs olarak isimlendirilir (2). Junctional melanositik nevüsler genellikle çocuk ve gençlerde görülür, zamanla hücreler bazal tabakadan a a ı dü er ve bunun sonucunda bile ik ya da dermal melanositik nevüslere dönü tükleri ileri sürülmü tür (42).

2.3.1.2. Bile ik (kompond) melanositik nevüs

Yüzeyi düzgün veya verrüköz olabilen bile ik melanositik nevüslerin, çapları genellikle 0,5-1 cm.olup, deriden hafif ya da belirgin derecede kabarık, kahverengi tonlarında, yuvarlak, simetrik özellik gösterirler ve vücudun herhangi bir yerinde gözlenebilirler (42).

2.3.1.3. Dermal Melanositik Nevüs

Dermal melanositik nevüs, diğer pigment lezyonlara göre daha açık renktedir ve papül, kubbeli papül, bazen saplı lezyonlarla karakterizedir. Orta ya ve üzerinde daha sık görülüyor olup, on ya ndan önce gözleniyor olması ola an dı ı kabul edilir ve ya ın ilerlemesiyle birlikte dermal melanositik nevüs görülme oranı artar (42).

2.3.1.4. Displastik nevüs

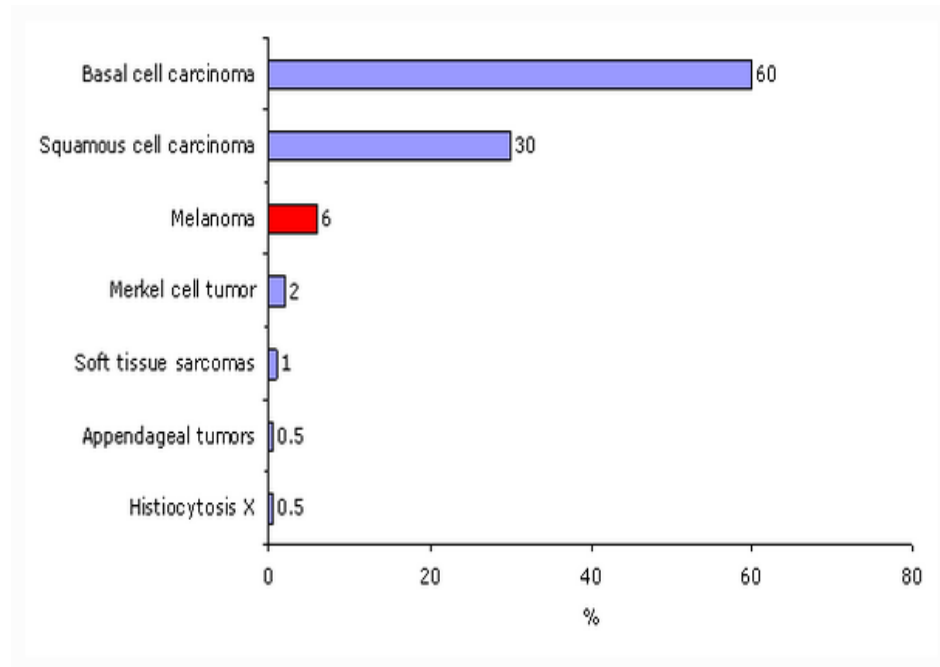
Önceleri atipik melanositik hiperplazi veya aktif fonksiyonel melanositik nevüs olarak adlandırılan displastik nevüs (atipik melanositik nevüs) ilk olarak 1978 yılında Clark tarafından tanımlanmıştır. Ailesel melanomalı bireylerde daha sık görülen displastik nevüs, malign melanoma öncüsü olma özelli i gösteren ve az görülen bir nevüs tipidir. Ailesel olgularda displastik nevüs, artmış malign melanoma riski ile birliktelik gösterir. Ömür boyu risk %100'dür. Displastik nevüsler ortalama 7-15 mm. çapında olup, deriden hafif kabarık veya yassı, kısmi asimetri gösteren, kılsız, yuvarlak, oval veya düzensiz sınırlı lezyonlar ekinde görülürler. En sık gövdede olmak üzere herhangi bir bölgede yerle ebilirler. Kahverenginin de i ik tonları, pembe veya siyah karı ımından olu an alacalı bir görünümde olabilir ve yüzeyinde deri çizgilerinde hasar bulunabilir. Displastik nevüslerin melanoma tanısında kullanılan ABCDE kriterlerine kısmen uyması dikkat çekicidir. Bu kriterler unlardır:

- Asimetrik olması (A: asymetry),

- Kenarları düzensiz veya sınırları belirsiz veya her ikisinin birlikte olması (B: border irregularity),
- Renk değişikliği, pigmentasyonun düzensiz dağılımı (C: colour Mixed),
- Çapın 6 mm veya daha büyük olması (D: diameter \geq 6 mm),
- Lezyon kenarının eritemli olması veya lezyonların deriden yüksek olması (E: erythema at margins or elevation of the lesions) (42).

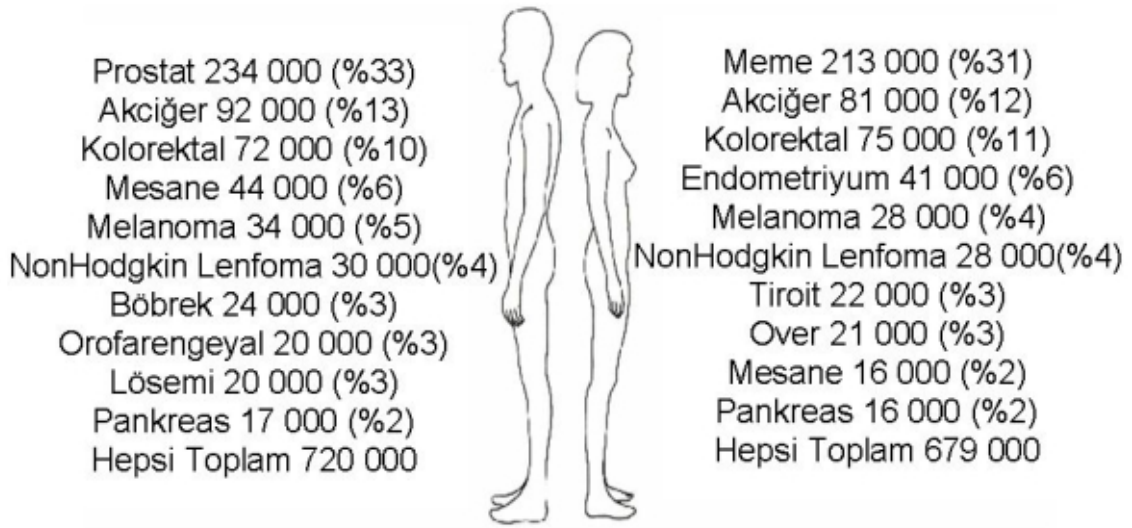
2.3.2. Malign melanom

Melanin, Yunanca'dan türemi (melas=siyah) bir terim olup, hemoglobin kökenli olmayan, melanositlerde tirozinaz enziminin, tirozinin dehidroksifenilalanine oksidasyonunu katalize ettiğinde oluşan, siyah kahverenkli pigmenttir. Melanin pigmenti üreten hücreler olan melanositlerin malign değişimi ile malign melanom gelişir. Melanositler deride bulunmasının yanı sıra skuamöz hücre ile kaplı mukoz membranlarda, gözün uveal tabakasında ve beyinin leptomeninkslerinde bulunur ve melanosit olan her yerde melanom gelişebilir.



ekil 2.1. Deri kanseri çeşitleri ve sıklıkları (22).

Malign melanom ilerledikçe yaşam süresi azalmakta olup, melanom insidansı dünya çapında bir kanserden daha hızlı şekilde artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre her yıl 132000 malign melanom olduğu tahmin edilmekte olup, ozon tabakasının UV ışınlarına karşı koruma özelliğinin %10 azaldıkça bu sayıya 4500 olgu ekleneceği belirtilmiştir (WHO 2011).

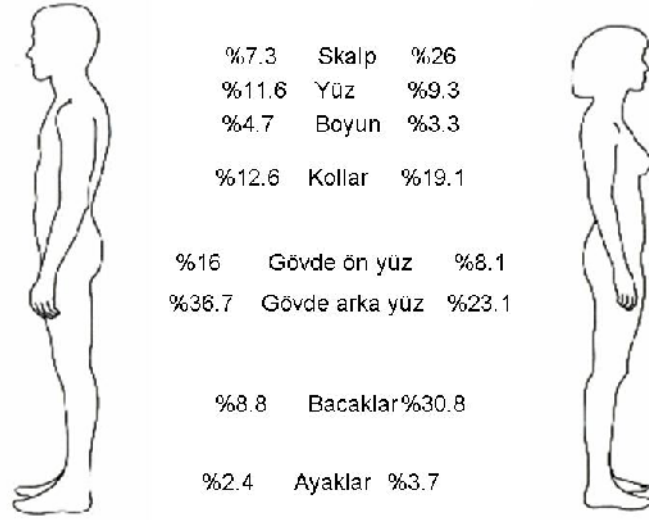


ekil 2.2. Amerika Birleşik Devletlerindeki Yıllık Tüm Kanser insidansı (23).

Melanomlar en sık olarak gövdede (%44), ekstremitelerde (%34), baş ve boyunda (%10), akrall bölgede (%12) görülür. Kadın ve erkekte de ilim farklılıkları vardır (ekil 2.3).

2.3.2.1. Malign melanoma alt tipleri

Malign melanomların sınıflandırılması önceleri yüzeysel yayılan malign melanom, lentigo tip malign melanom, nodüler tip melanom ve akrall-lentijinöz melanom şeklinde iken, WHO'nun yeni sınıflandırması tablo 2.2.'de olduğu gibidir.



ekil 2.3. Malign melanomun cinsiyete göre vücutta dağılımı (23).

2.3.2.1.1. Yüzeysel Yayılan Malign Melanoma

Premalign melanozis ve pagetoid melanoma olarak da bilinen yüzeysel yayılan malign melanom, melanomaların en sık görülen (%70) tipidir. Vücudun herhangi bir yerinde görülebilir. Erkeklerde en sık sırt, kadınlarda ise alt ekstremitede görülür. Yüzeyselden hafif kabarıklık, düzensiz sınırlı, plak şeklinde palpe edilebilen lezyonlardır. Yüzeysel yayılan malign melanoma, displastik nevüsten gelişir. Yüzeysel yayılan malign melanomayı displastik nevüsten ayırmada iki önemli fark vardır:

1. Displastik nevüste yama şeklinde perivasküler iltihabi hücre infiltrasyonu görülür.
2. Yüzeysel yayılan malign melanomada, uniform sitolojik atipi ayırıcı tanıda önemlidir, çünkü displastik nevüste rastgele atipi gözlenmektedir (2).

2.3.2.1.2. *Lentigo Malign Melanoma (Hutchinson's freckle)*

Lentigo malign melanom daha çok ya lı ve açık tenli ki ilerde gözlenen, genellikle derinin güne gören kısımlarında görülmektedir. Genellikle yava büyür ve rengi ten renginden siyah renge kadar de i kenlik gösterebilir. Mikroskopik olarak bazal tabakadaki atipik melanositlerin tek tek veya yuvalar halinde proliferasyonundan meydana gelir. Epidermis, yüzeysel yayılan malign melanomanın aksine sıklıkla yassı, düzensiz olarak incelmi ve kalınlı mı olabilir (2).

2.3.2.1.3. *Nodüler malign melanoma*

Nodüler malign melanom yüzeysel yayılan melanom tipine göre daha ya lı bireylerde gözlenir. Lezyonun pigment yo unlu u çok de i kendir. Histopatolojik olarak dermisteki tümör kitlesi epidermisteki tümör kitlesinden daha büyüktür. Genellikle tümör kitlesi papiller dermisi doldurur ve geni letir. Tümör hücrelerinin epidermise yayılımı, epidermin tümör üzerindeki kısmı ile sınırlıdır. Tümör hücreleri genellikle epiteloid veya i si görünümündedir. Birçok tümörde her iki hücre tipi beraber bulunur. Epiteloid hücreler genellikle yuvalar, i si hücreler ise demetler olu tururlar. Tümör iri nükleuslu, nükleer membranları düzensiz, nükleolusları sıklıkla belirgin hücrelerden meydana gelir. Tümörün hem dermal hem de epidermal komponentinde mitotik aktivite vardır (2).

2.3.2.1.4. *Akral Lentiginöz Malign Melanoma*

Akral lentiginöz malign melanoma en çok ayak tabanında olmak üzere, avuç içi, saçlı deri, tırnak çevresi, oral ve nazal kavite, anüs ile mukokutanöz birle im yerlerinde görülür. Akral lentiginöz malign melanoma, di er melanoma tiplerinden daha seyrek olup, siyah ırkta daha sıktır. Bu sebeple etyolojisinde güne ı ı ndan ba ka faktörlerin de rol oynayabilece i dü ünülmektedir. Klinik olarak sınırlar düzensiz veya belirsiz, pigmentasyon de i kendir. Histopatolojik olarak bu lezyonlara lentiginöz

denmesinin sebebi; özellikle lezyonun periferinde tümör hücrelerinin dermoepidermal bile kede lokalize olmasıdır. Tümörlerde hem i si, hem de yuvarlak pagetoid tümör hücreleri beraber görülür. Vakaların ço unda pigmente dendritik hücreler belirgindir. Akral lentiginöz malign melanomalarda tanı sırasında evrenin yüksek olması ile birlikte ço unlukla mikrosatellit lezyonların bulunması nedeni ile prognoz kötüdür (2).

2.3.3. Malign melanom ve melanositik nevüslerin histopatolojik farkları

Ayırıcı tanıda histopatolojik de i iklikler son derece önemlidir. Malign melanomayı dü ündüren bulgular :

1. Intraepidermal melanositlerde kohezyon kaybı
2. Çevre dokulara invazyon
3. Belirgin sitolojik atipi
4. Büyük eozinofilik nükleolus
5. Melanin pigmentinin toz eklinde olması
6. Lezyonda asimetri
7. Periferde tek tek hücre infiltrasyonu
8. Tek hücre nekrozu
9. Dermal melanositlerde matürasyon kaybı
10. Mitotik aktivite (özellikle atipik mitozlar)
11. Dermiste iltihabi hücre infiltrasyonu

Melanin pigmentinin yo unlu u ve ekli malign melanoma türüne göre de i iklik gösterebilir. Elektron mikroskopik incelemelerde lentigo malignada melanozomlar genellikle normal melanositleri hatırlatır ekilde elipsoid, yüzeysel yayılan malign melanoma ve nodüler malign melanomada sıklıkla anormal görünümde veya sferoidal olarak izlenir. Melanositler, benign ve malign hücrelerin kar ıla tırılması ise tablo 2.3. de verilmi tir (42).

Tablo 2.3. Melanosit, benign ve malign hücrelerinin özelliklerinin karşılaştırılması

	Melanosit	Nevüs hücreleri	Malign hücreler
Hücre dizilimi	Tek tek	Yuvalar ekinde	Büyük yuvalar ve tabakalar halinde
Nükleus	Küçük ve düzenli	Küçük ve düzensiz	Geni ve düzensiz
Sitoplazma	Dentritik	Yuvarlak ve i si	Yuvarlak ve i si
Mitoz	Nadir	Nadir	Genellikle pozitif

2.4. Melanom ve genetik

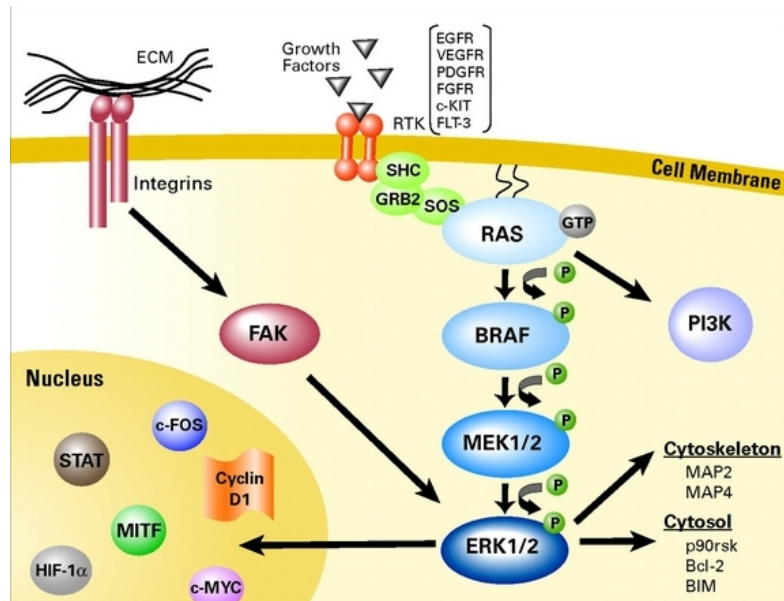
insan genom projesine göre genomdaki yaklaşık 32000 genin %20'si sinyal iletiminde görev almaktadır.

Membran yerleşimli ve sitoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere ikiye ayrılan protein kinazlar sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonu gerçekleştirirler. Katalitik özelliklerine göre tirozin ve serin/treonin olarak gruplandırılırlar. Membrana yerleşen proteinlere reseptör tirozin kinaz (RTK) denir. Kendi kendini fosforile etmesiyle RTK aktivasyonu başlar. Fosforlanan bölgelere adaptör proteinler bağlanır ve böylece hücre içi sinyal iletimi sağlanmıştır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasında ise fosfataz grubu proteinler rol alır. Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (11).

2.4.1. RAS yolu ve melanom

Mitogen-activated protein kinases ailesinde yer alan MAP kinazlar, hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında etkilidir. Bu sinyal iletimi kaskadları,

embriyogenezis, ya ama, ço alma, diferansiasyon ve apoptozis i levlerinin düzenlenmesinde rol alır. Sinyalin iletimi Ras aktivasyonu ile ba lar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz yola ı ilerler (ekil 2.4.). Ras ve Raf protoonkogendir. istirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP (guanin di fosfat)'nin yerine GTP (guanin tri fosfat) ba lanarak Ras aktive ir. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara ba lanıp, Raf kinazların hücre membranına yerle imini ve aktivasyonunu sa larlar (11).



ekil 2.4. RAS sinyal iletim yola ı (20).

nsan tümörlerinin %40'ında RAS gen ailesinde mutasyonlar saptanmı tır. Proto-onkogen olan RAS'ı onkogene dönü türen bu mutasyonlar GTP'nin GDP'ye hidrolizini engeller ve Ras proteini sürekli olarak hücreyi bölünmesi için uyarır (29).

Melanomlarda hemen hemen her olguda RAS sinyal yola ında de i iklikler söz konusudur (18).

Bu geninin isoformlarından olan K-RAS mutasyonları melanom olgularında nadir gözlenirken, N-RAS mutasyonu (61. Kodon) melanomların %15-20'sinde gözlenmektedir (37).

2.4.2. BRAF ve melanoma

Bir serin/treonin kinaz olan BRAF geninin melanosit ve nöral dokularda ekprese oranı yüksek olup, kalıtsal kanser yatkinlı 1 geni olarak kabul edilmemektedir (29). Germline mutasyon söz konusu oldu unda cardio-facio-cutaneous sendromu ile ili kilidir, ancak melanom riskini arttırmamaktadır (7, 30).

Tümörlerde en yaygın (yaklaşık %90) BRAF mutasyonu 600. Pozisyonda gerçekleşen T1799A mutasyonudur (BRAF V600E).

Melanomların %50-60' ında BRAF mutasyonu gözlenmekte olup, hem benign hem de displastik nevüslerde gözlemlendi i için malign transformasyonun gerçekleşmesi için yeterli de ildir (31, 40).

2.4.3. MEK ve melanoma

Protein kinaz ailesinden olan MEK geni, proliferasyon, farklılaşma ve transkripsiyon düzenlenmesinde görevlidir.

Melanom olgularında BRAF ve NRAS mutasyonu pozitif oldu u zaman MAP kinaz yola ında önemli bir nokta olarak kabul edilmiştir. Melanom hücreleri, BRAF mutasyonu pozitif oldu unda, RAS mutasyonu olan hücrelerden MEK inhibitörlerine karşı daha duyarlıdır (30).

2.4.4. KIT ve melanom

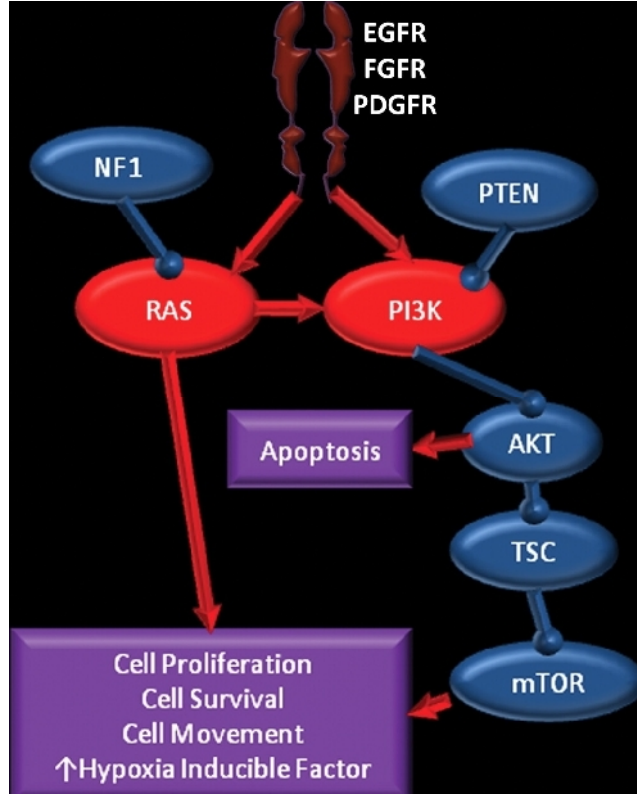
Bir reseptör tirozin kinaz olan KIT geni, melanosit, hematopoietik hücreler ve germ hücrelerinde proliferasyon, gelişme ve sakalımdan sorumludur. Aynı zamanda olgun melanositlerde de ekprese edilir. Özellikle akril ve mukozal melanomlarda olmak üzere daha az UV 1 ınlarına maruz kalan bölgelerde meydana gelen melanomların alt tiplerinde KIT amplifikasyonu yada mutasyonları saptanmıştır (9).

En sık görülen KIT mutasyonu 11. ekzonda L576P mutasyonudur. KIT aktivasyonu MAPK ve PI3K–AKT yollarının uyarılması ile sağlanır (6). Daha önce yayımlanan bir çalışmada KIT mutasyonu saptanan akral ve mukozal melanomlu 4 hastaya imatinib ve sorafenib ile tedavi uygulanmış olup, tümörün gerilediği belirtilmiştir (19).

2.4.5. PI3K/AKT/mTOR yolu ve melanom

Lokalizasyonu 10. kromozom üzerinde olan PTEN geni, tümör supressör bir protein kodlar. Bu protein, PI3K yollarında negatif düzenleyici olarak görev alan bir lipid protein fosfatazdır (ekil 2.5.). Primer melanomların %10-20'sinde PTEN mutasyonları görülmektedir (43).

Melanomlarda PTEN kaybı, özellikle BRAF mutasyonu olan bazı alt gruplarında PI3 ve AKT yollarındaki negatif regülasyonun kaybına yol açar (17). Apoptosis baskılayıcı olarak görev yapan AKT geninin kopya sayısı artışı melanomların %40-60'ında görülmekte olup, melanom progresyonu ile ilişkilendirilmiştir (41). Eğer PTEN kaybı söz konusu ise AKT yolu proliferasyona uğrar ve bunun sonucu olarak da anormal hücre büyümesi ve apoptozisten kaçma gözlenir. Melanomlarda BRAF mutasyonları ile PTEN kayıpları birbiri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (44).



ekil 2.5. PTEN, PI3K/AKT yola 1 (27).

2.4.6. CDKN2A , TP53 ve melanom

Melanomların ço u sporadik olmasına kar ın %5-10'u aileseldir. Retinoblastom proteinine ba lı olarak CDKN2A geni, hücre döngüsünün G1-S geçi ini düzenleyen P16INK4A proteinini kodlar. Ailesel melanomların %40'ında CDK2A germ-line mutasyonları bulunmaktadır (13).

Tümör supressör bir gen olan TP53'ün delesyonları bir çok kanser türünde sık görülmesine kar ın melanomlarda %0-25 oranında gözlenmektedir (13). Bu durum TP53 ile CDKN2A'nın hücre döngüsündeki görevlerinin örtü mesi ile açıklanabilir (1).

2.5. Melanom ve FISH

Melanomun insidansı ve mortalitesi hızla her yıl %3-7 arasında artmaktadır. Bu nedenle malign melanomların melanositik nevüslerden ayrımını hızlı bir şekilde yapmak çok daha fazla önem kazanmaktadır (14).

Çoğu melanom histolojik incelemede nevüsten kolayca ayrılabilir. Histopatolojik olarak melanoma benzeyen bir çok melanositik nevüs ve nevüse benzeyen malign melanom çeşitleri vardır. Vakaların önemli bir kısmı birbiriyle çelişen morfolojik kriterler gösterebilirler. Ek olarak, morfolojisi belirsiz olarak tanımlanan lezyonların tanılarını konusunda, inceleyen uzmanlar arasında fikir farklılığı olabilmektedir. Bir çalışmada sonucunda, büyük bir merkezde kontrol edilen 5136 primer melanositik lezyondan, 120 olgunun (%2.3) tanılarını nevüsten melanomaya yada tam tersi şekilde değiştirilmiştir (34).

Klonal kromozomal aberasyonların varlığı ya da yokluğu malign ve benign olgular arasında önemli derecede farklılık göstermektedir. Melanomlar 6q, 8p, 9p, ve 10q kayıpları ile 1q, 6p, kromozom 7, 8q, 17q, 11q, 20q ve kromozom 2 artıları gibi kromozomal anomali paternini tekrarlarlar, benign melanositik nevüsler ise kromozom aberasyonlarına sahip olmama ile ilimindedir. Melanomdan histopatolojik yöntemlerle ayrılması neredeyse imkansız olan spitz nevi ise bir istisnadır, 11. kromozomun kısa kolunun tamamında artı gözlenirken bu aberasyon melanomda bulunmaz (3, 4, 5).

Gerami ve arkadaşları 2009 yılında malign ve benign olguların ayrımını yapabilmek amacıyla CGH ve FISH yöntemlerini kullanmışlardır. İlk önce 97 malign melanom ve 95 melanositik nevüs olgularında, CGH ile 8 farklı kromozom (1, 6, 7, 10,11, 17, 20. kromozom) üzerinde 13 farklı bölgeyi incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre melanom ve melanositik nevüsler arasında ki en belirgin farklılıklar; 6p25 (RREB1), CEP6, 6q23 (MYB), 7q34 (BRAF), 11q13 (CCND1), 17q25 (TK1) ve 20q(ZNF217) bölgelerinde gözlenmiştir. Daha sonra bu bölgelere ait çeşitli prob kombinasyonları oluşturularak tekrar analiz ettiklerinde en önemli kombinasyonun 6p25, sentromer 6, 6q23 ve 11q13 olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmalarına 58 melanom ve 51 melanositik nevüs olgusunda bu 4 bölgeyi hedefleyerek FISH analizi ile devam

ettiklerinde 11q13 bölgesine ait sinyallerin 2 den fazla olma oranı %38, 6p25 bölgesine ait sinyallerin CEP6 sinyalinden fazla olma oranı %55, 6q23 bölgesine ait sinyallerin CEP6 sinyalinden az olma oranı %40 ve 6p25 bölgesine ait sinyallerin ikiden fazla olma durumu %29 ise bu olguların melanom olabilece ini belirtmi lerdir (14). Belirledikleri bu cut-off de erleri daha sonra yapılmı olan ço u çalı mada cut-off de eri olarak kabul edilmi tir.

2.6. RAS Responsive Element Binding Protein 1 (RREB1)

Ras Responsive Element Binding Protein 1 (RREB1), Kalsitonin (CT) geninin promoter bölgesinde yer alan Ras responsive element (RRB)'e ba lanır ve RAS/RAF yola ının aracılı ı ile CT promoter bölgesinin transkripsiyonel yanıtını artırır ve böylelikle RAS/RAF yola ı ile hücre farklılaşmasında görev alır (24).

2.7. MYB V-MYB Avian Myeloblastosis Viral Onkogene Homolog

Transkripsiyon faktör genleri olan MYB ailesinin bir üyesidir. Üç domain içermekte olup, N-terminal domaini DNA'ya ba lanma domainidir. Di er iki domain ise transkripsiyonel aktivasyon domaini ve di eri transkripsiyon baskılamada yer alan C-terminal domainidir. Hematopoesiste etkili olmakla birlikte, tümörogenesiste rol oynadı ı dü ünülmektedir (25).

2.8. Siklin D1 (CCND1)

Hücre döngüsünde görev alan, korunmu siklin ailesine ait bir gendir. Siklin ba ımlı kinazların düzenleyicisi olarak görev yaparlar. Siklinlerin her biri, mitoz sırasında koordineli bir ekilde farklı ekspresyon ve degradasyon paterni gösterirler. Siklin D1 hücre döngüsünün G1/S evresinde görev alır ve mutasyon, amplifikasyon

veya overekspresyon söz konusu oldu unda hücre döngüsü progresyonu de i ir ve genellikle tümör olu umu gözlenir (26).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Ara tırma grubu bireyleri

Çalı mamız 2008 ve 2013 yılları arasında Eski ehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Patoloji Ana Bilim Dalı'nda tanı almı 42 örnek ile ESOĞÜ Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı'nda gerçekte tirilmi tir. Örneklerimizden 24'ü melanositik nevüs, 18'i malign melanom olup, RREB1, MYB, CYCLIND1 ve SENTROMER 6 bölgelerinin yeniden düzenlenmeleri açısından ara tırılmı tır.

3.1.2. Kullanılan araçlar

- Elektronik terazi (Seuter, Ainworth-AA-250)
- Deep-Freeze (Heraeus)
- Etüv (Friocell MMM Med Center)
- Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)
- pH Metre (Jenco)
- Su banyosu (Nüve)
- Floresan mikroskop (Olympus BX-61)
- Sensys kamera (Sensys)
- Image Analyser (Cytovysion 3.93)
- Mikropipet (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Kronometre
- Pipet uçları

3.1.3. Kullanılan cam malzemeler

- Beher (500 ml, 1000 ml)
- Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)
- Mezür
- Yatay ve dikey ale

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

- Ethanol (Merck)
- DAPI (Sigma)
- HCl (Merck)
- Immersiyon ya ı (Merck)
- Na C H₅O₇.2H₂O (Carlo Erba)
- NaCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- Methanol (Merck)
- Rubber Cement (Marabu Fixogum)
- VECTASHIELD
- Tween 20 (Sigma)

3.1.5. Kullanılan problar

- LSI CYCLYND1 (11q23) (Abbott molecular),
- LSI RREB1 (6p25) (Abbott molecular),
- LSI MYB (6q23) (Abbott molecular),
- CEP6 (Abbott molecular)

3.2. Yöntem

Benign pigmente lezyon ve malign melanom örnekleri FISH yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.2.1. Materyal alımı

Malign melanom ve melanositik nevüs olgularına ait doku materyali ESOĞÜ Patoloji AD.'dan deparafinize edilmiş halde moleküler sitogenetik laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

3.2.2. FISH analizi

3.2.2.1. FISH tekni nin uygulanması

FISH tekni inde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır (39).

3.2.2.1.1. Preparatların ön yıkanması ve denatürasyonu

Preparatlar sırasıyla % 100- %70- %50- %30'luk alkol serisinden ve 0.1XSSC solüsyonundan birer dakika olmak üzere geçirilerek dehidre edilmiştir. Dehidratasyon sonrası preparatlar 70°C deki 2XSSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda içerisinde preparatların bulunduğu 2XSSC solüsyonu içeren ale so uk su içerisine konulmuş ve solüsyon ısısının 37 °C'ye gelmesi sağlanmıştır. Sıcaklığı 37 °C'ye düşükten sonra preparatlar oda sıcaklığı nda bulunan 0.07 M'lık NaOH solüsyonuna alınmış ve birer dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Denatürasyonu takiben oda sıcaklığı nda bulunan 0,1XSSC ve ardından +4

°C'de olan 0,1XSSC ve 2XSSC solüsyonlarında birer dakika bekletilen preparatlar sırasıyla %30 - %50 - %70 - %100'lük alkollerden birer dakikalık aralarla geçirilmi tir.

3.2.2.1.2. Prob denatürasyonu

Kullanılan CYCLYND1/RREB1/MYB/CEP6 (vysis) probu 70 C'de 5 dk. bekletilerek denatüre edilmi tir.

3.2.2.1.3. Hibridizasyon

Probun bulundu u 1 ml. lik tüpler santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sa lanmı tir. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl) eklenmi ve üzerlerine 24 mm'lik lamel kapatılmı tir. Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmı tir. Preparatlar 37 °C'de nemli ortamda iki gece hibridizasyona bırakılmı lardır.

3.2.2.1.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar

Hibridizasyon tamamlandıktan sonra, preparatlar etüvden çıkarılıp, lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi temizlenmi tir. Preparatlar oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafif karı tırılarak lameller peraparattan çıkarılmı olup, 1XSSC solüsyonu içerisinde 74 C'de 5 dk. bekletilmilerdir. Daha sonra 2XSSC/T-20 solüsyonunda 5 dk. bırakılmı tir.

3.2.2.1.5. Hibridize olan bölgelerin görünür kılınması

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda iki dakika bekletilmiler, süre sonunda 20 µl. yüzey boyası

(VECTASHIELD Mounting Medium) damlatılıp lamel kapatılmıştır. İnceleme başlamasına kadar preparatlar – 20 C’de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.2.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı sönümlü kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri incelenmiş, fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.2.2.1.7. Değerlendirme

Benign pigment lezyon ve malign melanom olgularından alınan, FISH yöntemi uygulanan her bir örnekten, tanılarına ilişkin, belirlenen bölgelerde 30 hücre analiz edilmiştir.

Değerlendirme esnasında her bir gen bölgesi için sinyal sayısı; eğer 2’den az ise delesyon, 3 ve daha fazla ise amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda Gerami ve arkadaşlarının belirledikleri cut-off değerleri kullanılmıştır (14). Bu değerler şöyledir; CCND1 gen bölgesi amplifikasyonu için %38, MYB gen delesyonu için %40, RREB1 gen bölgesi amplifikasyon için %29 ve RREB1 sinyal sayısının sentromer 6 bölgesine ait sinyal sayısından fazla olması durumu için %55’dir.

Kullanılan stok solüsyonlar

Tablo 3.1. Carnoy's fiksatif solüsyonu

Metanol	3 birim
Asetik asit	1 birim

Tablo 3.2. Preparatları ön yıkama solüsyonları

20XSSC solüsyonu	NaCl (3 M)	175,3 gr
	Tri Sodyum Sitrat	88,24 gr
	Distile su	1000 ml
0,1XSSC solüsyonu	20XSSC	3 ml
	Distile su	597 ml

Tablo 3.3. Preparatların denatürasyon solüsyonu

0,07 M NaOH solüsyonu	1M NaOH	14 ml
	Distile su	186 ml

Tablo 3.4. Hibridizasyon sonrası kullanılan solüsyonlar

1XSSC solüsyonu	20XSSC	10 ml
	Distile su	190 ml
2XSSC solüsyonu	20XSSC	20 ml
	Distile su	180 ml
2XSSC/Tween-20 solüsyonu	20XSSC	20 ml
	Tween-20	100 µl
	Distile su	180 ml

Tablo 3.5. Görüntüleme sistemi solüsyonu

DAPI/Antifade solüsyonu	2XSSC	20 ml
	DAPI	100 µl
	Distile su	80 ml

3.3. statiksel De erlendirme

Malign ve benign tümör dokuları arasında genetik aberasyonların görülme oranları arasındaki farkı kar ıla tırmak amacıyla SPSS 15.0 istatistik programında 2 istatistik testi kullanılarak, hastalarda gözlenen genetik anomalilerin Fisher's Exact Testine göre p de erleri hesaplanmı tır ve $P < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmi tir.

4. BULGULAR

Çalı mamız Eski ehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı'nda, üniversitemizin Patoloji Ana Bilim Dalı'nda tanısı konulmuş melanositik lezyon olgularına ait örnekler çalı arak gerçekleştirilmiştir. Çalı ma grubumuzu 24 benign ve 18 malign olgu oluşturmaktadır. Çalı mada malign ve benign olgular arasındaki genetik de i iklikleri ortaya koyarak, klinikte tanı, tedavi ve takip süreçlerinde FISH yönteminin katkısını göstermeyi amaçladık.

Çalı mamızda yer alan tüm olguların ya ortalaması 41 olup, bir olgumuzun ya bilgisine ula ılamamıştır. Olgularımızı 30 kadın, 12 erkek olgu oluşturmaktadır. A a ıdaki tablo 4.1. ve 4.2.'de olgularımızın ya , tanı ve cinsiyetleri hakkında bilgiler yer almaktadır.

Çalı tı ımız tüm olgularda 30'ar hücre analiz edilmiş olup, başarı oranımız %100 olarak belirlenmiştir. Elde etti imiz sonuçlarda cut-off de erleri CYCLIND1 gen amplifikasyonu için %38, MYB gen delesyonu için %40, RREB1 gen amplifikasyonu için %29 ve RREB1/CEP için %55 olarak kabul edilmiştir.

4.1. FISH Analiz Sonuçları

Çalı mamızda benign lezyon ve malign melanom olgularına ait örnekler çalı ılmış olup, her olgu için CCND1, MYB, RREB1 ve sentromer 6 bölgeleri için FISH ile analiz gerçekleştirilmiştir.

Elde etti miz sonuçlara göre malign melanom olgularının 15'inde (%83) en az bir anomali saptanmıştır. ki olguda tüm parametreler anormal iken, 5 olguda en az iki aberasyon görülmü tür. Di er çalı ma grubumuzu oluşturan 24 melanositik nevüs olgularından 20 tanesinde normal sonuç bulunmuştur (ekil 4.1.). Üç olguda bir gen bölgesinde aberasyon saptanmış olup, 1 olgunun (olgu 19) 3 parametre açısından anormal olduğu gözlenmiştir.

Malign melanom olgularının FISH sonuçları tablo 4.3.'de, benign nevüslerin FISH sonuçları tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Malign melanom olgularına ait cinsiyet, yaş ve tanı bilgileri

Olgu sayısı	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Alt tipi
1	57	Erkek	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
2	57	Kadın	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
3	66	Erkek	Malign melanom	Yüzeyel yayılan melanom
4	53	Erkek	Malign melanom	Yüzeyel yayılan melanom
5	48	Erkek	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
6	51	Kadın	Malign melanom	-
7	77	Kadın	Malign melanom	Lentigo malign melanom
8	61	Kadın	Malign melanom	Akral lentiginöz tip malign melanom
9	61	Kadın	Malign melanom	Yüzeyel yayılan melanom
10	66	Kadın	Malign melanom	Lentigo malign melanom
11	32	Kadın	Malign melanom	-
12	70	Erkek	Malign melanom	-
13	77	Kadın	Malign melanom	Akral lentiginöz tip malign melanom
14	61	Kadın	Malign melanom	Lentigo malign melanom
15	42	Kadın	Malign melanom	Akral lentiginöz tip malign melanom
16	66	Erkek	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
17	-	Kadın	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
18	71	Erkek	Malign melanom	-

Tablo 4.2. Melanositik nevüs olgularına ait cinsiyet, ya ve tanı bilgileri

Olgu sayısı	Ya	Cinsiyet	Tanı	Alt tipi
19	16	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs
20	20	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
21	33	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
22	48	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
23	16	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
24	34	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
25	35	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
26	11	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs
27	27	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
28	35	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
29	28	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
30	23	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
31	34	Erkek	Melanositik nevüs	Kompond nevosellüler nevüs
32	20	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevosellüler nevüs
33	14	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs
34	29	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs
35	23	Erkek	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
36	8	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
37	42	Kadın	Melanositik nevüs	ntradermal nevüs
38	35	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
39	38	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
40	49	Kadın	Melanositik nevüs	ntradermal nevüs
41	35	Erkek	Melanositik nevüs	ntradermal nevüs
42	20	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs

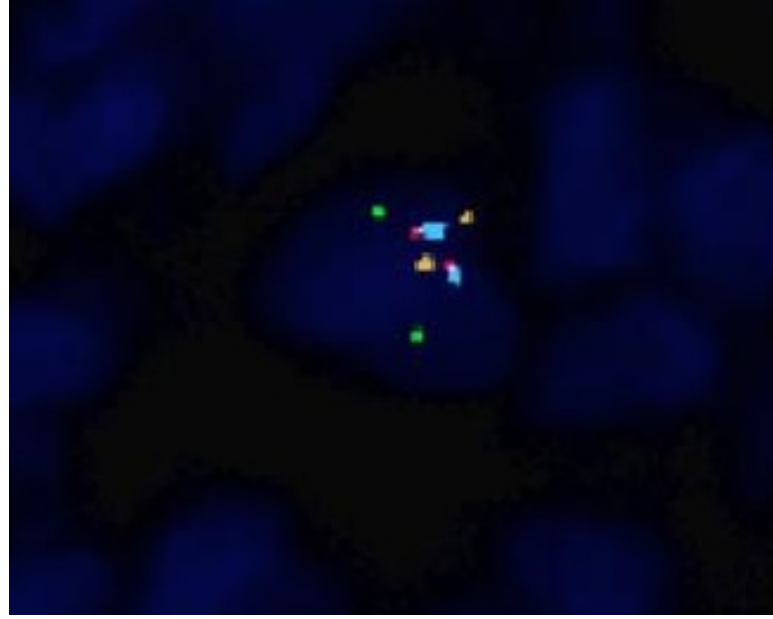
Tablo 4.3. Malign melanom olgularına ait FISH sonuçları

Olgu Sıra No	Olgu No	Tanı	CCND1 gen amp.	MYB gen delesyonu	RREB1 gen amp.	RREB1 / CEP6
1	1	Nodüler MM	negatif	negatif	pozitif	pozitif
2	2	Nodüler MM	negatif	negatif	negatif	negatif
3	5	Nodüler MM	pozitif	negatif	negatif	negatif
4	16	Nodüler MM	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
5	17	Nodüler MM	negatif	pozitif	negatif	negatif
6	3	Yüzeyel yayılan MM	negatif	negatif	negatif	negatif
7	4	Yüzeyel yayılan MM	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
8	9	Yüzeyel yayılan MM	negatif	pozitif	negatif	negatif
9	7	Lentigo MM	negatif	negatif	negatif	negatif
10	10	Lentigo MM	negatif	pozitif	negatif	negatif
11	14	Lentigo MM	negatif	negatif	pozitif	negatif
12	8	Akral lentiginöz MM	pozitif	negatif	pozitif	pozitif
13	13	Akral lentiginöz MM	negatif	negatif	pozitif	negatif
14	15	Akral lentiginöz MM	pozitif	negatif	negatif	negatif
15	6	MM	pozitif	negatif	negatif	negatif
16	11	MM	pozitif	negatif	negatif	negatif
17	12	MM	negatif	pozitif	pozitif	negatif
18	18	MM	pozitif	negatif	pozitif	negatif

Tablo 4.4. Melanositik nevüs olgularına ait FISH sonuçları

Olgu Sıra No	Olgu No	Tanı	CCND1 gen amp.	MYB gen delesyonu	RREB1 gen amp.	RREB1 / CEP 6
1	19	Spitz nevüs	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
2	33	Spitz nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
3	34	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
4	20	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
5	24	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
6	25	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
7	26	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	pozitif	negatif
8	27	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
9	28	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
10	29	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
11	30	Displastik kompond nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
12	35	Displastik kompond nevüs	negatif	pozitif	negatif	Negatif

13	36	Displastik kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
14	38	Displastik kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
15	39	Displastik kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
16	42	Displastik kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
17	21	Kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
18	22	Kompound nevüs	negatif	pozitif	negatif	negatif
19	23	Kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
20	31	Kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
21	32	Kompound nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
22	37	ntradermal nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
23	40	ntradermal nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif
24	41	ntradermal nevüs	negatif	negatif	negatif	negatif



ekil 4.1. CCND1, MYB, RREB1 ve CEP6 bölgeleri için normal sinyal paternine sahip olan olgu 38'in FISH görüntüsü

4.1.1. CCND1 geni için FISH sonuçları

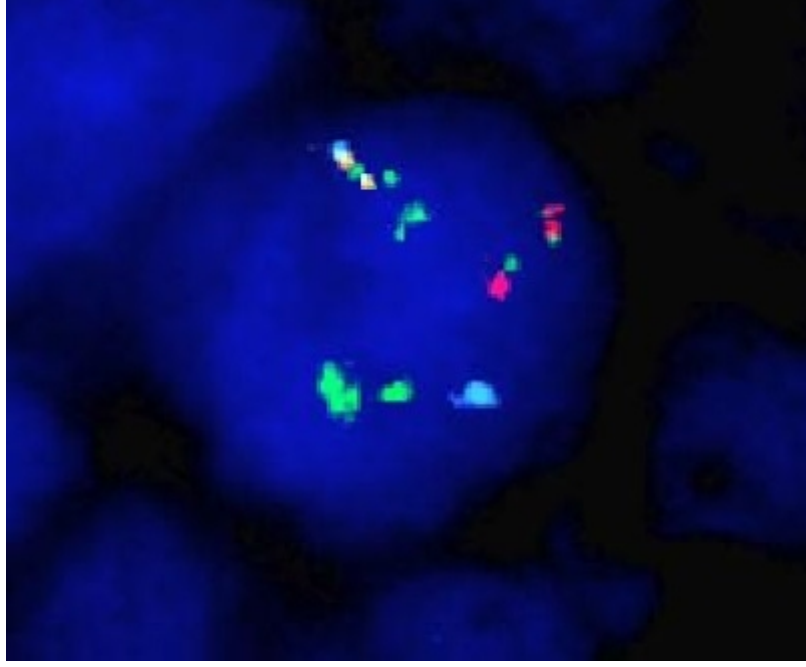
Çalı mamız sonucunda 18 malign melanom olgusundan 8'inin (%44,44) CCND1 gen amplifikasyonu açısından pozitif oldu u saptanmı tır (ekil 4.2.). Bu olguların ikisi nodüler tip (olgu 5 ve 16), ikisi akral lentijinöz tip (olgu 8 ve 15), bir olgu yüzeysel yayılan tip malign melanomdur (olgu 4) ve geriye kalan üç olgunun ise alt tipi belli de ildir. Olgu 8 ve 18'de CCND1 gen amplifikasyonuna RREB1 gen amplifikasyonu e lik etmi tir (ekil 4.5). Olgu 4 ve 16'da ise dört aberasyon gözlenmi tir. Olgu 15'e ait analiz edilen 30 hücrenin tümünde CCND1 gen kopya sayısı artı ı gözlenmi olup, %100 oranında amplifikasyon pozitif oldu u saptanmı tır.

Di er çalı ma grubumuz olan 24 melanositik nevüs olgularının tümünün CCND1 açısından normal oldu u gözlenmi tir.

Tablo 4.5. Malign melanom ve melanositik nevüs olgularının CCND1 gen bölgesi açısından FISH sonuçları

MAL GN MELANOM (MM)			MELANOS T K NEVÜS (MN)		
Olgu No	Tanı	CCND1 gen amp. oranı (%)	Olgu No	Tanı	CCND1 gen amp. oranı (%)
1	Nodüler MM	3,3	19	Spitz nevüs	3,3
2	Nodüler MM	0	20	Displastik kompond nevüs	3,3
3	Yüzeyel yayılan MM	26,7	21	Kompond nevüs	26,7
4	Yüzeyel yayılan MM	40	22	Kompond nevüs	0
5	Nodüler MM	46,7	23	Kompond nevüs	33,3
6	MM	40	24	Displastik kompond nevüs	0
7	Lentigo MM	3,3	25	Displastik kompond nevüs	0
8	Akrall lentijinöz MM	66,7	26	Displastik kompond nevüs	16,7
9	Yüzeyel yayılan MM	13,3	27	Displastik kompond nevüs	0
10	Lentigo MM	0	28	Displastik kompond nevüs	0
11	MM	86,7	29	Displastik kompond nevüs	0
12	MM	0	30	Displastik kompond nevüs	0

13	Akral lentijinöz MM	13,3	31	Kompond nevüs	0
14	Lentigo MM	13,3	32	Kompond nevüs	0
15	Akral lentijinöz MM	100	33	Spitz nevüs	0
16	Nodüler MM	40	34	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs	0
17	Nodüler MM	0	35	Displastik kompond nevüs	0
18	MM	56,7	36	Displastik kompond nevüs	0
			37	ntradermal nevüs	0
			38	Displastik kompond nevüs	0
			39	Displastik kompond nevüs	3,3
			40	ntradermal nevüs	0
			41	ntradermal nevüs	10
			42	Displastik kompond nevüs	3,3



ekil 4.2. CCND1 gen bölgesi için amplifikasyon saptanan, RREB1, MYB ve CEP6 bölgeleri normal gözlenen olgu 5'e ait FISH görüntüsü

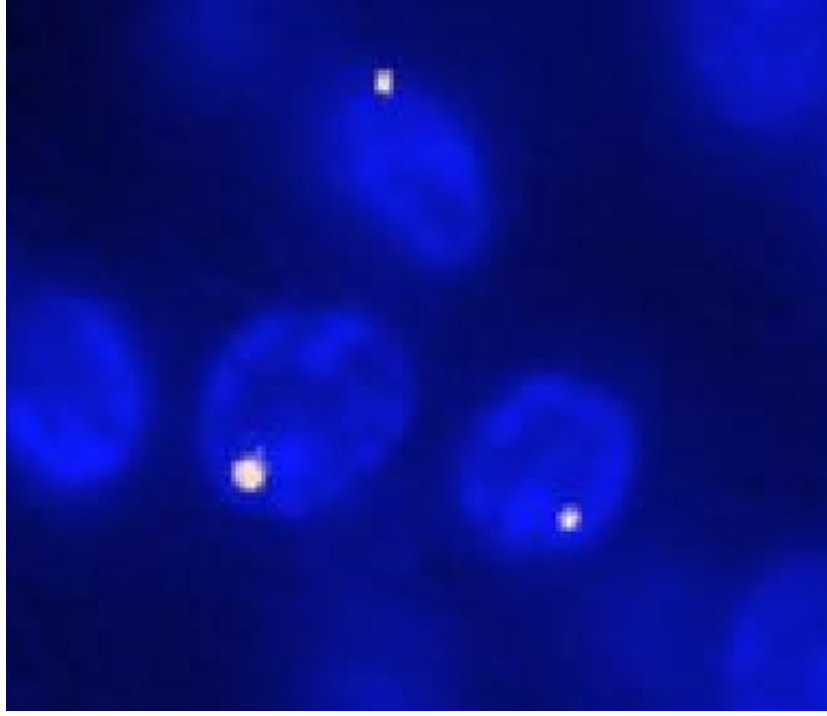
4.1.2. MYB gen bölgesi için FISH sonuçları

Malign melanom olgularımızı MYB gen delesyonu açısından incelediğimizde 6 olguda (olgu 4, 9, 10, 12, 16, 17) aberasyon saptadık. Bu olgulardan 2'sinde (olgu 4 ve 16) tüm parametreler açısından aberasyon gözlerken, olgu 12'de MYB delesyonu ve RREB1 gen kopya sayısı artışı saptanmıştır. Olgu 17'de ise MYB delesyon oranının %100 olduğunu gözledik (ekil 4.3.). Melanositik nevüs olgularından ise 3'ünde (olgu 19, 22 ve 35) MYB delesyonu saptadık. Bu olgular sırasıyla spitz nevüs, compound nevüs ve displastik nevüs olarak histopatolojik yöntemlerle raporlandırılmış olgulardır (Tablo4.6.)

Tablo 4.6. Malign melanom ve melanositik nevüs olgularının MYB gen bölgesi açısından FISH sonuçları

MAL GN MELANOM (MM)			MELANOS T K NEVÜS (MN)		
Olgu No	Tanı	MYB gen delesyon oranı (%)	Olgu No	Tanı	MYB gen delesyon oranı (%)
1	Nodüler MM	20	19	Spitz nevüs	46,7
2	Nodüler MM	0	20	Displastik kompond nevüs	16,7
3	Yüzeyel yayılan MM	0	21	Kompond nevüs	13,3
4	Yüzeyel yayılan MM	50	22	Kompond nevüs	53,3
5	Nodüler MM	26,7	23	Kompond nevüs	6,7
6	MM	26,7	24	Displastik kompond nevüs	10
7	Lentigo MM	6,7	25	Displastik kompond nevüs	36,6
8	Akral lentijinöz MM	23,3	26	Displastik kompond nevüs	20
9	Yüzeyel yayılan MM	76,7	27	Displastik kompond nevüs	0
10	Lentigo MM	46,7	28	Displastik kompond nevüs	10
11	MM	0	29	Displastik kompond nevüs	20
12	MM	50	30	Displastik kompond nevüs	30
13	Akral lentijinöz MM	0	31	Kompond nevüs	20

14	Lentigo MM	0	32	Kompond nevüs	20
15	Akral lentijinöz MM	0	33	Spitz nevüs	20
16	Nodüler MM	53,3	34	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs	16,7
17	Nodüler MM	100	35	Displastik kompond nevüs	50
18	MM	33,3	36	Displastik kompond nevüs	33,3
			37	ntradermal nevüs	20
			38	Displastik kompond nevüs	10
			39	Displastik kompond nevüs	3,3
			40	ntradermal nevüs	0
			41	ntradermal nevüs	13,3
			42	Displastik kompond nevüs	6,7



ekil 4.3. MYB gen bölgesinde delesyon, CCND1, RREB1 ve CEP6 bölgelerinde normal sinyal paterni gözlenen olgu 17'ye ait FISH görüntüsü

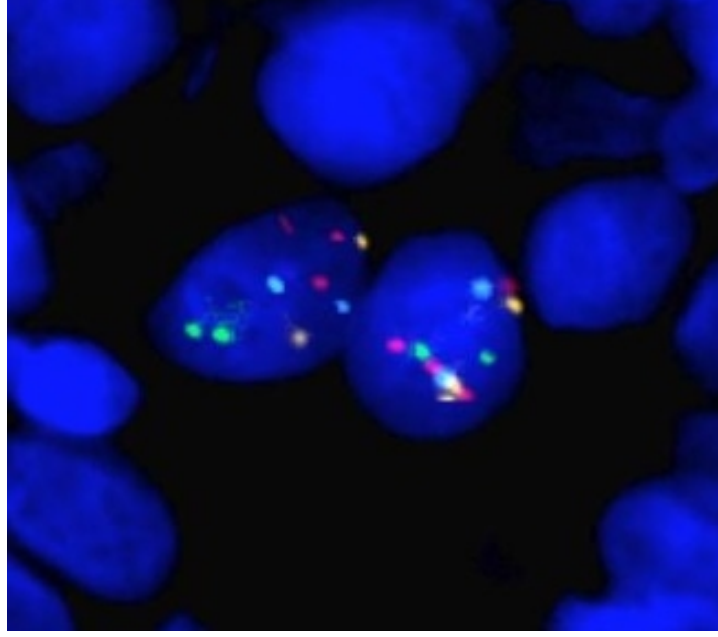
4.1.3. RREB1 gen bölgesi için FISH sonuçları

Çalı mamızda elde edilen FISH sonuçlarına göre 18 melanom olgusundan 8'inde (%44,44) RREB1 gen bölgesi için sinyal sayısında artı saptanmıştır (ekil 4.4.). Bu 8 olgudan 2'sini 4 parametre açısından aberasyon saptanan olgu 4 ve 16 olu turmu tur (ekil 4.6.). Geriye kalan olgulardan, olgu 8 ve 18'de, aynı zamanda CCND1 gen bölgesinde amplifikasyon ve olgu 12'de MYB gen bölgesi delesyonu gözlenmiştir. Melanositik nevüs olguları (24 olgu) arasında yer alan 2 olguda (olgu 19 ve 26) RREB1 gen kopya sayısı artı 1 gözlenmiş olup, bu olguların histopatolojik yöntemlerle aldığı tanımlar spitz nevüs ve displastik kompozit nevüs idi. Tablo 4.7.'de RREB1 gen bölgesi için FISH sonuçları belirtilmiştir.

Tablo 4.7 Malign melanom ve melanositik nevüs olgularına ait RREB1 gen bölgesi açısından FISH sonuçları

MAL GN MELANOM (MM)			MELANOS T K NEVÜS (MN)		
Olgu No	Tanı	RREB1 gen amp. oranı (%)	Olgu No	Tanı	RREB1 gen amp. oranı (%)
1	Nodüler MM	66,7	19	Spitz nevüs	63,3
2	Nodüler MM	0	20	Displastik kompond nevüs	10
3	Yüzeyel yayılan MM	13,3	21	Kompond nevüs	13,3
4	Yüzeyel yayılan MM	53,3	22	Kompond nevüs	0
5	Nodüler MM	16,7	23	Kompond nevüs	10
6	MM	13,3	24	Displastik kompond nevüs	26,7
7	Lentigo MM	3,3	25	Displastik kompond nevüs	0
8	Akral lentijinöz MM	76,7	26	Displastik kompond nevüs	36,7
9	Yüzeyel yayılan MM	3,3	27	Displastik kompond nevüs	0
10	Lentigo MM	0	28	Displastik kompond nevüs	0
11	MM	16,7	29	Displastik kompond nevüs	0
12	MM	50	30	Displastik kompond nevüs	0

13	Akral lentiginöz MM	53,3	31	Kompond nevüs	0
14	Lentigo MM	83,3	32	Kompond nevüs	0
15	Akral lentiginöz MM	0	33	Spitz nevüs	0
16	Nodüler MM	93,3	34	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs	0
17	Nodüler MM	0	35	Displastik kompond nevüs	0
18	MM	33,3	36	Displastik kompond nevüs	0
			37	ntradermal nevüs	0
			38	Displastik kompond nevüs	0
			39	Displastik kompond nevüs	3,3
			40	ntradermal nevüs	0
			41	ntradermal nevüs	6,7
			42	Displastik kompond nevüs	3,3



ekil 4.4. CCND1, MYB genleri ve CEP6 için normal sinyal paterni, RREB1 geni amplifikasyonu gözlenen olgu 1'in FISH görüntüleri

4.1.4. RREB1/CEP6 için FISH sonuçları

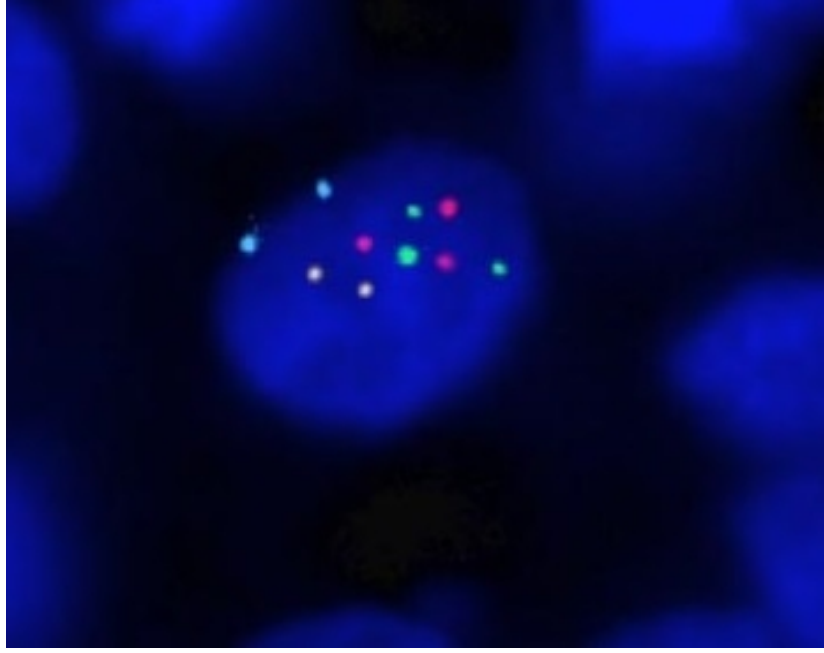
Çalı mamızda yer alan malign melanom ve melanositik nevüs olguları sentromer 6 açısından da incelenmi olup, RREB1 gen bölgesine ait sinyallerin sentromer 6 bölgesine ait sinyallerden fazla oldu u hücre sayısı %55 ve üzerinde ise olgularda amplifikasyon pozitif kabul edilmi tir. Elde etti imiz sonuçlara göre 18 malign melanom olgusundan 4'ünde RREB1/CEP6 oranında aberasyon gözlenmi tir. Melanositik nevüs olgularından birinde (olgu 19) amplifikasyon saptanmı tır (Tablo 4.8.). Bu olgu spitz nevüs olup MYB delesyonu ve RREB1 amplifikasyonu açısından da pozitif olarak de erlendirilmi tir.

Tablo 4.8. Malign melanom ve melanositik nevüs olguları için RREB1/CEP6

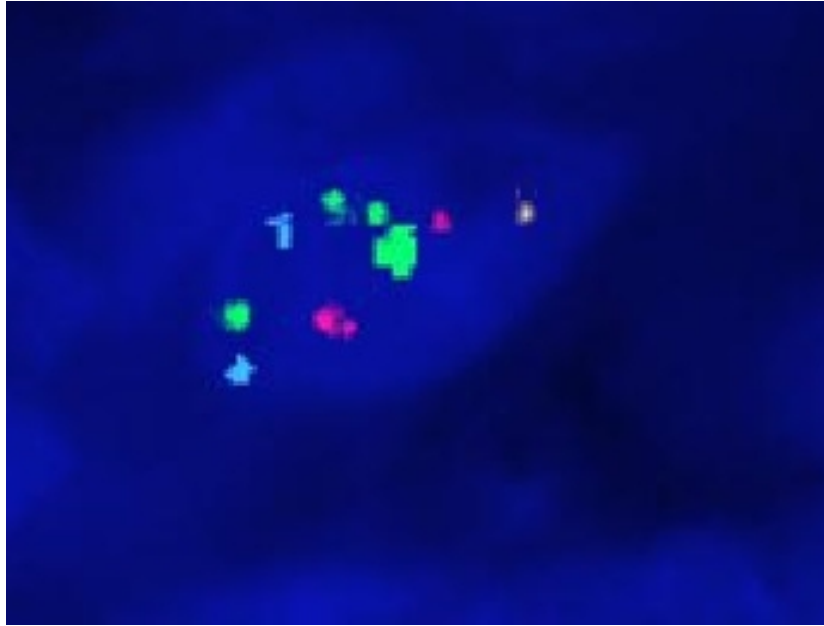
için FISH sonuçları

MAL GN MELANOM (MM)			MELANOS T K NEVÜS (MN)		
Olgu No	Tanı	RREB1 sinyal sayısı CEP6 sinyal sayısı oranı (%)	Olgu No	Tanı	RREB1 sinyal sayısı CEP6 sinyal sayısı oranı (%)
1	Nodüler MM	70	19	Spitz nevüs	60
2	Nodüler MM	0	20	Displastik Kompound nevüs	3,3
3	Yüzeyel yayılan MM	6,7	21	Kompound nevüs	6,7
4	Yüzeyel yayılan MM	56,6	22	Kompound nevüs	0
5	Nodüler tip MM	13,3	23	Kompound nevüs	20
6	MM	26,7	24	Displastik Kompound nevüs	10
7	Lentigo MM	3,3	25	Displastik Kompound nevüs	0
8	Akral lentijinöz MM	80	26	Displastik Kompound nevüs	13,3
9	Yüzeyel yayılan MM	10	27	Displastik Kompound nevüs	0
10	Lentigo MM	13,3	28	Displastik Kompound nevüs	0
11	MM	23,3	29	Displastik Kompound nevüs	0
12	MM	50	30	Displastik kompound nevüs	0

13	Akral lentiginöz MM	0	31	Kompond nevüs	3,3
14	Lentigo MM	6,7	32	Kompond nevüs	0
15	Akral lentiginöz MM	0	33	Spitz nevüs	0
16	Nodüler MM	93,3	34	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs	0
17	Nodüler MM	0	35	Displastik kompond nevüs	0
18	MM	23,3	36	Displastik kompond nevüs	0
			37	intradermal nevüs	0
			38	Displastik kompond nevüs	0
			39	Displastik kompond nevüs	0
			40	intradermal nevüs	0
			41	intradermal nevüs	0
			42	Displastik kompond nevüs	3,3



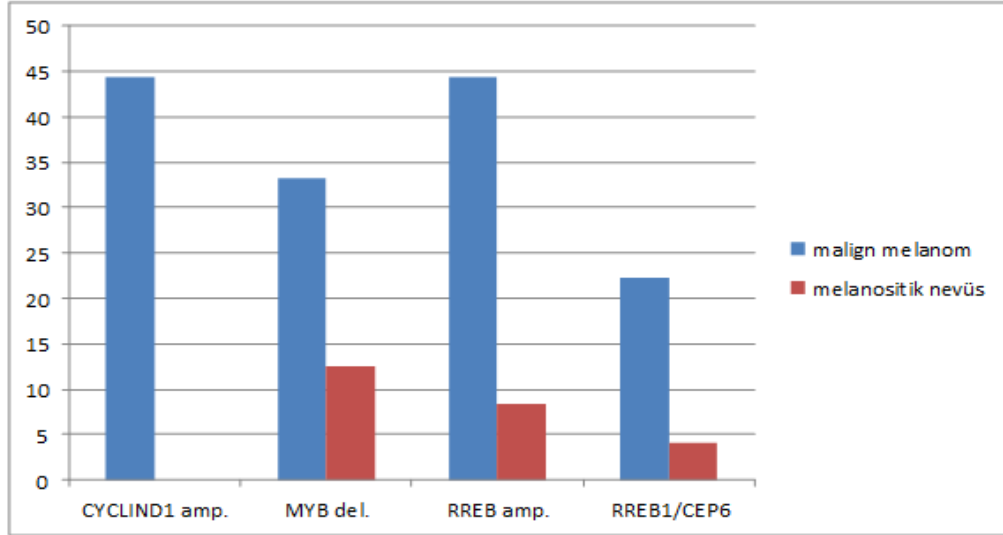
ekil 4.5. MYB ve CEP6 sinyalleri açısından normal, CCND1, RREB1/CEP6, RREB1 amplifikasyonu için pozitif değerlendirilen olgu 8'e ait FISH görüntüsü



ekil 4.6. CCND1, RREB1, RREB1/CEP6 amplifikasyonu ve MYB delesyonu pozitif gözlenen olgu 16'ya ait FISH görüntüsü

4.2. statiksel De erlendirme Sonuçları

Çalı ma sonuçlarımızın p de erlerini Fisher's Exact Testine göre hesaplandı. Elde etti imiz sonuçlar malign melanom ve melanositik nevüsler arasında önemli farklar oldu unu ortaya koymu tur (ekil 4.7.). nceledi imiz gen bölgeleri arasında yer alan CCND1 için p de eri 0,001'in altında bulunmu olup, iki grup arasındaki fark, önemli derecede anlamlı kabul edilmi tir. Bir di er incelenen gen bölgesi olan MYB için p de eri 0,609 olarak bulunmu olup, iki grubun ayrımını yapmak için yeterli farklılık gözlenmedi ini tespit edilmi tir. Amplifikasyon açısından incelenen RREB1 gen bölgesi için p de eri 0,002 bulunmu olup, iki grup arasında önemli farklılık oldu u belirlenmi tir. Bu gen bölgesine ait sinyal sayısının sentromer 6 bölgesine ait sinyal sayısından fazla olma durumu için hesaplanan p de eri 0,001'in altında bulunmu olup, önemli derecede anlamlı olarak kabul edilmi tir.



ekil 4.7. Malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında CCND1, MYB, RREB1 ve RREB1/CEP6 aberasyonlarının görülme oranlarının karşılaştırılması.

5. TARTI MA

Çalı mamızda Eski ehir Osmangazi Üniversitesi, Patoloji Ana Bilim Dalı'nda malign melanom ve melanositik nevüs tanısı alan hastalarda CCND1, RREB1, CEP6 ve MYB yeniden düzenlenmeleri FISH yöntemi ile ara tırılmı tır. Çalı mamızın sonuçları literatür ile kar ıla tırılarak tartı ılacaktır.

5.1. Olgularda Aberasyon Görülme Oranlarının Kar ıla tırılması ve FISH Etkinli inin De erlendirilmesi

Amacımızın RREB1, MYB, CEP6 ve CCND1 bölgelerindeki aberasyonların malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasındaki görülme farklılıklarını ortaya koymak oldu u çalı mamız sonucunda 18 malign melanom olgusunun 15'inde (%83), 24 melanositik nevüs olgusunun 4'ünde aberasyon (%17) saptandı.

Newman ve arkadaşları 2009 yılında, melanom ve melanositik nevüslerin ayırımını yapmak amaçlı RREB1, MYB, CEP6 ve CCND1 bölgelerine ait prob seti ile FISH yöntemini kullanarak, 36 nevüs kaynaklı melanom ve 6 derin dermal nevoid melanomayı incelemi lerdir. Sonuçlarını de erlendirmek için cut-off de erlerini Gerami ve arkadaşlarının belirledi i de erler olarak kabul etmi lerdir (14). Nevüs kaynaklı 36 melanom olgusundan 28'inde (%78) 4 bölgeden en az bir tanesinde aberasyon saptamı lardır. Di er grup olan 6 nevoid melanomun tümünde (%100) aberasyon gözlemi lerdir. Tüm örneklerin benign bölgeleri söz konusu dört bölge açısından incelendi inde hiçbir aberasyon saptanmamı tır. Elde ettikleri sonuçlara göre çalı an grup yüksek spesifite ve sensitivite ile bu dört bölgenin FISH ile analizi sonucu, melanom ve melanositik nevüsler arasındaki farkların ortaya konuldu unu ve ayırımlarını yapmada etkili bir yöntem oldu unu savunmu lardır (36).

Melanom hastalarında sentinal lenf nodu artı ı gözlendi ini, patologların sık kar ıla tıkları bu melanositik yapıları, benign nevüs ya da melanom olarak kolayca sınıflandırılmadı nı belirten Dalton ve arkadaşları, 2010 yılında 41 hastadan alınan 59

doku (24 lenf nodu metastazı, 17 noval nevüs, 18 primer melanom) örneğini, intranodal nevüslerin, metastaz gösteren melanomlardan ayırımını yapabilmek amacıyla, FISH yöntemi ile RREB1, MYB, CCND1 gen bölgelerinin ve sentromer 6'nın kopya sayısını de i ikliklerini incelemi lerdir. Her olguda otuz hücre analiz etmi lerdir. Metastatik melanom olguların %83 (20/24)'ünde aberasyon saptamı lardır. Geriye kalan 4 örnekten ikisi kesin olarak metastaz gösteren melanom olmasına kar ın, FISH ile yanlış negatif sonuç elde etmi lerdir. Metastazı bulunmayan bu olgulardan birinde daha sonra beyinde metastaz geli mi tir. Di er olguda lezyonun nevüs olabilece ini dü ünmü lerdir. Primer melanomların %78 (14/18)'inde aberasyon saptanmı olup, geriye kalan örneklerden bir tanesinde tanı de i ikli i yapmı lardır, ancak histomorfolojik olarak sınıflandıramamı tır. Di er grup olan ve 17 örnek içeren nodal nevüs olgularında da sadece bir olguda anomali saptanmı olup, yanlış pozitif olarak de erlendirilmi tir. Çalı mayı yürüten grup aldatici sitomorfolojik bulguların FISH yönteminde yanlış pozitif sonuçlar verebilece ini savunmu lardır. Primer tümörlerindeki aberasyonları bilinmeyen olgularda, FISH sonucu ile aberasyon saptanmadı ında, metastaz melanom tanısının dı lanılmaması gerekti ini savunan grup, primer tümörlerin aksine lenf nodlarında anomali bulunmaması sebebiyle, FISH ile anomali saptanmadı ında nodal nevüs olarak kabul edilebilece ini öne sürmü lerdir. Sonuç olarak grup, melanosit nodalların sadece geleneksel yöntemlerle analiz edilemeyece ini, FISH'in yardımcı bir yöntem oldu unu belirtmi lerdir (10).

Gerami ve arkadaş ları'nın 2010 yılında yüzeysel yayılan melanositik neoplazm olgularını 6p25, 6p25/CEP6, 11q13 ve 6p23 bölgelerini FISH yöntemi ile inceledikleri çalı mada 24 olgu yer almaktadır. Spitz nevüs, displastik nevüs ve melanomların histopatolojik yöntemlerle ayırımının zor oldu unu belirten grup, dermatologlar tarafından de erlendirilip, melanom tanısı alan 7 olgudan 5'inde (%71) FISH ile aberasyon saptamı lardır. Dermatologlar tarafından benign karakterde oldu u kabul edilen 6 nevüs örneğinin hiçbirinde FISH ile anomali saptanmamı tır. Tanısına karar verilemeyen 11 melanositik neoplazmın 2 tanesinde aberasyon gözlenmi tir. Bu 2 olgudan birinin atipik özellikler ta ıdı ı belirtilmi tir. Süperfisial spreading (yüzeysel yayılan) olgularının spitz nevüs, displastik nevüs ve primer melanomlarından ayırımının zor olmasından dolayı, çalı mayı yürüten grup, uzman dermatologların görü ü olmadan

ve FISH ile aberasyon saptanmadan, olguların primer melanom oldu una karar verilemeyece ini belirtmi lerdir (16).

Mudhar ve arkada ları'nın 2012 yılında yaptıkları resrospektif çalı mada, konjunktival benign nevüs ve in situ ya da invasiv melanom örneklerini içeren 18 olgu yer almakta olup, bu olgulardan 7 tanesinin tanısı histopatolojik olarak kesinle tirilememi tir. Bu olguları CCND1 gen artı 1, MYB gen kaybı, RREB1 gen artı 1, RREB1/CEP6 açısından, FISH ile inceleyen grup, cut-off de erleri olarak daha önce belirtilen, Gerami ve arkada ları'nın belirledi i de erleri kabul etmi olup (14), benign nevüs örneklerinin hiçbirinde anomali saptamamı , melanom örneklerinin tümünde ise aberasyon saptamı lardır. Tanısı belirsiz olan 7 olgudan 5'inde FISH ile aberasyon saptanmı olup, bu olguları in situ ya da invasiv melanom olarak kabul etmi lerdir. Geriye kalan iki olgudan birinde anomali gözlenmez iken, di er olgunun tetraploidi oldu u görülmü tür ve bu iki olgu benign nevüs olarak kabul edilmi tir. Elde ettikleri sonuçlara göre, çalı mayı yürüten grup FISH yönteminin, özellikle tanısı histopatolojik olarak belirlenemeyen olguların tanılarını kesinle tirmede oldukça yardımcı bir yöntem oldu unu savunmu lardır (35).

Pennacchia ve arkada ları, 2012 yılında yaptıkları çalı mada daha önce junctional nevüs olarak yanlış tanı konuldu una emin oldukları 8 olguyu FISH yöntemi ile CCND1, MYB, RREB1 ve RREB1/CEP6 açısından inceleyip, cut-off de erlerini Gerami ve arkada ları'nın belirledi i de erler (14) olarak belirleyen grup, benign nevüs oldu u kesin olan 5 olguyu da kontrol grubu olarak incelemi lerdir. Elde ettikleri FISH sonuçlarında kontrol grubu olgularının tümünün normal oldu u gözlenirken, yanlış tanı alan 8 olgudan 7'sinde aberasyon saptanmı olup, bu olgular junktional melanom olarak de erlendirilmi tir. Do ru tanı konulmasının sadece akademik açıdan de il, tedavi sürecinde de önemli oldu una vurgu yapan ekip, FISH yönteminin do ru tanı konulmasında oldukça etkili oldu unu savunmu lardır (38).

Martin ve arkada ları'nın 2012 yılında, 14 malign melanom ve 62 melanositik nevüs (51'i spitz nevüs) olgusunu CCND1, MYB, RREB1, RREB1/CEP6 açısından, FISH yöntemi ile inceledikleri çalı mada, 14 melanom olgusunun 12'sinde (%85) melanositik nevüs olgularının ise %6'sında (4/62) aberasyon saptanmı tir. Aberasyon

saptanan melanositik nevüs olgularının tümü spitz nevüstür ve bu olguların tanılarını melanom olarak de erlendirmişlerdir. Ara tırcılar histopatolojik inceleme sonrası nevüs olarak tanımlanan, FISH yöntemi ile aberasyon saptanan olguların tanıları açısından tekrar de erlendirilmeleri gerektiğini savunmuşlardır (32).

Çalışmamız sonucu melanom olgularında saptadığımız aberasyon oranımız %83'tür. Bu oran Newman, Dalton, Gerami, Mudhar, Pennacchia, Martin ve arkadaşlarının saptadıkları %78- %100 oran aralığında bulunmuştur ve çalışmamız bulguları ara tırcıların bulguları ile uyumlu olarak de erlendirilmiştir. Bizim de literatürde verilen bazı çalışmalarda olduğu gibi, malign melanom olup, beklenenin aksine FISH ile aberasyon negatif bulunan olgularımız mevcuttur (10,16,36,32). Bu olguların yanlış negatif olgular olduğunu söyleyebilmesi için literatüründe belirttiği gibi detaylı histopatolojik de erlendirmenin tekrarlanması ve klinik izleniminin yapılması gerekir. Bu detaylı patolojik de erlendirme ve klinik izlem sonrası karara varılabilecek olgularımızın çalışılan bölgelerimiz açısından FISH negatif olmaları yanında farklı genetik anomalilere sahip olabilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Yapılan çalışmalarda genellikle melanositik nevüs olgularında, incelenen bölgeler açısından herhangi bir aberasyon saptanmamıştır (16, 35, 36, 38). Martin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 51 spitz nevüs olgusunun 4'ünde (%7,81) aberasyon saptamışlar ve tanılarını melanom olarak de erlendirmişlerdir (32). Çalışmamızda melanositik nevüslerde aberasyon bulma oranımız %17 olup literatür ile farklılık göstermektedir. Bu farklılığın neden olan dört olgumuz incelendiğinde histopatolojik tanılar spitz nevüs, displastik nevüs ve kompozit nevüs olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3). Literatürde de belirtildiği gibi bu sınıf nevüslerin histopatolojik özellikleri oldukça aldatıcı olabilmektedir (42). Oranımızın yüksek olması histopatolojik de erlendirmenin tekrarlanması gerekliliğini düşündürmektedir. Ancak Dalton ve arkadaşları yaptıkları çalışmada gösterdikleri gibi az da olsa FISH ile yanlış pozitif sonuç elde etme olasılığı da bulunmaktadır. Ara tırcılar %6'lık bir oranla 17 melanositik nevüs olgusundan 1'inde anomali bulmuştur (10). Ancak oranımız yine de oldukça yüksek olup, olgularımızın yeniden histopatolojik olarak

de erlendirildikten sonra FISH analizinde yanlış pozitiflik konusunda sonuca varılabilece i dü ünülmü tür.

Tablo 5.1. Bulgularımızın literatür bilgileri ile karşılaştırılması

Ara tırıcı	Örnek tipi	Aberasyon saptama oranı (%)
Newman ve ark. 2009	36 Nevüs kaynaklı melanom	77,77
	6 derin dermal nevoid melanom	100
	42 melanositik nevüs	0
Dalton ve ark. 2010	24 metastaz gösteren lenf nodu	83
	18 primer melanom	78
	17 nodal nevüs	6
Gerami ve ark. 2010	7 malign melanom	71
	6 melanositik nevüs	0
	11 tanısı belirsiz melanositik lezyon	18
Mudhar ve ark. 2012	4 malign melanom	100
	7 melanositik nevüs	0
	7 tanısı belirsiz melanositik lezyon	71
Pennacchia ve ark. 2012	8 malign melanom	87
	5 melanositik nevüs	0
Martin ve ark. 2012	14 malign melanom	85
	62 melanositik nevüs	6
Bizim çalı mamız 2014	18 malign melanom	83
	24 melanositik nevüs	17

Ayrıca literatürde ulaşılabilen kısıtlı sayıdaki araştırmalar ve olgu sayıları göz önünde bulundurulduğunda bütün bu sonuçların karşılaştırılıp değerlendirilmesi için yeni olgu serilerinde yapılacak çalışmaların verilerine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda malign melanom olgularında incelediğimiz bölgelere ait aberasyonların saptanma oranları literatürle uyumlu bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde de malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında RREB1, RREB1/CEP6 ve CCND1 aberasyonlarının görülme oranlarındaki farklılıklar açısından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 5.1). Bu nedenle literatürde de belirtildiği gibi FISH ile saptanabilen, sözü geçen aberasyonların malign melanom ve melanositik nevüs olguları için ayırıcı tanı kriteri olarak kabul edilebileceği görülmüştür. Çalışmamızda malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında MYB delesyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Melanositik nevüs olgularında MYB gen delesyon görülme oranı %12,5 olarak belirlenmiştir, ancak bu aberasyonu saptadığımız olguların tanımlarının spitz nevüs, displastik nevüs ve compound nevüs olması sebebiyle daha önce de belirttiğimiz gibi histopatolojik değerlendirilmenin tekrarının gerekliliği bulunmaktadır.

5.2. Melanom Olgularında RREB1 ve RREB1/CEP6 Yeniden Düzenlenme Oranlarının Karşılaştırılması

Çalışmamız sonucunda 18 malign melanom olgusunun 8'inde (%44) RREB1 kopya sayısı artışı saptanmış ve bu 8 olgudan 4'ünde aynı zamanda RREB1/CEP6 oranında artışı gözlenmiştir. Saptanan aberasyonlar arasında en yüksek oranda gözlemediğimiz aberasyon RREB1 kopya sayısı artışı olmuştur.

Newman ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, 36 nevüs kaynaklı melanom olgusundan 28'inde aberasyon saptamışlardır. Bu 28 olgunun tümünde (%100) RREB1 kopya sayısı artışı gözlemi olup, 20'sinde (%55,5) RREB1/CEP6 oranında artışı saptamışlardır. Diğer grup olan 6 nevoid melanom olgusunun tümünde

aberasyon gözlemi olup, bu olgulardan 5'inde (%83) RREB1 kopya sayısı artışı ve 4'ünde (%66,6) RREB1/CEP6 oranında artışı gözlemi lerdir. Bu olguların 3'ünde ise her iki aberasyonun varlığı saptanmıştır. Ara tırmacılar bu çalışmada, en sık gözlenen anomalinin RREB1 gen amplifikasyonu olduğunu belirtmişlerdir (36).

Gerami ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada 7 malign melanom olgusunun 5'inde aberasyon saptanmıştır. Bu 5 olgunun tümünde RREB1 gen kopya sayısı artışı gözlenmiş olup, 4'ünde aynı zamanda RREB1/CEP6 oranında artışı saptanmıştır ve en yüksek oranda karışıklıkları aberasyonun RREB1 kopya sayısı artışı olduğunu belirtmişlerdir (16).

Martin ve arkadaşları, 2012'de yaptıkları çalışmada, 14 malign melanom olgusundan 10'nunda (%71) RREB1 kopya sayısı artışı saptanmış olup, bu 10 olgudan 2'sinde aynı zamanda RREB1/CEP6 oranında artışı gözlemi lerdir. Aberasyon saptanan olgularda, en yüksek oranda gözlenen anomali RREB1 amplifikasyonu olmuştur (32).

Çalışmamız sonuçları, malign melanom olgularında en sık gözlenen anomalinin, RREB1 kopya sayısı artışı olması açısından literatürler ile uyumlu bulunmuştur. Malign melanom olgularında en fazla RREB1 gen bölgesinde aberasyon gözlenmesinin sebebini RAS yoluyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü daha öncede belirttiğimiz gibi, Haluska ve arkadaşları melanom olgularının neredeyse tümünde RAS iletim yolunda değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir (18). Kalsitonin geni RAS/RAF ilişkili olan transkripsiyonel yanıtı attırmaktadır ve RREB1 gen ürünü, kalsitonin geninin promotor bölgesine bağlanarak kalsitoninin ekspresyonunu artırır. Bu nedenle RREB1 dolaylı olarak RAS/RAF yolunu aktive eder ve hücrenin apoptozisten kaçarak kontrolsüz çoğalmasına neden olur.

5.3. Melanom Olgularında MYB Yeniden Düzenlenmelerinin Görülme Oranlarının Karşılaştırılması

Çalışmamızda MYB yeniden düzenlenmesini incelediğimiz 18 malign melanom olgusunun 6'sında (%33) MYB delesyonu saptanmıştır.

Literatürde, kısıtlı sayıda MYB delesyon oranı bilgilerine ulaşılmıştır. Newman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sonucunda malign olguların %14'ünde (5/42), Martin ve arkadaşları ise %7 oranında (1/14) MYB gen delesyonu saptamışlardır (32, 36).

Literatürde belirtilen MYB delesyonu görülme oranları ile çalışmamız sonuçları karşılaştırıldığında, bizim elde ettiğimiz oranın daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

ileride yapılacak çalışmalar ile olgular arasındaki fenotipik özellikler göz önüne alınarak, MYB gen delesyonlarının görülme oranı farklılığının hastalık prognozuna etkisi araştırılabilir. Bastian ve arkadaşları 1998 yılında, melanom olgularında kromozom bölgelerinin kayıp ve artılarını CGH yöntemi ile araştırdıkları çalışmada 6. kromozom kısa kol artıları ve uzun kol kayıplarının tümör progresyonunda daha geç evrede gözlemlendiğini öne sürmüşlerdir (3). Aynı şekilde Mertens ve arkadaşlarının 1997 yılında, 3185 malign dokuda kromozom anomalilerini inceledikleri çalışmanın sonucunda 6. kromozomun uzun kol delesyonlarının sekonder anomali olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda MYB gen delesyonu oranının yüksek olmasının, tümör progresyonuyla ilişkisi zaman içinde daha fazla olguda yapılacak analizlerle araştırılabilir. Ancak malign melanomlarda MYB delesyonu ve tümör progresyonu arasındaki ilişkinin kesin olarak ortaya konulması için daha fazla sayıda literatür bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır.

5.4. Melanom Olgularında CCND1 Yeniden Düzenlenme Oranlarının Karşılaştırılması

Çalışmamız sonucunda malign melanom olgularında CCND1 kopya sayısı artışının görülme oranı %44 olarak belirlenmiştir.

Newman ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu malign melanom olgularında CCND1 kopya sayısı artışının görülme oranları %12'dir (36).

Literatürlerde en sık gözlenen aberasyonun RREB1 kopya sayısı artışı olduğu belirtilmesine karşın, bizim çalışmamızda en yüksek oranda gözlenen aberasyonlar arasında RREB1 ve CCND1 kopya sayısı artışılarıdır ve her iki aberasyonun görülme oranı %44 olarak belirlenmiştir. Tümör progresyonu ve CCND1 amplifikasyonu arasında ilişki kurulabilmesi ancak gelecekte geniş ölçekli serileriyle çalışmalar yapılması sonucunda gerçekleşebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasındaki RREB1, RREB1/CEP6, CCND1 ve MYB kopya sayısı de i ikliklerin FISH yöntemi ile ortaya konulmasını ve benign / malign lezyonların ayrımının yapılmasında FISH yönteminin etkinli inin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda;

- Malign melanom olgularının %83'ünde aberasyon saptanmıştır.
- Melanositik nevüs olgularının %17'sinde aberasyon saptanmıştır.
- Görülme oranı en yüksek olan aberasyonlar RREB1 ve CCND1 kopya sayısı artışı olarak belirlenmiştir.
- Melanositik nevüs olgularında CCND1 gen amplifikasyonu saptanmamıştır.
- Malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasındaki CCND1, RREB1, RREB1/CEP6 aberasyonları açısından farklılık, istatistiksel olarak ayırıcı tanı kriteri olması yönünden anlamlı bulunmuştur.
- Malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında MYB delesyonu açısından farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamız malign melanom ve melanositik nevüs olgularına tanı konulmasında histopatolojik bulgularının yanı sıra FISH yönteminde etkili bir yöntem olabilece ini göstermektedir. Malign melanom olgularında, melanositik nevüs olgularına oranla yüksek oranda aberasyon saptanması, mortalite oranı artışı için erken tanının oldukça önemli olduğu bu olguların, ayırıcı tanısında FISH yönteminin de kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Dolayısıyla histopatolojik yöntemlerle FISH yönteminin birlikte kullanılmasının doğru tanı koyma başarı oranını arttıracaktır inü ünmekteyiz.

Melanositik nevüs tanısı almı olgularda incelenen bölgelerde kopya sayısı de i ikli i saptanması, bu olguların tekrar histopatolojik olarak de erlendirilmesi gereklili ini ortaya koymaktadır.

Çalı manın devamı olarak histopatolojik olarak malign melanom tanısı almı , ancak FISH yöntemi ile aberasyon saptanmayan olgularda mutasyon ve gen ekspresyon çalı maları planlanmı tır. Ayrıca aberasyon saptanan olguların klinik verileriyle bulunan anomaliler arasındaki ili ki saptanmaya çalı ılacaktır.

Ula abildi imiz literatürler do rultusunda çalı mamız, Türk popülasyonunda malign melanom ve melanositik nevüs olgularında RREB1, RREB1/CEP6, MYB ve CCND1 yeniden düzenlenmelerinin incelendi i ilk çalı ma özelli indedir. Gerçekle tirdi imiz çalı ma ve sonraki dönemlerde daha geni hasta gruplarında yapılacak moleküler çalı malar yeni takip ve tedavi protokollerinin geli tirilmesinde rol oynayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Abbas, K., and Mitchell, F., 2007, Temel patoloji, (Çev.: Çevikba , U.), 8. Basım.
2. Arsav, V., 2006, Benign, sınırdaki ve malign pigmentli deri lezyonlarının ayırıcı tanısında VEGF, BFGF, P- CADHER N ve E-CADHER N'in rolü, Tıpta uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 59.
3. Bastian, B.C., LeBoit, P.E., Hamm, H., 1998, Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization, *Cancer Res.*, 58:2170-2175.
4. Bastian, B.C., Wesselmann, U., Pinkel, D., LeBoit, P., 1999, Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi shows cellular differences to melanoma, *J Invest Dermatol*, 113:1065-1069.
5. Bastian, B.C., Olshen, A.B., LeBoit, P.E., Pinkel, D., 2003, Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes, *Am J Pathol*, 163:1765-1770.
6. Beadling, C., Jacopson-Dunlop, E., Hodi, S., 2008, KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes, *Clin Cancer Res*, 14:6821-6828.
7. Chin, L., Garraway, L.A., Fisher D.E., 2006, Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era, *Genes Dev.*, 20: 2149-2182.
8. Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2006, Hücre: Moleküler yaklaşımlar, 3.baskı.
9. Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., Bastian, B.C., 2006, Somatic aktivasyon of KIT in distinct subtypes of melanoma, *J Clin Oncol.*, 24:4340-4346.

10. Dalton, S.R., Gerami, P., Kolaitis, N., Charzan, S., Werling, R., LeBoit, P.E., Bastian, B.C., 2010, Use of fluorescence in-situ hybridization (FISH) to distinguish intranodal nevus from metastatic melanoma, *Am J Surg Pathol.*, 34(2): 231-237.
11. Do an, A.L., ve Güç, D., 2004, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:34-42.
12. Erenler., B.H., 2010, Melanositik nevüs ve malign melanom tanısında kullanılan immünohistokimyasal belirleyicilerin karılaştırılması, *On dokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi*, 67.
13. Fecher, L.A., Cummings, S.D., Keefe, M.J., Alani, R.M., 2007, Toward a molecular classification of melanoma, *J Clin Oncol*, 25:1606-1620.
14. Gerami, P., Jewell, S.S., Morrison, L.E., Blondin, B., Schulz, J., Ruffalo, T., Matushek, P., Legator, M., Jacobson, K., Dalton, S.R., Charzan, S., Kolaitis, N.A., Guitart, J., Lersbarapa, T., Boone, S., LeBoit, P.E., Bastian, B.C., 2009, Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma, *Am J Surg Pathol*, 33:1146-1156.
15. Gerami, P., Mafee, M., Lurtsbarapa, T., Guitart, J., Haghghat, Z., Newman, M., 2010, Sensitivity of fluorescence in situ hybridization for melanoma diagnosis using RREB1, MYB, Cep6 and 11q13 probes in melanoma subtypes, *Arch Dermatol*, 146(3):273-278.
16. Gerami, P., Barnhill, R., Beilfuss, B.A., LeBoit, P., Schneider, P., Guitart, J., 2010, Superficial melanocytic neoplasms with pagetoid melanocytosis, *Am J Surg Pathol.*, 34:816-821.

17. Guldberg, P., Straten, P., Birck, A., 1997, Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma, *Cancer Res*, 57:3660-3663.
18. Haluska, F.G., Tsao, H., Wu, H., 2006, Genetic alterations in signaling pathways in melanoma, *Clinic Cancer Research*, 12:2301-2307.
19. Handolias, D., Hamilton, A., Salemi, R., Tan, A., Moodie, K., Keer, L., Dobrovic, A., McArthur, G.A., 2010, Clinical responses observed with imatinib or sorafenib in melanoma patients expressing in KIT, *British Journal Of Cancer*, 102, 1219-1223.
20. <http://jco.ascopubs.org/content/25/12/1606/F1.large.jpg>
21. <http://www.turkcancer.org.tr>
22. <http://www.mmmp.org/MMMP/import.mmmp?page=overview.mmmp>
23. <http://www.mmmp.org/MMMP/import.mmmp?page=epidemiology.mmmp>
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6239>
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4602>
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/595>
27. <http://radiographics.rsna.org/content/31/6/1717/F2.large.jpg>
28. Jackson, S., Harland, M., Turner, F., 2005, No evidence for BRAF as a melanoma/nevus susceptibility gene, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14:913-918.

29. Klug, W.S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2011, Genetik kavramlar, 8. baskıdan çeviri.
30. Ko, J.M., and Fisher, D.E., 2011, A new era: melanoma genetics and therapeutics, *Journal of Pathology*, 223: 241-250.
31. Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E., Hemminki, K., 2004, BRAF mutation are common somatic events in melanocytic nevi, *J. Invest Dermatol* , 122:342-348.
32. Martin, V., Banfi, S., Bordoni, A., Leoni-Parvex, S., Mazzucchelli, L., 2012, Presence of cytogenetic abnormalities in spitz naevi: a diagnostic challenge for fluorescence in situ hybridization analysis, *Histopatology*, 60,336-346.
33. Mertens, F., Hohansson, B., Höglund, M., 1997, Chromosomal imbalance maps of malignan solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms, *Cancer Res*, 57:2765-2780.
34. McGinnis, K.S., Lessin, S.R., Elder, D.E., Guerry, D., Schuchter, L., Ming, M., Elenitsas, R., 2002, Pathology rewiev of cases presenting to a multidisciplinary pigmented lesion clinic, *Arch Dermatol*, 138:617-621.
35. Mudhar, H.S., Smith, K., Talley, P., Whitworth, A., Atkey, N., Rennie, G., 2013, Fluorescence in situ hybridization (FISH) in histologically challenging conjunctival melanocytic lesions, *Br J Ophtalmol*, 97,40-46.
36. Newman, M.D., Lertsburapa, T., Mirzabeigi, M., Mafee, M., Guitart, Gerami, P., 2009, Fluoscence in situ hybridization as a tool for microstaging in malignant melanoma, *Modem Pathology*, 22, 989-995.
37. Omholt. K., Platz, a., Knater, L., 2003, NRAS nd BRAF mutations arise early during melanoma pathogeneis and preserved throughout tumor progression, *Clin cancer res.*, 9;6483-6488.

38. Pennacchia, I., Garcovich, S., Gasbarra, R., Leone, A., Arena V., Massi, G., 2012, Morphological and molecular characteristics of nested melanoma of elderly (evolved lentiginous melanoma), *Virchows Arch*, 461:433-439.
39. Rieder, H., Bonwetsch, C., Janssen, LAJ., Maurer, J., Janssen, IWG., Schwartz, S., Ludwig, WD., Gassmann, W., Bartram, CR., Thial, E., Löffler, H., Gökbuget, N., Holzer, D., Fonatsch, C., 1998, High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 12:1473-1481.
40. Saldanha, G., Purnell, D., Fletcher, A., Potter, L., Gillies, A., Pringle, J.H., 2004, High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types, *Int. J. Cancer*; 111: 705-710.
41. Stalh, J.M., Sharma, A., Cheung, M., 2004, Deregulated AKT3 activity promotes development of malignant melanoma, *Cancer Res*, 64:7002-7010.
42. im ek, H.A., 2009, Derinin melanositik lezyonlarının ayırıcı tanısında moleküler yöntemlerin katkısı, Uzmanlık tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, 65.
43. Tsao, H., Zhang, X., Benoit, E., Haluska, F.G., 1998, Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines, *Oncogene*, 16, 3397-3402.
44. Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., Haluska, F.G., 2004, Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma, *J Invest Dermatol*, 122:337-341.

ÖZGEÇM

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Sevgi I İK

Do um Tarihi ve Yeri : 16.07.1986 ESK EH R

Uyru u : T.C.

Medeni Durumu : Evli

İleti im Adresleri : Yıldıztepe mh. Kaleli sk. Aydınlar Apt. 7/7 ESK EH R

sevgiozpolat@gmail.com

E itim Durumu

2009 – 2014 ESOĞÜ Sa lık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı - Yüksek Lisans

2004 – 2009 ESOĞÜ Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü- ESK EH R - Lisans

2000 – 2003 Cumhuriyet Lisesi – ESK EH R - Lise

1997 – 2000 Battalgazi İkö retim Okulu - Ortaokul

1992 – 1997 Battalgazi İkö retim Okulu - İkokul

Uluslar Arası Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1. Aras B.D., Gündüz, E., Ozpolat, S., Ozdemir M., Cilingir O. , Artan S., Akay, O.M., Importance of clonal expansion of cytogenetic aberations in the patients resistant to imatinib therapy, 2013, Chromosome Research Vol:21, No:1, P94
2. Ozpolat, S., Akay, O.M., Ozdemir, M., Andıç, N., Cilingir, O., Gündüz, E., Artan, S., Aras, B.D., Miyeloid Hastalıklarda Nadir Görülen zokromozom 5p Anomalisi, 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2013, Antalya

Katıldı ı Ulusal Bilimsel Toplantılar

1. II . Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, ubat 2011, zmir
2. X. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Aralık, 2012, Bursa