



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Başkan: Prof. Dr. Aşım Büge Öz

Danışman: Doç. Dr. Övgü Aydın

**SPİTZOİD MORFOLOJİDE MELANOSİTİK
LEZYONLARDA RREB-1, MYB, CCND1 VE 9p21
(CDKN2A) GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN FISH
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE
PROGNOZ-MALİGNİTE İLE İLİŞKİSİ**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Deniz ÜNLÜER KAPIŞKAY

İstanbul – 2017



Bu tez Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nca desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince ve tez çalışmam sırasında bütün bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, beni dermatopatoloji ile tanıştıran bu denli sevmeme olanak sağlayan, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Cuyan Demirkesen'e,

Tez çalışmam süresince Acıbadem Üniversitesi Patoloji Laboratuvarı'nın tüm imkanlarından faydalanmamı sağlayan ve çalışmamın tüm maddi desteğini üstlenen Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Ümit İnce'ye,

Tez danışmanlığı üstlenen ve desteği ile yanımda yer alan Doç. Dr. Övgü Aydın'a,

Asistanlık dönemimde bilgi ve tecrübelerini aktaran, başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ayşim Büge Öz olmak üzere tüm hocalarıma,

Tecrübelerinden faydalanma olanağı bulduğum tüm değerli uzmanlarıma,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her zorlukta danıştığım kıdemlilerim Bilge, Emre, Songül, Ertuğrul, Atay, Zeynep ve Emel'e,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım ve yanımda oldukları için kendimi şanslı hissettiğim Neslihan, Özden, Gamze, Kerem, Reha, Cansu Yol, Cansu Türker, Özce, Penbegül, Selçuk ve Zehra'ya,

Tez çalışmam sırasında özverili ve gayretli çalışmaları için başta Songül Pınar Barut olmak üzere Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Asistanlığım boyunca bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum laborant arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca desteklerini bana hissettiren, attığım her adımda arkamda olduklarını bildiğim ve kendileri ile gurur duyduğum sevgili annem Tülin Ünlüer, babam Tarık Ünlüer, kardeşlerim Erkin ve Pınar Ünlüer'e,

Her zaman yanımda olduğunu bildiğim, desteği ile zorluklara göğüs gerdiğim sevgili hayat arkadaşım Yusuf Emrah Kapişkay'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Deniz ÜNLÜER KAPIŞKAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	VII
TABLO LİSTESİ.....	VIII
GRAFİK LİSTESİ.....	XIV
RESİM LİSTESİ.....	XV
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1.GİRİŞ.....	5
2.AMAÇ.....	6
3.GENEL BİLGİLER.....	7
3.1.TARİHÇE.....	7
3.2.KLİNİK ÖZELLİKLER.....	13
3.2.1.Spitz Nevüslerin Klinik Özellikleri.....	13
3.2.2.Spitzoid Malign Melanomların Klinik Özellikleri.....	15
3.2.3.Atipik Spitz Tümörlerin Klinik Özellikleri.....	15
3.3.HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	17
3.3.1.Spitz Nevüslerin Histopatolojik Bulguları.....	17
3.3.1.1. Tek Tek Dağılan Hücreler İçeren İntradermal Spitz Nevüs (Lentiginöz/Pagetoid Spitz Nevüs).....	18
3.3.1.2.Junktional Spitz Nevüs.....	18
3.3.1.3.Bileşik (Kompond) Spitz Nevüs.....	18

3.3.1.4.İntradermal Spitz nevüs.....	19
3.3.2.Spitz Nevüs Varyantları.....	20
3.3.2.1.Desmoplastik Spitz Nevüs.....	20
3.3.2.2.Pleksiform Spitz Nevüs (Granülatöz Spitz Nevüs).....	21
3.3.2.3.Anjiomatoid Spitz Nevüs.....	21
3.3.2.4.Hiperpigmente Spitz Nevüs.....	21
3.3.2.5.Reküran Spitz Nevüs.....	21
3.3.2.6.Hiyalinize Spitz Nevüs.....	22
3.3.2.7.Psödoepitelyomatöz Hiperplazi İle Giden Spitz Nevüs.....	22
3.3.2.8.Tubuler Spitz Nevüs.....	22
3.3.2.9.Konjenital Spitz Nevüs.....	22
3.3.2.10.Grup Oluşturan Spitz Nevüsler/Nevus Spilus Üzerinde Spitz Nevüsler...	22
3.3.2.11.Polipoid Spitz Nevüs.....	22
3.3.2.12.Halo Reaksiyonu Gösteren Spitz Nevüs.....	23
3.3.2.13.Dev Spitz Nevüs.....	23
3.3.3.Spitzoid Malign Melanomların Histopatolojik Bulguları.....	23
3.3.4.Spitzoid Malign Melanom Varyantları.....	25
3.3.5.Atipik Spitz Tümörlerin Histopatolojik Bulguları.....	26
3.4.SPİTZ TÜMÖRLERİN GENETİK ÖZELLİKLERİ.....	29
3.4.1.BAP-1 Kaybı.....	31
3.4.2.HRAS Mutasyonu.....	32
3.4.3.Kinaz Füzyonu.....	33
3.5.FISH (Floresans İn Situ Hibridizasyon).....	35
3.5.1.Problar.....	35

3.5.2.Probun İşaretlenmesi.....	35
3.5.3.Hedef Doku.....	36
3.5.4.Denatürasyon ve Hibridizasyon.....	36
3.5.5.İn Situ Hibridizasyon.....	36
3.5.6.Sinyallerin Saptanması ve Görselleştirilmesi.....	36
3.5.7.FISH Yönteminin Kullanım Alanları.....	37
3.6.SPİTZ TÜMÖRLERDE KULLANILAN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER.....	37
3.6.1.Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A (CDKN2A, p16).....	37
3.6.2.Ki-67.....	38
3.6.3.Human Melanoma Black 45 (HMB-45).....	38
3.7.MELANOSİTİK LEZYONLARDA FISH KULLANIMI.....	39
3.8.SPİTZOİD LEZYONLARDA FISH KULLANIMI.....	44
4.MATERYAL VE METOD.....	48
4.1.İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	52
5. BULGULAR.....	53
5.1.VAKALARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ.....	53
5.2.VAKALARIN HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	57
5.2.1.Simetri.....	57
5.2.2.Matürasyon.....	57
5.2.3.Subkutan Yağ Dokusuna Yayılım.....	57
5.2.4.Ülser/Erozyon Varlığı.....	57
5.2.5.Epiderminin Tümör Basısı İle İncelmesi (Epidermal “Consumption”).....	58
5.2.6.İntraepidermal Pagetoid Yayılım.....	58

5.2.7.Kamino Cisimcikleri.....	58
5.2.8.Sitolojik Atipi/Pleomorfizm.....	58
5.2.9.Ekspansif Nodül.....	59
5.2.10.Mitoz.....	59
5.2.10.1.Mitoz Sayısı.....	59
5.2.10.2.Mitozların Yerleşim Yeri.....	59
5.2.10.3.Atipik Mitoz Varlığı.....	59
5.2.11.Lenfositik İnfiltrasyon.....	60
5.3.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	62
5.4.KLASİK MELANOM PROBLARI İLE UYGULANAN FLORESANS İN SİTU HİBRİDİZASYON BULGULARI.....	65
5.4.1.KLASİK MELANOM PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	72
5.4.1.1. KLASİK MELANOM PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KLİNİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	73
5.4.1.2. KLASİK MELANOM PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE HİSTOPATOLOJİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	74
5.4.2.KLASİK MELANOM FISH SONUÇLARINA GÖRE POLİPLOİDİ DURUMU.....	82
5.5.9p21 PROBLARI İLE UYGULANAN FLORESANS İN SİTU HİBRİDİZASYON BULGULARI.....	83

5.5.1.9p21 FISH PROBU İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	88
5.5.1.1.9p21 FISH PROBU İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KLİNİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	88
5.5.1.2. 9p21 FISH PROBU İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE HİSTOPATOLOJİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	91
5.5.2.9p21 FISH SONUÇLARINA GÖRE POLİPLOİDİ DURUMU.....	98
5.6.KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH SONUÇLARININ BİRLİKTE İNCELENMESİ İLE ELDE EDİLEN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	100
5.6.1. KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KLİNİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	100
5.6.2. KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE HİSTOPATOLOJİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER.....	103
5.7.KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH VERİLERİNE GÖRE İSTATİSTİKSEL UYUM SONUÇLARI.....	112
6.TARTIŞMA.....	113
7.SONUÇ.....	127
8.CONCLUSION.....	129
9.KAYNAKÇA.....	131

KISALTMALAR

AST	Atipik Spitz Tümör
SMM	Spitzoid Malign Melanom
SN	Spitz nevüs
MBAIT	Melanositik BAP-1 ilişkili intradermal tümör
NEMMP	Nevoid melanoma benzeri melanositik proliferasyon
CGH	Komplet genomik hibridizasyon
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
FISH	Floresans in situ hibridizasyon
SLNB	Sentinel lenf nodu biyopsisi
RREB-1	Ras responsive element binding protein-1
CCND1	Siklin D1
MYB	Miyeloblastosis fetal onkogen protein
MYC	Myelositoz viral onkogen homolog protein
CEP6	Sentromer 6
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
SSC	Salin sodyum sitrat
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1:Sophie Spitz'in orijinal makalesinde yer alan Juvenil Melanom ve konvansiyonel nevüsün histopatolojik ayrımı.....	7
Tablo 2:Spitz ve ark.'nın makalesinde belirtilen AST'lerin derecelendirilme kriterleri.....	10
Tablo 3:Spitz tümörlerin klinik özellikleri.....	16
Tablo 4:Spitzoid lezyonların ayırıcı tanısında histopatolojik özellikler.....	27
Tablo 5:UCSF kriterleri.....	40
Tablo 6:NeoGenomics kriterleri.....	41
Tablo 7:Abbott kriterleri.....	41
Tablo 8:Kombine kriterler.....	42
Tablo 9:Vakaların tanı gruplarına göre yaş, cinsiyet, süre, lokalizasyon ve çap dağılımları.....	54
Tablo 10:Vakaların tanı gruplarına göre SLNB, bölgesel lenf nodu disseksiyonu, nüks, metastaz, klinik takip süresi ve genel durum dağılımları.....	56
Tablo 11:Vaka gruplarının histopatolojik parametrelere göre dağılımı.....	60
Tablo 12:Vaka gruplarına uygulanan immünohistokimyasal parametrelerin karşılaştırılması.....	64
Tablo 13:p16 antikoru ve 9p21 FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması.....	65
Tablo14:Klasik melanom FISH problemlerinin pozitif ve negatif değerlerinin vaka gruplarına göre karşılaştırmalı dağılımı.....	69
Tablo 15:Vaka gruplarının klasik melanom FISH problemleri bulgularının karşılaştırmalı dağılımı.....	70
Tablo 16:Vakaların yaş, süre, çap ve klinik takip süresi verilerinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	73

Tablo 17: Vakaların cinsiyet verilerinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	74
Tablo 18: Vakaların genel durum verilerinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi....	74
Tablo 19: Simetri parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	75
Tablo 20: Matürasyon parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	75
Tablo 21: Subkutan yağ dokusu tutulumu parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	76
Tablo 22: Ülser/erozyon parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	76
Tablo 23: Epidermal “ <i>consumption</i> ” parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	76
Tablo 24: Pagetoid yayılım parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	77
Tablo 25: Kamino cisimcikleri varlığı parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	77
Tablo 26: Sitolojik atipi/pleomorfizm parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	78
Tablo 27: Ekspansif nodül parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	78
Tablo 28: Mitoz sayısı parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	79
Tablo 29: Mitoz yerleşim yeri parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	79

Tablo 30:Atipik mitoz parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	80
Tablo 31:Lenfositik infiltrasyon parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	80
Tablo 32:Tüm vakalarda histopatolojik bulgular ile klasik melanom FISH sonuçlarının karşılaştırılması.....	81
Tablo 33:Klasik melanom FISH sonuçlarına göre poliploidi durumu.....	83
Tablo 34:9p21 FISH probunun negatif ve pozitif değerlerinin vaka gruplarına göre karşılaştırmalı dağılımı.....	86
Tablo 35:Vaka gruplarının 9p21 FISH probu bulgularının karşılaştırmalı dağılımı...87	
Tablo 36:Vakaların yaş, süre, çap ve klinik takip süresi verilerinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	89
Tablo 37:Vakaların cinsiyet verilerinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	90
Tablo 38:Vakaların genel durum verilerinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	90
Tablo 39:Simetri parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	91
Tablo 40:Matürasyon parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	92
Tablo 41:Subkutan yağ dokusu tutulumu parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	92
Tablo 42:Ülser/erozyon parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	92
Tablo 43:Epidermal “ <i>consumption</i> ” parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	93
Tablo 44:Pagetoid yayılım parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	93

Tablo 45:Kamino cisimcikleri parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	94
Tablo 46:Sitolojik atipi/pleomorfizm parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	94
Tablo 47:Ekspansif nodül parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	95
Tablo 48:Mitoz sayısı parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	95
Tablo 49:Mitoz yerleşim yeri parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	96
Tablo 50:Atipik mitoz parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	96
Tablo 51:Lenfositik infiltrasyon parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	97
Tablo 52: Tüm vakalarda histopatolojik bulgular ile 9p21 FISH sonuçlarının karşılaştırması.....	97
Tablo 53:9p21 FISH sonuçlarına göre poliploidi durumu.....	99
Tablo 54:Vakaların yaş, süre, çap ve klinik takip süresi verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	101
Tablo 55:Vakaların cinsiyet verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	102
Tablo 56:Vakaların genel durum verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	102
Tablo 57:Simetri parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	104

Tablo 58:Matürasyon parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	104
Tablo 59:Subkutan yağ dokusu tutulumu parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	105
Tablo 60:Ülser/erozyon parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	105
Tablo 61:Epidermal “ <i>consumption</i> ” parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	106
Tablo 62:Pagetoid yayılım parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	106
Tablo 63:Kamino cisimcikleri parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	107
Tablo 64:Sitolojik atipi/pleomorfizm parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	107
Tablo 65:Ekspansif nodül parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	108
Tablo 66:Mitoz sayısı parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	108
Tablo 67:Mitoz yerleşim yeri parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	109

Tablo 68:Atipik mitoz parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH probları ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	109
Tablo 69:Lenfositik infiltrasyon parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH probları ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi.....	110
Tablo 70:Tüm vakalarda histopatolojik bulgular ile klasik melanom FISH ve 9p21 FISH sonuçlarının karşılaştırması.....	110
Tablo 71:Klasik melanom FISH ve 9p21 FISH verilerinin uyum sonuçları.....	112
Tablo 72:Çeşitli çalışmalarda klasik melanom FISH testi ile elde edilen sensitivite ve spesifite değerleri.....	114

GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Grafik 1:Çalışmaya dahil edilen vakaların tanı dağılımları.....	53
Grafik 2:Tanı gruplarının klasik melanom FISH problemleri analiz sonuçlarına göre dağılımı.....	69
Grafik 3:Tanı gruplarının 9p21 FISH probu analiz sonuçlarına göre dağılımı....	87



RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1:Konvansiyonel bir Spitz nevüsün makroskobik görüntüsü.....	13
Resim 2:Konvansiyonel Spitz nevüslerin mikroskobik görüntüleri.....	17
Resim 3:İntradermal Spitz nevüsün mikroskobik görüntüleri.....	20
Resim 4: Desmoplastik Spitz nevüsün mikroskobik görüntüleri.....	21
Resim 5: SMM'larda görülen histopatolojik özellikler.....	25
Resim 6: Bir AST vakasının mikroskobik görüntüsü.....	29
Resim 7: Spitz tümörlerde tümör progresyon modeli.....	30
Resim 8: BAP-1 kaybı ile giden bir melanositik lezyonun mikroskobik görüntüsü.....	32
Resim 9-1:Hücre içi RAS yolağı, Resim 9-2:Hücre içi büyüme faktörü olarak HRAS, Resim 9-3:Kromozom 11 ve HRAS.....	33
Resim 10: Bölgesel lenf nodu disseksiyonu uygulanan vakanın HE, İHK ve FISH bulguları.....	55
Resim 11: İmmünohistokimyasal belirteçlerin mikroskobik görüntüleri.....	63
Resim 12: Çalışmamızda negatif kontrol olan Spitz nevüslerin mikroskobik ve klasik melanom FISH görüntüleri.....	66
Resim 13: Çalışmamızda pozitif kontrol olan nodüler malign melanomların mikroskobik ve klasik melanom FISH görüntüleri.....	67
Resim 14: Klasik melanom FISH problemleri ile normal sinyal paterni ve en sık izlenen anormal sinyal paternleri.....	72
Resim 15: Klasik melanom FISH problemleri ile triploidi ve tetraploidi gösteren hücreler.....	83
Resim 16: Çalışmamızda negatif kontrol olan Spitz nevüslerin mikroskobik ve 9p21 FISH görüntüleri.....	84
Resim 17: Çalışmamızda negatif kontrol olan nodüler malign melanomların mikroskobik ve 9p21 FISH görüntüleri.....	85

Resim 18: 9p21 FISH probuyla görülen sinyal paternleri.....	86
Resim 19: 9p21 FISH problemleri ile triploidi ve tetraploidi gösteren hücreler.....	99
Resim 20: Prepubertal SMM vakasının makroskopik ve mikroskopik görüntüleri, immünohistokimya ve FISH çalışma bulguları.....	117
Resim 21: Ring kromozom oluşumu.....	121
Resim 22: Çalışmamızda görülen 6q23 delesyon paternleri.....	122



ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı histopatolojik tanı gücüne yol açan Spitz tümörlerin klasik melanom FISH (RREB-1, CCND1, MYB ve CEP6) ve 9p21 FISH (CDKN2A) problemleri ile değerlendirilmesi, elde edilen verilerin histopatolojik, klinik ve prognostik veriler ile karşılaştırılarak aralarında ilişki bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır.

Materyal Metod: Çalışmamıza İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji ABD, Acıbadem Üniversitesi Patoloji ABD ve ETA Patoloji-Sitoloji Laboratuvarı'nda tanı almış 39 Atipik Spitz Tümör (AST) ve 10 Spitzoid Malign Melanom (SMM) alınmıştır. Ayrıca negatif kontrol amaçlı 2 adet Spitz nevüs (SN) ve pozitif kontrol amaçlı 2 adet nodüler malign melanom da dahil edilmiştir. Olguların klinik, prognostik ve histopatolojik verileri değerlendirilmiştir. RREB-1 (6p25), CCND1 (11q13) gen kazanımları, MYB (6q23) gen delesyonu, 9p21 (CDKN2A) homozigot-heterozigot kayıpları, tümörü en iyi şekilde temsil eden kesitlerde FISH yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 28,34 olup, vakaların 35'i (%71,4) kadın, 14'ü (%28,5) erkektir. Uygulanan klasik melanom FISH problemleri ile SMM'larda 8 (%80), AST'lerde 22 (%56,4) vakada pozitiflik saptanmış olup, negatif kontrol grubu olan SN'lerde pozitiflik izlenmemiştir. Pozitif kontrol grubu olan 2 adet nodüler malign melanomda da klasik melanom FISH çalışma sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. 9p21 probu ile yapılan FISH çalışmasında SMM'larda 6 (%60), AST'lerde 12 (%30,8) vakada pozitiflik saptanmıştır. Negatif kontrol olan SN'lerde pozitiflik görülmezken, pozitif kontrol olan nodüler malign melanomların 1'i pozitif, diğeri negatif olarak izlenmiştir. Her iki prob birlikte değerlendirildiğinde SMM'larda 9 (%90), AST'lerde 23 (%58,9) vakada anlamlı FISH anomalisi görülmüştür. Bu veriler ile Spitz tümörlerin doğru tanı ve risk grubu değerlendirmesinde klasik melanom ve 9p21 FISH problemlerinin birlikte uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Histopatolojik veriler, FISH sonuçları ile kıyaslandığında, 9p21 FISH probu ile derin mitoz varlığı (p:0,029) arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum olduğu görülmüştür. Ayrıca epidermal "consumption" (p:0,066) ve mitoz sayısı (p:0,05) parametreleri için anlamlı fark saptanmamakla birlikte epidermal "consumption" ve mitoz sayısının artmasıyla 9p21 FISH pozitifliğinin gözlemsel olarak artma eğiliminde olduğu izlenmiştir. Klinik veriler ile karşılaştırıldığında 9p21 FISH pozitifliği ile çap artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum (p:0,031) gözlenmiştir. Klasik melanom FISH problemleri ile yapılan değerlendirmede histopatolojik ve klinik veriler ile anlamlı uyum saptanmamıştır.

Sonuç: Spitz tümörler morfolojik örtüşmelerin sık olduğu ve bu nedenle tanı güçlüğü yaşanan lezyonlardır. Doğru tanı ve risk grubu değerlendirmesi için öncelikle doğru bir histopatolojik değerlendirme yapılmalı, bu veriler immünohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: Spitz nevüs, Spitzoid Malign Melanom, Atipik Spitz Tümör, FISH, 9p21, CDKN2A, RREB-1, CCND1, MYB



ABSTRACT

Objectives: Spitz tumors are challenging lesions, which may pose diagnostic difficulties. The aim of this study is to evaluate these tumors with conventional melanoma FISH (RREB-1, CCND1, MYB and CEP6) and 9p21 FISH (CDKN2A) probes and to compare the results with histopathological, clinical and prognostic data.

Material and Method: 39 Atypical Spitz Tumor (AST), 10 Spitzoid Malignant Melanoma (SMM) cases were included in the study group from the archives of I.U. Cerrahpaşa Medical Faculty Pathology Department, Acıbadem University Pathology Department and ETA Pathology-Cytology Laboratory. We also included 2 Spitz nevi as negative control and 2 nodular malignant melanomas as positive control. Clinical, prognostic and histopathological data of the cases were evaluated. RREB-1 (6p25), CCND1 (11q13) gene gains, MYB (6q23) gene deletion, 9p21 (CDKN2A) homozygous-heterozygous loss were investigated by FISH method in the sections that best represent the tumors.

Results: The mean age of the patients was 28.34, 35 cases (71.4%) were females and 14 cases (28.5%) were males. 8 (80%) of SMMs and 22 (56.4%) of ASTs were positive with conventional melanoma FISH probes. None of the Spitz nevi (negative control group) showed positive results. Conventional melanoma FISH was also applied to 2 nodular malignant melanomas (positive control group) and they were positive. In the FISH study with 9p21 probe, 6 (60%) of SMMs and 12 (30.8%) of ASTs were positive. None of the Spitz nevi showed 9p21 positivity. One of the nodular malignant melanomas was positive with 9p21 FISH probe. On the other hand, the other nodular malignant melanoma case was negative. When both probes were evaluated together, significant FISH anomalies were seen in 9 cases (90%) of SMMs and 23 cases (58.9%) of ASTs. As a result, we concluded that conventional melanoma and 9p21 FISH probes should be applied together in Spitz tumors. Histopathological data were compared with FISH results. A statistically significant difference was found between 9p21 FISH positivity and presence of deep mitosis ($p:0,029$). In addition, no significant difference was found with the parameters of epidermal "consumption" ($p: 0,066$) and number of mitosis ($p: 0,05$), but 9p21 FISH positivity tended to increase with increasing epidermal "consumption" and number of mitoses. When the clinical data were compared with 9p21 FISH results, there was a statistically significant correlation between

diameter increase and 9p21 positivity (p:0,031). There was no significant correlation between the results of conventional melanoma FISH probes and histopathological or clinical data.

Conclusions: Spitz tumors have frequent morphologic overlaps and therefore, the histopathological diagnosis of these lesions are difficult. For accurate diagnosis and assessment of the risk groups, a correct histopathologic evaluation should first be performed and these data should be supported by immunohistochemical and molecular methods.

Key words: Spitz nevus, Spitzoid Malignant Melanoma, Atypical Spitz Tumor, FISH, 9p21, CDKN2A, RREB-1, CCND1, MYB



1.GİRİŞ

Spitz nevüsler ilk kez 1948 yılında Sophie Spitz tarafından “juvenil melanomlar” olarak tanımlanmış (1), bu yıldan günümüze kadar farklı yazarlar tarafından yapılan farklı çalışmalar ile bu lezyonlara bir çok isimlendirme önerilmiştir (2). Bunun yanı sıra bazı spitzoid özellikte lezyonların konvansiyonel melanomlara benzer histopatolojik özellikler (asimetri, matürasyon kaybı, subkutan yağ dokusu tutulumu, ülser/erozyon varlığı, periferik pagetoid yayılım, ekspansif nodül varlığı, epidermal “*consumption*”, sitolojik atipi/pleomorfizm, sık ve derin yerleşimli mitozlar, atipik mitoz varlığı, boyutun 1 cm’den büyük oluşu vb.) gösterdiği, bu nedenle bahsedilen lezyonların “borderline” ve “malign” formlarının da olabileceği öne sürülmüştür (3).

Spitz tümörlerin görülme sıklığının 1,4-1,66/100.000 olduğu bilinmektedir. Her yaş grubunda görülmekle birlikte, 4. ve 5. dekatlardan sonra sıklığı azalmaktadır (4,5). Klinik olarak spitzoid lezyonlar iyi sınırlı, pembe, ten rengi ya da kahverengi, genellikle 1 cm’den küçük papüler lezyonlar olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Sentinel lenf nodu ve bölgesel lenf nodu metastazı yapabilmelerine karşın, klinik takiplerinde çoğu vakada uzak metastaz, nüks ve hastalık nedeni ile ölüm gibi kötü prognostik belirteçlerin görülmemesi nedeniyle bu lezyonlar klinisyenlerin ve patoloğların ilgisini çekmektedir (6). Spitzoid lezyonların büyük bir kısmının iyi prognoza sahip olduğu bilinirken, literatürde nadir de olsa uzak metastaz, nüks ve hastalığa bağlı ölümün görüldüğü vakalar da bildirilmektedir (7). Bu nedenle doğru risk grubunun belirlenmesi ve tedavi seçeneklerinin buna göre değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Günümüzde spitzoid lezyonların tanısında altın standart halen rutin ışık mikroskopik inceleme olsa da, malignite değerlendirmesi ve risk gruplarının doğru biçimde oluşturulması için yardımcı immünohistokimyasal ve moleküler tekniklerin kullanılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada; spitzoid melanositik lezyonların ayırıcı tanısında ve risk grubu değerlendirmesinde kullanılan klasik melanom FISH ve 9p21 FISH incelemelerinin etkinliği, histopatolojik ve klinik veriler ile korelasyonu araştırılmıştır.

2. AMAÇ

Çalışmanın amacı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Acıbadem Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı ve ETA Patoloji ve Sitoloji Laboratuvarı'nda AST ve SMM tanısı almış hasta popülasyonunda klasik melanom FISH ve 9p21 FISH moleküler testlerinin, bu lezyonların ayırıcı tanısı ile risk değerlendirmesindeki etkinliğini ortaya koymak ve elde edilen sonuçların klinik-histopatolojik veriler ile korelasyonunu araştırmaktır.



3. GENEL BİLGİLER

3.1.TARİHÇE:

Spitz tümör ilk olarak 1910 yılında Darier ve Civate tarafından, bir çocuğun burnundan eksize edilen materyalde görülen, alışılmış melanositik lezyonların dışında, epitelooid hücrelerle karakterize bir lezyon olarak tanımlanmıştır (8). Aynı yazarlar lezyon için benign ya da malign ayrımı yapamamışlardır. 1948 yılında Sophie Spitz benzer özellikte, çocuklardan alınmış ve melanom tanılı lezyonları incelemiştir. 13 vaka ile yaptığı çalışmada yalnızca 1 vaka generalize metastazlar nedeni ile kaybedilmiş, diğer tüm vakalarda prognoz oldukça iyi olarak izlenmiştir. Kaybedilen vakada lezyonun ayak tabanında lokalize olduğu, eksizyonda tümörün subkutan yağ dokusuna dek uzandığı görülmüştür. Eksizyondan 6 hafta sonra plantar fasyada tekrar tümör oluşumu ve inguinal lenf nodu metastazı saptanmıştır. 4 ay sonra vaka, generalize metastazlar sonucu kaybedilmiştir. Spitz, bu tümörlerin çocukluk çağına özgü, özel bir grup tümör olduğunu düşünmüş ve bu tümörleri “Juvenil Melanom” olarak isimlendirmiştir. Juvenil melanomların nadiren malign biyolojik davranış gösteren tümörler olduğunu söylemiştir. Bunun dışında Juvenil Melanom olarak adlandırdığı tümörler ile konvansiyonel nevüslerin histopatolojik kriterlerini kıyaslamıştır (1) (Tablo 1).

Tablo 1: Sophie Spitz’in orijinal makalesinde yer alan Juvenil Melanom ve konvansiyonel nevüsün histopatolojik ayrımı (1).

JUVENİL MELANOM	NEVÜSLER
<ul style="list-style-type: none">• Pleomorfik görünümde hücreler	<ul style="list-style-type: none">• Monoton görünümlü hücreler
<ul style="list-style-type: none">• Bizar/multinükleer hücreler	<ul style="list-style-type: none">• Yüzeyde üniform hücrelerden oluşan nestler, derine inildikçe melanositler küçülür ve fibröz doku artar
<ul style="list-style-type: none">• Junktional komponentte büyük ve pleomorfik hücrelerden oluşan küçük nestler	<ul style="list-style-type: none">• Junktional komponentte küçük ve monoton nestler
<ul style="list-style-type: none">• Sık mitotik figürler	<ul style="list-style-type: none">• Mitotik figürler nadir

1954 yılında Helwig ve ark., ilk kez “İğsi ve Epiteloid hücreli nevüs” isimlendirmesini yapmışlardır (9). 1960’lı ve 1970’li yıllarda Spitz nevüsler için bu isimlendirme sık olarak kullanılmıştır. Ayrıca 1976 yılında melanom tanılı 23 çocuk hasta ile yapılan bir çalışmada, bu melanomların bazılarının iğsi ve epiteloid hücreli nevüsler ile benzer histopatolojik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. Bu tümörlerin daha iyi seyirli olduklarını, sadece lezyonun ve bölgesel lenf nodlarının eksizyonu ile kür olabildiklerini gözlemlemişlerdir (10).

1969 yılında Huarte ve ark., Spitz nevüsler için atipik kelimesini ilk kez kullanmıştır. Huarte ve ark. bu lezyonların konvansiyonel nevüslerden farklı histopatolojik özelliklere sahip olduğunu söylemiş ve bu nedenle “atipik” olarak isimlendirmiştir (11).

1975 yılında Reed, Ichnosa, Clark ve Mihm, Spitz tümörlerin nadir görülen tümörler olduğunu ve bu tümörlerin malign varyantları olabileceğini belirtmişlerdir (12).

1977 yılında Weedon ve Little, bazı Spitz nevüslerin atipik özelliklere sahip olabildiğini, ancak melanom gibi kötü biyolojik davranış göstermediğini belirtmişlerdir. Yazarlar, lezyon bazalinde matürasyonun varlığı, atipik mitozların olmaması, intraepidermal pagetoid yayılımın bulunmayışı ve nükleer kromatin patern özelliklerinin melanom ve bu atipik özelliklerdeki Spitz nevüslerin ayırımında kullanılabileceğini savunmuşlardır (5).

1989 yılında Palazzo ve Durey, ilk kez “Atipik Spitz nevüs” terimini kullanmışlardır. Spitz nevüs olarak tanımlanan bir lezyonda, nükleer değişiklikler (koyu kromatinli, iri ve düzensiz nükleuslar), hücrelerin gruplar oluşturması ve melanositlerin papiller dermisten çok retiküler dermiste bulunması gibi özellikleri “atipik” olarak yorumlamışlardır (13).

Yine 1989 yılında K.J. Smith ve ark., Helwig’in teorisini genişletmiş ve “Atipik ve metastaz yapan iğsi ve epiteloid hücreli nevüsler (Malign Spitz nevüsler)” tanımını yapmışlardır. İlk histopatolojik tanısı Spitz nevüs olan 32 hasta ile yaptıkları çalışmada, 6 vakaya sentinel lenf nodu disseksiyonu uygulanmış, tüm bu hastalarda metastaz saptanmıştır. Malign Spitz nevüslerin bölgesel lenf nodlarına metastaz yapabildiğini, ancak uzak metastaz yapamadığını savunmuşlardır (14).

1991 yılında Barnhill ve ark., yapısal ve/veya sitolojik atipi ile giden pigmente iğsi hücreli nevüsler ile yaptıkları 120 vakalık çalışmada bu nevüslerin benign olduğunu ancak atipik özellikler içerdiği için melanoma transforme olabileceklerini savunmuşlardır (15). Ayrıca bu nevüsleri “tipik” ve “atipik” olarak sınıflandırmışlar, atipik olan tümörlerin borderline bir melanom formu olabileceğini söylemişlerdir.

1992 yılında Casso ve ark., Spitz nevüslerin bir hastalık spektrumunun benign ucu olabileceğini savunmuşlardır (16). Banal formların benign, atipik formların ise düşük grade'li malign olabileceğini dile getirmişlerdir.

1993 yılında Barnhill ve ark., konjenital nevüs, akral nevüs, Spitz nevüs gibi atipik nevüslerin displastik nevüslerle ortak yapısal ve sitolojik özellikler içerdiğini bu nedenle premalign olarak kabul edilebileceğini söylemişlerdir (17). Premalign özellikler gösteren nevüslerin de melanoma transforme olabileceğini savunmuşlardır.

1994 yılında Perkocha ve ark., çocuklarda görülen bu lezyonları “Spitz nevüs özellikleri taşıyan atipik dermal melanositik lezyonlar” şeklinde tanımlamıştır. Bu lezyonların bölgesel lenf nodlarına metastaz yapabildiğini ancak uzun vadede iyi prognoz gösterdiklerini belirtmişlerdir (18).

1995 yılında Barnhill, ilk kez “Atipik Spitz Tümör (AST)” tanımını yapmıştır. 15 yaş altı, melanom tanısı almış 23 vaka ile yaptığı çalışmada, melanomları 4 ayrı gruba ayırmıştır. Bunlar: 1)Küçük hücreli melanom, 2)Yetişkin tipi melanom, 3)Spitz nevüs benzeri melanom ve 4)Atipik Spitz tümör/metastaz yapan Spitz tümörlerdir. AST olarak sınıflandırdığı vakaların 2 tanesinde bölgesel lenf nodlarına metastaz saptanmış, bu nedenle bu lezyonlara, metastaz yapan Spitz tümör isimlendirmesi de yapılmıştır. Bu lezyonların metastaz yapması nedeniyle melanom olarak adlandırması gerektiği savunulsa da, 3-9 yıl arasında yapılan klinik takiplerinde prognozun iyi olması, uzak metastazın olmaması nedeniyle “Atipik Spitz Tümör” isimlendirmesinin daha doğru olacağı düşünülmüştür (19). Ayrıca AST tanısında destekleyici bulgular olarak: 1)Boyut büyüklüğü, 2)Derine kadar inen infiltrasyon, 3)Sellülarite artışı, 4)Sellüler atipi, 5)Dermal, derin ve atipik mitozların varlığından bahsetmişlerdir.

Aynı yılda Busam ve Barnhill, büyüme paterni açısından ve sitolojik olarak atipik olan ancak melanom tanısı için histopatolojik kriterleri karşılamayan lezyonlarda net bir isimlendirme yapılmaması ve deskriptif olarak tanı verilmesi gerektiğini savunmuşlardır (20).

1997 yılında Crotty, öncesinde Spitz nevüs tanısı almış fakat metastaz yapan tümörlerde “malign Spitz nevüs” tanımlaması yerine “Spitz benzeri malign melanom” tanımlamasının daha doğru olacağını savunmuştur (21). Ayrıca bu tümörlerin genellikle bölgesel lenf nodlarına metastaz yaptığından yola çıkarak metastazların da satellit, intransit ve uzak metastazlar olarak sınıflandırılması gerektiğini belirtmiştir.

1999 yılında Spatz ve ark., anormal melanositik proliferasyonlar için bir dereceleme sistemi gerekliliğinden bahsetmişler ve Spitz nevüs özellikleri ile birlikte atipik özellikler taşıyan AST'leri düşük, orta ve yüksek risk olarak sınıflamışlardır (22). Yaptıkları çalışmada yaş, boyut, ülserasyon, subkutan yağ dokusu tutulumu ve mm²'de 6 ya da üstünde mitoz görülmesinin anlamlı olduğunu vurgulamışlardır (Tablo 2).

Tablo 2. Spatz ve ark.'nın makalesinde belirtilen AST'lerin derecelendirilme kriterleri (22).

<ul style="list-style-type: none">Yaş <p>-0-10 : 0 -11-17: 1</p>
<ul style="list-style-type: none">Boyut <p>-0-10 mm :0 ->10 mm :1</p>
<ul style="list-style-type: none">Subkutan yağ dokusu tutulumu <p>-Var:2 -Yok:0</p>
<ul style="list-style-type: none">Ülserasyon <p>-Var :2 -Yok: 0</p>
<ul style="list-style-type: none">Mitotik aktivite <p>-0-5 :0 -6-8 :2 ->8 : 5</p>

Spatz sınıflamasına göre:

- 0-2 : Düşük metastaz riski
- 3-4: Orta derecede metastaz riski
- 5-11:Yüksek metastaz riski

Yine 1999 yılında Schimek ve Golitz, yüksek riskli Atipik Spitz nevüs için kendi kriterlerini belirlemişlerdir: 1)Ülserasyon varlığı, 2)Çapın 1 cm'den büyük olması, 3)Asimetri, 4)Derin

yerleşimli lezyon, 5)Selülarite artışı, 6)Matürasyon kaybı, 7)Belirgin sitolojik atipi varlığı, 8)Belirgin mitotik aktivite, 9)Derin mitoz/atipik mitoz varlığı, belirledikleri kriterlerdir (23).

1999 yılında Barnhill ve ark., tanı açısından zorluk yaşanan lezyonları:

*Stereotipik Spitz nevüs/tümör

*Atipik Spitz nevüs/tümör

*Spitzoid ya da konvansiyonel melanom

*Davranışı bilinmeyen melanositik tümör

*Sınıflandırılmayan melanositik lezyon olarak sınıflamıştır (24).

2000 yılında Edwards ve Blessing, AST'ler için "Malignite potansiyeli belirsiz Atipik Spitzoid lezyon" tanımını kullanmışlardır. Bu lezyonların histopatolojik olarak melanom ile ayırt edilmesinin mümkün olmadığını, lezyonların mutlaka klinik olarak takip edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (25).

2001 yılında Crawson, Magro ve Mihm, AST'lerin melanom ile benzer histopatolojik özelliklere sahip olmalarına rağmen indolent davranış gösterdiklerini söylemişlerdir (26).

Yine 2001 yılında Ackermann ve Mones, malign Spitz nevüs, metastaz yapan Spitz nevüs ve Atipik Spitz nevüs tanısı alan vakalarda metastaz saptanması halinde bu vakaların melanom olarak adlandırılması, bu vakalara özel bir tip olan Spitzoid Malign Melanom (SMM) tanısı verilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (27).

Aynı yılda Fabrizi ve Massi, çocuklarda Spitz nevüs özellikleri gösteren ancak belirgin nükleer atipi-pleomorfizm izlenen ve solid adalar şeklinde büyüme paternine sahip tümörlere melanom tanısı konulması gerektiğini savunmuşlardır (28).

2002 yılında Van Dijk ve ark., ilk kez moleküler yöntemle bu vakaları incelemişlerdir. Allelik İmbalans Analizi (Allelic Imbalance Analysis) yöntemiyle 55 vaka (12 Spitz nevüs, 9 AST, 17 "şüpheli" SMM ve 17 SMM) kullanılarak yapılan çalışmada Spitz nevüs tanılı 2 vakada allelik imbalans saptanmıştır. Allelik imbalansın nevüslerde de görülebilmesi sebebiyle moleküler biyolojik tekniklerin Spitz nevüs ve melanom ayırımını net yapamadığı görüşü ortaya konulmuştur (29).

Yine 2002 yılında Gürbüz ve ark., AST'lerin histopatolojik olarak Spitz nevüslerden farklı özellikler içerdiğini ve biyolojik davranışının net olarak belirlenemeyeceğini belirtmişlerdir. SMM ve AST ayrımının uzak metastaz varlığı ile yapılabileceğini savunmuşlardır (30).

Aynı yılda Le Boit ve ark. ise "Güvenli Spitz" ve "Güvensiz Spitz tanımlamasını yapmışlardır. Melanomların malign, nevüslerin benign davranış gösteren tümörler olduğunu, metastaz yapan Spitzoid lezyonların melanom olarak adlandırılması gerektiğini savunmuşlardır. Ancak Spitz nevüs ve melanom arasında kalan histopatolojik özelliklere sahip bir "intermediate" grup melanositik proliferasyonun da varlığını belirtmişler ve "Borderline" neoplazi tanımlamasını yapmışlardır. Le Boit ve arkadaşlarına göre "Güvenli Spitz" tanımlaması histopatolojik olarak tanısında herhangi bir güçlük yaşanmayan Spitz nevüsler için kullanılabilir. "Güvensiz Spitz" tanımlamasını ise: 1) Geniş oval ve iğsi hücrelerden oluşan nodüler proliferasyonlar içeren, 2) İnkomplet matürasyon gösteren, 3) Yüksek mitotik aktiviteye sahip olan, 4) Subkutan yağ dokusuna uzanım gösteren Spitzoid özelliklere sahip lezyonlar için önermişlerdir (31).

Son yıllardaki yaklaşım ise malignite kriterlerini taşımayan, spitzoid özelliklere sahip lezyonların Spitz nevüs, malignite kriterlerinden bir kısmını taşıyan ancak melanom demek için yeterli delil bulunamayan lezyonların AST, malignite kriterlerinin büyük çoğunluğunu taşıyan lezyonların SMM olarak değerlendirilmesi gerektiği yönündedir. Bu lezyonlardan AST ve SMM'lara sentinel lenf nodu biyopsisi uygulanabilir. Metastaz bulunması durumunda, lenf nodu disseksiyonunu önerenler olduğu gibi bunun yapılmaması gerektiğine inananlar da vardır. Klinik takip ile de uzak metastaz varlığı araştırılmalıdır. Lazzeri ve ark.'nın 2012 yılında yayınladıkları olgu sunumunda AST tanılı 16 yaşındaki hastada inguinal sentinel lenf nodu biyopsisi uygulanmış ve pozitif bulunmuştur. Ardından inguinal lenfadenektomi uygulanmış ve bulunan 21 adet lenf nodunun hepsinde metastaz görülmüştür. Yapılan takiplerinde ise 39 ay boyunca herhangi bir uzak metastaz ya da nüks bulgusu saptanmamıştır. Bu nedenle sentinel lenf nodu biyopsisi ve bölgesel lenfadenektominin prognozu belirlemede anlamlı olmadığını savunmuşlardır (32). Başka bir yayında ise 1994-2009 yılları arasında araştırmacıların kliniklerinde sağlam sınırla eksizyon uygulanmış ve AST tanısı almış 29 vakaya sentinel lenf nodu biyopsisi yapılmamıştır. Ortalama 8,4 yıl olan klinik takiplerinde hiçbir hastada nüks ya da metastaz bulgusu saptanmaması üzerine sentinel lenf nodu biyopsisinin ve bölgesel lenf nodu disseksiyonunun pediatrik AST'lerde prognozu belirlemede bir önemi olmadığı savunulmuştur. Sağlam sınırla eksizyon ve sonrasında klinik takibin yeterli bir yaklaşım olduğuna değinilmiştir (33). Öte yandan bir başka merkezde 67

AST tanısı alan vaka ile yapılan çalışmada bu vakalardan 6'sında derinlik <1mm bulunarak yalnızca eksizyon uygulanırken , 61 vakada derinlik >1mm olduğu ya da diğer kötü prognostik özelliklerden biri veya birkaçının bulunduğu tespit edilmiştir. 61 vakanın 57 tanesine eksizyon ve sentinel lenf nodu biyopsisi uygulanmış, 4 tanesine ise sadece eksizyon yapılmıştır. Sentinel lenf nodu biyopsisi uygulanan 57 vakanın 30'unda negatif, 27'sinde pozitif sonuç alınmış ve 27 vakaya bölgesel lenf nodu disseksiyonu uygulanmıştır. Sadece 1 vakada non-sentinel pozitif lenf nodu saptanmıştır. Yapılan klinik takipte bu vakanın uzak metastaz nedeniyle kaybedildiği görülmüştür. Bu nedenle sentinel lenf nodu biyopsisi ve pozitif olduğu takdirde bölgesel lenf nodu disseksiyonunun yapılması gerekliliği savunulmuştur (34). Ayrıca son yıllarda geliştirilen çeşitli genetik çalışmalar ile de AST'lerin biyolojik davranışı hakkında yorum yapılmaya çalışılmaktadır.

3.2.KLİNİK ÖZELLİKLER:

3.2.1.Spitz Nevüslerin Klinik Özellikleri:

Spitz nevüsler sıklıkla çocukluk ve genç erişkinlik çağında görülen nevüslerdir. Çocukluk çağındaki nevüslerin yaklaşık %1'ini oluştururlar. Ancak yapılan çalışmalarda Spitz nevüslerin yaklaşık 1/4 'ünün erişkinlerde görüldüğü ortaya çıkarılmıştır. Genellikle beyaz ırkta görülürler, siyah ırkta görülme sıklığı oldukça azdır. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre hafifçe fazladır (35).

Spitz nevüsler sıklıkla çevre deriden keskin bir sınırla ayrılan kubbe şeklinde papül olarak izlenirler. Bunun dışında plak, nodül, polipoid, verrüköz gibi makroskobik şekilleri de olabilir (16) (Resim 1).

Resim 1: Konvansiyonel bir Spitz nevüsün makroskobik görüntüsü



Lezyonlar genellikle, papiller dermiste telenjektatik damarlar bulunması nedeniyle kırmızimsı-pembe renkli olarak görülürler. Bu özelliklerinden dolayı hemanjiom ve piyojenik granülom ile karışabilirler. Ayrıca ten renginden koyu kahverengine kadar uzanan spektrumda izlenebilirler (1).

Spitz nevüsler genellikle küçük ve simetrik olarak görülürler. Çoğunlukla 6 mm'den küçük lezyonlardır ancak 2-3 cm'e kadar ulaşabilen Spitz nevüsler de bildirilmiştir. Genellikle tek lezyon olarak izlenirler ve travmatize olan lezyonlar dışında ülserasyon/erozyon görülmez. Lezyonlar genellikle kıl içermezler. Pigmente olan lezyonlarda pigmentasyon dağılımı genellikle homojen olarak izlenir. Nadiren halo reaksiyonu gözlenebilir (36).

Yerleşim yeri olarak Spitz nevüsler genellikle yüz, baş-boyun ve ekstremitelerde bulunurlar. Çocuklarda en sık yüz ve boyun bölgesinde yerleşirken, yetişkinlerde ise, kadınlarda en sık ekstremitelerde, erkeklerde en sık gövdede izlenir. Nadiren müköz membranlarda da (damak, dil, genital mukoza v.b.) görülebilir. El ayası, ayak tabanı ve ayak parmakları en nadir yerleşim yerleridir (37). Yaş ile histolojik subtipler arasında bağlantı olduğu görülmüştür. Küçük çocuklarda, genellikle yüz bölgesinde, nonpigmente, belirgin sellülariteye sahip, epitelooid hücrelerden oluşan ve papillomatöz görünümde tümörler izlenirken, erişkinlerde sellülaritesi daha az, daha çok fibrozis içeren, intradermal, iğsi hücreli tümörler dikkati çekmektedir (38) (Tablo 3).

Klinik olarak görülen Spitz nevüs varyantları:

1)Hiperpigmente Spitz nevüsler: Yoğun pigment içeren Spitz nevüsler ve koyu tenli kişilerde Spitz nevüsler daha koyu renkli olarak izlenirler.

2)Polipoid ve verrüköz Spitz nevüsler: Spitz nevüsler ekzofitik büyüme paternine sahip olabilirler. Ayrıca epidermiste papiller tipte hiperplazi geliştiğinde lezyon verrüköz konturlu olarak izlenebilir.

3)Multipl ve gruplar oluşturan Spitz nevüsler:

*Dissemine Spitz nevüsler: Çok sayıda pembe-kahverenkli papüller şeklinde tüm vücutta izlenir. Bu duruma nörolojik problemler de eşlik edebilir (39).

*Grup oluşturan Spitz nevüsler: Normal görünümlü deri ya da hiperpigmente bir makül üzerinde multipl papüller olarak izlenirler. Bir dermatom boyunca zosteriform olarak yerleşim gösterebilirler. Konjenital ya da edinsel olabilirler (40).

4)Satellit Spitz nevüsler: Spitz nevüsün eksizyonu sonrasında aynı bölgede multipl Spitz nevüs gelişimi olabilir. Bu durum özellikle satellit metastazlarla giden melanom rekürrensi ile karışabilir.

3.2.2.Spitzoid Malign Melanomların Klinik Özellikleri:

SMM'lar da, Spitz nevüsler gibi sıklıkla baş-boyun ve ekstremitelerde yerleşim gösterirler. Çoğunlukla erişkinlerde görülmekle birlikte çocuklarda da SMM görülebilmektedir. Çoğu yaklaşık 1 cm boyutunda izlenmekle birlikte, daha büyük ve daha küçük çaplı SMM'lar da bildirilmiştir (41).

Lezyonlar genellikle pembe-kırmızı ya da kahverenkli olarak izlenirler. Pigmente lezyonlarda, Spitz nevüslerin aksine pigment dağılımı heterojendir. Lezyon yüzeyinde ise genellikle küçük bir erozyon alanı dikkati çeker. Bu lezyonlar hızlı ve devamlı olarak büyüme gösteren lezyonlardır (42).

SMM'lar genç hastalarda klasik melanoma göre daha düşük metastaz potansiyeli ve daha iyi prognoza sahip tümörler olarak izlenmektedir. Sağlam sınırla eksizyon ve sentinel lenf nodu biyopsisi yapılan hastaların 5 yıllık sağ kalımları %90'lara varan oranlarda bildirilmektedir (43) (Tablo 3).

3.2.3.Atipik Spitz Tümörlerin Klinik Özellikleri:

AST'ler de her yaşta görülebildiği gibi hayatın ilk 2 dekatında sık olarak izlenmektedir. Klinik olarak Spitz nevüsler ile benzer özellikler göstermesine karşın 1 cm'den büyük çap, heterojen pigmentasyon, asimetri, ülserasyon gibi malign melanomu çağrıştırabilecek makroskobik özellikler de gösterebilirler (44) (Tablo 3).

Komplet eksizyon ve sentinel lenf nodu biyopsisi, vakaların çoğunda tedavide yeterli olarak görülmektedir. AST'lerde sentinel lenf nodu pozitifliği yüksek oranda izlenmekle birlikte (%45), pozitif sentinel lenf nodu uzak metastaz yapacağını gösteren bir bulgu değildir. Bu tümörlerde uzak metastaz çok nadirdir (45).

Tablo 3:Spitz tümörlerin klinik özellikleri

KLİNİK ÖZELLİKLER	SPİTZ NEVÜSLER	SPİTZOID MALİGN MELANOMLAR	ATİPİK SPİTZ TÜMÖRLER
RENK	Pembe-kırmızımsı renk sık görülür ancak ten renginden koyu kahverengiye uzanan spektrum	Pembe veya açık-koyu kahve renkli	Pembe veya açık-koyu kahve renkli
YERLEŞİM YERİ	Baş-boyun, ekstremiteler (en sık)	Baş-boyun, ekstremiteler (en sık)	Baş-boyun, ekstremiteler (en sık)
YAŞ	Sıklıkla ilk 2. dekat ancak her yaşta görülebilir	Sıklıkla erişkinlerde (çocuklarda da görülebilir)	Her yaşta görülebilir ancak sıklıkla ilk 2. dekatta
BOYUT	Genellikle <0,6 cm	Genellikle 1 cm ve üstü	Genellikle 1 cm ve üstü (değişken çaplarda olabilir)
SİMETRİ	Genellikle simetrik	Genellikle asimetrik	Simetrik/asimetrik
ÜLSERASYON	Genellikle görülmez (travmatize Spitz nevüsler hariç)	Görülebilir	Görülebilir
PİGMENTASYON	Az ve Homojen pigmentasyon	Heterojen pigmentasyon	Homojen/Heterojen pigmentasyon
SÜRE	Genellikle uzun süreli ve çocukluktan beri olan lezyonlar	Hızlı büyüme/kısa süreli öykü ya da uzun süredir var olan lezyonun son zamanlarda kısa sürede renk- boyut-şekil değiştirmesi	Değişken lezyon süresi
TEDAVİ	Total eksizyon	Sağlam sınırla total eksizyon+/- SLNB	Sağlam sınırla total eksizyon+/-SLNB

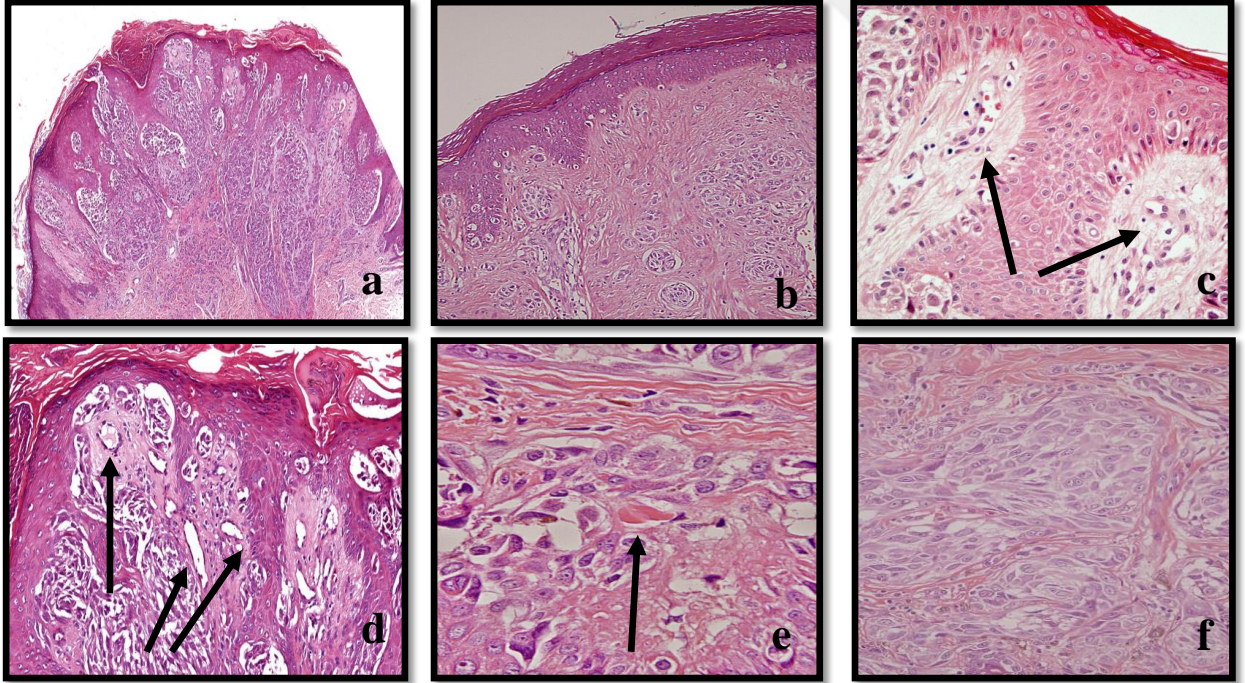
(SLNB: Sentinel lenf nodu biyopsisi)

3.3.HİSTOPATOLOJİK BULGULAR:

3.3.1.Spitz Nevüslerin Histopatolojik Bulguları:

Spitz nevüsler junktional, bileşik ve intradermal olabilen melanositik neoplazilerdir. Bu neoplazilere genellikle hiperkeratoz ve akantoz eşlik etmektedir. Ayrıca papiller dermiste ödem, telenjiyektazi gibi özellikler içerirler. Nevüsü oluşturan melanositler geniş nükleuslu, belirgin nükleollü, buzlu cam benzeri görünümde eozinofilik sitoplazmalı hücreler olup, epiteloïd ya da iğsi olabilirler. Bunun dışında çoğunlukla subepidermal alanda, yuvarlak görünümde, kollagen liflerden oluşan, PAS(+), aselüler eozinofilik agregatlar görülmektedir. Bu agregatlara “Kamino cisimcikleri” adı verilir. Her selim melanositik lezyonda olduğu gibi Spitz nevüsler de simetrik olup matürasyon gösterirler (46) (Resim 2) (Tablo 4).

Resim 2: Konvansiyonel Spitz nevüslerin mikroskobik görüntüleri: a)HEX40, b)Epidermal hiperplazi HEx200, c)Papiller dermiste ödem HEx200 (oklar ile gösterilmiştir), d)Telenjiyektazi HEx200 (oklar ile gösterilmiştir), e)Kamino cisimciği HEx1000 (ok ile gösterilmiştir), f)Spitzoid morfolojide melanositlerden oluşan yuva yapıları HEx400



Spitz nevüslerin hızlı bir büyüme safhasını geçirdikten sonra stabil kaldıkları bilinmektedir. Bu konu ile ilgili stabil kalan bir Spitz nevüsün 4 farklı aşamayı geçirdiği söylenmektedir. (4 aşama hipotezi). Aynı zamanda bu aşamalar melanositlerin yerleşim yerine göre Spitz nevüs tiplerini de oluştururlar. Bu alt tipler: Tek tek dağılan hücreler içeren intraepidermal Spitz nevüs, Junktional Spitz nevüs, Bileşik (Kompond) Spitz nevüs, İntradermal Spitz nevüs olarak sıralanabilir.

3.3.1.1. Tek tek dağılan hücreler içeren intraepidermal Spitz nevüs (Lentiginöz/Pagetoid Spitz nevüs)

Spitz nevüslerin en erken aşaması olarak kabul edilir. Genellikle genç hastalarda ve 4 mm'den küçük, hafifçe pigmente, açık kahve renkli bir makül olarak izlenir.

Bu lezyonda melanositler dermoepidermal bileşkede soliter hücreler halinde dağılırlar. Genellikle spinal tabakanın alt yarısında yerleşim gösterirler. Bu lezyonlarda rete ridgelerde uzama izlenir. Tek tek dağılan melanositler dermoepidermal bileşke ve uzamış rete ridgeler boyunca sıralanır (47). Bu durum "Spitzoid Lentigo" olarak da adlandırılır. Nest yapıları yok ya da belirsizdir. Melanositler büyük, monomorfik, oval veziküler nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı olarak izlenirler. Spinal tabakaya doğru dendritik uzantılar içerirler. Bu melanositlerin buldukları alanda hafif hiperkeratoz ve akantoz görülebilir (48).

3.3.1.2. Junktional Spitz nevüs:

Junktional Spitz nevüslerde lezyon dermoepidermal bileşke yerleşimli olup, yuva yapıları oluşturur. Bu yuva yapıları birleşme eğiliminde olup, büyüktürler. Bazılarının üzerinde ayrışma gözlenir. Lezyonlar iğsi ve epiteloid hücrelerden oluşur. İğsi hücrelerden oluşan lezyonlarda, hücrelerin dizilimi dermoepidermal bileşkeye dik olarak izlenir. (Vertikal dizilim-"Raining down" fenomeni) (49). Melanositlerin dışında epidermiste de değişiklikler görülür. Bu epidermal değişiklikler rete ridgelerin uzaması, stratum korneumun kalınlaşması şeklindedir. Kamino cisimcikleri, özellikle iyi forme yuva yapılarının arasında, epidermisin alt yarısında, dermal papillaların üst kısmında yerleşmektedir (5).

3.3.1.3. Bileşik (Kompond) Spitz nevüs:

Spitz nevüslerin büyük çoğunluğu (yaklaşık %89) klinik olarak bu evrede fark edilir ve eksize edilirler (50). Özellikle erişkinlerde en sık görülen tip olup, simetrik, iyi sınırlı ve iğsi hücreli komponenti baskın olarak izlenir.

Epidermisteki hücreler dermoepidermal bileşkede yuva yapıları halinde bulunur. Bu yuva yapıları rete ridgelerin lateral kenarlarında yerleşim gösterir. Nevüsü oluşturan melanositlerin nükleusları belirgin, oval ve santral yerleşimli olup, belirgin nükleolleri bulunmaktadır. Nükleer membranları ince ve düzgündür. Sitoplazmaları homojen ve eozinofilik görünümündedir.

Lezyonda mitoz görülebilir ancak yüzeyde, genellikle dermoepidermal bileşkede dağınık halde ve az miktarda izlenir. Epidermin üst kısımlarında mitoz çok nadirdir. Pagetoid yayılım lezyonun orta kısımlarında, epidermin en kalın olduğu alanlarda görülebilir. Lezyon derinliklerine doğru inildikçe hücreler küçülmeye ve daha küçük gruplar oluşturmaya başlar. Arada kollagen lifler seçilir.

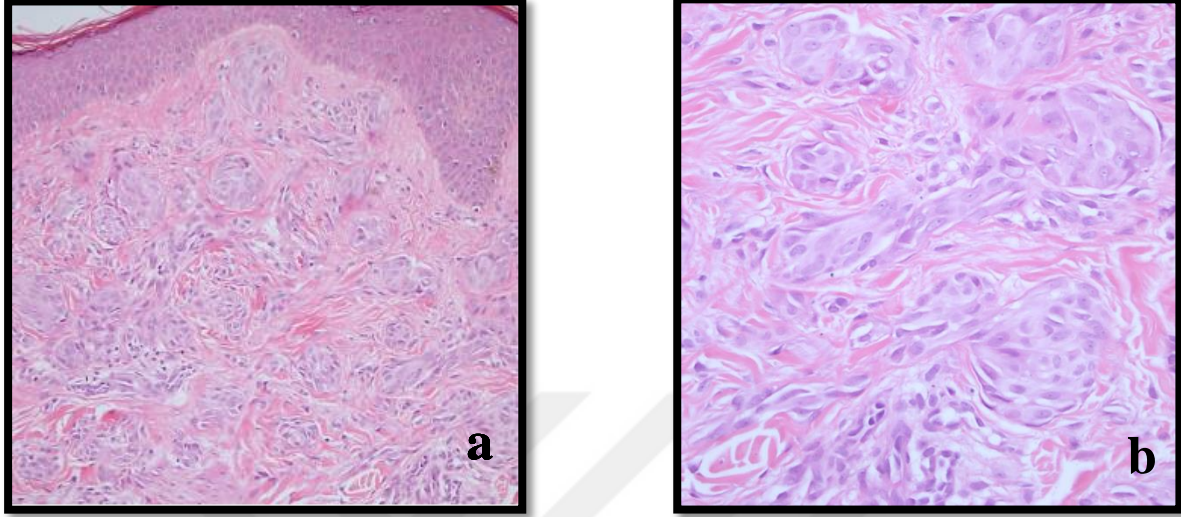
Melanositler arasındaki izlenen stroma değişkendir. Özellikle çocuklarda papiller dermis ödemli olup, burada dilate kan damarları bulunur. Epidermin altında Kamino cisimcikleri sık olarak izlenir. Epidermiste hiperkeratoz, akantoz ve hipergranüloz gözlenir. Epiteloid hücrelerin baskın olduğu lezyonlarda multinükleer dev hücreler görülebilir. Nükleuslar veziküler, nükleer kromatin çoğunlukla periferde toplanmış olarak seçilir.

Adneksiyal tutulum görülebilir. Özellikle ekrin glandlar içinde yuva yapıları oluşumu sık olarak izlenir. Erektor pili kası içinde melanositlerin bulunması Spitz nevüslerde sık görülen bir bulgu olup, tanı için kullanılabilir (51).

3.3.1.4.İntradermal Spitz nevüs:

En matür form olduğu düşünülür. Melanositler dermis yerleşimli olarak izlenir. Epidermal hiperplazi azalır. Kamino cisimcikleri kaybolur. Papiller dermiste ektatik damarlar görülür. Lezyon derinine doğru inildikçe matürasyon gösterir ve kollajen lifler arasında küçük gruplar, tek tek dağılan melanositler izlenir (Resim 3).

Resim 3: İntradermal Spitz nevüsün mikroskopik görüntüleri: a)HEX100 (Dermiste yerleşimli melanosit grupları), b)HEX400 (Kollajen lifler arasında dağılmış küçük melanosit grupları)



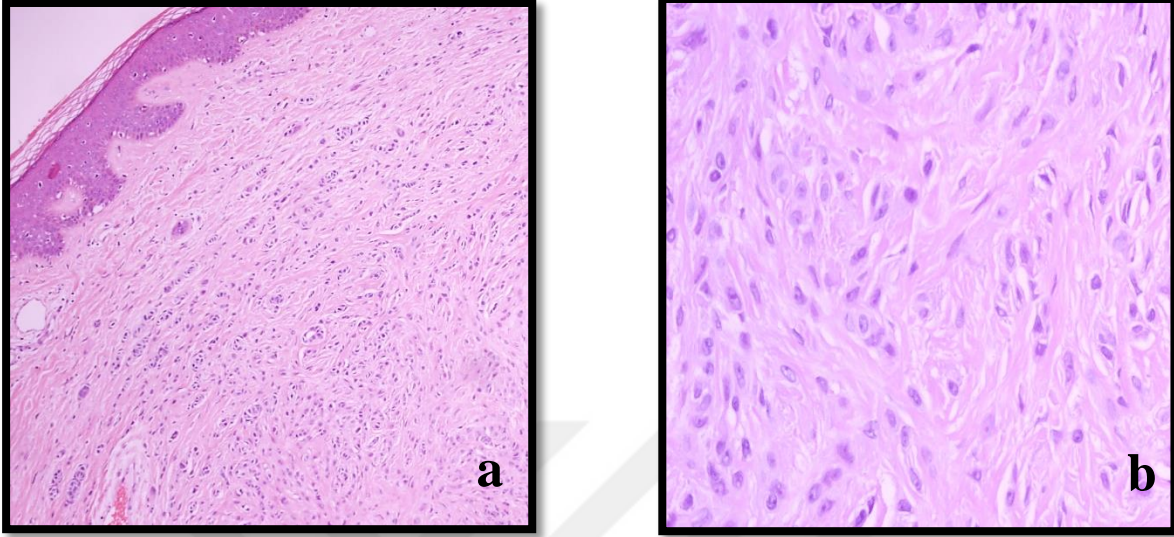
3.3.2.Spitz Nevüs Varyantları:

3.3.2.1.Desmoplastik Spitz nevüs:

Çoğunlukla genç erişkinlerde görülür ve ekstremitelerde yerleşim gösterir. Keloid benzeri görünümde kollajen liflerin arasında dağılmış iğsi ve epiteloid hücreler izlenir. Belirgin bir junktional komponent görülmez. Epiteloid hücrelerde sitoplazmik invajinasyonların oluşturduğu intranükleer inklüzyonlar bulunabilir ve geniş eozinofilik sitoplazmaları, belirgin iri nükleolleri ile ganglion hücrelerine benzeyebilirler (52) (Resim 4).

Simetrik, küçük agregat oluşturan, çoğunlukla şişkin görünümde hücrelerden oluşan lezyonlardır. Bu hücreler kısa fasiküller oluştururlar. Solar degenerasyon bulgusu görülmez (35).

Resim 4: Desmoplastik Spitz nevüsün mikroskopik görüntüleri: a)HEX100 (Dermiste kollajen demetler arasına dağılmış ıĝsi ve epiteloid hücreler), b)HEX400 (İĝsi ve epiteloid melanositler ,aralarında kollajen lifler)



3.3.2.2. Pleksiform Spitz nevüs (Granülomatöz Spitz nevüs):

Spitz nevüsler genellikle “V” şeklinde bir silüete sahiptir. Bazı Spitz nevüsler aralarında geniş kollajen lifler izlenen büyük nodüller oluştururlar. Bu görüntüleri ile sarkoidal granülomlara benzerler. Yuvarlak-oval nodül yapıları bazı lezyonlarda birleşme eğiliminde olurlar. Bu nedenle “Pleksiform” isimlendirmesi yapılmıştır (22).

3.3.2.3. Anjiomatoid Spitz nevüs:

Bu lezyonlar kalın duvarlı ve dilate görünümde, birbirinden farklı boyutlarda kan damarları içerirler. Kan damarları arasında dağınık ve küçük gruplar oluşturan epiteloid hücreler görülür. Arada kollajen demetleri izlenir. Junktional komponent yok ya da belirsizdir (53).

3.3.2.4. Hiperpigmente Spitz nevüs:

Tipik Spitz nevüsler genellikle pigmentsiz olurlar ya da çok az pigment içerirler. Spitz nevüslerin yaklaşık %10’u ise pigmentten zengin olarak izlenir. Bu tür lezyonlar genellikle erişkinlerde ve koyu tenli kişilerde görülür (54).

3.3.2.5. Rekürren Spitz nevüs:

Spitz nevüslerde komplet eksizyon sonrası genellikle rekürrens görülmez. Fakat vakaların yaklaşık %4-6’sında komplet eksizyona rağmen rekürrens izlenmektedir. Bunun dışında

rekürrensın en önemli sebebi inkomplet eksizyondur. Özellikle deri eklerinde yer alan melanositlerin eksizyonu yetersiz kalabilmektedir. Sitolojik olarak rekürren lezyonlar daha atipik, daha belirgin nükleus ve nükleoluslara sahip olarak izlenir. Mitotik figürler daha sıktır. Bu özellikleriyle melanomla ayırıcı tanı problemi oluşturabilirler (36).

3.3.2.6.Hyalinize Spitz nevüs:

Tek tek duran ya da küçük gruplar oluşturan iğsi ve epiteloid hücreler belirgin hyalinizasyon gösteren stroma içinde dağılmıştır. Stroma içinde ayrıca dilate kan damarları izlenebilir. Miksoid, ödematöz ve immatür kondroid stroma görülebilir (55).

3.3.2.7.Psödoepitelyomatöz hiperplazi ile giden Spitz nevüs:

Belirgin epidermal hiperplazi ve uzamış rete ridgeler ile karakterizedir. Melanositler genellikle epiteloid morfolojide ve proliferen epidermis ile hiperplastik adneksiyal epitel çevresinde izlenir.

3.3.2.8.Tubuler Spitz nevüs:

Küboidal, geniş soluk sitoplazmalı belirgin nükleus ve nükleoluslu hücrelerden oluşan lezyonlardır. Melanositler ortalarında küçük boşluklar içeren yuva yapılarını oluşturur. Yuva yapılarının ortasında kollagen lifler izlenir (56).

3.3.2.9.Konjenital Spitz nevüs:

Nadir görülür. Klasik konjenital nevüsler gibi deri ekleri, özellikle pilosebase üniteler çevresinde yer alan melanositler izlenir.

3.3.2.10.Grup oluşturan Spitz nevüsler/Nevus spilus üzerinde Spitz nevüsler:

Grup oluşturan Spitz nevüsler normal deri üzerinde olabileceği gibi hiperpigmente bir makül veya nevus spilus üzerinde de bulunabilir. Bu makül hafifçe hiperkeratotik olup, bazalde hafif melanosit proliferasyonu ve hiperpigmentasyon izlenir (57).

3.3.2.11.Polipoid Spitz nevüs:

Geniş oval epiteloid ve daha az oranda iğsi melanositlerden oluşan büyük ve saplı lezyonlardır. Bazale doğru inildikçe sellülarite ve mitoz azalır, matürasyon görülür, kollagen lifler belirginleşir.

3.3.2.12.Halo reaksiyonu gösteren Spitz nevüsler:

Spitz nevüslerde görülebilen inflamatuvar reaksiyonlar:

- Yoğun, band oluşturan lenfositik infiltrasyon genellikle bileşik Spitz nevüslerde görülür.
- Perivasküler infiltrasyon genellikle lezyonun bazalinde, retiküler dermise girdiği alanlarda izlenir.
- “Halo reaksiyonu”, diğer bir deyişle difüz inflamatuvar reaksiyon, regresyon bulgusu olarak izlenir. Halo reaksiyonunda gözlenen difüz lenfositik infiltrasyon lezyon bazalinden dermoepidermal bileşkeye kadar uzanır. Tek tek melanositlerde piknoz ve karyoreksis görülebilir. Lezyonun bazalinde inflamatuvar reaksiyon nedeniyle melanositlerde matürasyon görülemeyebilir (35).

3.3.2.13. Dev Spitz nevüs:

Spitz nevüsler nadiren 2-3 cm çapa kadar ulaşabilir. Bu dev Spitz nevüsler polipoid büyüme gösterebilirler ve genellikle epiteloid tipte melanositlerden oluşurlar.

3.3.3.Spitzoid Malign Melanomların Histopatolojik Bulguları:

SMM'lar, Spitz nevüsler gibi geniş oval-epiteloid ve/veya iğsi melanositlerden oluşan malign neoplazilerdir (58). Spitzoid özellikler taşıyan bir tümörün SMM olarak adlandırılabilmesi için kriterler belirlenmiştir. Bu kriterler:

- *Derin dermis ve subkutan yağ dokusuna kadar ulaşan infiltrasyon
- *Geniş dermal yuva yapıları ile karakterize solid adalardan oluşan büyüme paterni
- *Ekspansil nodüllerin varlığı
- *Derin dermal kısımlarda mitozların varlığı
- *Özellikle nükleuslarda seçilen sellüler pleomorfizm
- *Nekroz ve nükleer debrilerin varlığı (Spitz nevüslerde nekroz sadece travmaya bağlı olarak oluşabilir)
- *Belirgin sellülarite

*Belirgin pleomorfizm, kaba kromatin, geniş eozinofilik nükleolus, pigmentsiz ya da tozsuz (dusty) pigment içeren geniş eozinofilik sitoplazma gibi özellikleri içeren sitolojik değişiklikler

*Tümöral melanozis (melanosit grupları arasında melanofajların varlığı)

*Heterojen pigment dağılımı, bazal kısımlarda pigmentasyon varlığı

*Solar degenerasyon

*Matürasyon kaybı

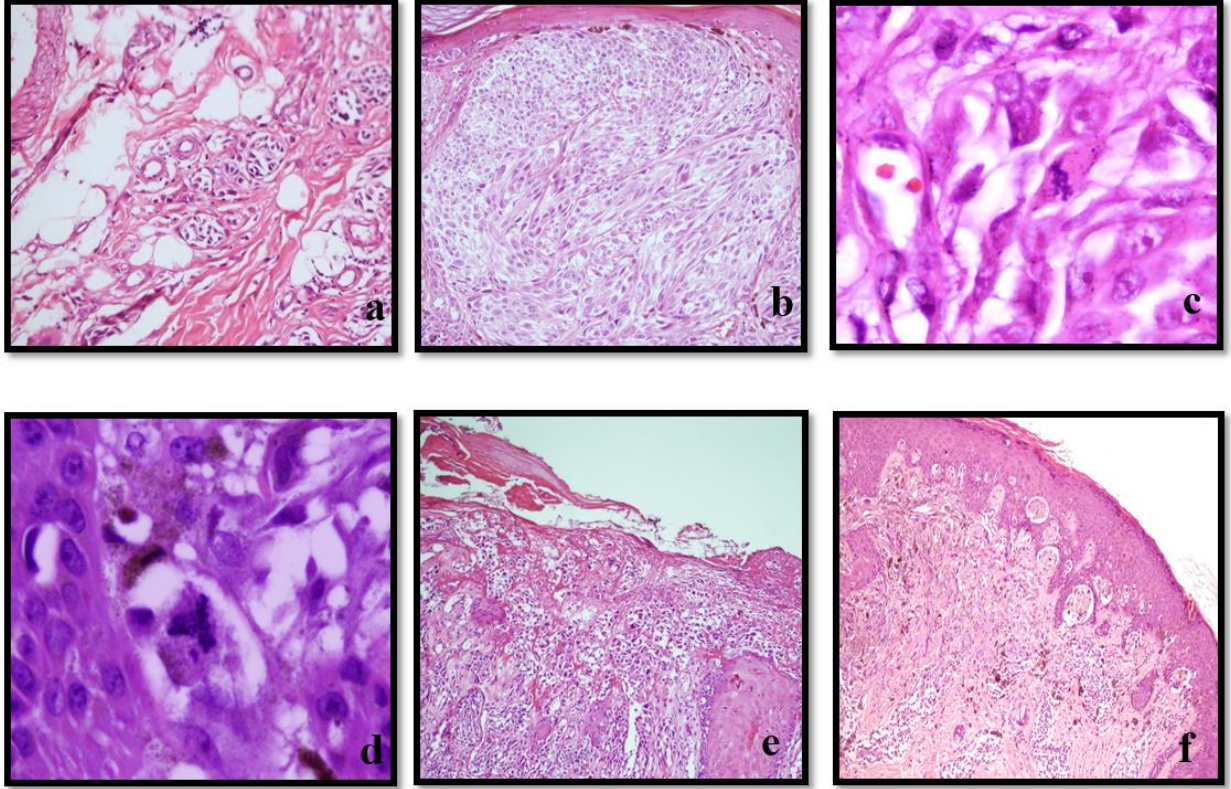
*Asimetri

*Ülserasyon

*Özellikle periferde izlenen pagetoid yayılım

*Belirgin plazmositik infiltrasyon olarak sıralanabilir (59) (Resim 5) (Tablo 4).

Resim 5: SMM’larda görülen histopatolojik özellikler: a)Subkutan yağ dokusu tutulumu HEx400, b)Ekspansil nodül HEx200, c)Derin yerleşimli mitoz HEx1000, d)Atipik mitoz HEx1000, e)Ülserasyon HEx200, f)Periferik pagetoid yayılım HEx200



3.3.4.Spitzoid Malign Melanom Varyantları:

Çoğu SMM ganglion hücresi benzeri geniş epitelooid hücreler ya da iğsi hücrelerden oluşur. Bazı SMM’ler her iki hücre tipini de içerebilir. Bu tipler dışında dendiritik hücre benzeri uzantıları olan melanositler içeren geniş yuva yapılarından oluşan “Reed nevüs benzeri Spitzoid Malign Melanom”lar bulunmaktadır. Bu tür melanomlar genellikle güneş hasarı olan bölgelerde izlenir. Dağınık pigmentasyon ve düzensiz dağılımlı lenfositik infiltrasyon gözlenir (60).

3.3.5. Atipik Spitz Tümörlerin Histopatolojik Bulguları:

Belirgin yapısal ve sitolojik atipi gösteren ancak melanom için gerekli olan histopatolojik kriterleri net olarak karşılayamayan junctional ya da bileşik spitzoid lezyonlar “Atipik Spitz Tümör” olarak isimlendirilirler (61).

Aşağıda tarif edilen kriterlerden biri ya da daha fazlası bulunması durumunda lezyon, Spitz nevüs yerine AST olarak adlandırılır. Bu kriterler:

*Asimetri

*Sınır düzensizliği

*Ülserasyon

*Geniş dermal melanosit gruplarının olması, belirgin sellülarite

*Matürasyon kaybı

*Derin dermal mitozlar, atipik mitoz varlığı

*Subkutan yağ dokuya yayılım

*Dermoepidermal bileşkede yuva yapılarının yerine tek tek dağılan melanositlerin baskın oluşu

*Çapın 1 cm’den büyük oluşu

*Epidermis üst yarısında ve periferde görülen pagetoid yayılım

*Kamino cisimciklerinin az olması ya da olmaması

*Belirgin sitolojik atipi (yüksek nükleus/sitoplazma oranı, tozsu pigmentasyon, kromatin kabalaşması, nükleer membran kalınlaşması v.b.)

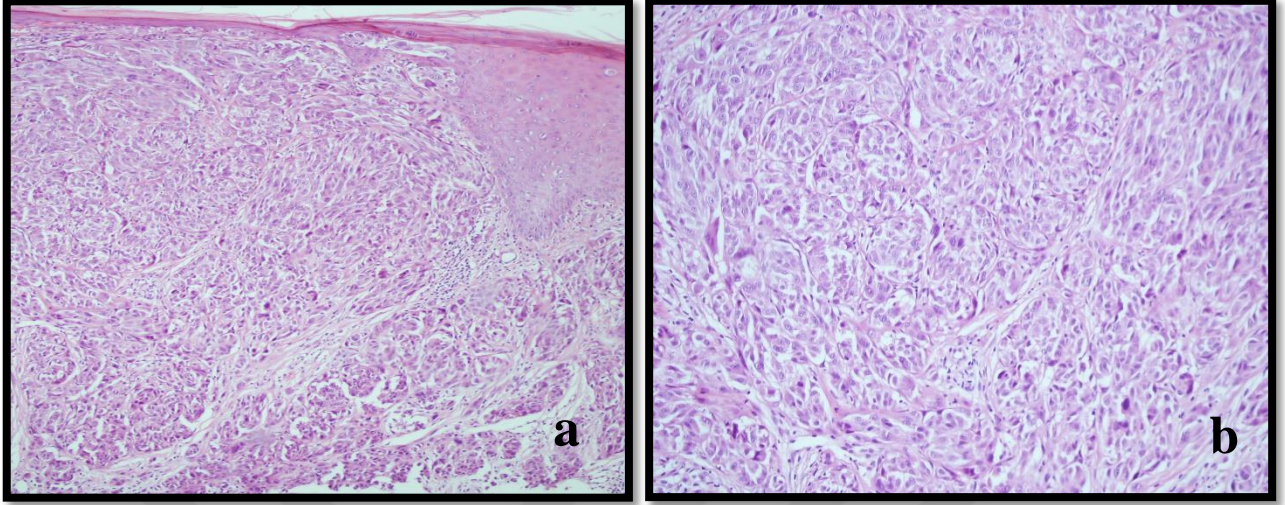
*Diğer kriterler: Tümör lokalizasyonu, uzun süreli lezyonlarda son zamanlarda olan değişiklikler (büyüme, renk değişikliği, sınır düzensizliği vb.), ailesel melanom öyküsü v.b. olarak sıralanabilir (62) (Tablo 4) (Resim 6).

Tablo 4 : Spitzoid lezyonların ayırıcı tanısında histopatolojik özellikler

	SPİTZ NEVÜS	SPİTZOİD MALİGN MELANOM	ATIPIK SPİTZ TÜMÖR
LEZYON SINIRLARI	Net seçilebilir ve düzenli	Belirgin ya da belirsiz, düzensiz	Belirgin ya da belirsiz, düzensiz
SİMETRİ	Simetrik	Çoğunlukla asimetrik	Simetrik/Asimetrik
KAMİNO CİSİMCİKLERİ VARLIĞI	Sık	Çok nadir ya da yok	Az ya da yok
EPİDERMAL ÖZELLİKLER	İntakt, hiperplastik	Ülser ve erozyon görülebilir.	Ülser ve erozyon görülebilir.
JUNKTİONAL ÖZELLİKLER	“Junktional clefting” mevcut	“Junktional clefting” olabilir/olmayabilir	“Junktional clefting” olabilir/olmayabilir
İNİLTRASYON YERİ	Çoğunlukla yüzeysel	Derin dermis ve subkutan yağ dokusuna ulaşan infiltrasyon	Derin dermis ve subkutan yağ dokusuna ulaşan infiltrasyon
MATÜRASYON	Derine inildikçe matürasyon varlığı, küçük yuva yapıları içinde boyutları küçülen hücreler	Derine inildikçe belirgin selülarite ve ekspansil nodüllerin devam etmesi, matürasyon kaybı	Derine inildikçe belirgin selülarite ve ekspansil nodüllerin devam etmesi, matürasyon kaybı
PAGETOİD YAYILIM	Epidermisin alt kısmında ve lezyonun orta kısımlarında sınırlı	Lezyonun orta ve periferinde, epidermisin üst kısımlarına dek uzanabilir.	Lezyonun orta ve periferinde, epidermisin üst kısımlarına dek uzanabilir.
NEKROZ	Görülmez(Travma hariç)	Geniş	Fokal

MİTOZ	Genellikle yüzeysel ve <math><2/mm^2</math>	Derinlerde de görülebilir , genellikle 2-6/mm ²	Derinlerde de görülebilir , genellikle 2-6/mm ²
HÜCRE ŞEKİLLERİ	İğsi ve epiteloid , derine indikçe küçülen ve matürleşen hücreler, multinükleer dev hücreler sık	Lezyonun her tabakasında büyük ve pleomorfik hücreler	Lezyonun her tabakasında büyük ve pleomorfik hücreler
HÜCRE ÖZELLİKLERİ	Opak , buzlu cam görünümünde , eozinofilik sitoplazmalı, pigment içermeyen ya da çok az pigment içeren hücreler	Granüler yada tozsu pigment içeren sitoplazmalı hücreler	Granüler yada tozsu pigment içeren sitoplazmalı hücreler
NÜKLEUS/ SİTOPLAZMA ORANI	Düşük	Yüksek	Yüksek
KROMATİN YAPISI	İnce kromatinli, uniform nükleuslar	Büyük , eozinofilik nukleolus içeren kaba kromatinli nükleuslar	Büyük , eozinofilik nukleolus içeren kaba kromatinli nükleuslar

Resim 6: Bir AST vakasının mikroskopik görüntüsü a)HEX100 (Derin dermise ulaşan infiltrasyon), b)HEX400 (Derin dermisteki melanositlerde maturasyon yokluğu)

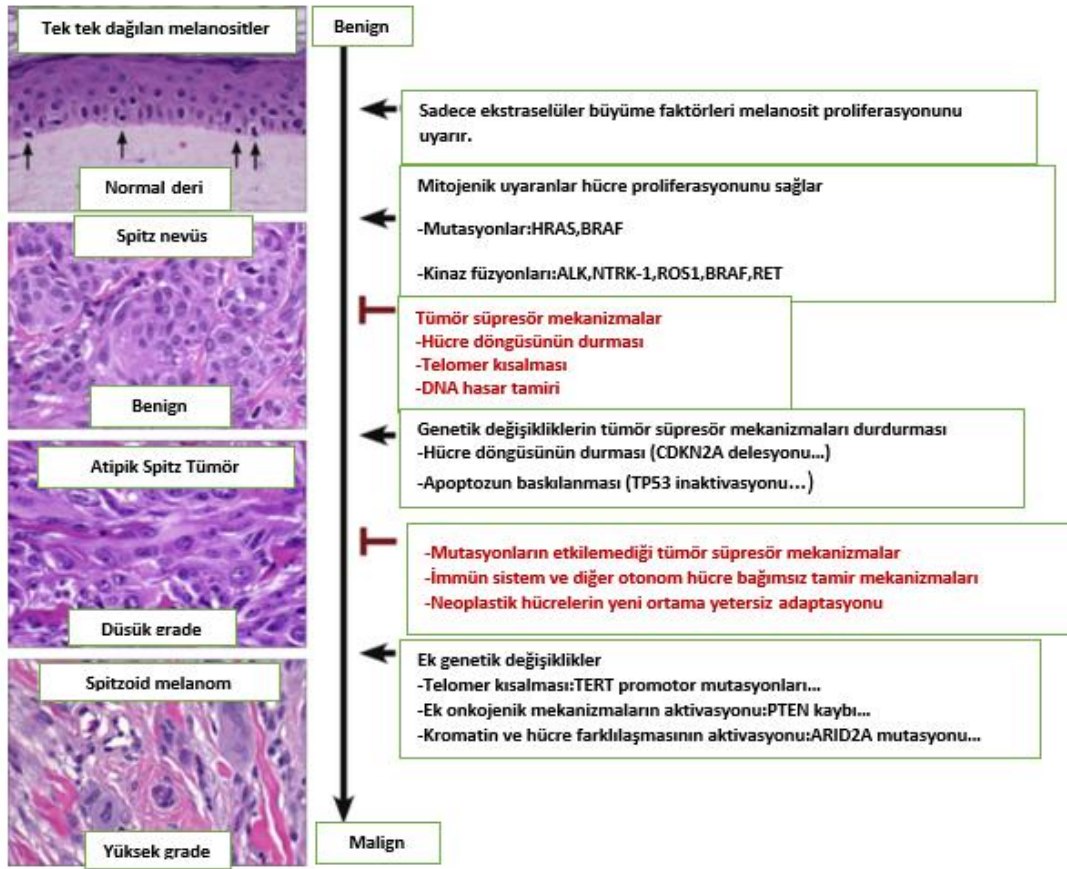


3.4.SPİTZ TÜMÖRLERİN GENETİK ÖZELLİKLERİ

Genel olarak akiz nevüs ve melanomlar BRAF mutasyonu, NRAS mutasyonu ve NF-1 inaktivasyonu ile ortaya çıkarken, Spitz tümörlerde farklı genetik değişiklikler izlenmektedir. Bu tümörlerde 11p gen kazanımı ve HRAS mutasyonu sıklıkla izlenirken, görülebilen diğer genetik değişiklikler BAP-1 inaktivasyonu ve kinaz füzyonları (ALK, ROS-1, NTRK-1, BRAF, RET, MET vb.) olarak sıralanabilir (63).

Spitz nevüsler başlangıçta hızlı bir büyüme fazına sahiptir. Bu hızlı büyüme fazı HRAS, BAP-1 gen mutasyonları, kinaz füzyonu gibi değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak sonrasında telomeraz erozyonu, DNA hasarı, artmış reaktif oksijen radikallerinin konsantrasyonu, epigenetik değişiklikler gibi faktörler ile hızlı büyüme fazı sınırlandırılır ve durdurulur. AST'ler büyümenin sınırlandırılmasını durduran mekanizmalardan kaçarak proliferere olmaya devam edebilir. Bu kaçışa neden olan en önemli mekanizmanın CDKN2A genindeki homozigot delesyon olduğu gösterilmiştir. CDKN2A geninin ürünü olan 2 önemli protein p14 ve p16'dır. Bu proteinlerden p14, p53 geninin stabilizasyonunu sağlayarak büyümenin durması ve apoptozda önemli rol alır. p16 ise Rb geninin fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünü sınırlar. CDKN2A geninde görülen homozigot delesyon sonucu p16 ve p14 proteinlerinin sentezlenmesi durmakta, dolayısıyla tümör süpresör mekanizmalar devre dışı kalmaktadır. SMM'larda bu kaçış mekanizmasına çeşitli mutasyonlar eklenerek apoptozdan kaçış, sınırsız bölünebilme gibi özellikler tümör hücrelerine kazandırılmaktadır (63,64) (Tablo 7).

Resim 7: Spitz tümörlerde tümör progresyon modeli (63).



Klasik melanomlarda %50 oranında BRAF V600 E mutasyonu görülürken, bunu %25 oranında RAS mutasyonları (%24'ünde NRAS) ve %10 oranında NF-1 inaktivasyonu izler. Klasik nevüslerde BRAF V600E, konjenital nevüslerde ise kodon 61 de bulunan NRAS mutasyonları sıklıdır. Mavi nevüslerde 209. kodon üzerinde yer alan GNAQ ve GNA11 mutasyonları büyük oranda görülür. Uveal melanomlarda ise triple "wild type" mutasyon (KIT, GNAQ, GNA11) izlenmektedir. KIT mutasyonları aynı zamanda akral ve mukozal melanomlarda da görülebilir (64).

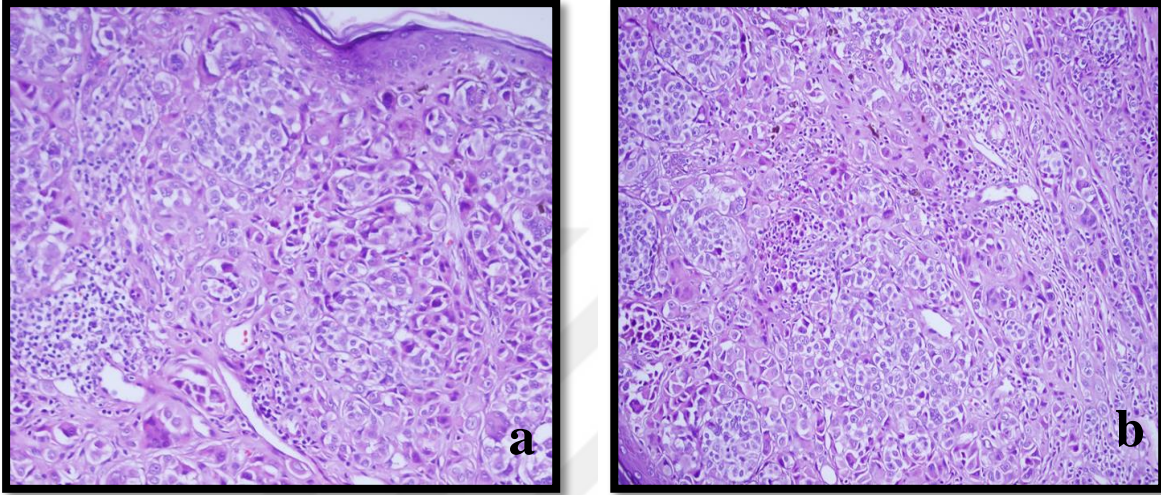
Spitz nevüslerde ise 11p kazanımları sık olarak izlenmektedir. 11p gen kazanımı desmoplazi ve stromal skleroz ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle özellikle desmoplastik Spitz nevüslerde 11p gen kazanımı sık olarak görülmektedir. 11. kromozomun kısa kolunda bulunan (11p15) HRAS gen mutasyonu ise %15 oranında Spitz nevüslerde izlenmektedir. Bu mutasyon dışında %5 oranında BAP-1 mutasyonu ve %50 ye varan oranda kinaz füzyonu izlenir. (ALK, ROS-1, NTRK-1, RET, MET, BRAF, STK vb.) (63,64).

3.4.1.BAP-1 kaybı:

BAP-1 (BRCA-1 associated protein-1) 3. kromozomun kısa kolundan eksprese olan (3p21) ve tümör süpresör rol üstlenen bir proteindir. Ubikuitin C terminal hidrolaz ailesinde yer alır ve deubikuinasyon ile görevlidir. Kromatin modülasyonu, transkripsiyonal regülasyon, ubikuitin-proteazom sistemi ve DNA hasar tamirinde önemli rol oynamaktadır. Tümör süpresör işlevinin yerine getirilmesinde deubikuinasyon görevi ve nükleer lokalizasyonu önem taşımaktadır. BAP-1 proteininin eksprese edildiği gen bölgesinin homozigot delesyonu tümör süpresör işlevin kaybına yol açmaktadır. Bu homozigot kayıp Knudson'un 2 vuruş hipotezi ile açıklanmaktadır. 1. vuruş 1 allelin monozomisi ya da uniparental dizomi gibi her iki allelin tek bir ebeveynden geldiği durumlarda gerçekleşmektedir. 2. vuruş ise inaktive edici BAP-1 mutasyonları ile gerçekleşmektedir. BAP-1 kaybına çoğunlukla BRAF mutasyonları da eşlik etmektedir. Bu şekilde ortaya çıkan multipl herediter tümör predispozisyon sendromu uveal melanomlar, kutanöz melanomlar ve multipl epiteloïd melanositik tümörler ile karakterizedir. Bunun dışında özellikle malign mezotelyoma, bazı herediter böbrek hücreli karsinomlar gibi birçok tümörün patogenezinde de rol oynamaktadır. BAP-1 kaybının rol aldığı melanositik lezyonlarda epiteloïd melanositler ön plana çıkmaktadır (65). Epiteloïd melanositler belirgin pleomorfik veziküler nükleuslu, net seçilemeyen nükleolusları olan, belirgin geniş amfofilik sitoplazmaya sahip hücrelerdir. BAP-1 kaybıyla ortaya çıkan melanositik tümörler genellikle intradermal ve junktional yerleşimli olup, Spitz nevüslerde sıkça görülen epidermal hiperplazi, hipergranüloz, dermoepidermal bileşkede görülen artifisyel yarıklanma, Kamino cisimcikleri gibi özellikleri taşımamaktadırlar. Aksiyel lokalizasyon, yapraksı büyüme paterni, sitoplazmik amfofili, belirgin sitoplazma sınırları, veziküler kromatin, binükleasyon/multinükleasyon, tümörü infiltre eden lenfositlerin varlığı bu tümörlerin özelliklerindedir (Resim 8). BAP-1 kaybı ile giden tümörler morfolojik olarak epiteloïd melanositler içermesi nedeniyle Spitz nevüsler ile benzer olarak görülse de, moleküler olarak BRAF mutasyonları içermeleri nedeniyle farklı isimlendirmeler de önerilmiştir. Bu isimlerden "Melanositik BAP-1 ilişkili intradermal tümör (MBAITs)", tümörlerin çoğunlukla intradermal oluşuna karşın junktional komponent de içerebilmesi nedeniyle kullanışlı olmamıştır. Diğer bir isimlendirme ise "Nevoid melanoma-like melanositik proliferasyon (NEMMPs)"dur. Nevoid melanomlar kötü prognoza sahip tümörlerdir. BAP-1 ilişkili tümörlerin nadiren melanoma ilerleyebileceği ve sıklıkla metastaz yapmadığı göz önünde bulundurulduğunda bu isimlendirmeden de uzaklaşmıştır. Bir diğer isimlendirme "BAPoma"dır. Bu isimlendirme aktive edici mutasyonlara sahip BRAFoma,

ALKoma gibi tümörler esas alınarak yapılmış olmakla birlikte, BAP-1 mutasyonunun inaktivasyonu sonucu tümörler gelişmekte olduğundan yine doğru bir isimlendirme olmamıştır. Bu tümörlerin isimlendirilmesi için fikir birliği henüz sağlanamamıştır (65,66).

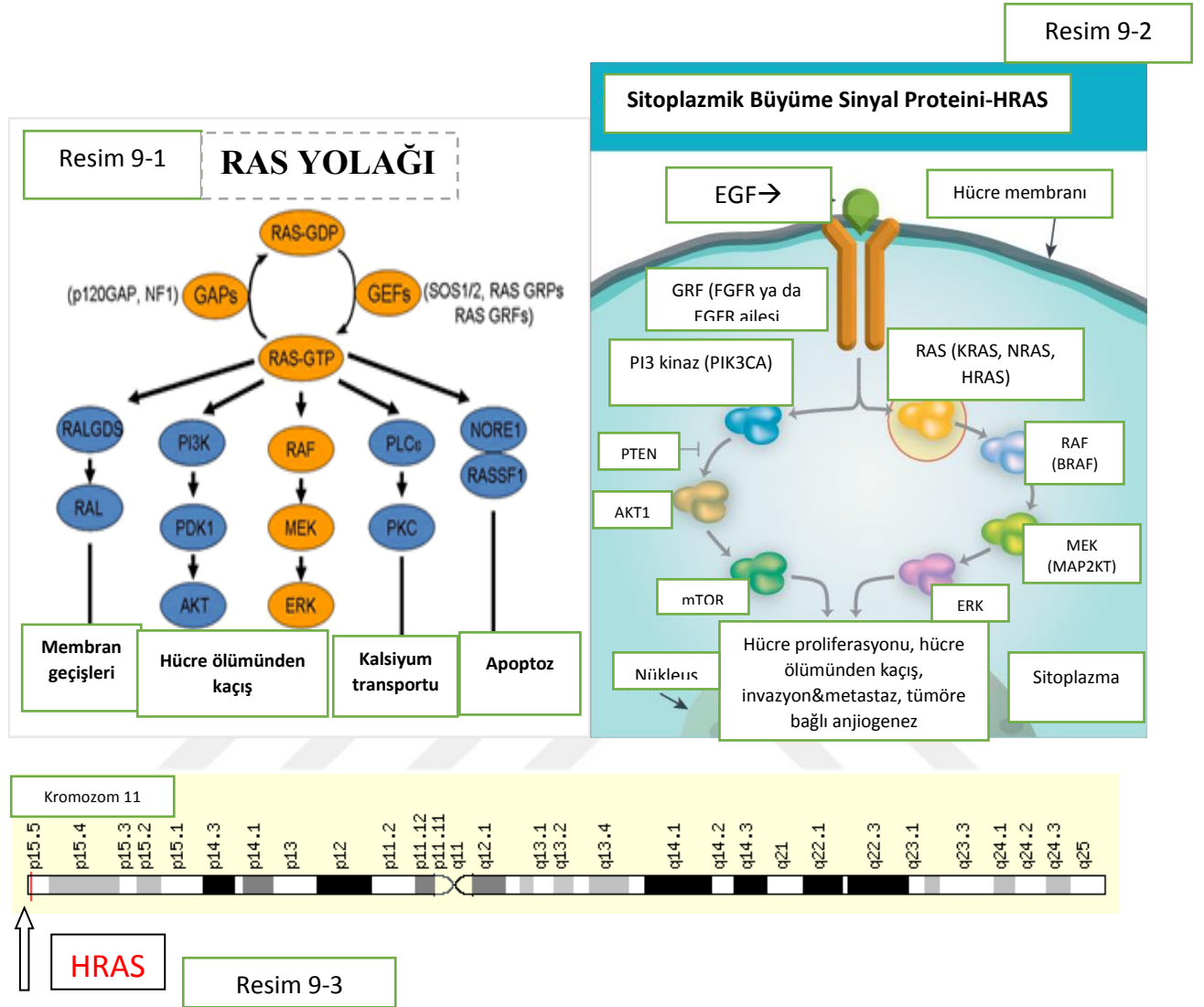
Resim 8: BAP-1 kaybı ile giden bir melanositik lezyonun mikroskopik görüntüsü a)HEX200 (Bizar, multinükleer dev hücrelerin eşlik ettiği epiteloid melanositler), b)HEX400 (Epiteloid melanositlerin arasında tümörü infiltre eden lenfositler)



3.4.2.HRAS mutasyonu:

HRAS geni 11. kromozomun kısa kolunda, ekzon 3'te bulunur. Bu lokusta ortaya çıkan mutasyon sonucu, glutamin amino asidinin lizin ya da arjinin ile yer değiştirmesiyle aktive protein ortaya çıkar. Bu mutant proteinin tetiklemesi ile MAP/ERK yolağı aktive olur. Bu sinyal yolağı da bir başka sinyal yolağı olan PI3K/AKT/mTOR yolağını aktive ederek hücre boyutunun büyümesine ve hücrenin hayatta kalma şansının artmasına yol açar (Resim 9-1, 9-2, 9-3). PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu), CGH (komplet genomik hibridizasyon) ve FISH (Floresans in situ hibridizasyon) yöntemleriyle bu gendeki değişiklikler gösterilebilir. HRAS mutasyonu Spitz tümörlerde benign davranışı gösterir. Bu nedenle SMM'larda rastlanan bir gen mutasyonu değildir (67,61).

Resim 9-1:Hücre içi RAS yolağı (68,69). Resim 9-2:Hücre içi büyüme faktörü olarak HRAS (70). Resim 9-3:Kromozom 11 ve HRAS (71).



3.4.3.Kinaz füzyonu:

Hücre içinde bulunan kinaz bölgeleri normal durumda intaktır ve sinyal yolağını aktive edici özelliği bulunmamaktadır. Ancak kinaz füzyonu görülen durumlarda bağımsız dimerizasyon ve otofosforilasyon gerçekleşir. Otofosforilasyon sonucu hücre içi sinyal yolları aktive olur. Bu hücre içi sinyal yolları MAP/ERK, PI3K/AKT/mTOR, JAK-STAT gibi yollar olup, hücrenin sınırsız bölünmesi ve apoptoz mekanizmalarından kaçışında rol oynarlar (65).

***ALK Füzyonu:** Tirozin kinaz füzyonudur. Spitz tümörlerin yaklaşık %10'unda ALK füzyonu izlenmektedir. Bu tümörler genellikle ekstremitelerde tek papül şeklinde ortaya çıkmaktadırlar. Çoğunlukla amelanotik olmakla birlikte yoğun pigment içeren tipleri de bulunmaktadır. Tümörler intradermal, bileşik ya da junktional olabilir. Fusiform melanositlerin oluşturduğu pleksiform yapılanma en karakteristik histopatolojik bulgusudur. Hücrelerin nükleusları düzgün konturlu ve veziküler görünümündedir. Belirgin pleomorfizm görülmez. Bunun yanısıra dermal skleroz eşlik edebilir. En sık füzyon partnerleri olan TPM3 ve DCTN1, 5' ucunda artmış fosforilasyona, böylece aktive edici kimerik protein oluşumuna neden olurlar. Bu sayede PI3K ve MAPK sinyal yolları aktive edilir (72,73,74).

***ROS-1 Füzyonu:** Tirozin kinaz füzyonudur. Belirgin spesifik bir histolojik bulgusu bulunmamaktadır. Çok çeşitli füzyon partnerleri mevcuttur. Spitz tümörlerin yaklaşık %10'unda görülmektedir. Oluşan aktive edici kimerik protein sayesinde ALK füzyonunda olduğu gibi PI3K ve MAPK sinyal yollarını aktive eder (75).

***NTRK-1 Füzyonu:** Tirozin kinaz füzyonudur. En sık görülen füzyon partneri LMNA'dır (73).

***RET Füzyonu:** Tirozin kinaz füzyonudur. KIF5B ve GOLGA-5 ile füzyonu sıktır. %5'ten az oranda görülür.

***MET Füzyonu:** Tirozin kinaz füzyonudur. Spitz tümörlerde oldukça nadirdir. Çok sayıda bilinen füzyon partnerlerinden 6 tanesi Spitz tümörlerde tespit edilmiştir. Füzyon sonucu oluşan aktive edici kimerik protein sayesinde ALK füzyonunda olduğu gibi PI3K ve MAPK sinyal yolları aktive edilir.

***BRAF Füzyonu ve Amplifikasyonu:** Diğer kinaz füzyonlarından farklı olarak serin/threonin kinaz füzyonudur. Füzyon N-terminal RAS bağlayıcı bölgelerde gerçekleşir. Spitz tümörlerin yaklaşık %5'inde görülmektedir. Spesifik bir morfolojik özellik ile ilişkilendirilememiştir. Otoinhibitör mekanizmaların kaybı sonucu tümör oluşumuna neden olur (75).

Spitzoid melanomlarda ise klasik melanomlarda belirlenen çeşitli gen mutasyonları görülebilir. Bu nedenle konvensiyonel melanomlarda belirlenen 3 farklı gen lokusunda tanımlanan Siklin D1(CCND-1) (11q13), Miyeloblastosis fetal onkogen protein (MYB) (6q23), ve Ras responsive element binding protein -1 (RREB-1) (6p25) içeren klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmalarda spitzoid melanomlarda da pozitiflik elde edilebilir.

Bunun dışında tümör süpresif bir gen olan CDKN2A (9p21) ile izlenen homozigot kayıplar da agresif gidişi gösteren bir belirteçtir. Bu lezyonların bazılarında 9p21 lokusunda sadece heterozigot delesyon saptanmasına rağmen agresif gidiş görülebilir. Bunun sebebi diğer allelin genomik yeniden düzenlenmesi, mutasyon, epigenetik mekanizmalar ve küçük delesyonlar gibi sebeplerle inaktivasyonu olarak düşünülmektedir. MYB geninde delesyon gösteren vakalarda ise daha iyi prognoz izlenmektedir (76,77).

3.5.FISH (Floresans in situ hibridizasyon)

Son yıllarda FISH kullanımını hem temel hem de klinik araştırmalarda sıkça kullanılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Spesifik DNA ya da RNA sekanslarının belirli problemler ile hibridizasyonu yaklaşık olarak 40 yıldır bilinen bir yöntemdir. Hibridizasyon sonrası oluşturulan preparatlar floresans mikroskopu altında belirli filtrelerden geçirilen ışık ile incelenir ve farklı renklerle karakterize olan sinyaller değerlendirilir (78,79). FISH metoduyla spesifik DNA ya da RNA sekansları ile izotopik olan işaretli problemler nükleusta, hücrenin tamamında ya da metafaz kromozomunda hibridize edilir. 1970'lerin sonlarında rekombinant DNA teknolojisinin çıkması sonucunda izotopik olmayan formlarla da işaretlenebilen problemlerin kullanılması FISH yöntemini daha hızlı ve güvenli hale getirmiştir (80).

3.5.1.Problar: En popüler olarak kullanılan problemler kromozomu spesifik olarak tekrarlayan DNA problemleri olup, hem metafaz hemde interfazda bulunan nükleuslarda kaliteli sinyal vermektedir. Bu satellit problemler kromozomun sentromer bölgesinde yerleşirler ve çok sayıda hibridizasyon için hedef oluşturan alana ait kopya içerirler (81). Bu problemler belirli bir gen bölgesinde olan genetik değişiklikleri gösterirler. Bu gen bölgesi 1 kilobazdan 300 kilobaza kadar ulaşabilen boyutlarda olabilir. Bununla birlikte kromozomun tamamını ilgilendiren değişiklikler ve translokasyonlar için kullanılan "Kromozom Boyaları" tek bir kromozomun izolasyonu ya da kromozom bankaları kullanılarak elde edilebilir (82,83).

3.5.2.Probların işaretlenmesi: Spesifik gen alanları içeren moleküller ile bunları işaretleyip sinyal alımını sağlayan non izotopik moleküllerin birleştirilmesi enzimatik ve kimyasal olarak gerçekleştirilebilir. Bu işlem için kullanılan sentezlenmiş nükleotid analogları olan haptenler biyotin ve digoksinin olarak bilinirler. Bu haptenler immünolojik ya da afinite bağlayıcı yöntemler ile floresans ligandlara bağlanırlar (İndirekt yöntem) (84). Son yıllarda nükleotidler, geliştirilen floroforlara direkt olarak da bağlanabilmektedir. Bu işaretleme yöntemleri; nick translasyon, random primerizasyon, in vitro transkripsiyon ve PCR amplifikasyon olarak sıralanabilir (85).

3.5.3.Hedef doku: İn situ hibridizasyon teknikleri, hücreler, doku kesitleri, izole edilmiş nükleuslar ve kromozomlar üzerinde uygulanabilir. Hibridizasyon öncesi doku kesitlerine fiksasyon işlemi uygulanır. Bunun yanısıra tek hücre süspansiyonu içinde de hibridizasyon işlemi uygulanabilir. Hibridizasyon işleminin başarısını arttırmak için birkaç farklı işlem öncesi prosedür uygulanabilir. Bu işlemler sayesinde sitoplazmalar, nükleer proteinler ve endojen RNA parçaları ortamdaki uzaklaştırılır, böylece probun DNA'ya penetrasyonu optimal koşullarda gerçekleşmiş olur. Bu işlem için proteolitik enzimler ya da deterjan solüsyonları kullanılabilir (80).

3.5.4.Denatürasyon ve Hibridizasyon: Hibridizasyonun gerçekleşebilmesi için çift sarmallı probun ve hedef DNA'nın tek sarmallı hale getirilmesi gerekmektedir. Bu işlem yüksek ısı ya da alkali denatürasyon ile sağlanmaktadır. Bu basamaklardaki süre ve sıcaklıklar prob ve dokunun özelliklerine göre değişkenlik gösterebilir. Hibridizasyon basamakları 10-20 mikrolitrelik küçük miktarlardaki tampon çözeltiler içinde gerçekleştirilir. Bu tampon solüsyonların tuz konsantrasyonları, pH değerleri, ısıları ve formamid konsantrasyonları, dokunun ve probun özelliklerine göre farklılık gösterebilir.

3.5.5.İn situ hibridizasyon: 1-5 kilobazlık problar FISH için yeterli olmakla birlikte kaliteyi arttırmak amacıyla 10-25 kilobazlık problar kullanılmaktadır. Ancak büyük miktarlardaki DNA'lar için kullanılan problar daha da fazla miktarda olabilir. Büyük miktarda DNA hibridizasyonlarında spesifik tekrarlar ile non spesifik tekrarlar içeren alanları ayırt etmek mümkün olmayabilir. Bu problem de probun işaretlenmemiş DNA ya da insan COT-1 DNA'sı ile prehibridizasyonu ile çözülmektedir. Bu DNA'lar nonspesifik tekrar eden gen alanlarını içermektedir (83,86).

3.5.6.Sinyallerin saptanması ve görselleştirilmesi: Post hibridizasyon yıkamalar ile nonspesifik prob artıkları ve hibridize dokuların direkt olarak uzaklaştırılması sonrasında prob florokrom konjugatları ile bağlanır. Biotin ile işaretli konjugatlar, avidin ve streptavidin ile konjuge edilerek yeşil sinyal, teksas red ve rhodamin ile konjuge edilerek kırmızı sinyal, hidrosikumarin ile konjuge edilerek mavi sinyaller elde edilir. Son yıllarda biyotin ya da digoksijeninin florofor konjugatlara bağlanarak direkt olarak hibridize edilmesiyle bu işlem yapılmadan da sinyal elde edilebilir hale gelmiştir. Bu sayede sinyal amplifiye edilebilmektedir.

3.5.7.FISH yönteminin kullanım alanları:

- İnterfaz sitogenetik
- Translokasyon analizi
- Kromozom boyama (kromozomdaki yapısal anomalilerin saptanması)
- Yeast artificial chromosomes (YACs) saptanması (yabancı olan DNA'nın saptanması)
- Amplifikasyon ve delesyonların saptanması
- Kromozom haritası oluşturulması
- Rezidüel hastalığın saptanması (80).

3.6.SPİTZ TÜMÖRLERDE KULLANILAN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER:

Hücre döngüsünün ve apoptozun düzenlenmesinde rol alan proteinlerin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi melanositik lezyonlarda malignitenin belirlenmesi için önemli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu proteinler BAX, Ki-67, Rb, p16, Siklin D1 (CCND1), p27 ve p53 olarak sıralanabilir. Bunun yanı sıra çeşitli melanositik belirteçlerin immünohistokimyasal olarak ekspresyonlarının araştırılması da melanositik lezyonlarda malignite açısından fikir verici olmaktadır. Bu belirteçler MART-1 ve HMB-45'tir. Spitzoid lezyonlarda malignitenin belirlenmesi için Puri ve ark.'nın yaptığı çalışmada kullanılacak en iyi panelin HMB-45, Ki-67 ve p16 antikolarını içeren üçlü panel olduğu vurgulanmıştır (87).

3.6.1.Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A (CDKN2A, p16):

Yapılan GCH çalışmalarında melanomlarda en sık kayıp izlenen genomik bölgenin 9p gen lokusu olduğu tespit edilmiştir. Bu lokusta bulunan CDKN2A genindeki homozigot delesyonlar, ailesel melanomların %90'ında, konvansiyonel melanomların ise %50'sinde izlenmektedir. Spitzoid lezyonlarda ise 9p lokusunda homozigot ve heterozigot delesyonlar görülebilmektedir (88).

Spitz tümörlerde p16 ekspresyonu açısından 3 farklı patern ortaya çıkmaktadır: *Difüz ekspresyon, *Total ekspresyon kaybı, *İntratümöral heterojen ekspresyon kaybı (Fokal ekspresyon kaybı).

Difüz ekspresyon 9. kromozomun intakt olduğunu gösterebileceği gibi, heterozigot delesyonlarda da izlenebilir. Total ekspresyon kaybı, homozigot 9p delesyonlarında karşımıza çıkmaktadır. Fokal ekspresyon kaybında ise tümör içinde hem 9p homozigot delesyonu gösteren, hem de intakt 9p ya da heterozigot 9p delesyonu içeren hücreler olduğundan sözü edilebilmektedir.

3.6.2.Ki-67:

Nevüsten melanoma ilerleyen süreçte başlangıç noktasını melanositlerin kontrolsüz proliferasyonu oluşturur. Bu proliferasyonu görünür hale getirmek için kullanılan Ki-67 proteini MKİ67 geni tarafından kodlanır ve hücre döngüsünün G₀ hariç tüm fazlarında saptanabilir. Tüm melanositik lezyonlarda olduğu gibi spitz tümörlerde de benign ve malign lezyon ayırımında proliferasyon indeksinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Özellikle derin dermal melanositlerde artmış proliferatif indeks görülmeye başlanması, lezyonun malign olabileceğinin habercisidir (89,90).

Ki-67 antikoru için Li ve ark.'nın yaptığı çalışmada %5'in altındaki değerler düşük proliferatif indeks, %10'un üzerindeki değerler ise yüksek proliferatif indeks olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgulara göre SN'lerde Ki-67 proliferatif indeks %5'in altında, SMM'larda ise %10'un üzerinde beklenmektedir. AST'lerde Ki-67 proliferatif indeks sıklıkla %5 ile %10 arasında izlenmektedir (91).

3.6.3.Human Melanoma Black 45 (HMB-45):

HMB-45, lenf nodu tutulumu gösteren pigmentli melanomlardan elde edilen bir antikordur. Bu antikor immatür melanositlerdeki nöraminidaza duyarlı oligosakkarit glukokonjugatlarla reaktivite gösterir (88).

Nevüslerde HMB-45 ekspresyonu matürasyon ile uyumlu bir boyanma paterni oluşturur. Bu patern lezyon yüzeyindeki az miktarda melanositte boyanma, lezyon derinine inildikçe boyanmanın kaybı şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Melanomlarda ise hem tüm lezyonda difüz ekspresyon, hem de total ekspresyon kaybı görülebilmektedir. Spitzoid lezyonlarda da konvansiyonel melanomlarda görülen paternler izlenmektedir (60).

3.7.MELANOSİTİK LEZYONLARDA FISH KULLANIMI:

Melanositik lezyonlar dermatopatolojinin tanısı zor olan alanlarından biridir. Bu nedenle malign ve benign ayrımının yapılabilmesi için rutin ışık mikroskopik inceleme ve immünohistokimyasal incelemenin yanısıra çeşitli yöntemlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda nevüs ve melanom arasındaki genetik farklılıkların anlaşılmasıyla birlikte, bu genetik değişiklikler moleküler diagnostik testlerin de hedefi haline gelmiştir (92).

Yapılan çalışmalarda nevüslerin genellikle tek nokta mutasyonları sonucu oluştuğu, nevüsten melanoma doğru gelişen süreçte ise kromozomal instabiliteye bağlı olarak gen kazanımları, amplifikasyonları, gen delesyonlarının meydana geldiği anlaşılmıştır. Bu genetik değişiklikler de son yıllarda geliştirilen tekniklerin hedefi haline gelmiştir (93,94). Diğer yöntemlere göre maliyetinin daha düşük oluşu, arşiv materyalinden de çalışılabilmesi, patoloji laboratuvarlarında uygulanabilirliğinin kolay oluşu, FISH yönteminin kromozomal değişiklikleri belirlemede tercih edilen bir yöntem olmasını sağlamıştır. Hematolojik ve solid tümörlerde kullanılmasının yanısıra melanom için de çeşitli problemler geliştirilmiştir (94).

2003 yılında Bastian ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, 132 melanom ve 54 nevüs kullanılarak yapılan çalışmada melanomlarda %96 oranında belirli kromozomal kopya sayısı farklılıkları saptanmış, bu genetik farklılıklar nevüslerde görülmemiştir (92). En sık görülen genetik farklılıklar 6p, 1q, 7p,7q, 8q, 17q, 11q, 20q gen kazanımları ve 9p, 9q,10q, 10p, 6q gen delesyonları olarak saptanmıştır (95).

FISH testinin melanom için formülasyonu CGH ile belirlenen yüksek riskli alanların dökümantasyonu ile yapılmıştır. Bastian ve ark.'nın belirlediği 8 farklı kromozom üzerinde bulunan 13 yüksek riskli alanın, melanomlar ve nevüsler arasındaki ayrım açısından önem taşıdığı saptanmıştır. Ayrıca 4. kromozom üzerindeki KIT geni de terapötik hedef olması açısından önem kazanmıştır. Eğer bir kromozom melanomlarda genellikle gen kazanımına ya da gen delesyonuna uğruyorsa bu genler FISH problemleri için hedef alanlar olarak seçilmiştir (96).

FISH panelleri genellikle 2 ila 4 prob içerir ve her probun farklı bir florofor ile işaretlenmesiyle oluşur. Bastian ve ark.'nın 97 melanom ve 95 nevüs ile yaptıkları çalışmada geliştirilen paneller her vakaya uygulanmış ve 4 probun melanomları tespit edilmesinde en ideal problemler olduğu görülmüştür (97). Bu problemler Ras responsive element binding protein-1 (RREB-1 ,6p25), v-myb miyeloblastosis viral oncogene homolog proteini (MYB, 6q23), siklin D-1 (CCND1, 11q13) ve kromozom sayısının kontrolü için kullanılan sentromer 6

(CEP 6) olarak sıralanabilir. Bu problemlerden RREB-1 kırmızı spektrum, MYB gold spektrum, CCND1 yeşil spektrum, D6Z1 (CEP6) aqua spektrum ile işaretlenir. Ayrıca post hibridizasyon yıkamalar sırasında DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) boyamasının da entegre edilmesiyle sayıma hazır hale getirilir (77,98).

Sayım sırasında tümöre ait en az 60 değerlendirmeye uygun hücre seçilir. Hibridizasyonu zayıf olan ya da üstüste binmiş çekirdekler sayım dışında tutulur. Ayrıca 30'dan az tümör hücresi olan vakalar değerlendirmeye alınmaz. Tüm hücreler kriterlere göre değerlendirildikten sonra 1 ya da daha fazla kriteri sağlayan vakalar FISH pozitif olarak kabul edilir (98).

Pozitivite kriterlerini belirlemek amacıyla University of California at San Fransisco (UCSF) tarafından 58 adet melanom ve 51 adet nevüs kullanılarak yapılan çalışmada, nevüs ve melanomlar arasında ayrımı sağlayan 4 adet eşik değer saptanmıştır: 1) Sayılan hücrelerin %38'inden fazlasında 2'den fazla CCND1 sinyalinin olması, 2) Sayılan hücrelerin %55'inden fazlasında RREB-1/CEP 6 oranının 1'den büyük olması, 3) Sayılan hücrelerin %40'undan fazlasında MYB/CEP 6 oranı 1'den küçük olması, 4) Sayılan hücrelerin %29'unda 2'den fazla RREB-1 sinyali görülmesi kriterlerinden herhangi birini sağlayan vakalar FISH pozitif olarak kabul edilir (97) (Tablo 5).

UCSF'in eşik değerlerinin validasyonu açısından Chicago'daki Northwestern Üniversitesi'nde yapılan çalışmada 83 melanom ve 86 nevüs kullanılmış, eşik değerlerin %86,7 oranında sensitivite ve %95,4 oranında spesifiteye sahip olduğu görülmüştür (99).

Tablo 5: UCSF kriterleri

KRİTERLER	SİNYALLER	EŞİK DEĞERLERİ (%)
6p25 (RREB-1) kazanımı	>2 RREB-1 (kırmızı)	>29
6p25 (RREB-1) kazanımı	RREB-1 (kırmızı) > CEP6 (aqua)	>55
6q23 (MYB) kaybı	MYB (gold) < CEP6 (aqua)	>40
11q13 (CCND1) kazanımı	>2 CCND1 (yeşil)	>38

Sinyaller için belirlenen eşik değerler farklı laboratuvarlarda farklı şekillerde bulunabilmektedir. Bunun sebepleri arasında farklı hibridizasyon koşulları, hesaplama metodlarının ve ekip tecrübesinin farklı oluşu, kullanılan problemlerin sensitivite ve spesifite

değerlerindeki farklılık sıralanabilir. NeoGenomics Laboratuvarları'nın 157 nevüs ve 167 melanom kullanarak yaptığı çalışmada sınır değerleri ise: 1) Sayılan hücrelerin %16'sından fazlasının RREB-1 sinyallerinin hücrelerde 2'den fazla olması, 2) Sayılan hücrelerin %53'ünden fazlasının RREB-1/CEP 6 oranının 1'den büyük olması, 3) Sayılan hücrelerin %42'sinden fazlasının MYB/CEP 6 oranının 1'den küçük olması, 4) Sayılan hücrelerin %19'undan fazlasının CCND1 sinyallerinin 2'den fazla olması olarak belirlenmiştir. Bu sayede eşik değerlerinin sensitivitesi %84, spesifitesi %95 olarak belirlenmiştir (Tablo 6). Aynı vakalara UCSF kriterleri uygulanarak değerlendirildiğinde ise spesifite %98 olurken sensitivite değeri %64 e gerilemiştir (100).

Tablo 6: NeoGenomics kriterleri

KRİTERLER	SİNYALLER	EŞİK DEĞERLERİ (%)
6p25 (RREB-1) kazanımı	>2 RREB-1 (kırmızı)	>16
6p25 (RREB-1) kazanımı	RREB-1 (kırmızı) > CEP6 (aqua)	>53
6q23 (MYB) kaybı	MYB (gold) < CEP6 (aqua)	>42
11q13 (CCND1) kazanımı	>2 CCND1 (yeşil)	>19

Bununla birlikte Abbott Laboratuvarları'nda geliştirilen başka eşik değerler ise: 1) Nükleus başına düşen ortalama CCND1 sinyallerinin 2,5 ya da daha fazla olması, 2) Nükleus başına düşen MYB sinyallerinin 2,5 ya da daha fazla olması, 3) MYB/CEP6 sinyallerinin <1 olduğu hücrelerin %31'den fazla olması ve 4) >%63 hücrede RREB-1 sinyal anomalisi saptanması olarak sıralanabilir (Tablo 7). Bu değerler ile sensitivite %82,2, spesifite %94 olarak değerlendirilmiştir (101).

Tablo 7: Abbott kriterleri

KRİTERLER	EŞİK DEĞERLERİ
CCND1 sinyali/nükleus	$\geq 2,5$
MYB sinyali/nükleus	$\geq 2,5$
MYB/CEP6 sinyalleri <1/nükleus	>%31
RREB-1 sinyal anomalisi	>%63

Kutzner ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yayınlanan çalışmada ise Abbott ve UCSF (Gerami) kriterlerinin kombine edilmesi sonucunda sensitivite ve spesifitenin daha yüksek olacağı savunulmuştur. Önerilen bu yeni kombine kriterler: 1)RREB-1 gen kazanımının (hücre başına >2 sinyal) %29'dan fazla olması, 2)RREB-1/CEP 6 oranında artışın (RREB-1 sinyallerinin hücre başına CEP 6 sinyallerinden fazla olması) %55'den fazla olması, 3)Anormal RREB-1 sinyalinin (her nükleusta <2 ya da>2 RREB-1 sinyali varlığı) %63 ve üzerinde olması, 4)Nükleus başına düşen ortalama MYB sinyali 2,5 ve üzeri olması, 5)MYB/CEP 6 relatif kaybının (hücre başına düşen MYB sinyalinin CEP 6 sinyaline oranla daha az oluşu) %31 ve üzerinde olması (Abbott), %40'tan fazla olması (UCSF), 6)Nükleus başına düşen ortalama CCND1 sinyali 2,5 ve üzeri olması 7)CCND1 gen kazanımının (hücre başına >2 sinyal) %38'in üzerinde olması olarak belirtilmiştir (Tablo 8). Bu kriterler kullanılarak yapılan çalışmada 163 adet melanom ele alınmış, bu vakaların %82,2 sinde kombine kriterler kullanılarak pozitiflik elde edilmiştir. Bu oran Abbott kriterleri kullanıldığında %69,3, UCSF kriterleri kullanıldığında %72,4 olarak belirlenmiştir (101).

Tablo 8:Kombine kriterler

KRİTERLER	EŞİK DEĞERLERİ
RREB-1sinyali/nükleus >2	>%29
RREB-1/CEP6 sinyali >1/nükleus	>%55
Anormal RREB-1 sinyali	≥%63
MYB sinyali/nükleus	≥2,5
MYB/CEP6 sinyali <1/nükleus	≥%31(Abbott) >%40 (UCSF)
CCND1 sinyali/nükleus	≥2,5
CCND1 sinyali/nükleus >2	>%38

2011 yılından beri ise klasik melanom problemleri ile oluşturulan melanom panelinin bazı durumlarda yetersiz kaldığından bahsedilmektedir. Bu problemlerin yetersiz kaldığı iki önemli grup spitzoid lezyonlar ve nevoid melanomların ayırımı olarak gündeme gelmektedir. Belirtilen 3 majör problem: 1)Morfolojik olarak malign ve benign ayırımının zor yapıldığı melanositik lezyonlarda düşük sensitivite ve spesifite oranlarına sahip olması, 2)Spitzoid neoplazilerde relatif olarak düşük sensitivite ve spesifite değerlerine sahip olması 3) Spitz nevüs ve atipik epitelyal komponente sahip nevüslerde (NAECC) tetraploidiye bağlı yanlış pozitifliklerin bulunmasıdır (102,98,103).

Klasik melanom FISH panelinde en sık görülen kromozomal değişiklikler olan RREB-1 ve CCND1 kazanımları, bir hücrede 2'den fazla sinyal ile karakterizedir. Bu değişiklikler triploidi ya da tetraploidi gösteren hücrelerde de görülebilmektedir. Triploidi ya da tetraploidi gösteren hücrelerde yanlış pozitiflik oranı oldukça yüksek olarak izlenmektedir. Bu durum epiteloid hücreli melanositik lezyonlar ve spitzoid morfolojili lezyonlarda sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Klasik melanom FISH problemleri kullanılarak yapılan analizlerde, bu morfolojiye sahip olan vakalar yanlış pozitif olarak değerlendirilebilmektedir (104).

Klasik melanom problemleri kullanılarak yapılan FISH analizlerinde ortaya çıkan diğer problemler ise, prob karışımının yalnızca 2 kromozomu incelemesi, dolayısıyla melanogenezdeki tüm kromozomal değişiklikleri monitörize etmede yetersiz kalması (105), melanomların bir değil bir çok farklı genetik değişiklikleri içeren kompleks tümörler olması, spitzoid lezyonlarda kinaz füzyonlarının izlenmesi (75), Koreli hastalarda görülen akrall melanomlarda %40'a varan KIT amplifikasyonu (106) ve var olan prob karışımının CDKN2A içermiyor olması (spitzoid lezyonlarda ve %40'a varan familyal melanomlarda görülen genetik değişiklik) olarak sıralanabilir (107).

Ayrıca son yıllarda FISH kullanımının amacının diagnostik olmaktan çok prognostik oluşu yeni problemlerin dizayn edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır (108). Bu nedenle Gerami ve ark.'nın yaptığı çalışmada yeni bir prob karışımı ortaya konulmuştur. 8 prob, 2 prob grubu halinde tasarlanmış ve 9p21, Cep 9, 1q25, Cep17, 8q24, 7q34, Cep 10 ve 20q13 lokuslarını içermektedir. Bu prob karışımları ve klasik melanom prob paneli ile yapılan 31 melanom ve 34 nevüs içeren çalışmada 9p21 (CDKN2A), Cep9, 20q13 ve 8q24 içeren prob dizaynının en iyi performans gösteren grup olduğu kaydedilmiştir. Eşik değerleri her probun kendi dizaynına göre belirlenmiştir. 49 melanom ve 51 nevüs kullanılan 2. çalışmada ise 4 prob parametrelerinin 4'erli kombinasyonları uygulanmış ve uygun kombinasyon olarak 9p21 (CDKN2A), 6p25 (RREB-1), 11q13 (CCND1) ve 8q24 (MYC) içeren prob paneli belirlenmiştir. Bu prob kombinasyonu ile yapılan 3. çalışmada tüm problemler için sınır değeri %29 olarak belirlenmiştir. (9p21 homozigot delesyonu, 6p25 kazanımı, 11q13 kazanımı, 8q24 kazanımı.) Son olarak 51 melanom ve 51 nevüs ile yapılan validasyon çalışmasında klasik melanom problemleri uygulandığında sensitivite değeri %75, spesifite değeri %96 olarak saptanırken, 9p21, 6p25, 11q13 ve 8q24 içeren prob karışımı ile yapılan uygulamada sensitivite %94, spesifite %98 olarak belirlenmiştir (109,110).

Sonuç olarak tavsiye edilen, spitzoid morfolojide lezyonlarda prognostik açıdan yapılan FISH çalışmasında klasik melanom problemlerinin yanı sıra 9p21 içeren ikinci bir prob karışımının da uygulanması, nevoid morfoloji gösteren melanositik lezyonlarda ise klasik melanom problemlerinin yanısıra 8q24 içeren prob karışımının da uygulanması yönünde olmaktadır. 9p21 (CDKN2A) nin homozigot kaybı ve 8q24 (MYC) nin gen kazanımı ise malignite yönünde belirteçler olarak bildirilmektedir (111).

3.8.SPİTZOİD LEZYONLARDA FISH KULLANIMI:

Spitzoid morfolojideki lezyonlar konvansiyonel ışık mikroskopuyla tanısı zor olabilen lezyonlardır. Özellikle intermediate gradeli melanositik lezyonlar olan AST'lerin histopatolojik olarak ayırımı oldukça zordur. Bu lezyonlar spitzoid sitoloji, epidermal hiperplazi, Kamino cisimcikleri gibi Spitz nevüslere ait özelliklere sahip oldukları gibi, mitotik figürler ve matürasyon kaybı gibi melanomlara ait özellikler de gösterebilirler (112). Spitz nevüsler, AST'ler ve SMM'lar çok sık görülen lezyonlar olmamakla birlikte, histopatolojik olarak tanısı zor olan lezyonlar olduğundan, tanı yanılığısı, benign lezyonlarda agresif tedavi verilmesine ya da malign lezyonlarda tedavi yetersizliğine sebep olabilir (113). Van Dijk ve ark.'nın 2008 yılında yaptığı çalışmaya göre çocuk ve genç erişkinlerde görülen Spitz nevüslerin %40'ı melanom olarak yanlış tanı almıştır (114).

2008 yılında Avusturya'nın Graz kentinde Uluslararası Dermatopatoloji Topluluğu'nun Graz Tıp Üniversitesi'ne ait 57 vaka kullanarak yaptıkları çalışmada, kalınlığı 1 mm'nin üstünde ve çoğunlukla intradermal tümörlerin melanom ile çok sık karışabildiği gösterilmiştir. Özellikle spitzoid lezyonlar, sellüler/epiteloid mavi nevüsler ve derin penetran nevüsler, melanom ile sıkça karışabilen lezyonlar olarak belirlenmiştir. 57 vakalık bu seride spitzoid lezyonların 17'si iyi prognozlu, 26'sı kötü prognozlu, 14'ü ise "borderline" prognoza sahip olarak tanımlanmış ve malignite potansiyeli belirsiz melanositik lezyonlar (MELTUMP) kategorisinde değerlendirilmiştir. Işık mikroskopik olarak mitoz varlığı, lezyonun bazalinde mitozların bulunması ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kötü prognozla ilişkilendirilmekle birlikte biyolojik davranışın belirlenmesinde daha ileri incelemelerin yapılması gerektiğine değinilmiştir (115).

Spitzoid lezyonlarda ışık mikroskopik olarak yapılan değerlendirmede malignite lehine bulgular bulunmasına rağmen lezyonların bölgesel lenf nodları dışında uzak metastaz yapmasının nadir oluşu, lezyon prognozu hakkında daha fazla bilgi edinilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Çocukluk çağının SMM'ları bu konuda önemli bir örnek teşkil etmektedir.

Lezyonların doğru tedavi alabilmesi için risk değerlendirmesinin doğru bir şekilde yapılabilmesi önem taşımaktadır. Northwestern Üniversitesi Lurie Kanseri Araştırma Merkezi'ne ait 75 adet spitzoid lezyon kullanılarak yapılan çalışmada, 11 vakada bölgesel lenf nodu dışında uzak metastaz saptanmış, bu vakalardan 3'ünde hastalığa bağlı ölüm görülmüştür. 75 vakanın 15'inde klasik melanom problemleri ile pozitiflik izlenmiştir. Metastatik olan 11 vaka FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca 11 vakanın tamamı 9p21 probu ile de anlamlı homozigot delesyon göstermektedir. Bunun yanı sıra klasik melanom ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışmada negatif olarak değerlendirilen hiçbir vakada kötü prognoz görülmemiştir. Bu nedenle kötü prognozu belirlemede klasik melanom ve 9p21 problemleri ile yapılan çalışmaların önem taşıdığı vurgulanmıştır (3).

4 prob kullanılarak uygulanan, kromozom 6 ve 11'i hedef alan FISH yöntemi biyolojik olarak davranışı belirsiz lezyonlarda, malign melanomlarda ve nevüslerde ayırım yapma açısından %84 sensitivite ve %95 spesifite göstermektedir. Aynı prob dizimi ile %50'si spitzoid morfolojide olan 90 vakaya uygulanan FISH yöntemiyle sensitivite %43'e, spesifite ise %80'e düşmektedir (116). 43 vakalık spitzoid melanom içeren bir başka çalışmada klasik 4 prob içeren FISH yöntemiyle sensitivite %70 iken, kromozom 9 içeren problemler eklendiğinde sensitivitenin %85'e çıktığı saptanmıştır (110).

CDKN2A geni daha önce de bahsedildiği gibi 2 önemli tümör süpresör gen proteinini kodlayan bir genidir. Bu proteinlerden ilki olan p16^{INK4a} siklin bağımlı kinaz inhibitörü olup Retinoblastoma yolağını aktive ederek CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. Böylece uygun olmayan hücreler proliferasyonları durdurur. İkinci protein olan p14^{ARF} ise bu genin alternatif yolla sentezlenen proteini olup p53 aktivasyonundan sorumludur. CDKN2A genindeki germline mutasyonlar familial melanomların yaklaşık %40'ını oluştururlar. Ayrıca displastik ve Spitz nevüslerde de 9p21 geninde FISH ile saptanan değişiklikler olduğu görülmüştür. Spitz nevüslerde bu görülen değişikliğin büyük bir kısmını 9p21 lokusunun heterozigot kaybı oluşturur (117,118).

9p21 lokusundaki homozigot kaybın melanom ve nevüslerde ayırım için kullanılacak spesifik bir marker olduğu bilinmekle birlikte, spitzoid melanomlarda homozigot kayıp fazla olarak saptanmıştır. Bu nedenle Spitz nevüs-SMM ayırımı sırasında klasik 4 renkli melanom problemleri ile birlikte 9p21 ve CEP9 da içeren 2 renkli problemin kullanılması sensitiviteyi arttırmaktadır (110).

Nortwestern Üniversitesi Lurie Cancer Center'da yapılan araştırmaya göre 9p21 lokusunu hedef alan FISH çalışmasında 85 melanom ve 58 nevüs kullanılmış, her vaka için 30 adet tümöral hücre sayılarak değerlendirilmeler yapılmıştır. Bu değerlendirmeler sırasında tanılar bilinmemektedir. Melanom ve nevüs gruplarında aralık, ortalama değerler ve standart sapmalar hesaplanmış ve eşik değer olarak homozigot delesyon gösteren hücrelerin %29'dan fazla olmasının nevüs ve melanom ayırımında kullanılabileceği belirtilmiştir (119).

2009 yılında Gerami ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre spitzoid morfolojideki lezyonlarda 4 probu FISH çalışmasında elde edilen sensitivite değeri %55 iken, bu değer konvansiyonel melanomda %85 olarak hesaplanmıştır (97). Ayrıca 2012 yılında Gammon ve ark.'nın yaptığı çalışmada 9p21 lokusunu içeren probun da eklenmesi ile spitzoid melanomların tespiti açısından sensitivite %85'e çıkmıştır (110). CDKN2A genini barındıran 9p21 lokusunda sentezlenen birincil protein p16 olup, Spitz nevüslerde yaygın ve kuvvetli ekspresyon gösterir. İmmünohistokimyasal yöntemle bu yaygınlık ve boyanma şiddeti AST'lerde değişkenlik göstermekte iken, SMM'larda ise oldukça azalmakta ya da tamamen kaybolmaktadır (120).

Homozigot 9p21 delesyonu SMM'larda agresif gidişi gösteren bir belirteç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu delesyonu göstermeyen SMM'lar özel bir kategori olup, konvansiyonel melanomlara göre çok iyi prognozludur. Ancak 9p21 delesyonu gösteren SMM'larda prognoz daha kötü olmaktadır. Buna karşın 9p21 lokusunda görülen heterozigot delesyonlar ile prognoz arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Spitz nevüslerde de 9p geninde heterozigozite kaybı sık rastlanan bir bulgu olduğundan bu sonuç çok da şaşırtıcı olmamıştır (121,117).

Homozigot delesyonu değerlendirmek bazı sınırlamalar nedeniyle zorluk yaratabilmektedir. Bu zorluklar genellikle dokunun kesitlemesinden kaynaklı sorunlar olup DNA içeriğinin bir kısmının kaybına varan sonuçlar doğurabilir. Bu durum "Trunkasyon" olarak adlandırılır. Trunkasyon sebebiyle heterozigot delesyon görülen ya da normal diploid olan hücrelerde homozigot kayıp var gibi görülebilir. Ancak trunkasyon gösteren vakalarda yapılan çalışmalarda, bu nedenle homozigot kayıp görülen hücre sayısının, ortalama 30 hücrede 6 hücre olduğu görülmüştür. Bu nedenle eşik değer olan %29 homozigot delesyonu geçmediği düşünülmektedir (110).

9p21 lokusunun yanı sıra klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmalarda da çeşitli prognostik parametreler elde edilmiştir. 6p25 ve 11q13 lokuslarındaki gen kazanımları

sentinel lenf nodu dışında daha uzak metastazların olabileceğini göstermekle birlikte 9p21 homozigot delesyonu gösteren vakalara göre daha az agresif davranışa işaret ederler (122). Bu konu ile ilgili Gerami ve ark. 6p25 kazanımı ya da 11q13 kazanımı ile giden SMM'ların, 9p21 homozigot kaybı ile giden SMM'lardan farklı olarak ele alınması gerektiğini savunmuşlardır. FISH pozitif olarak değerlendirilen vakalarda ise en az riske sahip olan grup 6q23 (MYB) gen delesyonu ile giden lezyonlardır. 6q23 gen delesyonu SMM'larda en sık görülen kromozomal değişiklik olup (%72), bu delesyona sahip tümörlerin agresif davranış göstermediği ve nadiren sentinel lenf nodu metastazı yaptığı saptanmıştır (3).

Polipoidi (triploidi ve tetraploidi) Spitz nevüsler, AST'ler ve SMM'larda sık görülen bir bulgudur. Bu lezyonlarda 6. ve 11. kromozomlarda yanlış pozitif olarak değerlendirilmeye yol açacak sinyal artışlarına sebep olabilir. Bu nedenle 9p21 ve CEP9 içeren ikili probun da kullanılmasıyla yanlış pozitiflik oranı oldukça azaltılabilmektedir (108).



4.MATERYAL VE METOD

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Özel ETA Patoloji ve Sitoloji Laboratuvarı ve Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış olan, retrospektif olarak taranmış ve parafin bloklarında yeterli doku bulunan 39 adet AST ve 10 adet SMM alınmıştır. Ayrıca negatif kontrol olması açısından 2 adet Spitz Nevüs (SN) ve pozitif kontrol olması açısından 2 adet nodüler malign melanom dahil edilmiştir.

Olgular, yaş, cinsiyet, lokalizasyon, lezyon süresi ve çap gibi klinik bulgular açısından değerlendirilmiştir. Tanı sonrası sentinel lenf nodu biyopsisi, yapılmış ise bölgesel lenf nodu disseksiyonu sonuçları incelenmiştir. Prognozu değerlendirirken hastalar nüks, lenf nodu tutulumu, metastaz durumu açısından araştırılmıştır. Hastaların takip süresi, genel durumu gibi klinik bulguları sorgulanmıştır. Primer tümörde simetri, matürasyon varlığı, subkutan yağ dokusu tutulumu, ülser/erozyon varlığı, epidermal “*consumption*” (epidermisin tümör basısıyla incelmesi) varlığı, intraepidermal pagetoid yayılım, Kamino cisimcikleri varlığı, sitolojik atipi ve pleomorfizm, ekspansif nodül varlığı, mitoz (sayı ve yerleşim yeri) ve atipik mitoz varlığı, lenfositik infiltrasyon gibi histopatolojik özellikler incelenmiştir. Her vakanın H&E boyalı kesitleri üç araştırmacı tarafından yeniden değerlendirilmiştir.

Yeterli miktarda tümör hücresi (en az 60 tümör hücresi) bulunan bloklara ait kesitlerde tümör hücre yoğunluğunun en fazla ve pigment miktarının en az olduğu alanlar işaretlenmiştir.

Uygulama için bloklardan 3-4 mikron kalınlığında kesitler alınmış ve FISH ticari problemleri (9p21 için;9p21 Vysis LSI p16 Spectrum Orange, Abbott Molecular ve CEP9 Vysis CEP9 Spectrum Green, Abbott Molecular, klasik melanom FISH paneli için;CCND1 (11q13) Spectrum Green, MYB (6q23) Spectrum Gold, RREB-1 (6p25) Spectrum Red Empire Genomics, Buffalo NY ve D6Z1(CEP6) Spectrum Aqua Abbott Molecular , Des Plains IL) kullanılarak RREB-1 gen amplifikasyonu, CCND1 gen amplifikasyonu, MYB gen delesyonu ve 9p21 homozigot-heterozigot delesyonları araştırılmıştır.

FISH inceleme için 3-4 mikron kalınlığında alınan kesitler 56⁰C’de 1 gece boyunca etüvde bekletilmiş, ardından deparafinizasyon ve hibridizasyon aşamalarına geçilmiştir.

Deparafinizasyon basamakları:

- Ksilende 3 kere 10 dakika, absölu alkolde 2 kere 5 dakika, deparafinizasyon ön yıkama solüsyonunda 80⁰C’de 30 dakika bekletilmiştir. Bu işlem esnasında Coplin şale

kullanılmıştır. Toz halinde bulunan deparafinizasyon ön yıkama solüsyonu, ilk kullanımda 240 ml distile suda çözülerek hazırlanmış, daha sonraki kullanımlar için oda sıcaklığında saklanmıştır.

Hibridizasyon öncesi basamaklar:

- Distile suda 10-15 saniye çalkalanmıştır.
- Önceden hazırlanmış ve 37⁰C'de bekletilen 15 cc hacmindeki distile suya, 150 µl 1M HCl ve 150 µl distile su ile hazırlanmış enzim reaktifi eklenmiştir. Enzim reaktifi toz halinde olup, kullanımın hemen öncesinde hazırlanmıştır. Kesitler bu solüsyonda 15 dakika bekletilmiştir.
- Distile suda 10-15 saniye çalkalanmıştır.
- 2XSSC (saline sodium citrate)'de 2 kez 3'er dakika bekletilmiştir.
- Sırasıyla %70, %85, ve %100'lük alkolde 3'er dakika bekletilmiştir.
- Kesitler havada kurutulmuştur. Bu sırada %70, %85 ve %100'lük alkoller -20⁰C'ye alınmıştır.
- Lamlar 73⁰C'de %70 formamid/2XSSC'de 5 dakika tutulmuştur.
- 3'er dakika süre ile -20⁰C'deki %70, %85 ve %100'lük alkol serisinden geçirilerek kurumaya bırakılmıştır.
- Lamlar %100'lük alkolden alınıp yavaşça kurulanmıştır.
- Bu basamaktan sonraki tüm işlemler karanlık ortamda yapılmıştır.

Prob denatürasyon basamakları:

- Kullanılacak miktardaki proplar mikro santrifüj tüplerinde oda ısısına getirilmiştir.
- 1-3 saniyelik santrifüjden sonra vortekslenip tekrar santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde 73⁰C suda yüzdürülmüştür.
- Plastik çimento uygulanmıştır.
- 37⁰C'de nemli ortamda 12-16 saat boyunca bırakılmıştır.

Hibridizasyon sonrası basamaklar:

- 73⁰C'de ve oda ısısında 2 şalede 50 ml 2XSSC/%0,3NP40 hazırlanmıştır.

- Plastik çimento ve lamel el ile ayrılmış, ayırmada güçlük yaşanan kesitler oda ısısındaki 2XSSC/%0,3NP40 solüsyonunda bekletilmiştir.
- 73⁰C'deki 2XSSC/%0,3NP40 solüsyonunda kesitler 1-3 saniye çalkalanarak 2 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Oda ısısındaki 2XSSC/%0,3NP40'ta çalkalanmıştır.
- Açıkta ve karanlıkta kurutulduktan sonra DAPI 10-16 µl uygulanmıştır.
- Değerlendirme öncesi 20-30 dakika -20⁰C'de bekletilmiştir.

FISH uygulaması yapılan lamlar, bilgisayar bağlantılı floresans mikroskopunda (OlympusBX51; Olympus Optical, Japonya) değerlendirilmiştir. Bilgisayar ortamındaki görüntüleme dijital kamera (XLMM, Dage-MTI IN, ABD) ve uyumlu yazılım (Pannoramic Viewer, 3DHISTECH Ltd., Macaristan) kullanılmıştır.

Klasik melanom FISH paneli değerlendirilmesi için bilgisayar üzerine aktarılmış görüntülerde tümör hücre yoğunluğunun en yüksek olduğu, üst üste gelmeyen tümör hücre çekirdeklerinin bulunduğu bölgeler seçilmiş ve en az 60 tane tümör hücre çekirdeğindeki sinyaller sayılmıştır. Sayımlar orijinal tanı bilinmeden, kör olarak gerçekleştirilmiştir.

9p21 gen profili değerlendirilmesi için bilgisayar üzerine aktarılmış görüntülerde tümör hücre yoğunluğunun en yüksek olduğu, üst üste gelmeyen tümör hücre çekirdeklerinin bulunduğu bölgeler seçilmiş ve en az 30 tane tümör hücre çekirdeğindeki sinyaller sayılmıştır. Sayımlar orijinal tanı bilinmeden, kör olarak gerçekleştirilmiştir.

Klasik melanom FISH paneli için 2 adet kırmızı, 2 adet yeşil, 2 adet aqua ve 2 adet gold sinyalin olduğu hücreler normal FISH profili olarak kabul edilmiştir. Bu değerlendirmede aqua prob ile görünür hale getirilen CEP6, RREB-1 (6p25) ve MYB (6q23) genlerinin üzerinde bulunduğu 6. kromozomun sentromerik bölgesi olup, kesitleme sırasında oluşabilecek allel kayıplarının anlaşılabilmesi ve her iki allelin de mevcut kesitte bulunduğunu gösterecek bir kontrol mekanizması olması açısından kullanılmaktadır. Kontrol mekanizması özellikle gen delesyonunun anlamlı olduğu MYB geni açısından önem teşkil etmektedir. Bu sayede artifisyel kayıplar nedeni ile yanlış pozitifliklerin önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Aynı panelde yer alan CCND1 (11q13) için herhangi bir kontrol mekanizması oluşturulmamıştır. Bunun nedeni ise CCND1 geninin amplifikasyonunun önemli olmasıdır. Kırmızı sinyallerin 2'den fazla, yeşil sinyallerin 2'den fazla ve sarı sinyallerin 2'den az ya da aqua sinyallerine oranla az olduğu hücreler anormal FISH profili

gösteren hücreler olarak kabul edilmiştir. İnceleme sırasında aqua sinyallerin 1 olduğu ya da hiç olmadığı hücreler değerlendirme dışı bırakılmıştır. 2 sinyal arasındaki mesafenin 1 sinyalin sığabileceği boyuttan daha küçük olduğu durumlarda ise bu sinyaller tek sinyal olarak kabul edilmiştir. Sinyallerin tek bir nokta oluşturmadığı, dağıldığı ya da diğer sinyallere göre oldukça silik olduğu durumlarda filtreler değiştirilerek sinyallerin gerçek sinyal olup olmadığı değerlendirilmiş, gerçek sinyal olmadığı düşünülen ışımalar kaydedilmemiştir. Değerlendirme için uygun kabul edilen hücrelerde en az 2 adet aqua sinyal bulunmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca DAPI filtre ile hücre çekirdeğinin net olarak seçilebilmesine, en az 60 adet değerlendirmeye uygun tümör hücre çekirdeğinin olmasına ve artefaktın en az olduğu bölgelerin kullanılmasına özen gösterilmiştir. Değerlendirme sırasında klasik melanom FISH problemleri için pozitivite kriterleri; RREB-1 gen sinyallerinin (kırmızı) 2'den fazla olduğu hücrelerin %29'dan fazla olması, RREB-1/CEP6 (aqua) sinyallerinin RREB-1 geni lehine artış gösterdiği hücrelerin %55'ten fazla olması, MYB (gold)/CEP 6 sinyallerinin MYB için azalma gösterdiği hücrelerin %40'tan fazla olması ve CCND1 gen sinyallerinin (yeşil) 2'den fazla olduğu hücrelerin %38'den fazla olması koşullarından 1 ya da daha fazlasının sağlanması olarak kabul edilmiştir. Değerlendirme için kullanılan kriterler daha önce bahsedilen UCSF kriterleridir (97).

9p21 gen profili değerlendirilirken 2 adet yeşil ve 2 adet turuncu sinyal alınan hücreler normal FISH profiline sahip olarak kabul edilmiştir. Bu değerlendirmede yeşil prob ile görünür hale getirilen CEP9, 9p21 geninin üzerinde bulunduğu 9. kromozomun sentromerik bölgesi olup, kesitleme sırasında oluşabilecek allel kayıplarının anlaşılabilmesi ve her iki allelin de mevcut kesitte bulunduğunu gösterecek bir kontrol mekanizması olması açısından kullanılmaktadır. Turuncu sinyallerin sayısının yeşil sinyallere oranla daha az ancak var olduğu durumlarda heterozigot delesyon, turuncu sinyallerin hiç olmadığı ancak 2 veya daha fazla yeşil sinyalin bulunduğu durumlar homozigot delesyon olarak kaydedilmiştir. Heterozigot kayıplar özellikle AST'lerde gözlenen bir bulgu olup, heterozigot kayıp olan ancak kötü gidişli vakalarda kayıp gerçekleşmeyen allelin inaktivasyonundan ya da kromozomal yeniden düzenlenme sonucu işlev göremediğinden söz edilebilir. Bunun yanı sıra heterozigot kayıplar SN ve SMM'lerde de görülebilmektedir. Homozigot kayıp anlamlı bir bulgu olup kötü prognoza işaret etmektedir. Seyrek hücrede homozigot kayıp SN'ler gibi benign tümörlerde de görülebilmektedir. 2'den fazla ancak eşit miktarda yeşil ve turuncu sinyal içeren hücreler de normal FISH profiline sahip ancak poliploidi gösteren hücreler olarak değerlendirilmiştir. Yeşil sinyallerin 3 olduğu hücreler triploidi, 4 olduğu hücreler

tetraploidi olarak adlandırılmıştır. 2 sinyal arasındaki mesafenin 1 sinyalin sığabileceği boyuttan daha küçük olduğu durumlarda ise bu sinyaller tek sinyal olarak kabul edilmiştir. Sinyallerin tek bir nokta oluşturmadığı, dağıldığı ya da diğer sinyallere göre oldukça silik olduğu durumlarda filtreler değiştirilerek sinyallerin gerçek sinyal olup olmadığı değerlendirilmiş, gerçek sinyal olmadığı düşünülen ışımalar kaydedilmemiştir. %29'dan daha yüksek oranlarda tespit edilen homozigot kayıplar FISH pozitif olarak kabul edilmiştir (107). Değerlendirme için uygun kabul edilen hücrelerde en az 2 adet yeşil sinyal bulunmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca DAPI filtre ile hücre çekirdeğinin net olarak seçilebilmesine, en az 30 adet değerlendirmeye uygun tümör hücre çekirdeğinin olmasına ve artefaktın en az olduğu bölgelerin kullanılmasına özen gösterilmiştir.

Değerlendirme sırasında klasik melanom FISH problemleri için raporlama sırasında görülen tüm normalden sapmalar, hücre sayısı ve yüzdeleri ile beraber belirtilmiştir. RREB-1, CCND1, MYB ve CEP6 sinyallerinin normal olduğu hücrelerin yüzdeleri hesaplanmıştır.

9p21 problemleri için raporlama sürecinde homozigot delesyon görülen hücrelerin yanı sıra, heterozigot delesyon gösteren hücre sayısı, normal FISH profili gösteren hücre sayısı ve bunların yüzdeleri de belirtilmiştir. Homozigot delesyon, heterozigot delesyon ve normal FISH profili gösteren hücrelerin triploidi ya da tetraploidi sayıları da kaydedilmiştir.

4.1. İSTATİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ:

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerinde sürekli değişkenler için ortalama değer, standart sapma, medyan, en az ve en fazla değerler; kesikli değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri hesaplanmıştır.

Başlangıç analizleri olarak normal dağılımın değerlendirilmesinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik verilerde bağımsız gruplarda student t testi, nonparametrik verilerde Mann Whitney U, Ki kare ve Fisher'in kesin testi kullanılmıştır. Testler arası uyumu değerlendirmek için Kappa testi uygulanmıştır. Kappa değerleri 0.00-0.20 düşük uyum, 0.21-0.40 düşük-orta derecede uyum, 0.41-0.60 orta derecede uyum, 0.61-0.80 iyi derecede uyum, 0.81-1.00 mükemmel uyum olarak sınıflandırılmıştır (123).

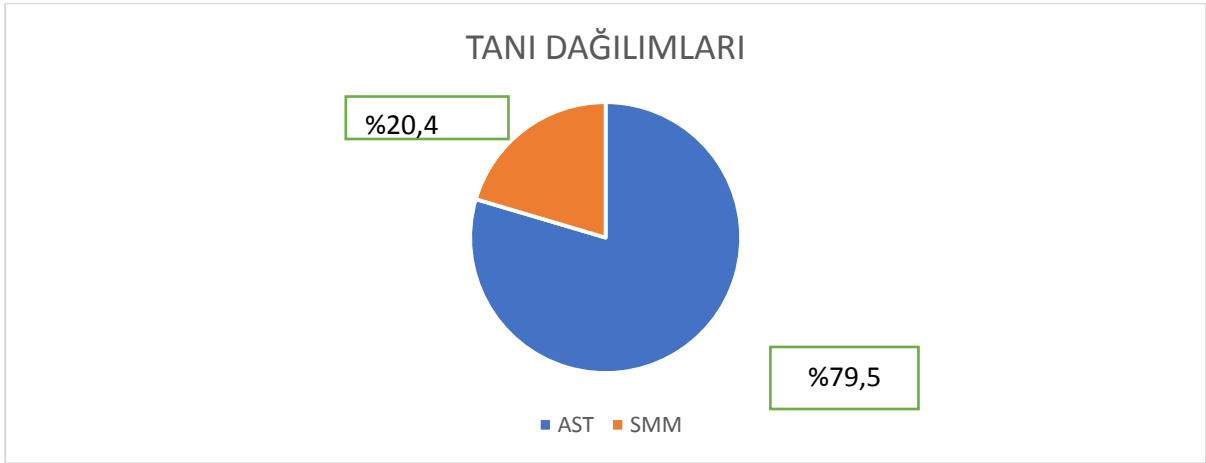
Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilerek $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak tanımlanmıştır.

5.BULGULAR

5.1.VAKALARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ:

Çalışma kapsamında 39'u AST, 10'u SMM olmak üzere 49 vaka bulunmaktadır. Ayrıca tekniğin kontrolü amacıyla, 2 adet nodüler malign melanom (pozitif kontrol) ve 2 adet Spitz nevüs (negatif kontrol) değerlendirmeye alınmıştır. (Grafik 1)

Grafik 1: Çalışmaya dahil edilen vakaların tanı dağılımları



Tanı gruplarına göre karşılaştırmalı olarak hastaların yaş, cinsiyet, süre, lokalizasyon ve çapları Tablo 9'da verilmiştir. AST grubunda hastaların tanı anındaki yaşları 3 ila 57 arasında değişmekte olup, ortalama 27,3, medyan 25±14,55 yaşdır. SMM'larda ise tanı anında vaka yaşları 6 ila 56 arasında değişmekte olup, ortalama 32,4, medyan 35±15,53'tür. AST'lerde tanı anında 18 yaş altı 13 (%33,3), prepubertal (<12 yaş) 7 (%17,9) vaka bulunmaktadır. SMM'lerde ise tanı anında 18 yaş altı 2 (%20), prepubertal (<12 yaş) 1 (%10) vaka izlenmiştir. AST vakalarının 30'u (%76,9) kadın, 9'u (%23,07) erkektir (Kadın/Erkek:3,33). SMM vakalarının 6'sı (%60) kadın, 4'ü (%40) erkektir (Kadın/Erkek:1,5)

Lezyonların lokalizasyonu göz önüne alındığında AST vakalarının 5'i (%12,8) baş-boyun, 7'si (%17,9) gövde, 27'si (%69,2) ekstremitelerde yerleşimlidir. SMM vakalarının ise 2'si (%20) baş boyun, 2'si (%20) gövde, 6'sı (%60) ekstremitelerde lokalizasyonludur. Tanı anında lezyonların süresi bilinen vakalarda AST grubunda 0,5 ila 180 ay arasında değişmekte olup, ortalama 18,4, medyan 6±38,3 aydır. 12 vakada lezyon süresi bilinmemektedir. SMM grubunda ise lezyon süresi 1 ila 24 ay arasında değişmekte olup ortalama 11,2, medyan 12±8,46 aydır. 5 vakada lezyon süresi bilinmemektedir. Tanı anında lezyon çapları AST'lerde 2 ila 11mm arasında değişmekte olup, ortalama 6,03, medyan 6±2,23mm'dir. SMM'larda

lezyon çapları 3 ila 15mm arasında değişmekte olup, ortalama 6,4, medyan 7±3,47mm'dir (Tablo 9).

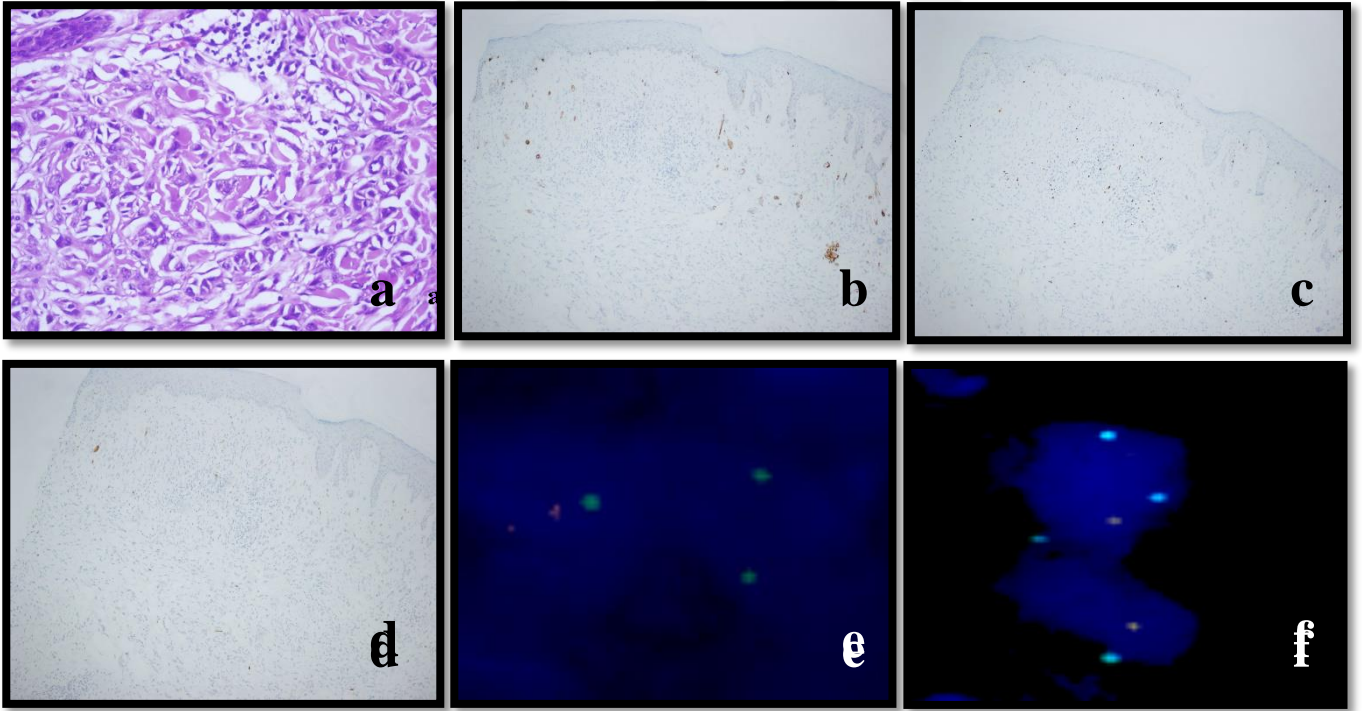
Tablo 9: Vakaların tanı gruplarına göre yaş, cinsiyet, süre, lokalizasyon ve çap dağılımları

	SMM n=10	AST n=39
YAŞ		
- ORTALAMA	32,4	27,3
- MEDYAN	35	25
- ARALIK	6-56	3-57
- 18 YAŞ ALTI	2 (%20)	13 (%33,3)
- PREPUBERTAL (<12 YAŞ)	1 (%10)	7 (%17,9)
CİNSİYET		
- KADIN	6(%60)	30(%76,9)
- ERKEK	4(%40)	9(%23,07)
LOKALİZASYON		
- BAŞ-BOYUN	2(%20)	5(%12,8)
- GÖVDE	2(%20)	7(%17,9)
- EKSTREMİTE	6(%60)	27(%69,2)
SÜRE		
- ORTALAMA(AY)	11,2	18,4
- MEDYAN(AY)	12	6
- ARALIK(AY)	1-24	0,5-180
- BİLİNMEYEN	5	12
ÇAP		
- ORTALAMA (mm)	6,4	6,03
- MEDYAN (mm)	7	6
- ARALIK (mm)	3-15	2-11

Tanıdan sonra sentinel lenf nodu biyopsisi, bölgesel lenf nodu diseksiyonu, nüks, metastaz, klinik takip ve genel durum parametreleri SMM'lar ve AST'ler için belirlenmiş ve karşılaştırmalı olarak Tablo 10'da özetlenmiştir. Sentinel lenf nodu biyopsisi uygulanan vaka sayısı AST'ler için 4 (%10,2), SMM'ler için 4 (%40) olup tamamı negatif olarak

raporlanmıştır. AST vakalarının 17'sine (%43,5), SMM vakalarının 2'sine (%20) ise sentinel lenf nodu biyopsisi yapılmadığı bilinmektedir. Bölgesel lenf nodu disseksiyonu uygulanan AST tanılı bir vaka mevcuttur (%2,56). Yapılan disseksiyonda izlenen 13 adet lenf nodundan birinde metastaz saptanmıştır. Metastaz saptanan bu vaka 41 yaşında kadın hasta olup, tanıdan sonra SLNB yapılmamış, direkt disseksiyona geçilmiştir. Bu bilgiler dışında klinik takip verilerine ulaşılamamış, ancak hastanın sağ olduğu öğrenilmiştir. Yapılan histopatolojik incelemede AST olarak tanı konulsa da ön planda SMM lehine düşünülmüştür (Resim 10). AST grubunda 20 (%51,2), SMM grubunda 5 (%50) vakada ise bölgesel lenf nodu disseksiyonu uygulanmamıştır.

Resim 10: Bölgesel lenf nodu disseksiyonu uygulanan vakanın HE, İHK ve FISH bulguları a)HEx400, b)HMB-45x100 (Tüm lezyonda ekspresyon kaybı), c)Ki-67x100 (Düşük proliferatif aktivite), d)p16x100 (Difüz ekspresyon kaybı), e)9p21 FISH (9p21 homozigot delesyonu gösteren bir hücre, trunkasyon nedeniyle CEP9 sinyallerinden bir tanesini kaybetmiş bir hücre), f)Klasik melanom FISH (İzole MYB gen delesyonu)



Klinik takip durumu bilinen 20 (%51,2) AST, 5 (%50) SMM vakası mevcuttur. Bu vakaların hiç birinde nüks, metastaz bulgusu ya da hastalık nedeni ile ölüm görülmemiştir. Klinik takip süreleri AST grubunda 3 ila 84 ay arasında değişmekte olup, ortalama 40,81,

medyan 18±32,85 aydır. SMM grubunda ise 8 ila 84 ay arasında değişmekte olup, ortalama 40, medyan 24±35,44 aydır (Tablo 10).

Tablo 10: Vakaların tanı gruplarına göre SLNB, bölgesel lenf nodu disseksiyonu, nüks, metastaz, klinik takip süresi ve genel durum dağılımları

	SMM n=10	AST n=39
TANIDAN SONRA SLNB		
-VAR	4 (%40)	4 (%10,2)
• <i>NEGATİF</i>	4 (%40)	4 (%10,2)
• <i>POZİTİF</i>	-	-
-YOK	2 (%20)	17 (%43,5)
-BİLİNMIYOR	4 (%40)	18 (%46,15)
BÖLGESEL LENF NODU DİSSEKSİYONU		
-VAR	-	1 (%2,56) *
• <i>NEGATİF</i>	-	-
• <i>POZİTİF</i>	-	1 (%2,56)
-YOK	5 (%50)	20 (%51,2)
-BİLİNMIYOR	5 (%50)	18 (%46,15)
NÜKS		
-VAR	0 (%0)	0 (%0)
-YOK	5 (%50)	20 (%51,2)
-BİLİNMIYOR	5 (%50)	19 (%48,7)
UZAK METASTAZ		
-VAR	0 (%0)	0 (%0)
-YOK	5 (%50)	20 (%51,2)
-BİLİNMIYOR	5 (%50)	19 (%48,7)
KLİNİK TAKİP SÜRESİ		
-ORTALAMA(AY)	40	40,81
-MEDYAN(AY)	24	18
-ARALIK(AY)	8-84	3-84
-TAKİPSİZ	5	19
GENEL DURUM		
-SAĞ-HASTALIKSIZ	5 (%50)	20 (%51,2)
-BİLİNMIYOR	5 (%50)	19 (%48,7)

*Bu vakaya sadece bölgesel lenf nodu disseksiyonu yapılmış olup, SLNB uygulanmamıştır.

5.2.VAKALARIN HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ:

Çalışma kapsamında değerlendirilen 49 vaka, tanı konulan biyopsilerindeki morfolojik özellikler temel alınarak birçok histopatolojik parametre açısından karşılaştırılmıştır. Bu histopatolojik parametreler simetri, matürasyon, subkutan yağ dokusu tutulumu, ülser/erozyon varlığı, epiderminin tümör basısı ile incelenmesi (epidermal “*consumption*”), intraepidermal pagetoid yayılım, kamino cisimcikleri, sitolojik atipi/pleomorfizm, ekspansif nodül varlığı, mitoz (miktar, yerleşim yeri ve atipik mitoz varlığı) ve lenfositik infiltrasyon olarak sıralanabilir. Vakaların histopatolojik özellikleri tanı gruplarına göre karşılaştırmalı olarak Tablo 11’de özetlenmiştir.

5.2.1. Simetri:

Çalışmamıza dahil edilen AST vakalarının 27’si simetrik (%69,2), 12’si asimmetrik (%30,7) olarak izlenmiştir. SMM’larda ise vakaların 8’i (%80) asimmetrik, 2’si (%20) simetrikdir. Bu verilere göre SMM’larda büyük oranda asimetri görüldüğü tespit edilmiştir.

5.2.2. Matürasyon:

Çalışmaya dahil edilen AST vakalarının 24’ünde (%61,5) matürasyon izlenmiştir. 13 vakada (%33,3) matürasyon kaybı mevcuttur. 2 vakada (%2,56) matürasyon, lezyon taban cerrahi sınırdaki devam etmekte olduğundan değerlendirilememiştir. SMM’larda 3 vakada (%30) matürasyon izlenirken, 7 vakada (%70) matürasyon kaybı görülmüştür.

5.2.3. Subkutan yağ dokusu tutulumu:

AST vakalarının 1’inde (%2,56) subkutan yağ dokusu tutulumu izlenmiştir. 33 vakada (%84,6) subkutan yağ dokusu tutulumu görülmezken, 5 vakada (%12,8) mevcut kesitlerde subkutan yağ dokusu seçilemediği için değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır. SMM’larda ise hiç bir vakada subkutan yağ dokusu tutulumu izlenmemiştir (%100).

5.2.4. Ülser/Erozyon varlığı:

Çalışmamıza dahil edilen AST vakalarının 13’ünde (%33,3) ülser yada erozyon varlığı tespit edilmiş olup, 26 vakada (%66,6) ülser yada erozyon görülmemiştir. SMM vakalarında ise 1 vakada (%10) ülser görülmüş olup, 9 vakada (%90) görülmemiştir. Bu bulgular ışığında her iki tanı grubunda da ülser ya da erozyon görülme oranının düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.5. Epidermisin tümör basısı ile incelenmesi (Epidermal “consumption”):

AST vakalarının 21’inde (%53,8) epidermal “consumption” gözlenmiştir. 18 vakada (%46,15) ise izlenmemiştir. SMM’larda 7 vakada (%70) epidermal “consumption” gözlenirken, 3 vakada (%30) görülmemiştir. Tanı grupları epidermal “consumption” yönünden karşılaştırıldığında SMM’lerde epidermal “consumption” yüksek oranda mevcut olup, AST’lerde bulunan ve bulunmayan vaka sayıları birbirine yakındır.

5.2.6. İntraepidermal pagetoid yayılım:

İntraepidermal pagetoid yayılım lezyonun orta ya da periferinde olmasına göre farklı değerlendirilen bir parametredir. Lezyonun periferinde pagetoid yayılım gösteren AST vaka sayısı 10 (%25,6) olup, lezyonun orta kısımlarında pagetoid yayılım gösteren vaka sayısı 12’dir (%30,7). 17 vakada (%43,5) pagetoid yayılım izlenmemiştir. SMM vakalarında ise lezyonun orta kısımlarında pagetoid yayılım gösteren 2 vaka (%20), periferinde pagetoid yayılım gösteren 8 vaka (%80) bulunmaktadır. Periferde pagetoid yayılım SMM grubunda yüksek oranda görülmüş olup, AST’lerde bu oran daha düşüktür.

5.2.7. Kamino cisimcikleri:

Kamino cisimcikleri AST vakalarının 11’inde (%28,2) izlenmiştir. 28 vakada ise (%71,7) görülmemiştir. SMM vakalarının hiç birinde Kamino cisimcikleri görülmemiştir. (%100) İki tanı grubu karşılaştırıldığında SMM’lerde Kamino cisimcikleri tespit edilememiş olup, görülen tüm vakalar AST grubundadır. Ancak AST grubunda da görülme oranı düşüktür.

5.2-8. Sitolojik atipi/pleomorfizm:

Atipik spitzoid lezyon ve hatta melanom düşündürecek sitolojik özellikler, yüksek nükleus/sitoplazma oranı, granüler yada tozsuz sitoplazmaya sahip spitzoid melanositler, nükleer membran kalınlaşması, kaba kromatin yapısı ve büyük eozinofilik nükleol varlığı olarak sıralanabilir. Bu özellikleri gösteren hücrelerin çok sayıda oluşu, lezyon içinde asimetrik ve gelişigüzel dağılımı sitolojik atipi olarak yorumlanmaktadır (62). Bu kriterler gözönüne alındığında, AST vakalarının 8’inde (%20,5) hafif, 18’inde (%46,15) orta derecede, 12’sinde (%30,7) belirgin sitolojik atipi/pleomorfizm mevcuttur. 1 vakada ise (%2,56) sitolojik atipi/pleomorfizm görülmemiştir. SMM’larda 1 vakada (%10) hafif, 2 vakada (%20) orta derecede, 7 vakada (%70) belirgin sitolojik atipi/pleomorfizm görülmektedir. Her iki tanı grubuna bakıldığında orta ve belirgin sitolojik atipinin baskın olduğu izlenmektedir.

5.2.9. Ekspansif nodül:

Özellikle dermal komponentte izlenen ve matürasyon göstermeyen hücrelerle karakterize büyük hacimli, sellüler nodüller literatürde ekspansif nodül olarak tanımlanmaktadır (62). AST vakalarına bakıldığında 21 vakada (%53,8) ekspansif nodül varlığı saptanmıştır. 18 vakada (%46,15) ekspansif nodül görülmemiştir. SMM vakalarının 8'inde (%80) ekspansif nodül mevcut iken, 2 vakada (%20) görülmemiştir. Her iki tanı grubunda da ekspansif nodül görülme oranı yüksektir.

5.2.10. Mitoz:

Çalışmamıza dahil edilen AST ve SMM vakalarında mitoz varlığı, mitoz sayısı, yerleşim yeri ve atipik mitoz varlığı karşılaştırılmıştır.

5.2.10.1. Mitoz sayısı:

Mitoz sayısı AST vakalarında değerlendirildiğinde vakaların 29'unda (%74,3) 1-6/mm² arasında, 2 vakada (%5,12) >6/mm² olduğu görülmüştür. 8 vakada (%20,5) mitoz saptanmamıştır. SMM'larda 1-6/mm² arasında mitoz görülen vaka sayısı 8 (%80), >6mm² mitoz görülen vaka sayısı 1 (%10), mitoz görülmeyen vaka sayısı 1 (%10)'dir. 1-6/mm² mitoz görülen vakaların AST ve SMM gruplarının büyük çoğunluğunu oluşturduğu izlenmiş olup, >6/mm² mitoz 2 AST ve 1 SMM vakasında saptanmıştır.

5.2.10.2. Mitozların yerleşim yeri:

Çalışmaya dahil edilen tanı gruplarında mitozların yerleşim yeri yüzeysel-orta ve derin yerleşim olarak kategorize edilmiştir. AST vakalarının 25'inde (%64,1) yüzeysel-orta, 6'sında (%15,3) derin yerleşimli mitozlar izlenmiştir. SMM'larda vakaların 5'inde (%50) mitozlar yüzeysel-orta, 4'ünde (%40) derin yerleşimlidir. AST ve SMM vakalarında izlenen mitozların büyük çoğunluğu yüzeysel-orta yerleşimli olmakla birlikte, derin yerleşimli mitoz, SMM'larda daha sıktır.

5.2.10.3. Atipik mitoz varlığı:

AST vakalarının 3'ünde (%7,69) atipik mitoz saptanmıştır. SMM'larda ise 2 vakada (%20) atipik mitoz izlenmiştir.

5.2.11. Lenfositik infiltrasyon:

Lenfositik infiltrasyon varlığı ve derecesi tanı grupları arasında karşılaştırılmış olup, lenfositik infiltrasyon görülen vakalar hafif ve belirgin olarak derecelendirilmiştir. AST vakalarının 21'inde (%53,8) hafif, 13'ünde (%33,3) belirgin lenfositik infiltrasyon saptanırken, 5'inde (%12,8) görülmemiştir. SMM'larda 7 vakada (%70) hafif, 2 vakada (%20) belirgin lenfositik infiltrasyon izlenmiştir. 1 vakada (% 10) lenfositik infiltrasyon görülmemiştir (Tablo 11).

Tablo 11: Vaka gruplarının histopatolojik parametrelere göre dağılımı

	SMM n=10	AST n=39	TOPLAM n=49
ASİMETRİ	8(%80)	12(%30,7)	20(%40,8)
MATÜRASYON KAYBI	7(%70)	13(%33,3)	20(%40,8)
SUBKUTAN YAĞ DOKU TUTULUMU	-	1(%2,56)	1(%2,04)
ÜLSER/EROZYON VARLIĞI	1(%10)	13(%33,3)	14(%28,5)
EPİDERMAL "CONSUMPTION" VARLIĞI	7(%70)	21(%53,8)	28(%57,1)
PERİFERDE İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	8(%80)	12(%30,7)	20(%40,8)

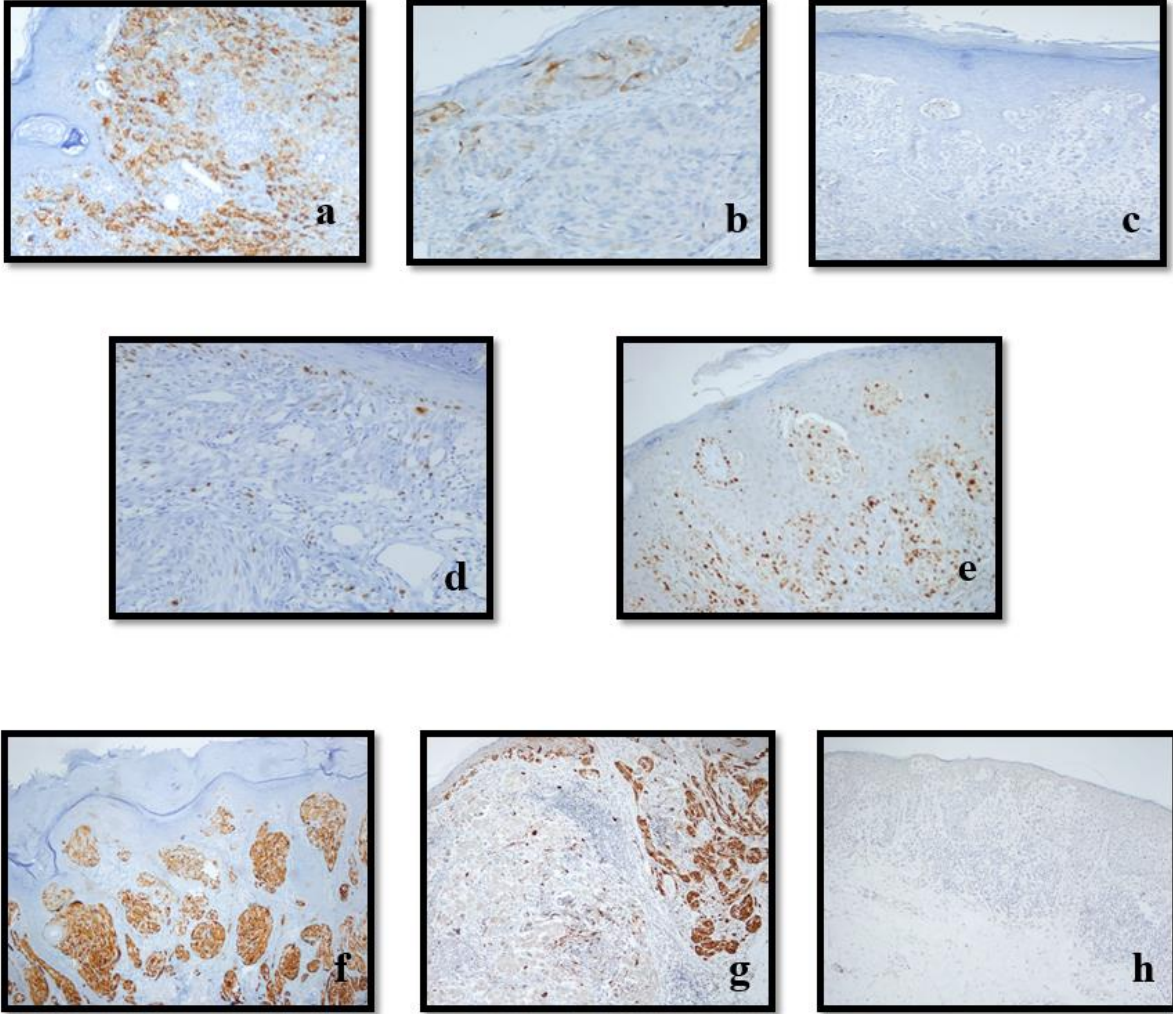
LEZYONUN ORTASINDA İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	2(%20)	10(%25,6)	18(%36,7)
KAMİNO CİSİMCİKLERİ VARLIĞI	-	11(%28,2)	11(%22,4)
SİTOLOJİK ATİPİ/PLEOMORFİZM			
• <i>HAFİF</i>	1 (%10)	8(%20,5)	9(%18,3)
• <i>ORTA</i>	2(%20)	18(%46,15)	20(%40,8)
• <i>BELİRGİN</i>	7(%70)	12(%30,7)	19(%38,7)
EKSPANSİF NODÜL VARLIĞI	8(%80)	21(%53,8)	29(%59,18)
MİTOZ SAYISI			
- 0/MM ²	1(%10)	8(%20,5)	9(%18,3)
-1-6/MM ²	8(%80)	29(%74,3)	37(%75,5)
->6/MM ²	1(%10)	2(%5,12)	3(%6,12)
(1-6/mm ² düşük mitotik aktivite >6/mm ² yüksek mitotik aktivite)			
MİTOZLARIN YERLEŞİM YERİ			
-YÜZEYEL-ORTA	5(%50)	25(%64,1)	30(%61,2)
-DERİN	4(%40)	6(%15,3)	10(%20,4)
ATİPİK MİTOZ VARLIĞI	2(%20)	3(%7,69)	5(%10,2)
LENFOSİTİK İNFİLTRASYON			
• <i>YOK</i>	1 (%10)	5 (%12,8)	6 (%12,2)
• <i>HAFİF</i>	7 (%70)	21 (%53,8)	28 (%57,1)
• <i>BELİRGİN</i>	2 (%20)	13 (%33,3)	15 (%30,6)

5.3.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR:

Çalışmaya alınan olguların önceden uygulanmış ya da FISH analizi sonrasında uygulanan immünohistokimyasal çalışma sonuçları incelenmiştir. Bu immünohistokimyasal belirteçlerden HMB-45, p16 ve Ki-67 değerlendirmeye alınmıştır. HMB-45 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada boyanma yeri ve boyanma varlığı, p16 antikoruna ile boyanmanın varlığı/yokluğu, Ki-67 antikoruna ile ise yüzde olarak proliferatif indeks incelenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 10 adet SMM olgusunda HMB-45 ile 1 vakada (%10) sadece lezyonun yüzeysel kısımlarında boyanma saptanırken, 6 vakada (%60) lezyonun hem yüzeysel hem de derin kısımlarında boyanma görülmüştür. p16 antikoruna ile 4 vakada (%40) lezyonda ekspresyon izlenmiştir. Ekspresyon kaybı izlenen 4 vaka (%40) olup, bunlardan 2'sinde (%20) fokal kayıp mevcuttur. 2 vakada (%20) mevcut bloklarda doku tükendiğinden değerlendirme yapılamamıştır. Ki-67 proliferatif indeks en düşük %0-1, en yüksek %25 olarak izlenmiştir. Ortalama proliferatif indeks %6,85 olarak belirlenmiştir. AST vakalarının 16'sında (%41) HMB-45 ile sadece yüzeysel boyanma görülürken, 14'ünde (%35,8) yüzeysel ve derinde boyanma izlenmiştir. 4 vakada (%10,2) HMB-45 ile immünoreaksiyon saptanmamıştır. 5 vakada (%12,8) HMB-45 antikoruna çalışılmamıştır. p16 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada AST vakalarının 26'sında (%66,6) pozitif immünoreaksiyon görülmüştür. Ekspresyon kaybı izlenen 11 vaka (%28,2) olup, bunlardan 6'sında (%15,3) fokal kayıp mevcuttur. 2 vakada (%5,12) mevcut bloklarda doku tükendiğinden değerlendirme yapılamamıştır. Ki-67 proliferatif indeks en düşük %0-1, en yüksek %50, ortalama %6,75 oranındadır. 3 vakada (%7,7) Ki-67 antikoruna uygulanmamıştır (Resim 11) (Tablo 12).

Resim 11: İmmünohistokimyasal belirteçlerin mikroskopik görüntüleri a)HMB-45 ile yüzey ve derinde boyanma (HMB-45x100), b)HMB-45 ile sadece yüzeyde boyanma (HMB-45x100), c)HMB-45 ile total ekspresyon kaybı (HMB-45x100), d)Ki-67 ile düşük proliferatif indeks (Ki-67x100), e)Ki-67 ile yüksek proliferatif indeks (Ki-67x100), f)p16 ile difüz pozitivite (p16x100), g)p16 ile fokal ekspresyon kaybı (p16x100), h)p16 ile difüz ekspresyon kaybı (p16x100)



Tablo 12: Vaka gruplarında uygulanan immünohistokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

	SMM n=10	AST n=39
HMB-45		
• SADECE YÜZEY	1(%10)	16(%41)
• YÜZEY+DERİN	9(%90)	14(%35,8)
• NEGATİF	-	4(%10,2)
• DEĞERLENDİRİLEMEDİ	-	5(%12,8)
p16		
• POZİTİF	4 (%50)	26 (%70,02)
• p16 KAYBI	4 (%50)*	11 (%29,7)**
• DEĞERLENDİRİLEMEDİ	2 (%20)	2 (%5,12)
Ki-67		
• EN DÜŞÜK	%0-1	%0-1
• EN YÜKSEK	%25	%50
• ORTALAMA	%6,85	%6,75
• DEĞERLENDİRİLEMEDİ	3(%30)	3(%7,7)

*Negatif olarak değerlendirilen 4 vakanın 2'sinde (%20) fokal alanda kayıp mevcuttur.

** Negatif olarak değerlendirilen 11 vakanın 6'sında (%15,3) fokal alanda kayıp mevcuttur.

İmmünohistokimyasal olarak p16 antikoru ile elde edilen bulgular ile 9p21 FISH sonuçları karşılaştırıldığında SMM'larda, fokal kayıp izlenen 2 vakada (%20) 9p21 FISH ile pozitiflik izlenmiştir. Total ekspresyon kaybı izlenen 2 (%20) vakada da 9p21 FISH sonuçları pozitifdir. p16 antikoru ile pozitif olarak değerlendirilen 4 (%40) vakanın 1'i (%10) 9p21 FISH ile pozitif, diğerleri negatif olarak yorumlanmıştır. AST'lerde ise fokal kayıp izlenen 6 (%15,3) vakanın 1'i 9p21 FISH ile pozitif, diğerleri negatif olarak izlenmiştir. Total ekspresyon kaybı görülen 5 (%12,8) vakadan 1'inde 9p21 FISH ile pozitiflik saptanırken, diğer vakalar negatif olarak değerlendirilmiştir. p16 antikoru ile pozitif olan 26 vakanın 9'u (%23,07) 9p21 FISH ile pozitif, 17'si (%43,5) negatiftir (Tablo 13). Bu sonuçlar ile p16 immünohistokimyasal çalışma bulguları ile 9p21 FISH verileri arasında vakaların büyük çoğunluğunda uyum olduğu söylenebilir. p16 antikoru ve 9p21 FISH çalışma sonuçları karşılaştırmalı bulguları Tablo 13'te özetlenmiştir.

Tablo 13: p16 antikoru ve 9p21 FISH çalışma sonuçlarının karşılaştırılması

p16	SMM n=10		AST n=39	
	9p21 FISH Pozitif (n=6)	9p21 FISH Negatif (n=4)	9p21 FISH Pozitif(n=12)	9p21 FISH Negatif(n=27)
EKSPRESYON KAYBI MEVCUT*	4 (%40)	-	2 (%5,12)	9 (%23,07)
EKSPRESYON KAYBI GÖRÜLMEDİ	1 (%10)	3 (%30)	9 (%23,07)	17 (%43,5)
DEĞERLENDİRİLEMEDİ**	1 (%10)	1 (%10)	1 (%2,56)	1 (%2,56)

*Ekspresyon kaybı görülen SMM'ların 2'si (%20), AST'lerin 6'sında (%15,3) fokal alanda ekspresyon kaybı mevcuttur. Fokal kayıp izlenen SMM'ların her ikisi de 9p21 FISH pozitifdir. AST'lerin ise 1'i 9p21 FISH pozitif, diğerleri negatiftir.

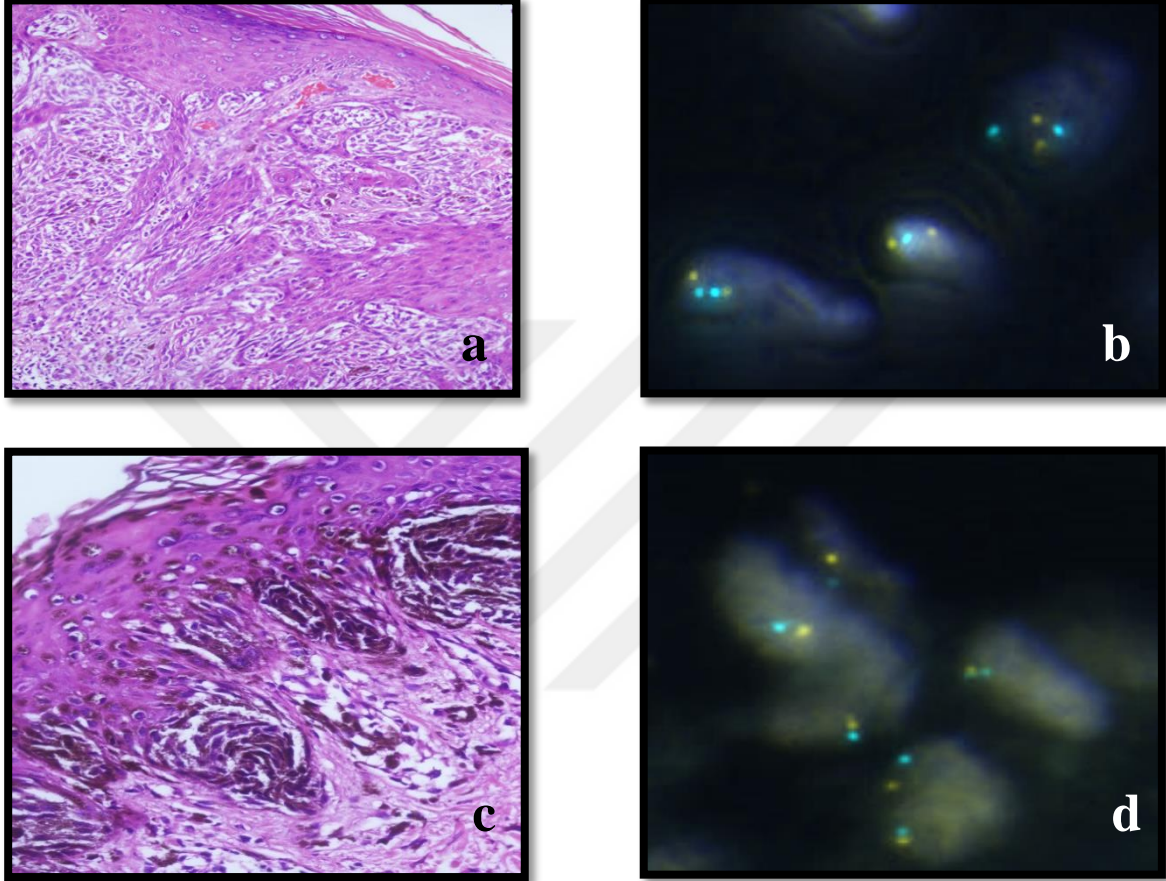
**SMM'larda 2 (%20), AST'lerde 2 (%5,12) vakada mevcut bloklarda yeterli doku kalmadığından p16 antikoru için değerlendirme yapılamamıştır.

5.4.KLASİK MELANOM PROBLARI İLE UYGULANAN FLORESANS İN SİTU HİBRİDİZASYON BULGULARI:

Çalışmamıza dahil edilen 10 adet SMM ve 39 adet AST vakasına klasik melanom problemleri ile FISH çalışılmıştır. Klasik melanom problemleri RREB-1 (6p25-kırmızı prob), MYB (6q23-gold prob), CCND1 (11q13-yeşil prob) ve kontrol amacıyla kullanılan D6Z1 (CEP6-aqua prob) olarak belirlenmiştir. Değerlendirme sırasında hem UCSF kriterleri hem de kombine kriterlerin (UCSF+Abbott kriterleri) eşik değerleri göz önüne alınarak karşılaştırma yapılmış, çalışma grubumuza dahil edilen vakalarda klasik melanom FISH sonuçları açısından fark saptanmamıştır. Bu nedenle değerlendirmede UCSF kriterleri esas alınmıştır.

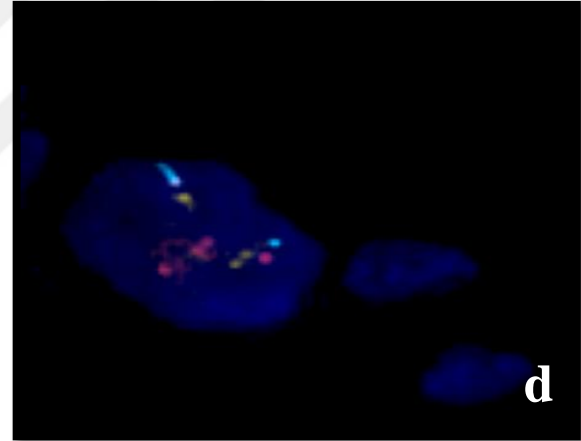
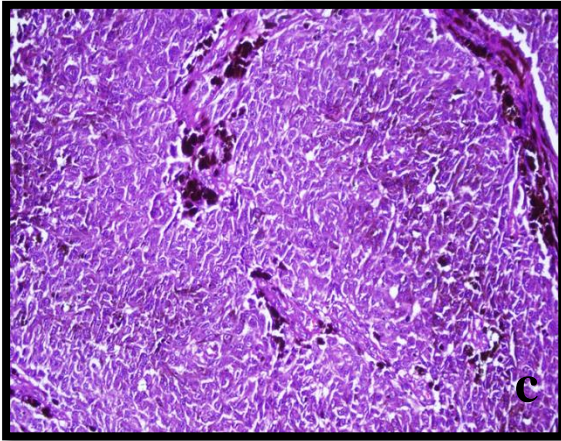
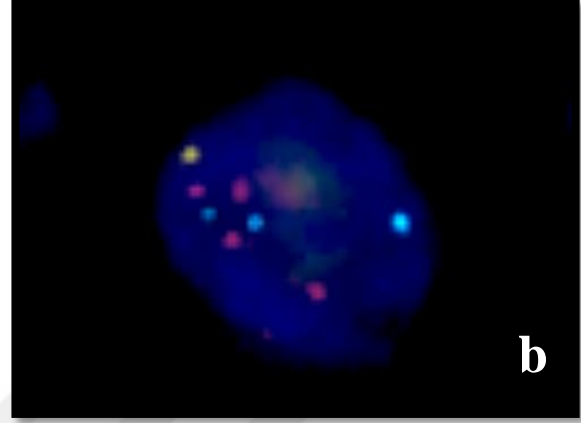
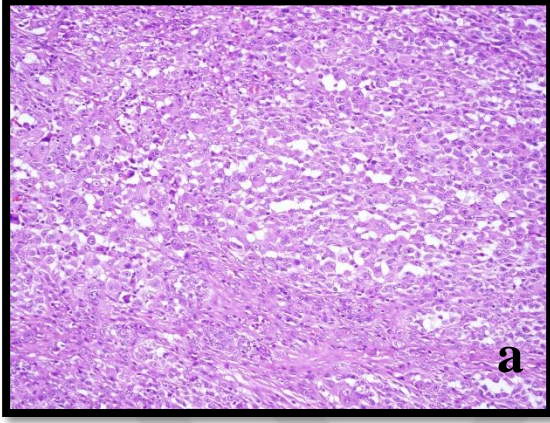
Çalışmamızda negatif kontrol olması için bulunan 2 adet SN kullanılarak klasik melanom FISH paneli ile yapılan çalışmada, her 2 vakada da sadece az miktarda hücrede MYB kaybı izlenmiştir. Diğer hücrelerin hepsinde normal FISH profili saptanmıştır. İzole MYB kaybı vakalardan 1'inde %15, diğerinde %13,3 oranında saptanmıştır. Bu sinyal paterni dışında başka anormal sinyal paterni saptanmamıştır. Bu oranlar eşik değer olan %40'ı aşmadığından her 2 vaka da FISH negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 12).

Resim 12: Çalışmamızda negatif kontrol olan Spitz nevüslerin mikroskopik ve klasik melanom FISH görüntüleri a)1 nolu nevüs HEx200, b)1 nolu nevüs klasik melanom FISH (normal FISH profili gösteren hücreler), 2 nolu nevüs HEx200, d)2 nolu nevüs klasik melanom FISH (normal FISH profili gösteren hücreler)



Pozitif kontrol olması amacıyla çalışılan 2 adet nodüler malign melanom vakasında ise, vakaların birinde klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmada 31/60 (%52) hücrede RREB-1 gen kazanımı, 4/60 hücrede (%7) CCND1 gen kazanımı ve 15/60 hücrede (%29) MYB gen delesyonu izlenmiştir. Diğer vakada ise 34/60 hücrede (%56) RREB-1 gen kazanımı, 2/60 hücrede (%3,33) CCND1 gen kazanımı, 14/60 hücrede (%11) MYB gen delesyonu görülmüştür. Tüm bu bulgulara göre her iki vaka da RREB-1 kazanımına bağlı (RREB-1 gen kazanımı >%29) FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 13).

Resim 13: Çalışmamızda pozitif kontrol olan nodüler malign melanomların mikroskopik ve klasik melanom FISH görüntüleri a)1 nolu melanom HEx200, b)1 nolu melanom klasik melanom FISH (RREB-1 gen kazanımı ve eşlik eden MYB gen delesyonu), c)2 nolu melanom HEx200, d)2 nolu melanom klasik melanom FISH (İzole RREB-1 gen kazanımı)



Çalışmamızda yer alan 10 adet SMM kullanılarak klasik melanom FISH paneli ile yapılan çalışmada, 8 vakada (%80) eşik değer olan %40'ı aşan MYB gen delesyonu olduğu görülerek bu vakalar, FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 14). Bu eşik değerinin altında kalan ve FISH negatif olarak değerlendirilen 2 vakada ise (%20), MYB gen delesyonu oranı %38,3 ve %20 olarak izlenmiştir. 4 vakada (%40), eşik değer olan %29'u aşmayan izole RREB-1 kazanımı izlenmiştir. Bu vakalarda izlenen izole RREB-1 kazanımı en düşük %1,6, en yüksek %6,6 oranındadır. İzole CCND1 kazanımı 1 vakada, %5 oranında görülmüştür. 2 vakada (%20) MYB kaybına eşlik eden RREB-1 kazanımı izlenmiş olup, oranları %1,6 ve %6,6'dır. 1 vakada (%10) CCND1 kazanımına eşlik eden MYB kaybı saptanmış olup, %3,3

oranındadır. RREB-1 ve CCND1 gen kazanımlarının her ikisinin de birlikte aynı hücrede gözleendiği vaka bulunmamaktadır.

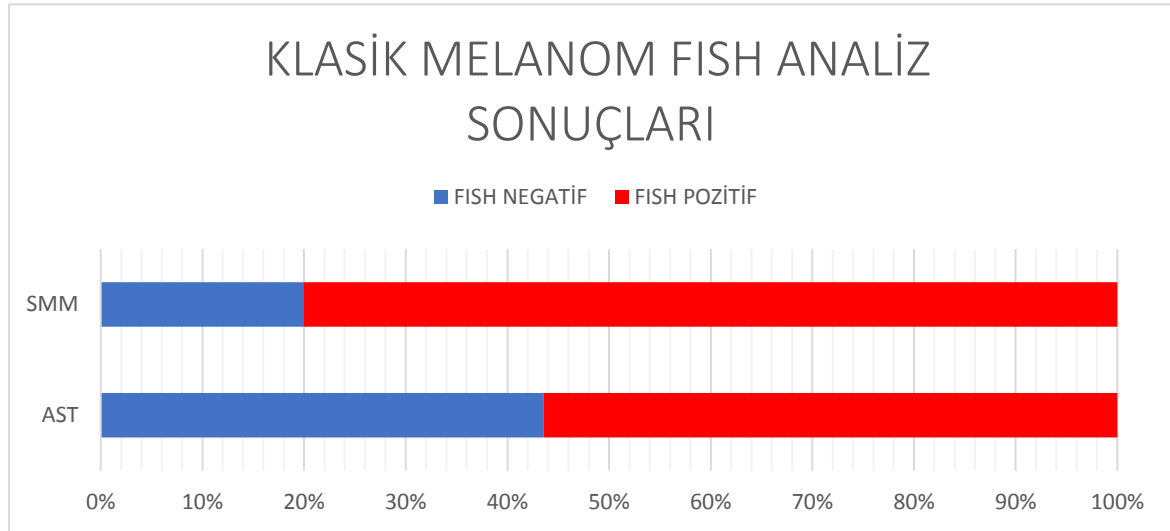
Çalışmamızda yer alan 39 adet AST kullanılarak, klasik melanom FISH paneli ile yapılan çalışmada, vakaların 21'inde (%53,8), %40'ı aşan izole MYB gen delesyonu izlenmiş olup, bu vakalar FISH pozitif olarak kabul edilmiştir (Tablo 14). Bu eşik değerin altında kalan izole MYB gen delesyonu için görülen en düşük oran %10, en yüksek oran ise %38,3 'tür. 16 vakada (%41) izole RREB-1 kazanımı izlenmiştir. Bu vakalarda izlenen izole RREB-1 kazanımı en düşük %1,6, en yüksek %16,6 oranındadır. Bu oranlar eşik değerin (%29) altında yer almaktadır. İzole CCND1 kazanımı 3 vakada, en düşük %5, en yüksek %25 oranında görülmüştür . CCND1 için bildirilen eşik değer ise %38'dir. 12 vakada (%30,7) MYB gen delesyonuna eşlik eden RREB-1 gen kazanımı izlenmiştir. Eşik değer olan %29'u aşan RREB-1 gen kazanımı izlenerek FISH pozitif olarak kabul edilen 1 vakada (%2,56) hücrelerin %40'ında RREB-1 gen kazanımı ve MYB gen delesyonu birlikte izlenmiştir. Diğer vakalarda en düşük %1,6, en yüksek %3,3 oranında görülmüştür. 3 vakada (%7,69) CCND1 kazanımına eşlik eden MYB kaybı saptanmıştır. MYB kaybına eşlik eden CCND1 kazanımı en yüksek %3,3, en düşük %1,6 oranındadır. RREB-1 ve CCND1 gen kazanımlarının her ikisinin de birlikte aynı hücrede %1,6 oranında gözleendiği 1 vaka (%2,56) bulunmaktadır. İncelenen 39 vakanın 22'si (%56,4) pozitif, 17'si (%43,5) negatif olarak izlenmiştir. Pozitif olan vakaların 21 tanesi (%53,8) MYB (gold)/CEP 6 sinyallerinin MYB için azalma gösterdiği hücrelerin %40'tan fazla olması sebebiyle , 1 vaka ise (%2,56) RREB-1 gen sinyallerinin (kırmızı) 2'den fazla olduğu hücrelerin %29'dan fazla olması nedeniyle FISH pozitif olarak kabul edilmiştir (Tablo 15) (Grafik 2) (Resim 14).

Tablo 14:Klasik melanom FISH problemlerinin pozitif ve negatif değerlerinin vaka gruplarına göre karşılaştırmalı dağılımı (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Tanı	Klasik Melanom FISH		Total (n=49)	Ki kare	P
	Negatif (n=21)	Pozitif (n=30)			
	Sayı (%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Spitzoid Malign Melanom	2 (%20)	8(%80)	10(%100)	2,926	0,141
Atipik Spitz Tümör	17(%43,6)	22(%56,4)	39(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30 (%61,2)	49(%100)		

Tanı gruplarına göre değerlendirildiğinde; istatistiksel olarak anlamlı olmasa da klasik melanom FISH pozitifliğinin gözlemsel olarak malignite yönünde eğilim gösterdiği söylenebilmektedir.

Grafik 2: Tanı gruplarının klasik melanom FISH problemleri analiz sonuçlarına göre dağılımı

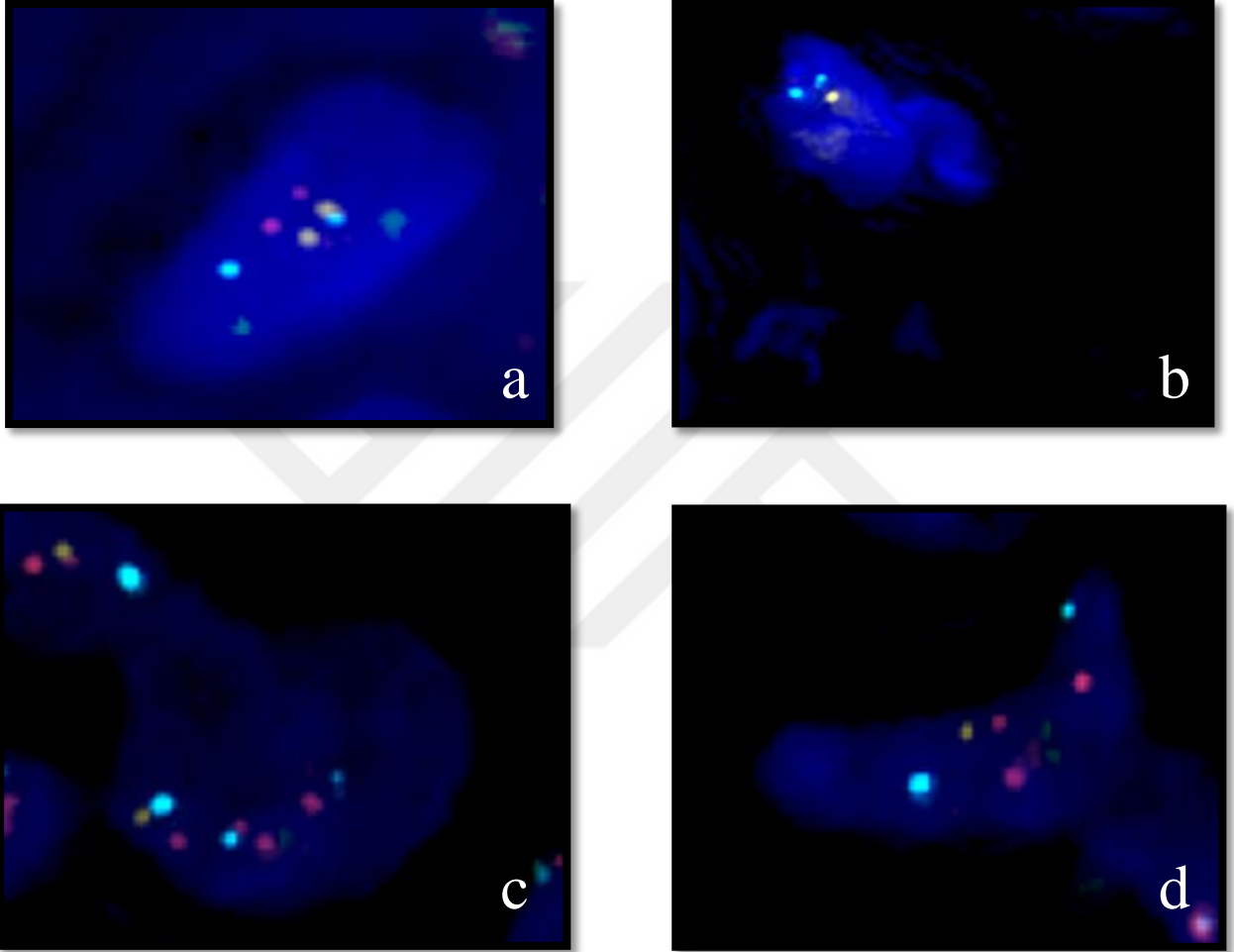


Tablo 15: Vaka gruplarının klasik melanom FISH problemleri bulgularının karşılaştırmalı dağılımı

	SMM n=10	AST n=39
İZOLE MYB GEN DELESYONU <ul style="list-style-type: none"> • VAKA SAYISI • GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE • GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE 	<p>10</p> <p>%20</p> <p>%90</p>	<p>39</p> <p>%10</p> <p>%83,3</p>
İZOLE RREB-1 GEN KAZANIMI <ul style="list-style-type: none"> • VAKA SAYISI • GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE • GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE 	<p>4</p> <p>%1,6</p> <p>%6,6</p>	<p>16</p> <p>%1,6</p> <p>%16,6</p>
İZOLE CCND1 GEN KAZANIMI <ul style="list-style-type: none"> • VAKA SAYISI • GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE • GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE 	<p>1</p> <p>%5</p> <p>%5</p>	<p>3</p> <p>%5</p> <p>%25</p>
RREB-1 GEN KAZANIMI+MYB GEN DELESYONU <ul style="list-style-type: none"> • VAKA SAYISI • GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE • GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE 	<p>2</p> <p>%6,6</p> <p>%1,6</p>	<p>12</p> <p>%40</p> <p>%1,6</p>
CCND1 GEN KAZANIMI+MYB GEN DELESYONU <ul style="list-style-type: none"> • VAKA SAYISI • GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE • GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE 	<p>1</p> <p>%3,3</p> <p>%3,3</p>	<p>3</p> <p>%3,3</p> <p>%1,6</p>

RREB-1 VE CCND1 GEN KAZANIMLARI <ul style="list-style-type: none"> • VAKA SAYISI • GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE • GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE 	- - -	1 %1,6 %1,6
FISH SONUCU <ul style="list-style-type: none"> • NEGATİF (%) • POZİTİF (%) 	2 (%20) 8 (%80)	17 (%43,5) 22 (%56,4)
POZİTİFLİĞİ SAĞLAYAN KRİTER <ul style="list-style-type: none"> • RREB-1>2 SİNYAL/NÜKLEUS OLAN>%29 HÜCRE VARLIĞI • RREB-1/CEP6 >1 OLAN >%55 HÜCRE VARLIĞI • MYB/CEP6 <1 OLAN >%40 HÜCRE VARLIĞI • CCND1>2 SİNYAL/NÜKLEUS OLAN>%38 HÜCRE VARLIĞI 	- - 8 (%100) -	1 (%4,54) - 21 (%95,4) -

Resim 14: Klasik melanom FISH problemleri ile normal sinyal paterni ve en sık izlenen anormal sinyal paternleri a)Klasik melanom FISH normal sinyal paternine sahip hücre, b)İzole MYB delesyonu, c)İzole RREB-1 kazanımı, d)MYB delesyonuna eşlik eden RREB-1 kazanımı



5.4.1. KLASİK MELANOM PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonuçları klinik parametreler ve histopatolojik parametreler ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı bulunan ve bulunmayan veriler kaydedilmiştir.

5.4.1.1. KLASİK MELANOM PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KLİNİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Vakaların yaş, cinsiyet, çap, süre, klinik takip süresi ve genel durum verilerinin klasik melanom FISH problemleri kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarına göre karşılaştırmalı analiz değerleri Tablo 16, 17 ve 18’de özetlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre klasik melanom FISH verileri ile belirtilen parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 16-18).

Tablo 16: Vakaların yaş, süre, çap ve klinik takip süresi verilerinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Student t testi kullanılmıştır.)

Klasik Melanom FISH		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	En az	En fazla	t	P
Yaş	Negatif (n=19)	30,73	16,22	36	4	57	0,898	0,374
	Pozitif (n=30)	26,8	13,78	27	3	56		
Süre (Ay)	Negatif (n=14)	17,82	28,009	6	0,5	96	124,5*	0,954*
	Pozitif (n=18)	18,69	41,05	9	0,5	180		
Çap (mm)	Negatif (n=19)	6,02	2,15	6	3	10	-0,439	0,663
	Pozitif (n=30)	6,16	2,72	5,5	2	15		
Klinik Takip Süresi (Ay)	Negatif (n=7)	31,14	31,95	12	0	72	-0,719	0,479
	Pozitif (n=17)	37,47	34,55	24	0	84		

(*Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Tablo 17: Vakaların cinsiyet verilerinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Cinsiyet	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Erkek	7 (%50)	7 (%50)	14(%100)	1,040	0,308
Kadın	12 (%34,2)	23 (%65,7)	35(%100)		
Toplam	19 (%38,77)	30 (%61,2)	49(%100)		

Tablo 18: Vakaların genel durum verilerinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Genel Durumu	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=24)	Ki kare	P
	Negatif (n=6)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
İyi- Takipte	4(%40)	6(%60)	10(%100)	0,974	0,393
İyi- Sağlıklı	2(%14,2)	12(%85,7)	14(%100)		
Toplam	6(%25)	18(%75)	24(%100)		

5.4.1.2. KLASİK MELANOM PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE HİSTOPATOLOJİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Vakaların incelenen histopatolojik bulgularının (simetri, matürasyon, subkutan yağ dokusu yayılımı, ülser/erozyon varlığı, epiderminin tümör basısı ile incelenmesi (epidermal "consumption"), intraepidermal pagetoid yayılım, kamino cisimcikleri, sitolojik atipi/pleomorfizm, ekspansif nodül varlığı, mitoz ve lenfositik infiltrasyon) klasik melanom FISH problemleri kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarına göre karşılaştırmalı analiz değerleri her parametre için ayrı yapılan tablolarda özetlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre klasik melanom FISH verileri ile belirtilen bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Subkutan yağ dokusu tutulumu ve sitolojik atipi/pleomorfizm parametreleri

için istatistiksel analiz yapılamamıştır. İntraepidermal pagetoid yayılımın periferde bulunması SMM'larda görülen bir bulgu olmakla birlikte klasik melanom FISH sonuçları ile karşılaştırıldığında FISH pozitifliği ile istatistiksel olarak anlamlı uyum görülememiştir (Tablo 19-32).

Tablo 19: Simetri parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Simetri	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Simetrik	12(%38,7)	19(%61,2)	31(%100)	0,0	0,990
Asimetrik	7(%38,8)	11(%61,1)	18(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 20: Matürasyon parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Matürasyon	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Görülmedi	6(%28,5)	15(%71,4)	21(%100)	2,215	0,137
Mevcut	13(%50)	13(%50)	26(%100)		
Değerlendirilemedi	0(%0)	2(%100)	2(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 21: Subkutan yağ dokusu tutulumu parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre karşılaştırması

Subkutan Yağ Dokusu Tutulumu	Klasik Melanom FISH		Total (n=49)	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)		
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)	
Yok	18(%41,8)	25(%58,1)	43(%100)	*
Var	0(%0)	1(%100)	1(%100)	
Değerlendirilemedi	1(%20)	4(%80)	5(%100)	
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)	

(* İstatistiksel analiz yapılamamıştır.)

Tablo 22: Ülser/erozyon parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Ülser/Erozyon	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	12(%34,2)	23(%65,7)	35(%100)	1,040	0,308
Var	7(%50)	7(%50)	14(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 23: Epidermal “consumption” parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Epidermal “Consumption”	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	11(%40,7)	16(%59,2)	27(%100)	0,770	0,782
Var	8(%36,3)	14(%63,6)	22(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 24: Pagetoid yayılım parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Pagetoid Yayılım	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	7(%36,8)	12(%63,1)	19(%100)	0,072	0,965
Var					
• Orta	5(%41,6)	7(%58,3)	12(%100)		
• Perifer	7(%38,8)	11(%61,1)	18(%100)		
Toplam	19(%38,8)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 25: Kamino cisimcikleri varlığı parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Kamino Cisimcikleri	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki kare	p
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	13(%34,2)	25(%65,7)	38(%100)	0,267	0,729
Var	5(%45,4)	6(%54,5)	11(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 26: Sitolojik atipi/pleomorfizm parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi

Sitolojik Atipi/ Pleomorfizm	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)		
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)	
Yok	1(%100)	0(%0)	1(%100)	*
Var				
• Hafif	5(%55,5)	4(%44,4)	9 (%100)	
• Orta derecede	8(%42,1)	11(%57,8)	19(%100)	
• Belirgin	5(%25)	15(%75)	20(%100)	
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)	

(*İstatistiksel analiz yapılamamıştır.)

Tablo 27: Ekspansif nodül parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Ekspansif Nodül	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	8(%40)	12(%60)	20(%100)	0,021	0,884
Var	11(%37,9)	18(%62,06)	29(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 28: Mitoz sayısı parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Mitoz (Sayı)	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	3(%33,3)	6(%66,6)	9(%100)	0,645	0,422
Var					
• 1-6/mm2	14(%37,8)	23(%85,15)	37(%100)		
• >6/mm2	2(%66,6)	1(%33,3)	3(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 29: Mitoz yerleşim yeri parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Mitoz (Yerleşim yeri)	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	3(%33,3)	6(%66,6)	9(%100)	0,081	0,775
Var					
• Yüzeysel-orta	12(%40)	18(%60)	30(%100)		
• Derin	4(%40)	6(%60)	10(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 30: Atipik mitoz parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Atipik mitoz	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	16(%36,3)	28(%63,6)	44(%100)	1,057	0,363
Var	3(%60)	2(%40)	5(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 31: Lenfositik infiltrasyon parametresinin klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Lenfositik infiltrasyon	Klasik Melanom FISH		Toplam (n=49)	Ki kare	P
	Negatif (n=19)	Pozitif (n=30)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	2(%33,3)	4(%66,6)	6(%100)	0,191	0,908
Var					
• Hafif	11(%39,2)	17(%60,7)	28(%100)		
• Belirgin	6(%40)	9(%60)	15(%100)		
Toplam	19(%38,7)	30(%61,2)	49(%100)		

Tablo 32: Tüm vakalarda histopatolojik bulgular ile klasik melanom FISH sonuçlarının karşılaştırması

	KLASİK MELANOM FISH NEGATİF n=19	KLASİK MELANOM FISH POZİTİF n=30
ASİMETRİ	7 (%38,8)	11 (%61,1)
MATÜRASYON KAYBI	6 (%28,5)	15 (%71,4)
SUBKUTAN YAĞ DOKUSU TUTULUMU	0 (%0)	1 (%100)
ÜLSER/EROZYON VARLIĞI	7 (%50)	7 (%50)
EPİDERMAL “CONSUMPTION”	8 (%36,3)	14 (%63,6)
PERİFERDE İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	7 (%38,8)	14 (%63,6)
LEZYONUN ORTASINDA İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	4 (%41,6)	7 (%58,3)
KAMİNO CİSİMCİKLERİ VARLIĞI	5 (%45,4)	6 (%54,5)
SİTOLOJİK ATİPİ/ PLEOMORFİZM		
-HAFİF	5 (%55,5)	4 (%44,4)
-ORTA DERECEDE	8 (%42,1)	11 (%57,8)
-BELİRGİN	5 (%25)	15 (%75)
EKSPANSİF NODÜL VARLIĞI	11 (%37,9)	18 (%62,06)
MİTOZ SAYISI		
-0	3 (%33,3)	6 (%66,6)
-1-6/mm ²	14 (%37,8)	23 (%62,16)
->6/mm ²	2 (%66,6)	1 (%33,3)
MİTOZ YERLEŞİM YERİ		
-YÜZEYEL-ORTA	12 (%40)	18 (%60)
-DERİN	4 (%40)	6 (%60)

ATİPİK MİTOZ VARLIĞI	3 (%60)	2 (%40)
LENFOSİTİK İNFİLTRASYON		
-YOK	2 (%33,3)	4 (%66,6)
-HAFİF	11 (%39,2)	17 (%60,7)
-BELİRGİN	6 (%40)	9 (%60)

5.4.2 KLASİK MELANOM FISH SONUÇLARINA GÖRE POLİPLOİDİ DURUMU

Bütün bu histopatolojik parametrelerin yanı sıra klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmada poliploidi gösteren hücreler de kayıt altına alınmıştır (Tablo 33) (Resim 15). Negatif kontrol grubu olarak kullanılan SN'lerde klasik melanom FISH problemleri ile yapılan incelemede, 1 vakada sayılan 60 hücreden 4'ünde triploidi, 1 hücrede tetraploidi, diğer vakada 2 hücrede tetraploidi gözlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan 2 adet nodüler malign melanomda ise klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmada poliploidi gösteren hücreye rastlanmamıştır. Çalışma grubunda bulunan SMM'larda 9 vakada (%90) poliploidi saptanmıştır. Triploidi görülen en fazla 15, en az 1, medyan 6, ortalama $6,5 \pm 4,89$ hücre bulunmaktadır. Tetraploidi gösteren en az 1, en fazla 3 hücre görülmüş olup, medyan 2,5, ortalama $2,25 \pm 0,95$ 'tir. AST grubunda ise 32 vakada (%82,05) triploidi, 18 vakada (%46,15) tetraploidi saptanmıştır. Triploidi en fazla 20, en az 1, medyan 8, ortalama $8,09 \pm 5,10$ hücrede izlenirken, tetraploidi en fazla 7, en az 1, medyan 2, ortalama $2,22 \pm 1,76$ hücrede belirlenmiştir. Bu bulgular Tablo 33'te özetlenmiştir.

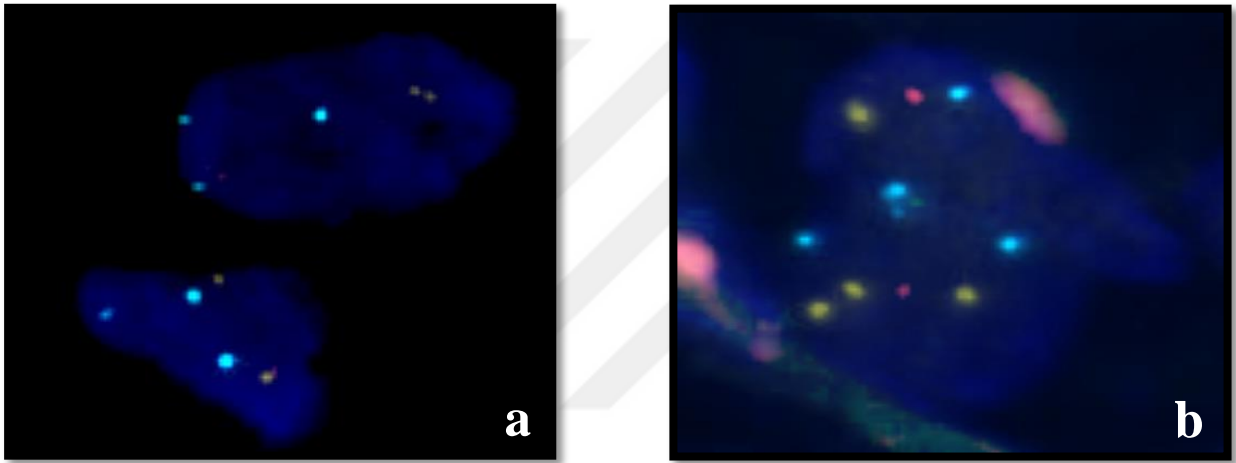
Tablo 33:Klasik melanom FISH sonuçlarına göre poliploidi durumu

	TRİPLOİDİ (n=41)					TETRAPLOİDİ (n=23)				
	En az*	En fazla*	Ortalama	Medyan	Standart sapma	En az*	En fazla*	Ortalama	Medyan	Standart sapma
SMM	1	15	6,5	6	4,89	1	3	2,25	2,5	0,95
AST	1	20	8,09	8	5,10	1	7	2,22	2	1,76

*Poliploidi gösteren en az ve en fazla hücre sayısı

Resim 15: Klasik melanom FISH problemleri ile triploidi ve tetraploidi gösteren hücreler

a) Triploidi, b) Tetraploidi

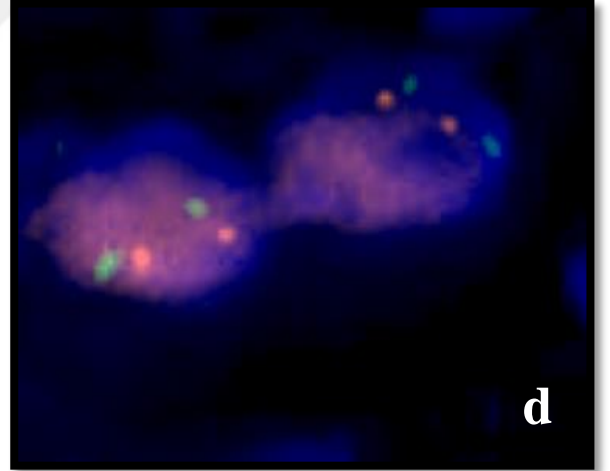
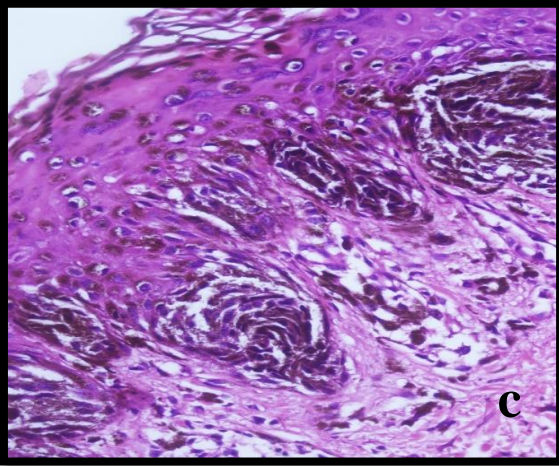
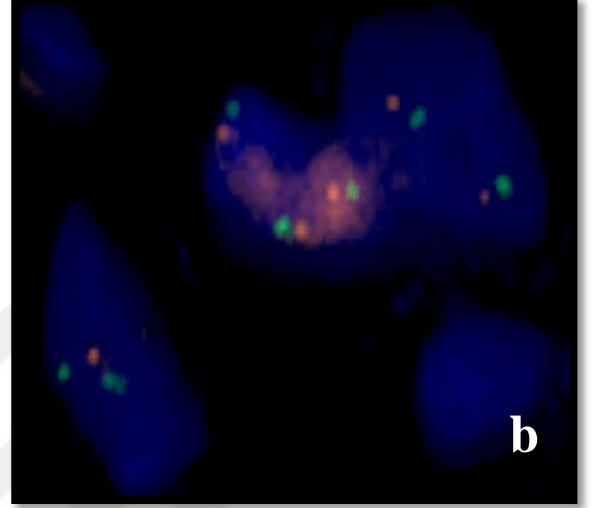
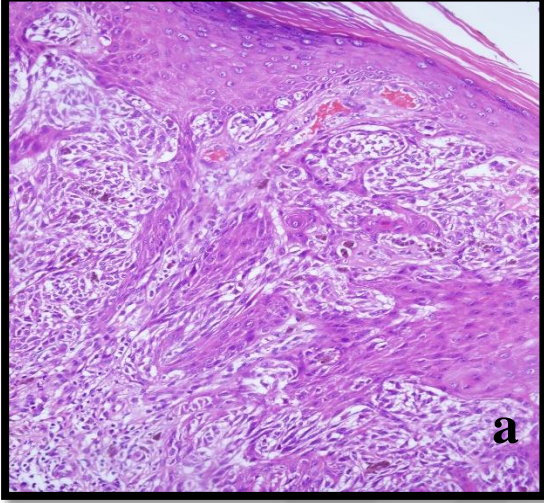


5.5.9p21 PROBLARI İLE UYGULANAN FLORESANS İN SİTU HİBRİDİZASYON BULGULARI:

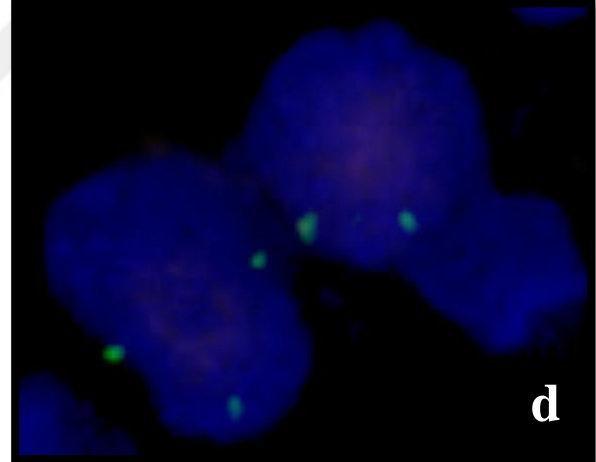
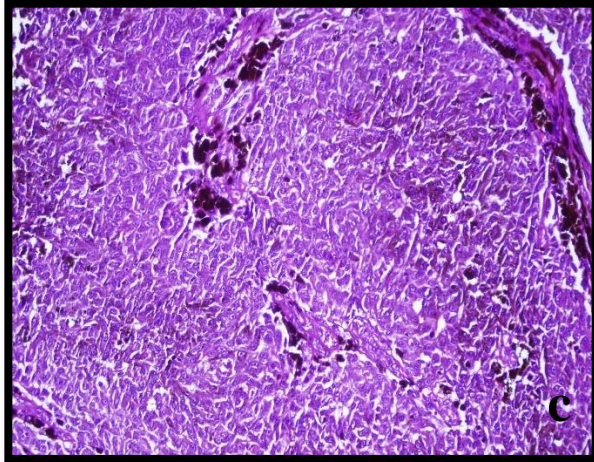
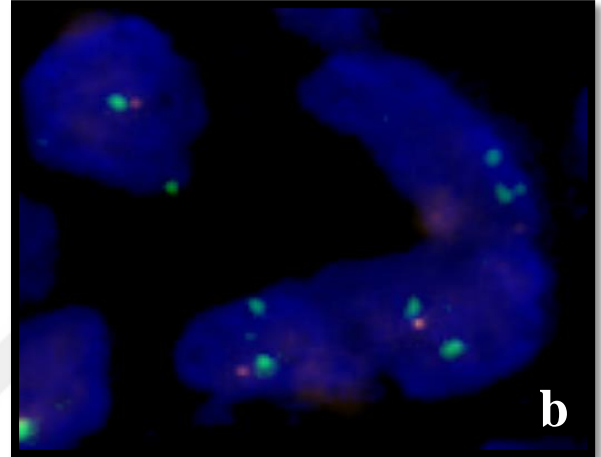
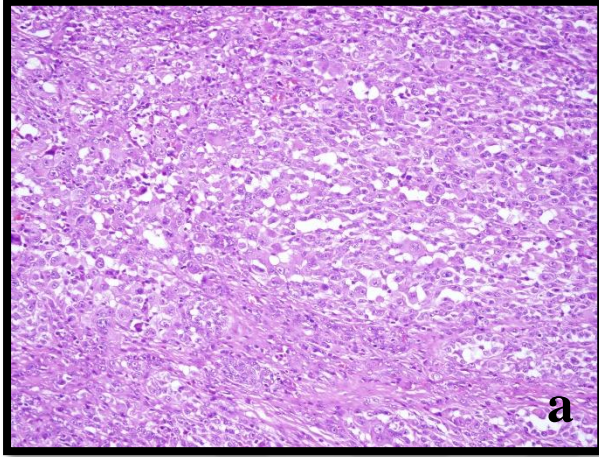
Çalışmamıza dahil edilen 10 adet SMM ve 39 adet AST vakasına 9p21 probu ile FISH çalışması yapılmıştır. 9p21 probu ile yapılan çalışma tümörün prognozunu belirlemek amacıyla değerlendirilmektedir.

Negatif kontrol olması amacıyla kullanılan 2 adet SN vakasında homozigot delesyon gösteren hücreye rastlanmamış olup, en düşük %23,3, en yüksek %33,3 oranında heterozigot delesyon gösteren hücre saptanmıştır. Bu sonuçlar ile FISH pozitif vaka görülmemiştir (Resim 16). Pozitif kontrol olması amacıyla kullanılan 2 adet nodüler malign melanomda ise 1 vakada %10 oranında heterozigot delesyon saptanmış, homozigot delesyon görülmemiştir. Diğer vakada ise %46,6 oranında homozigot delesyon, %53,3 oranında heterozigot delesyon izlenmiştir. Bu bulgulara göre %46,6 homozigot delesyon gösteren vaka 9p21 FISH pozitif kabul edilirken, diğer vaka 9p21 FISH negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 17).

Resim 16: Çalışmamızda negatif kontrol olan Spitz nevüslerin mikroskopik ve 9p21 FISH görüntüleri a)1 nolu nevüs HEx200, b)1 nolu nevüs 9p21 FISH (Normal 9p21 FISH profili gösteren bir hücre, normal 9p21 FISH profiline sahip triploidi gösteren bir hücre ve 9p21 heterozigot delesyonu gösteren bir hücre), c)2 nolu nevüs HEx200, d)2 nolu nevüs 9p21 FISH (Normal 9p21 FISH profiline sahip hücreler)



Resim 17: Çalışmamızda negatif kontrol olan nodüler malign melanomların mikroskopik ve 9p21 FISH görüntüleri a)1 nolu melanom HEx200, b)1 nolu melanom 9p21 FISH (9p21 heterozigot delesyonu gösteren hücreler ve 9p21 homozigot delesyonu içeren triploidi gösteren bir hücre), c)2 nolu melanom HEx200, d)2 nolu melanom 9p21 FISH (Biri triploidi gösteren, 9p21 homozigot delesyonu içeren hücreler)

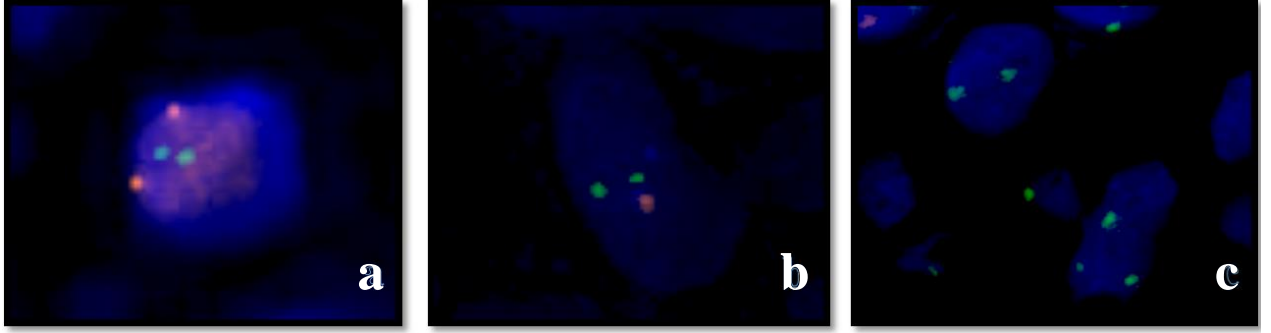


Çalışmamızda kullanılan 10 adet SMM’da eşik değer olan %29 homozigot delesyonu aşarak 9p21 FISH pozitif kabul edilen 6 vaka (%60) bulunmaktadır. Eşik değerinin altında kalan ve 9p21 FISH negatif olarak değerlendirilen diğer 4 vakada (%40) homozigot delesyon oranı en düşük %10, en yüksek %23,3’tür. Heterozigot delesyon ise en düşük %3,3, en yüksek %73,3 oranında saptanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan 39 adet AST’de eşik değer olan %29 homozigot delesyonu aşarak 9p21 FISH pozitif kabul edilen 12 vaka (%30,8) bulunmaktadır. Eşik değerinin altında kalan ve 9p21 FISH negatif olarak değerlendirilen diğer 27 vakada (%69,2) homozigot delesyon oranı

en düşük %0, en yüksek %23,3'tür. Heterozigot delesyon ise en düşük %13,3, en yüksek %76,6 oranında saptanmıştır (Resim 18) (Tablo 34-35) (Grafik 3).

Resim 18: 9p21 FISH probuyla görülen sinyal paternleri a)9p21 normal FISH profili, b)9p21 heterozigot delesyonu, c)9p21 homozigot delesyonu

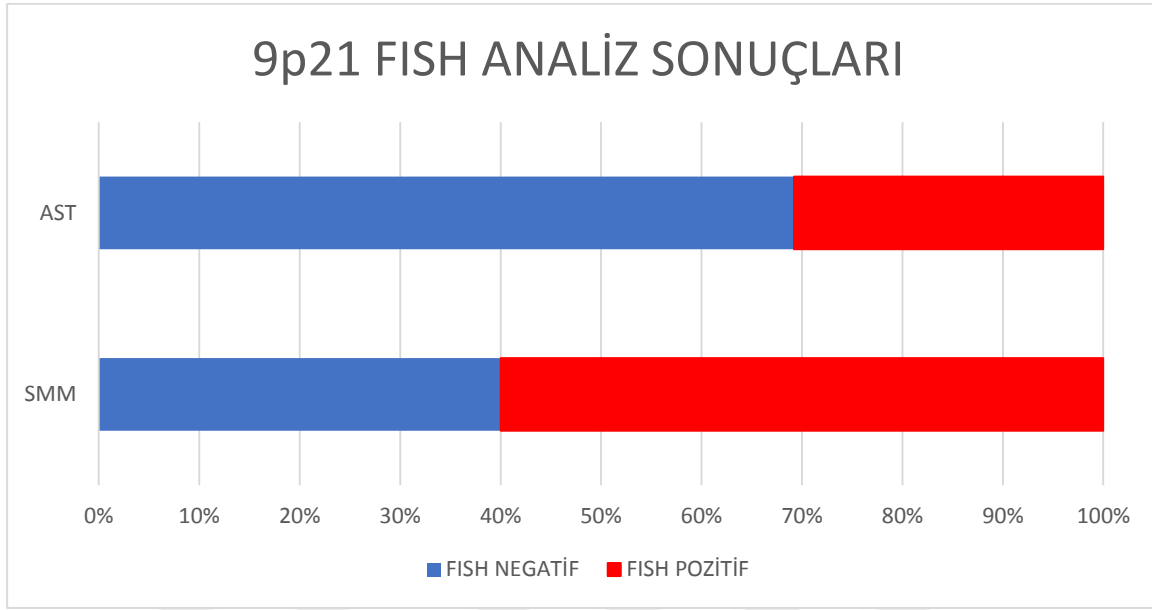


Tablo 34: 9p21 FISH probunun pozitif ve negatif değerlerinin vaka gruplarına göre karşılaştırmalı dağılımı (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Tanı	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Spitzoid Malign Melanom	4(%40)	6(%60)	10(%100)	1,866	0,278
Atipik Spitz Tümör	27(%69,2)	12(%30,7)	39(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tanı gruplarına göre değerlendirildiğinde; gözlemsel olarak 9p21 FISH pozitifliğinin malignite yönünde eğilim gösterdiği söylenebilmektedir.

Grafik 3: Tanı gruplarının 9p21 FISH probu analiz sonuçlarına göre dağılımı



Tablo 35: Vaka gruplarının 9p21 FISH probu bulgularının karşılaştırmalı dağılımı

	SMM n=10	AST n=39
HOMOZİGOT DELESYON ORANLARI		
• GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE	%10	%1,6
• GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE	%95	%81,6
HETEROZİGOT DELESYON ORANLARI		
• GÖRÜLEN EN DÜŞÜK YÜZDE	%3,3	%13,3
• GÖRÜLEN EN YÜKSEK YÜZDE	%73,3	%76,6
FISH SONUCU		
• POZİTİF-SAYI (%)	6 (%60)	12 (%30,7)
• NEGATİF-SAYI (%)	4 (%40)	27 (%69,2)

5.5.1.9p21 FISH PROBU İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonuçları klinik parametreler ve histopatolojik parametreler ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı bulunan ve bulunmayan veriler kaydedilmiştir.

5.5.1.1.9p21 FISH PROBU İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KLİNİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Vakaların yaş, cinsiyet, çap, süre, klinik takip süresi ve genel durum verilerinin 9p21 FISH probu kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarına göre karşılaştırmalı analiz değerleri Tablo 36, 37 ve 38’de özetlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre 9p21 FISH verileri ile belirtilen parametreler arasında çap parametresi için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup ($p=0,031$), çapın artmasıyla 9p21 FISH pozitifliği artmaktadır. Diğer parametreler için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo36-38).

Tablo 36: Vakaların yaş, süre, çap ve klinik takip süresi verilerininin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Student t testi kullanılmıştır.)

9p21 FISH		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	En az	En fazla	t	P
Yaş	Negatif (n=31)	30	14,96	32	4	57	1,065	0,292
	Pozitif (n=18)	25,5	14,3	29,5	3	45		
Süre (Ay)	Negatif (n=19)	23,84	45,03	6	0,5	180	118,0*	0,938*
	Pozitif (n=13)	10,2	8,77	7	0,5	24		
Çap (mm)	Negatif (n=31)	5,69	2,34	5	2	11	-2,226	0,031
	Pozitif (n=18)	6,8	2,64	6,5	4	15		
Klinik Takip Süresi (Ay)	Negatif (n=12)	43	33,63	48	0	84	0,845	0,407
	Pozitif (n=12)	28,25	32,58	18	0	84		

(*Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Tablo 37: Vakaların cinsiyet verilerinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Cinsiyet	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Erkek	10(%71,4)	4(%28,5)	14(%100)	0,562	0,453
Kadın	21(%60)	14(%40)	35(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 38: Vakaların genel durum verilerinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Genel Durumu	9p21 FISH		Toplam (n=24)	Ki kare	p
	Negatif (n=12)	Pozitif (n=12)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
İyi- Takipte	6(%60)	4(%40)	10(%100)	0,686	0,408
İyi- Sağlıklı	6(%42,8)	8(%57,1)	14(%100)		
Toplam	12(%50)	12(%50)	24(%100)		

5.5.1.2.9p21 FISH PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE HİSTOPATOLOJİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Vakaların incelenen histopatolojik bulgularının (simetri, matürasyon, subkutan yağ dokusu yayılımı, ülser/erozyon varlığı, epidermisin tümör basısı ile incelenmesi (epidermal “*consumption*”), intraepidermal pagetoid yayılım, kamino cisimcikleri, sitolojik atipi/pleomorfizm, ekspansif nodül varlığı, mitoz ve lenfositik infiltrasyon) 9p21 FISH probu kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarına göre karşılaştırmalı analiz değerleri her parametre için ayrı yapılan tablolarda özetlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre 9p21 FISH verileri ile belirtilen bulgular arasında mitoz yerleşim yeri parametresi için anlamlı fark saptanmış olup (p:0,029), derin yerleşimli mitoz varlığı ile 9p21 FISH pozitifliği artmaktadır. Ayrıca epidermal “*consumption*” (p:0,066) ve mitoz sayısı (p:0,05) parametreleri için anlamlı fark saptanmamakla birlikte epidermal “*consumption*” ve mitoz sayısının artmasıyla 9p21 FISH pozitifliğinin gözlemsel olarak artma eğiliminde olduğu izlenmiştir. Diğer parametreler için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Subkutan yağ dokusu tutulumu ve sitolojik atipi/pleomorfizm parametreleri için istatistiksel analiz yapılamamıştır. İntraepidermal pagetoid yayılımın periferde bulunması SMM’lerde görülen bir bulgu olmakla birlikte 9p21 FISH sonuçları ile karşılaştırıldığında FISH pozitifliği ile istatistiksel olarak anlamlı uyum görülememiştir (Tablo 39-52).

Tablo 39: Simetri parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Simetri	9p21 FISH		Toplam (n=49) Sayı(%)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)			
Simetrik	19(%61,2)	12(%38,7)	31(%100)	0,142	0,707
Asimetrik	12(%66,6)	6(%33,3)	18(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 40: Matürasyon parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Matürasyon	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Görülmedi	13(%61,9)	8(%38,09)	21(%100)	0,278	0,598
Mevcut	18(%69,2)	8(%30,7)	26(%100)		
Değerlendirilemedi	0(%0)	2(%100)	2(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 41: Subkutan yağ dokusu tutulumu parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre karşılaştırmalı analizi

Subkutan Yağ Dokusu Tutulumu	9p21 FISH		Total (n=49)	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)		
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)	
Yok	28(%65,1)	15(%34,8)	43(%100)	*
Var	1(%100)	0(%0)	1(%100)	
Değerlendirilemedi	2(%40)	3(%60)	5(%100)	
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)	

(* İstatistiksel analiz yapılamamıştır.)

Tablo 42: Ülser/erozyon parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Ülser/Erozyon	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	23(%65,7)	12(%34,2)	35(%100)	0,316	0,574
Var	8(%57,1)	6(%42,8)	14(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 43: Epidermal “consumption” parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Epidermal “Consumption”	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	17(%77,2)	5(%22,7)	22(%100)	3,371	0,066
Var	14(%58,3)	13(%48,1)	27(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 44: Pagetoid yayılım parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Pagetoid Yayılım	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	12(%63,1)	7(%36,8)	19(%100)	1,203	0,548
Var					
• Orta	9(%75)	3(%25)	12(%100)		
• Perifer	10(%55,5)	8(%44,4)	18(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 45: Kamino cisimcikleri parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Kamino Cisimcikleri	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki kare	p
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=31)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	23(%60,5)	15(%39,4)	38(%100)	0,546	0,724
Var	8(%72,7)	3(%27,2)	11(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 46: Sitolojik atipi/pleomorfizm parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre karşılaştırmalı analizi

Sitolojik Atipi/ Pleomorfizm	9p21 FISH		Toplam (n=49)	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)		
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)	
Yok	1(%100)	0(%0)	1(%100)	*
Var				
• Hafif	7(%77,7)	2(%22,2)	9 (%100)	
• Orta derecede	12(%63,1)	7(%36,8)	19(%100)	
• Belirgin	11(%55)	9(%45)	20(%100)	
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)	

(* İstatistiksel analiz yapılamamıştır.)

Tablo 47: Ekspansif nodül parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Ekspansif Nodül	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	18(%90)	2(%10)	20(%100)	2,002	0,157
Var	13(%44,8)	16(%55,17)	29(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 48: Mitoz sayısı parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Mitoz (Sayı)	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	8(%88,8)	1(%11,1)	9(%100)	3,841	0,05
Var					
• 1-6/mm2	22(%59,4)	15(%40,5)	37(%100)		
• >6/mm2	1(%33,3)	2(%66,6)	3(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 49: Mitoz yerleşim yeri parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Mitoz (Yerleşim yeri)	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	8(%88,8)	1(%11,1)	9(%100)	4,766	0,029
Var					
• Yüzeysel-orta	19(%63,3)	11(%36,6)	30(%100)		
• Derin	4(%40)	6(%60)	10(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 50: Atipik mitoz parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Atipik mitoz	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	28(%63,6)	16(%36,3)	44(%100)	1,297	0,342
Var	3(%60)	2(%40)	5(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 51: Lenfositik infiltrasyon parametresinin 9p21 FISH probu ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Lenfositik infiltrasyon	9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki kare	P
	Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	3(%50)	3(%50)	6(%100)	0,772	0,678
Var					
• Hafif	19(%67,8)	9(%32,14)	28(%100)		
• Belirgin	9(%60)	6(%40)	15(%100)		
Toplam	31(%63,2)	18(%36,7)	49(%100)		

Tablo 52: Tüm vakalarda histopatolojik bulgular ile 9p21 FISH sonuçlarının karşılaştırması

	9p21 FISH NEGATİF n=31	9p21 FISH POZİTİF n=18
ASİMETRİ	12 (%66,6)	6 (%33,3)
MATÜRASYON KAYBI	13 (%61,9)	8 (%38,09)
SUBKUTAN YAĞ DOKUSU TUTULUMU	1 (%100)	0 (%0)
ÜLSER/EROZYON VARLIĞI	8 (%57,1)	6 (%42,8)
EPİDERMAL “CONSUMPTION”	14 (%58,3)	13 (%48,1)
PERİFERDE İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	10 (%55,5)	8 (%44,4)
LEZYONUN ORTASINDA İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	9 (%75)	3 (%25)
KAMİNO CİSİMCİKLERİ VARLIĞI	8 (%72,7)	3 (%27,2)

SİTOLOJİK ATİPİ/		
PLEOMORFİZM		
- <i>HAFİF</i>	7 (%77,7)	2 (%22,2)
- <i>ORTA DERECEDE</i>	12 (%63,1)	7 (%36,8)
- <i>BELİRGİN</i>	11 (%55)	9 (%45)
EKSPANSİF NODÜL VARLIĞI	13 (%44,8)	16 (%55,17)
MİTOZ SAYISI		
-0	8 (%88,8)	1 (%11,1)
-1-6/mm ²	22 (%59,4)	15 (%40,5)
->6/mm ²	1 (%33,3)	2 (%66,6)
MİTOZ YERLEŞİM YERİ		
- <i>YÜZEYEL-ORTA</i>	19 (%63,3)	11 (%36,6)
- <i>DERİN</i>	4 (%40)	6 (%60)
ATİPİK MİTOZ VARLIĞI	3 (%60)	2 (%40)
LENFOSİTİK İNFİLTRASYON		
- <i>YOK</i>	3 (%50)	3 (%50)
- <i>HAFİF</i>	19 (%67,8)	9 (%32,14)
- <i>BELİRGİN</i>	9 (%60)	6 (%40)

5.5.2 9p21 FISH SONUÇLARINA GÖRE POLİPLOİDİ DURUMU

Bütün bu histopatolojik parametrelerin yanı sıra 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışmada poliploidi gösteren hücreler de kayıt altına alınmıştır (Tablo 53). Negatif kontrol grubu olarak kullanılan SN'lerde 9p21 FISH problemleri ile yapılan incelemede, heterozigot delesyon görülen hücrelerin %8,3'ünde triploidi, %1,6'sında tetraploidi izlenmiştir. Normal FISH profiline sahip olan hücrelerin %11,6'sında triploidi saptanmış olup, tetraploidi izlenmemiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan 2 adet nodüler malign melanomda ise 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışmada 1 vakada, heterozigot delesyon gösteren hücrelerin %3,33'ünde, normal FISH profili gösteren hücrelerin %13,3'ünde triploidi görülmüştür. Diğer vakada homozigot delesyon gösteren hücrelerin %20'sinde, heterozigot delesyon gösteren hücrelerin %13,3'ünde triploidi izlenmiştir. Çalışma grubunda bulunan SMM'larda 7 vakada (%70) poliploidi saptanmıştır (Resim 19). Triploidi görülen en fazla 18, en az 6, medyan 10, ortalama 11,14±4,63 hücre bulunmaktadır. Tetraploidi gösteren en az 1, en fazla 13 hücre görülmüş olup, medyan 3,5, ortalama 4,6±4,32'dir. AST grubunda ise 33 vakada (%84,6)

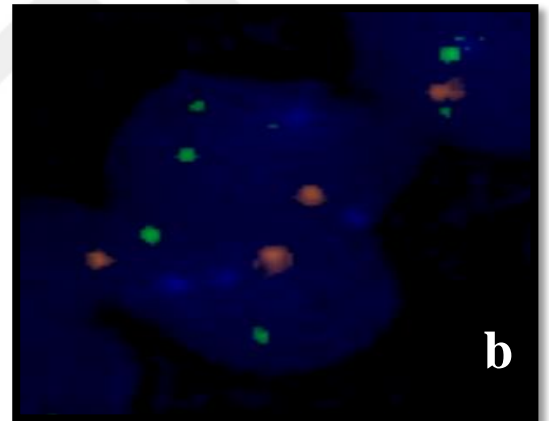
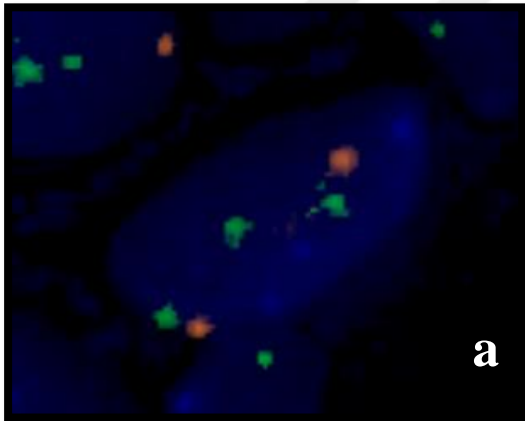
triploidi, 23 vakada (%58,9) tetraploidi saptanmıştır. Triploidi en fazla 16, en az 1, medyan 5, ortalama $6,3 \pm 3,78$ hücrede izlenirken, tetraploidi en fazla 15, en az 1, medyan 2, ortalama $3,69 \pm 4,2$ hücrede belirlenmiştir. Bu bulgular Tablo 53'te özetlenmiştir.

Tablo 53: 9p21 FISH sonuçlarına göre poliploidi durumu

	TRİPLOİDİ (n=40)					TETRAPLOİDİ (n=27)				
	En az*	En fazla*	Ortalama	Medyan	Standart sapma	En az*	En fazla*	Ortalama	Medyan	Standart sapma
SMM	6	18	11,14	10	4,63	1	13	4,6	3,5	4,32
AST	1	16	6,3	5	3,78	1	15	3,69	2	4,2

*Poliploidi gösteren en az ve en fazla hücre sayısı

Resim 19: 9p21 FISH problemleri ile triploidi ve tetraploidi gösteren hücreler a) Triploidi, b) Tetraploidi



5.6.KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH SONUÇLARININ BİRLİKTE İNCELENMESİ İLE ELDE EDİLEN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Klasik FISH melanom ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonuçları birlikte klinik parametreler ve histopatolojik parametreler istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı bulunan ve bulunmayan veriler kaydedilmiştir.

5.6.1.KLASİK MELANOM FISH ve 9p21 FISH PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE KLİNİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Vakaların yaş, cinsiyet, çap, süre, klinik takip süresi ve genel durum verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçlarının birlikte değerlendirilmesine göre karşılaştırmalı analiz sonuçları Tablo 54, 55 ve 56'da özetlenmiştir. İstatistiksel olarak 9p21 ve klasik melanom FISH verileri ile yapılan karşılaştırmalı analizlere göre çap parametresi ile istatistiksel olarak olmasa da gözlemsel olarak anlamlı fark saptanmış olup, çap arttıkça her 2 FISH pozitifliğinin birlikte artma eğiliminde olduğu görülmüştür. (p:0,071) (Tablo54-56).

Tablo 54: Vakaların yaş, süre, çap ve klinik takip süresi verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Student t testi kullanılmıştır.)

Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	En az	En fazla	t	P
Yaş	Negatif (n=33)	29,4	15,12	29,5	3	45	0,784	0,437
	Pozitif (n=16)	26,06	14,1	32	4	57		
Süre (Ay)	Negatif (n=19)	16	24,41	6	0,5	96	107,5*	0,750*
	Pozitif (n=13)	21,6	48,19	6	0,5	180		
Çap (mm)	Negatif (n=33)	5,73	2,36	5,5	2	11	-1,853	0,071
	Pozitif (n=16)	6,87	2,65	6,5	4	15		
Klinik Takip Süresi (Ay)	Negatif (n=14)	37,42	34,06	30	0	84	0,129	0,898
	Pozitif (n=10)	33,1	33,72	24	0	84		

(*Mann Whitney U testi kullanılmıştır.)

Tablo 55: Vakaların cinsiyet verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Cinsiyet	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Erkek	10 (%71,4)	4(%28,5)	14(%100)	0,148	1,00
Kadın	23 (%65,7)	12 (%34,2)	35(%100)		
Toplam	33 (%67,3)	16 (%32,6)	49(%100)		

Tablo 56: Vakaların genel durum verilerinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Genel Durumu	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=24)	Ki kare	P
	Negatif (n=14)	Pozitif (n=10)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
İyi- Takipte	7(%70)	3(%30)	10(%100)	0,960	0,421
İyi- Sağlıklı	7(%50)	7(%50)	14(%100)		
Toplam	14(%58,3)	10(%41,6)	24(%100)		

5.6.2.KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH PROBLARI İLE YAPILAN FISH ÇALIŞMA SONUCUNA GÖRE HİSTOPATOLOJİK VERİLER İLE YAPILAN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZ VE İSTATİSTİKLER:

Vakaların incelenen histopatolojik bulgularının (simetri, matürasyon, subkutan yağ dokusu yayılımı, ülser/erozyon varlığı, epidermisin tümör basısı ile incilmesi (epidermal “*consumption*”), intraepidermal pagetoid yayılım, kamino cisimcikleri, sitolojik atipi/pleomorfizm, ekspansif nodül varlığı, mitoz ve lenfositik infiltrasyon) klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarına göre birlikte uygulanan karşılaştırmalı analiz değerleri, her parametre için ayrı yapılan tablolarda özetlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre klasik melanom FISH ve 9p21 FISH verilerinin birlikte değerlendirilmesi ile belirtilen bulgular arasında mitoz yerleşim yeri ve mitoz sayısı parametreleri için anlamlı fark saptanmamış, ancak mitoz sayısının ve derinliğinin artmasıyla klasik melanom FISH ve 9p21 FISH birlikte pozitifliğinin artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (Mitoz yerleşim yeri p:0,075 ve mitoz sayısı p:0,218). Ayrıca epidermal “*consumption*” parametresi için de anlamlı fark saptanmamakla birlikte (p:0,181), epidermal “*consumption*” görülen olgularda klasik FISH melanom ve 9p21 FISH birlikte pozitifliği artma eğiliminde olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer parametreler için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Subkutan yağ dokusu tutulumu ve sitolojik atipi/pleomorfizm parametreleri için istatistiksel analiz yapılamamıştır. İntraepidermal pagetoid yayılımın periferde bulunması SMM’lerde görülen bir bulgu olmakla birlikte klasik melanom FISH ve 9p21 FISH birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlara göre karşılaştırma yapıldığında her iki FISH pozitifliği ile istatistiksel olarak anlamlı uyum görülemediği (Tablo 57-70).

Tablo 57: Simetri parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Simetri	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Simetrik	21(%67,7)	10(%32,2)	31(%100)	0,006	0,938
Asimetrik	12(%66,6)	6(%33,3)	18(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 58: Matürasyon parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Matürasyon	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Görülmedi	13(%61,9)	8(%38,09)	21(%100)	1,253	0,263
Mevcut	20(%76,9)	6(%23,07)	26(%100)		
Değerlendirilemedi	0(%0)	2(%100)	2(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%36,2)	49(%100)		

Tablo 59: Subkutan yağ dokusu tutulumu parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi

Subkutan Yağ Dokusu Tutulumu	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Total (n=49)	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)		
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)	
Yok	30(%69,7)	13(%30,2)	43(%100)	*
Var	1(%100)	0(%0)	1(%100)	
Değerlendirilemedi	2(%40)	3(%60)	5(%100)	
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)	

(*İstatistiksel analiz yapılamamıştır.)

Tablo 60: Ülser/erozyon parametresinin klasik FISH melanom ve FISH 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Ülser/Erozyon	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	25(%71,4)	10(%28,5)	35(%100)	0,928	0,501
Var	8(%57,1)	6(%42,8)	14(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 61: Epidermal “consumption” parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Epidermal “Consumption”	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	16(%72,7)	6(%27,2)	22(%100)	1,789	0,181
Var	17(%62,9)	10(%37,03)	27(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 62: Pagetoid yayılım parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Pagetoid Yayılım	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	13(%68,4)	6(%31,5)	19(%100)	0,654	0,721
Var					
• Orta	9(%75)	3(%25)	12(%100)		
• Perifer	11(%61,1)	7(%38,8)	18(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 63: Kamino cisimcikleri parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Kamino Cisimcikleri	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki kare	p
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	25(%65,7)	13(%34,2)	38(%100)	0,187	1,00
Var	8(%22,7)	3(%7,2)	11(%27,7)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 64: Sitolojik atipi/pleomorfizm parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre karşılaştırmalı analizi

Sitolojik Atipi/ Pleomorfizm	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)		
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)	
Yok	1(%3,0)	0(%0)	1(%2,0)	*
Var				
• Hafif	7(%21,2)	2(%6,2)	9 (%21,2)	
• Orta derecede	14(%42,4)	5(%15,6)	19(%47,9)	
• Belirgin	11(%33,3)	9(%28,1)	20(%50,0)	
Toplam	33(%77,7)	16(%32,6)	49(%100)	

(* İstatistiksel analiz yapılamamıştır.)

Tablo 65:Ekspansif nodül parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Ekspansif Nodül	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	15(%75)	5(%25)	20(%100)	0,90	0,343
Var	18(%62,06)	11(%37,9)	29(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 66: Mitoz sayısı parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Mitoz (Sayı)	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	8(%88,8)	1(%11,1)	9(%100)	1,518	0,218
Var					
• 1-6/mm2	23(%62,1)	14(%37,8)	37(%100)		
• >6/mm2	2(%66,6)	1(%33,3)	3(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 67: Mitoz yerleşim yeri parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Mitoz (Yerleşim yeri)	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	8(%88,8)	1(%11,1)	9(%100)	3,167	0,075
Var					
• Yüzeyel-orta	20(%66,6)	10(%33,3)	30(%100)		
• Derin	5(%50)	5(%50)	10(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 68: Atipik mitoz parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki kare testi kullanılmıştır.)

Atipik mitoz	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki Kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	30(%68,1)	14(%31,8)	44(%100)	1,137	1,00
Var	3(%60)	2(%40)	5(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,6)	49(%100)		

Tablo 69: Lenfositik infiltrasyon parametresinin klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışma sonucuna göre istatistiksel karşılaştırmalı analizi (Ki Kare testi kullanılmıştır.)

Lenfositik infiltrasyon	Klasik Melanom FISH ve 9p21 FISH		Toplam (n=49)	Ki kare	P
	Negatif (n=33)	Pozitif (n=16)			
	Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
Yok	2(%33,3)	4(%66,6)	6(%100)	0,581	0,747
Var					
• Hafif	22(%78,5)	6(%21,4)	28(%100)		
• Belirgin	9(%60)	6(%40)	15(%100)		
Toplam	33(%67,3)	16(%32,7)	49(%100)		

Tablo 70: Tüm vakalarda histopatolojik bulgular ile klasik melanom FISH ve 9p21 FISH sonuçlarının karşılaştırması

	KLASİK MELANOM VE 9p21 FISH NEGATİF n=33	KLASİK MELANOM VE 9p21 FISH POZİTİF n=16
ASİMETRİ	12 (%66,6)	6 (%33,3)
MATÜRASYON KAYBI	13 (%61,9)	8 (%38,09)
SUBKUTAN YAĞ DOKUSU TUTULUMU	1 (%100)	0 (%0)
ÜLSER/EROZYON VARLIĞI	8 (%57,1)	6 (%42,8)
EPİDERMAL “CONSUMPTION”	17 (%62,9)	10 (%37,03)
PERİFERDE İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	11 (%61,1)	7 (%38,8)

LEZYONUN ORTASINDA İNTRAEPİDERMAL PAGETOİD YAYILIM	9 (%75)	3 (%25)
KAMİNO CİSİMCİKLERİ VARLIĞI	8 (%72,7)	3 (%27,2)
SİTOLOJİK ATİPİ/ PLEOMORFİZM		
- <i>HAFİF</i>	7 (%77,7)	2 (%22,2)
- <i>ORTA DERECEDE</i>	14 (%73,6)	5 (%26,3)
- <i>BELİRGİN</i>	11 (%55)	9 (%45)
EKSPANSİF NODÜL VARLIĞI	18 (%62,06)	11(%37,9)
MİTOZ SAYISI		
-0	8 (%88,8)	1 (%11,1)
-1-6/mm ²	23 (%62,1)	14 (%37,8)
->6/mm ²	2 (%66,6)	1 (%33,3)
MİTOZ YERLEŞİM YERİ		
- <i>YÜZEYEL-ORTA</i>	20 (%66,6)	10 (%33,3)
- <i>DERİN</i>	5 (%50)	5 (%50)
ATİPİK MİTOZ VARLIĞI	3 (%60)	2 (%40)
LENFOSİTİK İNFİLTRASYON		
- <i>YOK</i>	2 (%33,3)	4 (%66,6)
- <i>HAFİF</i>	20 (%71,4)	8 (%28,5)
- <i>BELİRGİN</i>	9 (%60)	6 (%40)

5.7.KLASİK MELANOM FISH VE 9p21 FISH VERİLERİNE GÖRE İSTATİSTİKSEL UYUM SONUÇLARI:

Tablo 68: Klasik melanom FISH ve 9p21 FISH verilerinin uyum sonuçları

		FISH 9P21		Toplam (n=49)	Kappa	p
		Negatif (n=31)	Pozitif (n=18)			
		Sayı(%)	Sayı(%)	Sayı(%)		
KLASİK MELANOM FISH	Negatif (n=19)	17(%89,4)	2(%10,5)	19(%38,7)	0,384	0,002
	Pozitif (n=30)	14(%46,6)	16(%53,3)	30(%61,2)		
Toplam (n=49)		31(%100)	18(%100)	49(%100)		

9p21 FISH pozitif saptanan 18 vakanın 14'ünde (%77,7) klasik melanom FISH sonuçları da pozitif bulunmuş olup, 9p21 FISH sonuçları negatif olan 31 vakadan 17'si (%54,8) klasik melanom FISH negatif saptanmıştır. Yapılan Kappa analizi sonucunda iki test arasında istatistiksel olarak anlamlı ve düşük-orta derecede bir uyum saptanmıştır ($\kappa=0,384$ $p=0,002$) (Tablo 68).

6.TARTIŞMA

Günümüzde melanositik lezyonların tanısı için altın standart konvansiyonel histopatolojik incelemelerdir (111). Ancak bu lezyonların tanısı halen dermatopatolojinin zor konularından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Rutin ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal inceleme ile biyolojik davranışı belirlenemeyen vakalar olmaktadır. Bu tanı güçlüğü melanositik lezyonların geniş bir morfolojik heterojenite göstermesinden kaynaklanmaktadır (95,77). Son araştırmalar nevüsler ile malign melanomlar arasında çeşitli genetik farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu genetik farklılıklar yardımcı diagnostik testlerin temel hedefini oluşturmuştur. Çoğu nevüste onkojenik nokta mutasyonları saptanırken, malign melanomlarda kromozomal instabilite (kromozom kayıpları, gen kazanımları, gen amplifikasyonlar vb.) dikkati çekmektedir (97).

Spitzoid lezyonlarda da, diğer melanositik lezyonlarda olduğu gibi morfolojik tanıda gözlemciler arası farklılıkların olabileceği bilinmektedir. Bu morfolojik farklılıkları azaltmak için mevcut histomorfolojik kriterlerin yanı sıra nesnel yardımcı tanı testlerine de ihtiyaç duyulmaktadır. Massi ve ark.'nın yaptığı çalışmada da belirtildiği gibi spitzoid lezyonların büyük çoğunluğunda prognozun iyi oluşu, bölgesel lenf nodları dışında metastazın konvansiyonel melanomlara göre çok daha az görülmesi, bu lezyonların tanınması ve doğru risk değerlendirmesinin yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (124).

Spitzoid lezyonlarda, malignite değerlendirmesi ve SMM tanısı için Gerami ve ark. çeşitli histopatolojik tanı kriterlerini belirlemiştirlerdir. Bu kriterler nükleer atipi, ekspansif nodüller veya difüz büyüme paterni, sık ve derin yerleşimli mitoz, atipik mitozların varlığı, matürasyon kaybı, epidermal “*consumption*”, ülserasyon, tümöral nekroz varlığı, boyutun 1 cm'den büyük olması, subkutan yağ doku yayılımı olarak sıralanabilir (3). Bu kriterlerin varlığında malignite yönünde şüphe oluşsa da, lezyonun biyolojik davranışını belirlemek adına kromozomal değişikliklerin de tespit edilmesi önemli fikirler vermektedir.

Melanositik lezyonlarda kromozomal değişikliklerin saptanması 1992 yılında CGH çalışmaları ile başlasa da, bu konuda ilk çalışma 2003 yılında Bastian ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada melanomlarda bazı spesifik gen lokuslarında (6p, 1q, 7p, 8q, 17q, 11q, 20q) gen kazanımları, bazılarında ise (9p, 9q, 10q, 6q) gen kayıpları olduğu CGH yöntemi ile tespit edilmiştir (92).

FISH yöntemi ise son yıllarda solid ve hematolojik tümörlerde diagnostik kullanılabilirliği ve güvenilirliğini kanıtlamış bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle melanositik lezyonların tanısında da yardımcı diagnostik test olarak yerini almaktadır.

Çalışmamızda AST'ler ve SMM'larda, klasik melanom FISH ve 9p21 FISH problemleri ile melanositik lezyonlarda öne çıkan kromozomal değişiklikler ve bu gen değişikliklerinin prognoza etkileri incelenmiştir. Ayrıca her vaka için histopatolojik ve klinik özellikler belirlenmiş ve bu özelliklerin FISH verileri ile karşılaştırılması yapılmıştır. Bu karşılaştırmalara göre FISH sonuçları ile histopatolojik parametreler arasındaki istatistiksel anlamlılık araştırılmıştır.

Klasik melanom FISH problemleri (RREB1, CCND1, MYB, CEP6) kullanılarak son yıllarda yapılan bir çok çalışma mevcuttur (Tablo 72). 2010 yılında Gerami ve ark. yaptığı çalışmada farklı tiplerde 123 melanom ve 110 nevüs kullanılmış, klasik melanom FISH problemlerine göre sensitivite %83, spesifite %94 olarak hesaplanmıştır (100). Bununla birlikte çalışmada en yüksek sensitivite değerine sahip olan gen değişikliğinin de %60 oranla RREB1 gen kazanımı olduğu, güneş hasarına bağlı lezyonlarda ise CCND1 gen kazanımının belirgin olarak gözlemlendiği vurgulanmıştır. Konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda elde edilen sensitivite ve spesifite değerleri Tablo 72'de özetlenmiştir.

Tablo 72: Çeşitli çalışmalarda klasik melanom FISH testi ile elde edilen sensitivite ve spesifite değerleri

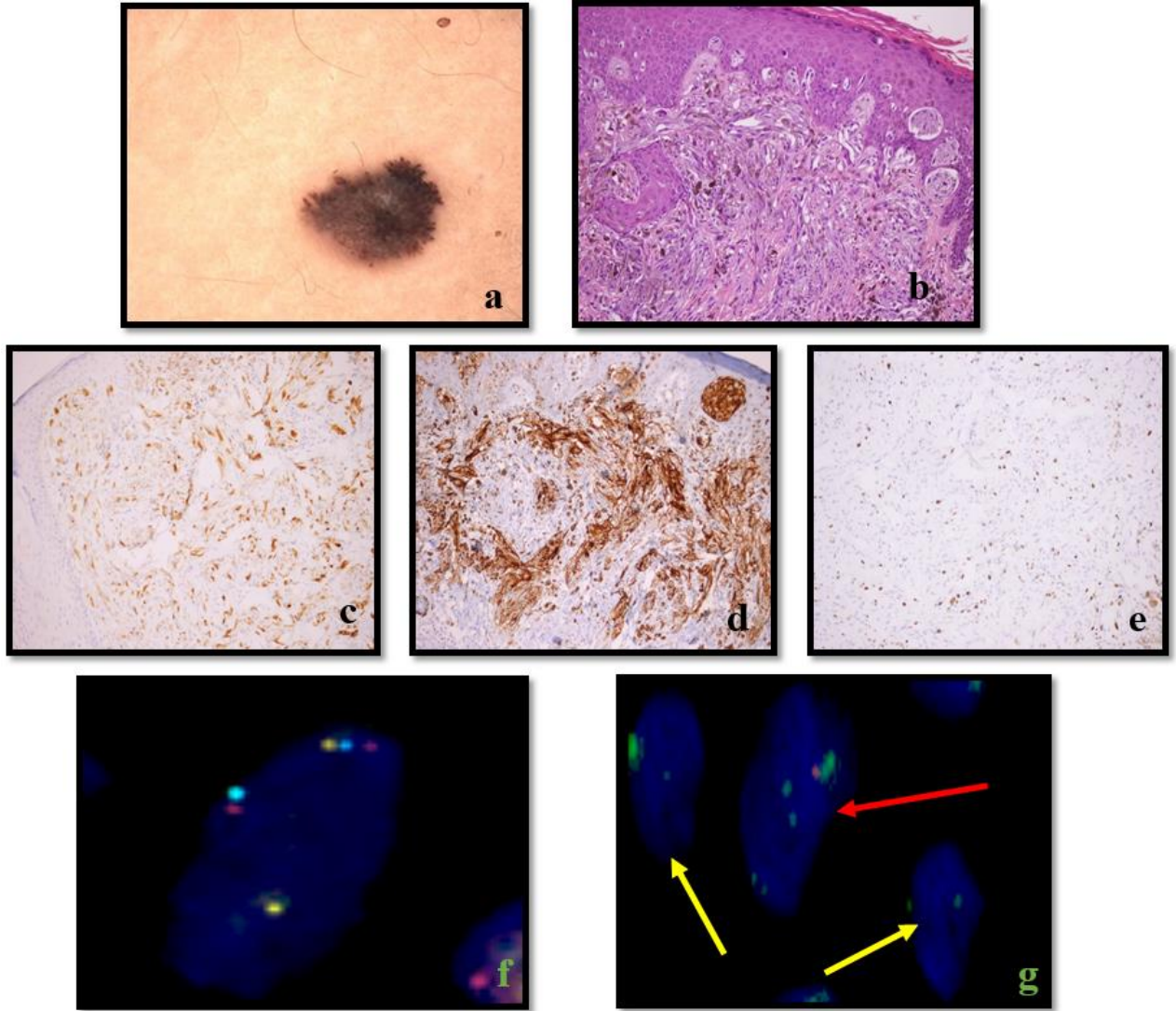
SENSİTİVİTE	SPEŞİFİTE	KAYNAK
%90	%95	Moorey ve ark.(125)
%87	%95	Newman ve ark.(126)
%86,7	%95,4	Gerami ve ark.(97)
%75	%100	Clemente ve ark.(127)
%83,8	%98,1	Moore ve Gasparini (77)
%83	%94	Gerami ve ark.(100)
%85	%90	Vergier ve ark.(116)
%100	%94	Abasolo ve ark.(129)
%82	%98	Fang ve ark. (128)
%72	Bilinmiyor	Wang ve ark. (130)

Bizim çalışmamızda ise pozitif kontrol grubu olan 2 adet nodüler malign melanomun her ikisinde de RREB-1 gen kazanımına bağlı FISH pozitifliği izlenmiştir. Negatif kontrol grubu olan SN'ler ise FISH negatif olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışma kapsamında değerlendirilen 10 adet SMM'un 8 tanesi (%80) klasik melanom FISH paneli ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgulara göre bizim çalışmamızda da klasik melanom FISH değerlendirmesinin maligniteyi belirleme açısından önemli bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra pozitif kontrol grubu olan nodüler malign melanom vakalarımızın her ikisinde de RREB-1 kazanımı görülmesi, konvensiyonel melanomlarda RREB-1 kazanımının en sık görülen gen değişikliği olduğu bilgisini desteklemektedir. Ancak literatürde %50'si spitzoid lezyonlardan oluşan 90 vaka kullanılarak klasik melanoma FISH problemleri ile yapılan çalışmalarda sensitivite %43, spesifite %80 olarak bildirilmiştir (125,131). Çalışmamızda SMM'larda literatüre göre yüksek oranda klasik melanom FISH pozitifliği görülmesi vaka sayısının az oluşu ile açıklanabilir.

Klasik melanom FISH problemleri ile son yıllarda yapılan çalışmalar, daha önce de belirtildiği gibi spitzoid lezyonlarda sensitivite değerlerinin düştüğünü göstermektedir. Ayrıca bu durum, özellikle malignite potansiyeli belirsiz olan AST gibi tümörlerde prognozu belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Belirtilen sebeplerle hem SMM'ların hemde AST'lerin doğru tanısı ve prognoz değerlendirmesi için yeni yöntemler arayışına girilmiştir. Bu sorunun çözümü için Bastian ve ark.'nın CGH çalışmalarında izlenen 9. kromozomda görülen delesyonlar göz önüne alınmıştır (92). Yine yapılan çalışmalarda homozigot 9p21 delesyonunun spitzoid lezyonlarda agresif hastalığı gösteren bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır(132,3,133). Klasik melanom FISH problemleri ile Ferringer ve ark.'nın yaptığı çalışmada 8 adet SMM'un 4'ünde pozitiflik saptanmış olup, diğer 4 SMM'da kromozom 9'da anomaliler izlenmiştir (113). Gammon ve ark. tarafından yapılan, 43 SMM kullanılan bir başka çalışmada, klasik melanom FISH problemlerine kromozom 9'u hedef alan başka bir prob eklenmiş, böylece sensitivite değeri %70'ten %85'e çıkarılmıştır (110). Tüm bu bilgiler ışığında Yazdan ve ark., AST'ler için kullanılacak bir risk sınıflaması oluşturmuştur. Bu sınıflamaya göre: *Homozigot 9p21 delesyonu gösteren spitzoid tümörler (yüksek risk), *6p25 gen kazanımı yada 11q13 gen kazanımı gösteren spitzoid tümörler (orta-yüksek risk), *6q23 gen delesyonu gösteren spitzoid tümörler (düşük risk), *FISH anomalisi bulunmayan spitzoid tümörler (düşük-çok düşük risk) olarak değerlendirilmiştir (134). Bununla birlikte 9p21 homozigot delesyonu içerseler bile, SMM'ların konvensiyonel melanomlardan daha iyi prognoz göstereceğini belirten çalışmalar da mevcuttur (3).

Tüm bu literatür bilgileri sonucunda çalışmamızda klasik melanom FISH problemlerinin yanı sıra 9p21 FISH probu ile de değerlendirme yapılmıştır. 9p21 probunun tek başına uygulanması ile SMM'larda 6 vakada (%60) pozitiflik saptanmıştır. SMM'larda görülen bu değer, klasik melanom FISH paneli ile elde edilen değere göre (%80) düşük olmakla birlikte, hem klasik melanom FISH problemleri hem de 9p21 FISH probu ile yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde 9 vakada (%90) FISH ile belirlenen kromozom anomalisi saptanmıştır. Klasik melanom FISH problemleri ile pozitiflik görülmeyen ancak 9p21 FISH probuyla pozitiflik izlenen vaka 6 yaşında olup, tarafımızca prepubertal SMM olarak değerlendirilmiştir (Resim 20). Daha önce de belirtildiği gibi 9p21 homozigot delesyonu spitzoid lezyonlarda agresif gidiş ile ilişkilidir. Bizim vakamızda SLNB uygulanmış, ancak metastaz bulgusu saptanmamıştır. Bununla birlikte yapılan tarama testlerinde herhangi bir nüks ya da metastaz bulgusu da görülmemiştir. Ancak vakanın klinik takip süresi 8 ay olarak belirlenmiş olup, literatürde agresif gidişin değerlendirilmesi için en az 5 yıllık bir takip süresi olması gerektiği vurgulanmıştır (7). Takip süresinin yeterli olmayışı nedeni ile bu vakada agresif gidiş hakkında yorum yapılamamıştır.

Resim 20: Prepubertal SMM vakasının makroskopik ve mikroskopik görüntüleri, immünohistokimya ve FISH çalışma bulguları a)Lezyonun makroskopik görüntüsü, b)HEx200, c)HMB-45x200, d)p16x200, e)Ki-67x200, f)Klasik melanom FISH (normal FISH profili) g)9p21 FISH (9p21 homozigot delesyonu gösteren hücreler(sarı oklar), heterozigot delesyon gösteren poliploidik hücre(kırmızı ok))



Hem klasik melanom FISH problemleri hem de 9p21 FISH probe ile pozitiflik izlenen 6 vakanın 1'inde takip süresi (72 ay) yeterli olmasına karşın nüks ya da metastaz bulgusu görülmemiştir. 9p21 pozitifliği agresif davranışı göstermesine karşın bu vakada prognozun beklenenden iyi oluşu, 9p21 probeunun değerlendirilmesinde yaşanan sorunlar ile açıklanabilir. Kesitlemeye bağlı genomik kayıplar (trunkasyon) ya da sinyal kalitesindeki yetersizlikler, 9p21 probeu ile yapılan çalışmanın yanlış pozitif olarak değerlendirilmesine sebep olabilir. Konu ile ilgili literatürde de yanlış pozitiflikler görülebileceği vurgulanmıştır (110). Ayrıca değerlendirilen nükleusların sübjektif olarak seçilmesinin testin objektivitesini düşürmekte olduğu da bilinmektedir. Gaiser ve ark., yaptıkları çalışmada, FISH değerlendirilmesinde nükleus seçimine bağlı gözlemciler arası fikir farklılıklarının %19-25 oranında görülebildiğini vurgulamışlardır (102). Bunun yanı sıra her iki FISH probe grubuyla yapılan değerlendirmede pozitiflik saptanan diğer 5 vakada da nüks, metastaz ya da hastalığa bağlı ölüm görülmemiştir. Ancak klinik takip süreleri yeterli olmadığından (<60 ay), prognoz ile ilgili sağlıklı verilerin elde edilebilmesi için en az 5 yıllık klinik takip sonrasında tekrar değerlendirme yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen 39 AST vakasında klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmalarda 22 vakada pozitiflik saptanmıştır (%56,4). Klasik melanom FISH problemleri ile pozitif olarak değerlendirilen vakaların 11'inde 9p21 probeuyla yapılan incelemede de pozitiflik gözlenmiştir. Ayrıca klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmada negatif olarak değerlendirilen 1 AST vakasında 9p21 probeu ile pozitiflik izlenmiştir. Bütün bu vakaların yapılan klinik takiplerinde, 1 vakada bölgesel lenf nodu metastazı saptanmıştır. Bu vakanın FISH özelliklerine bakıldığında, klasik melanom FISH problemleri ile %63,3 oranında MYB gen delesyonu (MYB gen delesyonu >%40, FISH pozitif) , 9p21 probeu ile %36,6 oranında homozigot delesyon (9p21 homozigot delesyon >%29, FISH pozitif) izlenmiştir. Diğer vakaların hiçbirinde nüks, metastaz bulgusu ya da hastalık nedeni ile ölüm görülmemiştir. Klinik takip süreleri göz önüne alındığında, 9p21 probeu ile pozitiflik izlenen vakaların yalnızca 2'sinde takip süresinin belirtilen 5 yıllık (60 ay) periyodun üzerine çıktığı görülmüştür (Her iki vakada da 84 ay). Bu bulgulara göre, nüks ve metastaz gibi agresif hastalık belirteçlerinin vakaların büyük çoğunluğunda görülmemesi SMM'larda olduğu gibi klinik takip süresinin yeterli olmaması ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra agresif gidişin bir çok vakada görülmemesi, farklı bir eşik değeri kullanılması gerektiğine işaret edebilir. Literatürde farklı laboratuvarlarda farklı eşik değerleri oluşturulabileceği konusunda da çalışmalar mevcuttur (104,88). Bu bilgiye göre, öncesinde pozitif olarak değerlendirilen vakalar farklı

bir eşik değer kullanımında negatif olarak değerlendirilebilir. Klinik takip süresi yeterli olan 2 vakada 9p21 probu ile yapılan çalışmada pozitiflik oranları %33,3 ve %30 olup, kullanılan eşik değer olan %29'a yakın oranlarda izlenmiştir. Bu vakalarda da agresif gidişe işaret eden nüks, metastaz, hastalık nedeni ile ölüm gibi bulguların görülmemesi, farklı bir eşik değer kullanımında vakaların negatif olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bu konu ile ilgili 14-16 Nisan 2016 tarihinde San Diego'da yapılan 7. Yıllık Sürekli Tıp Eğitimi, Melanom ve Melanositik Proliferasyonların Patolojisi: Kapsamlı Gözden Geçirme ve Güncelleme Kursu'nda (7th Annual CME Course Pathology of Melanoma and Melanocytic Proliferations: Comprehensive Review and Update) Dr. Pedram Gerami, yaptığı konuşmada klinik olarak agresif gidiş gösteren vakalarda %70'e varan yüksek oranlarda homozigot delesyon saptandığından bahsetmiştir. Ayrıca konu ile ilgili Raskin ve ark.'nın 16 AST ile yaptığı çalışmada 8 vakada sentinel lenf nodu metastazı ve bunların 1'inde hastalık nedeniyle ölüm görülmesine rağmen, FISH ile saptanabilen herhangi bir genetik anomali bulunmadığı ortaya konulmuştur. Buna ek olarak klasik melanom FISH problemleri ile RREB-1 ve CCND1 gen kazanımı izlenen 7 vakada ise agresif gidişi gösteren herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bu nedenle belirlenen kromozomal anomalilerin AST'lerde prediktif değerinin olmadığı bazı yazarlar tarafından savunulmuştur (135).

9p21 gen lokusundaki homozigot kayıplar agresif klinik gidiş ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte, heterozigot kayıplar kötü prognoz ile bağdaştırılamamıştır (134). Konu ile ilgili Cesinaro ve ark.'nın 28 AST kullanarak yaptıkları çalışmada heterozigot delesyon gösteren vakalarda kötü prognostik bulgu saptanmamıştır (121). Mason ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise bazı Spitz nevüslerde 9p21 gen lokusunda heterozigot kayıplar izlenebileceği, bazı primer ve metastatik melanomlarda 9p21 kaybının görülmeyebileceği bildirilmiştir (136). Ayrıca literatürde 9p21 heterozigot kaybının biyolojik öneminin henüz belirlenemediği, ancak benign ve malign neoplazilerde görülebildiği vurgulanmıştır. Bu nedenle heterozigot kayıpların malignite ile ilişkilendirilmemesi gerektiğine değinilmiştir (118,117).

Çalışmamızda tüm vakalar için 9p21 heterozigot kaybı gösteren hücreler kaydedilmiştir. Vaka gruplarının hepsinde, tüm vakalarda heterozigot delesyon gösteren hücreler izlenmiştir. Negatif kontrol olan SN'lerde değerlendirilen 30'ar hücrede %33,3 ve %23,3 oranlarında heterozigot delesyon saptanırken, pozitif kontrol olan nodüler malign melanomlarda 1 vakada %10, diğer vakada %53,3 oranında heterozigot delesyon izlenmiştir. SMM'larda bu oran en az %3,3, en fazla %73,3'tür. AST'lerde ise en yüksek %76,6, en düşük %13,3 oranında heterozigot delesyon görülmüştür. Bu verilere göre 9p21 heterozigot delesyonunun tüm tanı

gruplarında değişen oranlarda görülebildiği ve literatürde de belirtildiği gibi maligniteyi gösteren bir belirteç olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bunun yanı sıra çalışmamıza dahil edilen vaka gruplarında immünohistokimyasal olarak p16 antikoruna uygulanmış ve sonuçlar 9p21 FISH bulgularıyla karşılaştırılmıştır. SMM'larda immünohistokimyasal olarak p16 ekspresyonu izlenen 4 vakanın yalnızca 1'inde (%25) 9p21 FISH pozitifliği görülmüştür. p16 difüz ekspresyon kaybı olan her 2 vaka da 9p21 FISH pozitifdir. AST vakalarında ise 26 vakada p16 antikoruna ile pozitiflik saptanmış, bu vakaların 9'u (%34,6) 9p21 FISH pozitif olarak izlenmiştir. p16 antikoruna ile difüz ekspresyon kaybı görülen 5 vakanın 4'ü (%75) 9p21 FISH ile negatiftir. Bu sonuçlar ile vakaların büyük çoğunluğunda p16 immünohistokimya sonuçları ile 9p21 FISH sonuçlarının korelasyon gösterdiği söylenebilir.

Daha önce de belirtildiği gibi çalışmamızda klasik melanoma FISH problemleri ile SMM'lerin 8'inde (%80), AST'lerin 22'sinde (%56,4) pozitiflik saptanmıştır. Bu pozitiflik SMM'lerin tamamında AST'lerin 21'inde (%53,8) 6q23 (MYB) delesyonu (MYB/CEP6 oranının 1 den küçük olduğu >%40 hücre) kriteri ile sağlanmıştır. 1 AST vakasında 6p25 (RREB-1) lokusunda gen kazanımları izlenmiştir. Bu konu ile ilgili North ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre 378 spitzoid lezyona klasik melanom FISH paneli uygulandığında %72 oranla 6q23 delesyonunun en sık görülen kromozomal değişiklik olduğu saptanmıştır (98). Bizim alışmamızda da bu literatüre paralel olarak en sık görülen kromozomal değişiklik 6q23 gen delesyonu olarak izlenmiştir. Shen ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada ise klasik melanom FISH ve 9p21 FISH panelleri uygulanan 75 spitzoid melanositik lezyondan 24'ünde izole 6q23 delesyonu gözlenmiştir. Bu vakaların 11'ine SLNB uygulanmış, 6 tanesinde metastaz izlenmiştir. Ancak hiçbir vakada non-sentinel lenf nodu metastazı, uzak metastaz ya da nüks bulgusu saptanmamıştır. Bu nedenle Yazdan ve ark. gibi 6q23 delesyonu gösteren spitzoid lezyonların prognozunun daha iyi olacağı hatta AST grubunda kromozomal anomali göstermeyen vakalardan farkının olmayacağı sonucuna varılmıştır (134). Aynı çalışmada 6q23 delesyonu gösteren vakaların histopatolojik özellikleri incelenmiş, bu kromozomal anomali ile istatistiksel olarak anlamlı uyum gösteren histopatolojik bulguların minimal pagetoid yayılım (p:0,004), ekspansif nodül varlığı (p:0,08) ve fokal ülserasyon (p:0,19) olduğu vurgulanmıştır (133).

Çalışmamızda eşik değer olan %40'ı aşarak FISH pozitif olarak kabul edilen ve izole 6q23 delesyonu ile giden 21 AST, 8 SMM vakasında nüks ya da metastaz bulgusunun

görülmemesi, bu kromozomal anomalinin iyi prognoza işaret ettiğini destekler niteliktedir. Ancak çalışmamızdaki klasik melanom FISH sonuçları ile histopatolojik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek bir bağlantı saptanamamıştır.

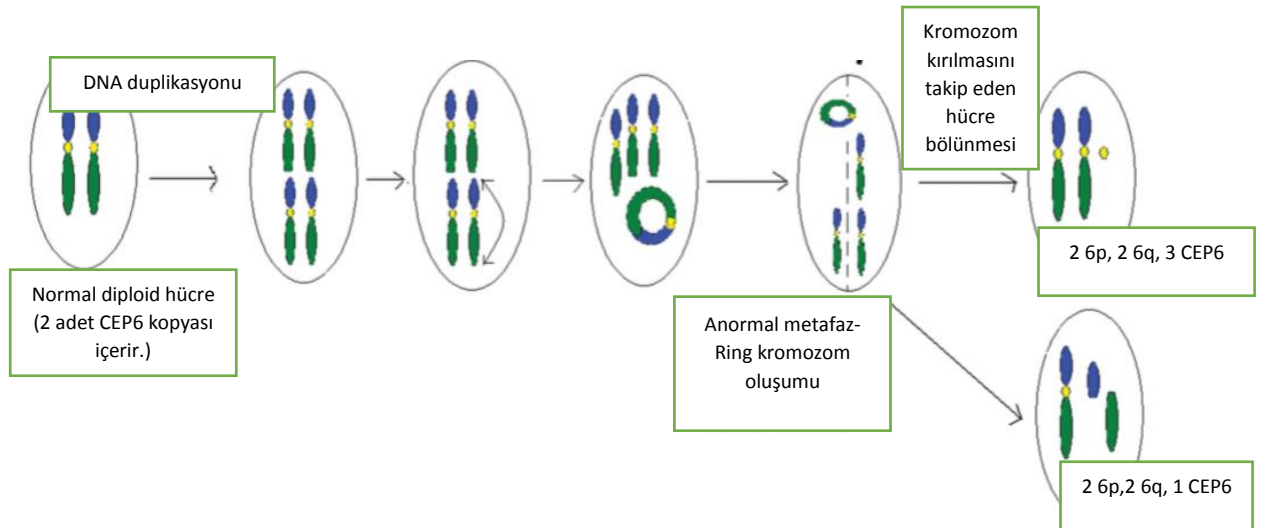
Shen ve ark.'nın yaptığı çalışmada dikkat çekilen başka bir konu ise 6q23 delesyonunun ortaya çıkış mekanizmalarıdır. Konu ile ilgili 3 adet farklı patern tanımlamışlardır.

*Patern 1: RREB-1, CCND1 ve CEP6 sinyalleri beklendiği gibi her hücrede 2'şer adet seçilirken MYB sinyali 1 tane seçilmekte ya da hiç seçilememektedir. (Gen delesyonuna bağlı) (En sık görülen patern)

*Patern 2: RREB-1, CCND1 ve CEP6 sinyalleri 4'er tane seçilebilmekte iken 2 adet MYB sinyali seçilebilmektedir. (Hücre bölünmek için DNA miktarını 2 katına çıkarmakta ancak hücre yaşlanma mekanizmaları nedeni ile bölünememektedir. Bu sırada gen delesyonu nedeni ile 1 kopya içeren MYB lokusu da 2 katına çıkarak 2 sinyal oluşturmaktadır.)

*Patern 3: 3 adet CEP6 sinyali seçilirken 2 adet MYB sinyali seçilebilmektedir (Ring kromozom oluşumu) (Resim 21).

Resim 21: Ring kromozom oluşumu

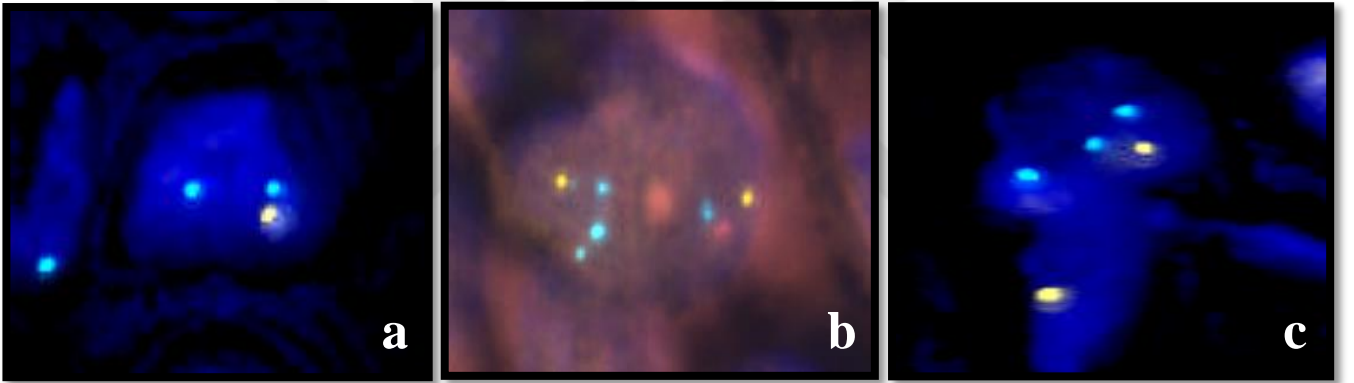


Bu paternde, normal diploid safhadaki bir hücre bölünme için DNA miktarını iki katına çıkardığı anda 6. kromozomlardan birinin iki ucundaki telomerler, telomeraz aktivitesini kaybederek birbiri ile bağlanır. Böylece telomerleri bağlanan kromozom halka şeklini alarak ring kromozom oluşturur. Bölünme sırasında bu ring kromozom kırılır ve sentromerik bölgesi

diğer 2 normal kromozomun bulunduğu hücrede, kırık 6p ve 6q uçları diğer normal kromozomun bulunduğu hücrede kalacak şekilde bölünme gerçekleşir (133).

Bahsedilen her 3 sinyal paterni de çalışmamızda gözlemlediğimiz sinyal paternleridir (Resim 22). AST vakalarının tümünde (%100) Patern 1, 32'sinde (%82,05) Patern 3, 18'inde (%46,15) Patern 2 saptanmıştır. SMM'lerin tamamında (%100) Patern 1, 9'unda (%90) Patern 3, 3'ünde (%30) Patern 2 görülmüştür. Negatif kontrol olan SN'lerde ise Patern 1 için bu oran %100, Patern 3 için %100, Patern 2 için %50 olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olan nodüler malign melanomlarda ise 6q23 delesyonu izlenen hücrelerin tamamında Patern 1 saptanmıştır. Bahsedilen çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da en sık görülen Patern 1 olarak kaydedilmiştir.

Resim 22: Çalışmamızda görülen 6q23 delesyon paternleri a)Patern 1, b)Patern 2, c)Patern 3



Bu sinyal paternlerinin oluşumundan da anlaşılacağı gibi poliploidi spitz tümörlerde yüksek oranda görülen bir genetik değişiklik olarak karşımıza çıkmaktadır. Poliploidi en az %30 oranında, her hücrede 3 yada daha fazla somatik kromozom kopya sayısının varlığını, X kromozomu için ise kadınlarda 3 ya da daha fazla, erkeklerde 2 ya da daha fazla sayıda bulunmasını ifade eder (111). Konu ile ilgili ilk olarak Gerami ve ark. SN'lerde %10-14 oranında tetraploidi görüldüğünü ifade etmişlerdir (137). Isaac ve ark.'nın 41 SN kullanarak yaptığı çalışmada 4 vakada poliploidi saptanmış, bu 4 vakanın 3'ünün aynı hastaya ait olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre yazarlar poliploidinin FISH değerlendirmesinde zorlayıcı bir unsur olduğundan ve multipl SN görülen hastalarda "genetik imza" olarak karşımıza çıkabileceğinden söz etmişlerdir. Aynı zamanda poliploidi gösteren hücrelerin benign, borderline ve malign hücrelerde bulunabileceğini, malignite açısından belirleyici olmadığını

vurgulamışlardır (98). Martin ve ark.'nın çalışmasında ise 51 SN kullanılmış ve 19 SN'de FISH ile saptanabilen genetik anomalilerin bulunduğu gösterilmiştir. Bu SN'lerin yalnızca 4'ü poliploidi göstermemektedir. Bu çalışmaya göre poliploidinin en sık görülen FISH anomalisi olduğu sonucuna varılmıştır (138). Bununla birlikte spitzoid lezyonlarda poliploidinin %26'ya varan oranlarda yanlış FISH pozitifliklerine yol açtığı da bildirilmektedir (104).

Bizim çalışmamızda ise negatif kontrol olan SN grubunda klasik melanom FISH problemleri ile yapılan incelemede, 1 vakada 4 hücre triploidi, 1 hücrede tetraploidi, diğer vakada 2 hücrede tetraploidi gözlenmiştir. Pozitif kontrol olan nodüler malign melanomlarda ise klasik melanom FISH problemleri ile poliploidi saptanmamıştır. SMM'larda 9 vakada (%90) poliploidi izlenmiştir. AST grubunda ise 32 vakada (%82,05) triploidi, 18 vakada (%46,15) tetraploidi saptanmıştır. 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışmada ise negatif kontrol olan SN'lerde 1 vakada 7 triploidi gösteren hücre, diğer vakada 5 triploidi, 1 tetraploidi gösteren hücre saptanmıştır. Pozitif kontrol olan nodüler malign melanomlarda 9p21 FISH problemleri ile yapılan çalışmada 1 vakada heterozigot delesyon gösteren hücrelerin %3,33'ünde, normal FISH profili gösteren hücrelerin %13,3'ünde triploidi görülmüştür. Diğer vakada homozigot delesyon gösteren hücrelerin %20'sinde, heterozigot delesyon gösteren hücrelerin %13,3'ünde triploidi izlenmiştir. Çalışma grubunda bulunan SMM'larda 7 vakada (%70) poliploidi saptanmıştır. AST grubunda ise 33 vakada (%84,6) triploidi, 23 vakada (%58,9) tetraploidi saptanmıştır. Bu bulgular ile bizim çalışmamızda da literatürde belirtildiği gibi triploidi ve tetraploidinin yüksek oranda görüldüğü söylenebilir. Buna ek olarak çalışmamızda her üç grupta da triploidi ve tetraploidi görülmesi, poliploidinin malignite açısından önem taşımadığını göstermektedir.

9p21 FISH probu ile yapılan çalışmada klasik melanom FISH probuna kıyasla daha fazla hücrede triploidi ve tetraploidi görülmüştür. Bu konu ile ilgili literatürde bilgi olmamakla birlikte, 9p21 FISH probunda sözü edilen değişikliklerin daha fazla gözlenmesi, daha önce de bahsedilen kesitleme sorunları (trunkasyon) ile açıklanabilir. Klasik melanom FISH problemlerinde 4 ayrı gen lokusu ve 2 kromozomun incelenmesi, 2 gen lokusu ve 1 kromozomun incelendiği 9p21 FISH probuna göre daha fazla kesitleme sorunu yaratabilmektedir. Bu şekilde FISH incelemesine yansıyan materyal kaybı nedeniyle görülebilecek gen değişikliklerinin, klasik melanom FISH problemleri ile yapılan incelemede daha belirgin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda klasik melanom FISH problemleri ve 9p21 FISH probu ile elde edilen veriler, klinik ve histopatolojik veriler ile karşılaştırılmıştır. Bu konuda literatürdeki bilgiler daha çok FISH sonuçlarının prognoz üzerine etkisi ile ilgili olarak verilmiştir. Yaş, cinsiyet, lokalizasyon, süre, çap, klinik takip süresi ve genel durum gibi klinik veriler ile klasik melanom FISH problemleri kullanılarak yaptığımız karşılaştırmalı analiz sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır. Bununla birlikte aynı klinik veriler 9p21 probu ile yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, çap parametresi ile anlamlı fark (p:0,031) izlenmiştir. Bu sonuca göre çap arttıkça 9p21 FISH pozitiflik oranının da arttığı sonucuna varılmıştır. Busam ve ark.'nın 75 AST kullanılarak yaptığı araştırmada 9p21 FISH pozitifliği ile klinik verilerin kıyaslanmasında, 9p21 FISH incelemesi ile eşik değerin üzerinde homozigot delesyon gösteren 8 vakanın 6'sında nüks, uzak metastaz ve hastalığa bağlı ölüm gibi tümör progresyonuna ait bulgular saptanarak, istatistiksel olarak en güçlü korelasyonun bu bulgular ile olduğu tespit edilmiştir (p:0,001) (3). Çalışmamızda ise homozigot delesyonun prognostik önemi gösterilememiştir. Ancak vaka sayımızın azlığı ve takip sürelerinin bir çok vakada 5 yılın altında oluşu göz önüne alınmalıdır.

Çalışmamızda klasik melanom FISH problemleri ile yapılan analiz sonuçları ile histopatolojik veriler kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Aynı veriler 9p21 probu ile yapılan FISH analiz sonuçları ile karşılaştırıldığında ise, mitozun yerleşim yeri (p:0,029) ile anlamlı fark saptanmış olup, derin yerleşimli mitoz varlığı ile 9p21 FISH pozitifliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Epidermal "consumption" (p:0,066) ve mitoz sayısı (p:0,05) parametreleri ile de istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da, gözlemsel olarak 9p21 FISH pozitifliğinin artma eğiliminde olduğu görülmüştür. Yine Busam ve ark.'nın yaptığı araştırmada (3) 9p21 probuyla histopatolojik verilerin karşılaştırmalı analizinde de en güçlü korelasyonun mitoz sayısı ile (p:0,03) olduğu belirtilmiştir. Bu anlamda da mitoz sayısının artmasıyla 9p21 FISH pozitiflik oranının artma eğiliminde olması konusunda bulgularımız literatür verisi ile uyum göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda her iki FISH probu birlikte kullanılarak elde edilen bulguların, klinik ve histopatolojik veriler ile karşılaştırması sonucunda, 9p21 probu ile yapılan kıyaslamaya benzer olarak, klinik parametrelerden çap (p:0,071) ve histopatolojik parametrelerden derin yerleşimli mitozun (p:0,075) varlığı ile, her iki prob ile uygulanan FISH pozitifliğinin artma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Bu konu ile ilgili Massi ve ark.'nın 18 yaş altı vakalarda 50 AST ve 20 SN kullanarak yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak klasik melanom FISH pozitifliği ile nükleer pleomorfizm (p:0,02) ve artmış nükleus/sitoplazma oranı (p:0,01) arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum

saptanmıştır. Ayrıca 9p21 FISH probu ile histopatolojik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum gözlenmemiştir (7).

Elde edilen bu bulguların yanı sıra çalışmamızda sitolojik atipi/pleomorfizm ve subkutan yağ doku tutulumu parametreleri ile klasik melanom FISH ve 9p21 FISH pozitifliği açısından istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Sitolojik atipi/pleomorfizm için hafif atipi gösteren 15, orta derecede atipi gösteren 19, belirgin atipi gösteren 14, atipi göstermeyen 1 vaka bulunmaktadır. Subkutan yağ dokusu tutulumu için ise tutulumun görüldüğü 1, görülmediği 43 vaka bulunmakta olup, 5 vaka için değerlendirme yapılamamıştır. Bu durumda her iki parametre için de bahsedilen dağılım gruplarının birer tanesinde vaka sayısı 1 olarak izlenmiştir. 1 vakanın FISH ile ilişki değerlendirmesi mümkün olmayacağından, bu iki parametre için istatistiksel olarak sonuç alınamamıştır.

Sonuç olarak; spitzoid lezyonlarda, diğer melanositik lezyonlarda olduğu gibi, altın standart histopatolojik inceleme olmasına karşın SN ve SMM ayırımı problemli olabilir. Özellikle benign, malign ve borderline spitzoid lezyonların doğru tanısı ve prognoz açısından değerlendirmesi için yardımcı tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bir çok spitzoid lezyonda tedavi için eksizyon ve SLNB yeterli olmakta iken, agresif seyredebilecek vakaların belirlenmesi ve tedavi stratejilerinin bu verilere göre yönlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile tanı doğruluğu arttırılmaya çalışılmakta ve risk kategorilerinin doğru biçimde belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmamızda hastalık nedeni ile ölüm görülen vaka bulunmamakla birlikte 9p21 homozigot delesyonu görülen 1 vakada bölgesel lenf nodu metastazı saptanması nedeniyle özellikle AST grubunda tedavi öncesi 9p21 probu ile gen değişikliklerinin araştırılması ve tedavi modalitesinin seçilirken bu verilerin de dikkate alınması gerektiği kanısına varılmıştır. Bununla birlikte hem SMM'larda hem de AST'lerde klasik melanom FISH problemleri ile yapılan çalışmada pozitif saptanan vakalarda büyük oranda MYB gen delesyonu izlenmiştir. MYB gen delesyonu izlenen vakalar düşük risk grubunda bulunmaktadır. Bu nedenlerle klasik melanom FISH ve 9p21 FISH ile tespit edilen genetik değişikliklere ait bilgilerin doğru risk grubunu belirlemede büyük önem taşıdığı sonucuna varılmıştır. Risk gruplarının doğru bir biçimde değerlendirilmesi ile, yüksek riskli hastalarda yetersiz, düşük riskli hastalarda ise agresif tedavi uygulamalarının önüne geçilecektir.

Bu nedenler ile arada kalınan vakalarda öncelikle doğru bir histopatolojik değerlendirme yapılmalı, burada elde edilen veriler de çeşitli immünohistokimyasal ve moleküler testlerle desteklenmelidir. Bu sayede doğru tedavi modalitelerinin uygulanabilmesi mümkün olacaktır.



7.SONUÇ

Spitzoid lezyonların morfolojik tanısında gözlemciler arası farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte vakaların büyük çoğunluğunda prognozun iyi olduğu ve az miktarda vakada agresif klinik seyir görüldüğü ortaya konmaktadır. Bu nedenle doğru tanı ve tedavi için yardımcı tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada histopatolojik tanıya ek olarak kullanılabilecek klasik melanom FISH ve 9p21 FISH yöntemleri, AST ve SMM vakalarına uygulanmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar klinik ve histopatolojik veriler ile kıyaslanmış, FISH bulguları ile bu veriler arasında anlamlı uyum varlığı araştırılmıştır.

Literatür verileri değerlendirildiğinde, spitzoid lezyonlarda malign davranışı ortaya koymada klasik melanom FISH yönteminin tek başına sensitivite ve spesifite değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. Klasik melanom FISH problemlerine, 9. kromozomu içeren bir başka prob eklendiğinde ise sensitivite ve spesifite değerleri yükselmektedir. Benzer olarak çalışmamızda da yalnızca klasik melanom FISH problemleri ile uygulanan analizde pozitif olan vaka sayısı, her iki prob grubu birlikte uygulandığında pozitif olarak değerlendirilen toplam vaka sayısından düşük olarak izlenmiştir. Bu nedenle spitzoid lezyonların tanı ve prognoz değerlendirmesinde her iki prob grubunun birlikte uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

9p21 probu ile yapılan değerlendirmelerde heterozigot delesyonun sık görülen bir FISH anomalisi olduğu ve hem malign hem de benign lezyonlarda görülebildiği izlenmiştir. Bu konuda literatür bilgileri de bulgularımızı desteklemektedir.

Yapılan çalışmalarda klasik melanom FISH problemleri ile eşik değer olan %40'ı aşan 6q23 gen delesyonu izlenerek pozitif kabul edilen vakaların iyi prognoz gösterdiği ve düşük risk grubunda bulunduğu bahsedilmektedir. Bizim çalışmamızda da vakaların büyük çoğunluğu 6q23 gen delesyonu göstererek FISH pozitif olarak kabul edilmiştir. Klinik veriler dikkate alındığında uzak metastaz, nüks ve hastalık nedeni ile ölüm görülen vakamız bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığında elde ettiğimiz verilerin literatür bilgileri ile uyum gösterdiği kanısına varılmıştır.

Konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde spitzoid lezyonlarda yüksek oranda poliploidi saptandığı görülmüştür. Çalışmamıza dahil olan tüm vaka gruplarında değişen oranlarda triploidi ve tetraploidi saptanması literatür verilerini destekler niteliktedir.

Klasik melanom FISH ve 9p21 FISH yöntemleri ile elde ettiğimiz sonuçların klinik ve histopatolojik bulgular ile kıyaslanmasında 9p21 FISH pozitifliği ile en güçlü korelasyonun klinik olarak çap, histopatolojik olarak derin yerleşimli mitoz parametreleri ile olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 9p21 FISH pozitifliğinin epidermal “*consumption*” varlığı ve mitoz sayısının artışı ile artma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde her iki prob grubu birlikte uygulandığında FISH pozitifliğinin aynı parametreler ile istatistiksel olarak olmasa da gözlemsel olarak uyum gösterdiği izlenmiştir. Klasik melanom FISH sonuçları tek başına değerlendirildiğinde ise klinik ve histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum görülmemiştir. Literatürde benzer şekilde yapılan kıyaslamalarda klinik olarak kötü prognoz bulgularının varlığı (uzak metastaz, nüks, hastalığa bağlı ölüm), histopatolojik olarak mitoz sayısının artışı, artmış nükleus/sitoplazma oranı ve belirgin nükleer pleomorfizmin klasik melanom FISH pozitifliği ile istatistiksel olarak uyumlu olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak moleküler genetik alanında bilgi birikiminin artması, spitzoid lezyonlarda doğru tanı, risk grubu değerlendirmesi ve doğru tedavi modalitelerinin seçilmesi konusunda büyük yarar sağlamaktadır. Devam eden çalışmalarla spitzoid lezyonlardaki moleküler değişiklikler daha da aydınlatılacak, gelecekte daha ileri tanı ve tedavi stratejilerinin oluşmasına imkan sağlayacaktır.

8.CONCLUSION

It is known that there are differences among the observers in the morphological diagnosis of Spitzoid lesions. However, the vast majority of cases have good prognosis and small number of cases have aggressive clinical course. Therefore, ancillary techniques for correct diagnosis and treatment are needed.

In this study, conventional melanoma FISH and 9p21 FISH methods which can be used in addition to histopathological diagnosis were applied to AST and SMM cases and the results were recorded. The results were compared with clinical and histopathologic data, and a significant correlation between FISH findings and that data were investigated.

When the literature data evaluated, it is seen that sensitivity and specificity values of conventional melanoma FISH alone are low in establishing malignant behavior in spitzoid lesions. Sensitivity and specificity values increase when conventional melanoma FISH probes are performed with another probe containing the 9th chromosome. Similarly, in our study, the number of positive cases in the analysis performed with conventional melanoma FISH probes was lower than the number of cases that were reported as positive when both groups of probes were applied together. Therefore, it has been concluded that both probe groups should be applied together for the diagnosis and prognosis evaluation of spitzoid lesions.

In the evaluations made with the 9p21 probe, heterozygous deletion were observed as a common FISH anomaly and seen in both malignant and benign lesions. Literature information also supports our findings.

In the previous studies, the cases with 6q23 gene deletion exceeding 40% threshold value with conventional melanoma FISH probes and reported as positive have good prognosis and are in low risk group. In our study, the majority of cases were considered FISH positive by showing 6q23 gene deletion. Considering clinical data, we do not have cases with distant metastasis, recurrence, and disease related death. That information comes to the conclusion that the data we obtain, correspond to the literature information.

When studies on this subject were examined, it was seen that polyploidy were detected in high proportion of spitzoid lesions. The presence of triploidy and tetraploidy in all cases with varying proportions in our study supports the literature. In comparison of clinical and histopathological findings with conventional melanoma FISH and 9p21 FISH methods, the strongest correlation with 9p21 FISH positivity was found to be clinically with the diameter

of lesion and histopathologically with deeply located mitoses. However, 9p21 FISH positivity was found to increase with epidermal "*consumption*" presence and increasing number of mitoses. Similarly, when both groups of probes were applied together, FISH positivity was observed to be not statistically but observationally compatible with the same parameters. When conventional melanoma FISH results were evaluated alone, there was no statistically significant correlation between clinical and histopathological findings. In the literature, the presence of clinically poor prognostic findings (distant metastasis, recurrence, disease-related death), histopathologically increasing number of mitoses, increased nucleus/cytoplasm ratio and prominent nuclear pleomorphism were found statistically consistent with conventional melanoma FISH positivity.

In conclusion, increased knowledge in the field of molecular genetics have great benefits in the diagnosis of spitzoid lesions, assessment of risk groups and selection of the right treatment modalities. Ongoing studies will elucidate the molecular changes in spitzoid lesions, allow for further diagnosis and treatment strategies in the future.



9.KAYNAKÇA

1. Spitz S. Melanomas of childhood. *Am J Surg Pathol.* 1948;24(3):591-609.
2. Mones JM., Ackerman AB. "Atypical" Spitz's nevus, malignant Spitz's nevus and "metastasizing" Spitz's nevus: a critique in historical perspective of three concepts flawed fatally. *Am J Dermatopathol.* 2004 Aug;26(4):310-333.
3. Gerami P., Scolyer RA., Xu X., Elder DE., Abraham RM., Fullen D., et al. Risk assesment for atypical spitzoid melanocytic neoplasms using FISH to identify chromosomal copy number aberrations. *Am J Surg Pathol.* 2013 May;37(5):676-684.
4. Ko CB.,Walton S., Wyatt EH., Bury HP. Spitz nevus. *Int J Dermatol.* 1993;32(5):354-357.
5. Weedon D., Little JH. Spindle and epithelioid cell nevi in children and adults: a review of 211 cases of the Spitz nevus. *Cancer.* 1977 Jul;40(1):217-225.
6. Murali R., Sharma RN., Thompson JF. Sentinel lymph node biopsy in histologically ambiguous melanocytic tumors with spitzoid features (so-called atypical spitzoid tumors.). *Ann Surg Oncol.* 2008;15(1):302-309.
7. Massi D., Tomasini C., Senetta R., Paglierani M., Salvianti F., Errico ME., et al. Atypical Spitz tumors in patients younger than 18 years. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Jan;72(1):37-46.
8. Situm M., Balanca Z., Buljan M., Tomas D., Ivancic M. Nevus Spitz-everlasting diagnostic difficulties-the review. *Coll Antrapol.* 2008 Oct;32(2):171-176.
9. Helwig EB. Seminar on skin neoplasms and dermatoses. In *Proceedings of the Twentieth Seminar of the American Society of Clinical Pathologists.* 1955 Sept;63-67.
10. Helwig EB. Malignant melanoma in children. Health Memorial Award Lecture. *Year Book Medical Publishers,Inc.;*1975:11-26.
11. Huarte PS. Nevus atypico de Spitz (melanoma Juvenil) studio clinicopatologica de nueve casos. *Actas Dermosefilogr.* 1969;61:205-224.
12. Reed RJ., Ichinose H., Clark WH. Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas. *Semin Oncol.* 1975;2:119-127.
13. Palazzo J., Duray PH. Typical, dysplastic, congenital and Spitz nevi. *Hum Pathol.* 1989;20:341-346.
14. Smith KJ., Barrett TL., Skelton HG. Spindle cell and epithelioid cell nevi with atypia and metastasis (malignant Spitz nevus). *Am J Surg Pathol.* 1989;13:931-939.

15. Barnhill RL., Barnhill MA., Berwick M. The histologic spectrum of pigmented spindle cell nevus:A review of 120 cases with emphasis on atypical variants. *Hum Pathol.* 1991;22:52-58.
16. Casso EM.,Grin-Jorgensen CM., Grant-Kels JM., Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27:901-903.
17. Barnhill RL. Melanocytic nevi and tumor progression:Perspectives concerning histomorphology, melanoma risk and molecular genetics. *Dermatol.* 1993;187:86-90.
18. Perkocha LA. Classification of melanoma in adults and children. *Pathol.* 1994;2:299-338.
19. Barnhill RL., Florette TJ., Fleischli M. Cutaneous melanoma and atypical Spitz tumors in childhood. *Cancer.* 1995;76:1833-1845.
20. Busam KJ., Barnhill RL. Pagetoid Spitz nevus. *Am J Surg Pathol.* 1995;19:1061-1067.
21. Crotty KA. Spitz's naevus:Histological features and distinction from malignant melanoma. *Australas J Dermatol.* 1997;8:49-53.
22. Spatz A., Colonje E., Handfield Jones S. Spitz tumors in children: a grading system for risk stratification. *Arch Dermatol.* 1999;135:282-285.
23. Shimek CM., Golitz LE. The golden anniversary of the Spitz nevus. *Arch Dermatol.* 1999;135:333-335.
24. Barnhill RL., Argenzy ZB., From L. Atypical Spitz nevi/tumors:Lack of consensus of diagnosis, discrimination from melanoma and prediction of outcome. *Hum Pathol.* 199;30:515-520.
25. Edwards SL., Blessing K. Problematic pigmented lesions:Approach to diagnosis. *J Clin Pathol.* 2000;53:409-418.
26. Crawson AN., Magro CM., Mihm MC. The Melanocytic Proliferations:A Comprehensive Textbook of Pigmented Lesions. New York:Wiley-Liss,Inc. 2001;163:483-484.
27. Ackermann AB., Mones JM. Resolving Quandaries in Dermatology, Pathology and Dermatopathology, second volume. New York:Ardor Scribendi;2001.
28. Fabrizi G., Massi G. Spitzoid malignant melanoma in teenagers:andentity with no better prognosis than that of other forms of melanoma. *Histopathology.* 2001;38:448-453.
29. Van Dijk MRCF., Rombout PDM., Mooi KJ. Allelic imbalance in the diagnosis of benign and malignant Spitz tumors. *J Pathol.* 2002;197:170-178.

30. Gurbuz Y., Apaydin R., Muezzinoğlu M. A current dilemma in histopathology: Atypical Spitz tumor or spitzoid melanoma? *Pediatr Dermatol.* 2002;19:99-102.
31. Le Boit P. "Safe Spitz" and its alternatives. *Pediatr Dermatol.* 2002;19:163-165.
32. Lazzeri D., Pieroni M., De Rosa M., Agostini T. Atypical Spitz tumour with positive sentinel lymph node. *J Plast Surg Hand Surg.* 2013 Jun;47(3):234-237.
33. Cerrato F., Wallins JS., Webb ML., Mc Carthy ER., Schmidt BA., Labow BL. Outcomes in pediatric atypical Spitz tumors treated without sentinel lymph node biopsy. *Pediatr Dermatol.* 2012 Jul-Aug;29(4):448-453.
34. Ludgate MW., Fullen DR., Lee J., Lowe L., Bradford C., Gieger J, et al. The Atypical Spitz Tumor of Uncertain Biologic Potential A Series of 67 Patients From a Single Institution. *Cancer.* 2009;115:631-641.
35. Paniago-Pereira C., Maize JC., Ackerman AB. Nevus of large spindle and/or epithelioid cells (Spitz's nevus). *Arch Dermatol.* 1978;114(12):1811-1823.
36. Mooi WJ. Spitz nevus and its histologic simulators. *Adv Anat Pathol.* 2002 Jul;9(4):209-212.
37. Kaye VN., Dehner LP. Spindle and epithelioid cell nevus (Spitz nevus). Natural history following biopsy. *Arch Dermatol.* 1990 Dec;126(12):1581-1583.
38. Coskey RJ., Mehregan A. Spindle cell nevi in adults and children. *Arch Dermatol.* 1973 Oct;108(4):535-536.
39. Dawe RS., Wain Wright NJ., Ewans AT., Lowe JG. Multiple widespread eruptive Spitz naevi. *Br J Dermatol.* 1998 May;138(5):872-874.
40. Akasaka T., Imamura Y., Kon S. Multiple aggregated juvenile melanoma arising on a hyperpigmented macule. *J Dermatol.* 1993 Oct;20(10):638-642.
41. Barnhill PL. Malignant melanoma, dysplastic melanocytic nevi and Spitz tumors. Histologic classification and characteristic. *Clin Plast Surg.* 2000 Jul;27(3):331-360.
42. Walsh N., Crotty K., Palmer A., Mc Carthy S. Spitz nevus versus spitzoid malignant melanoma: an evaluation of the current distinguishing histopathologic criteria. *Hum Pathol.* 1998 Oct;29(10):1105-1112.
43. Mones JM., Ackerman AB. Melanomas in prepubescent children: review comprehensively, critique historically, criteria diagnostically and course biologically. *Am J Dermatopathol.* 2003 Jun;25(3):223-238.
44. Brodel RT., Santa-Cruz DJ. Borderline and atypical melanocytic lesions. *Semin Diagn Pathol.* 1985 Feb;2(1):63-86.

45. McCormak CJ., Conyers RK., Scolyer RA., Kirkwood J., Speakman D., Wang N., et al. Atypical Spitzoid neoplasms:a review of potential markers of biological behavior including sentinel node biopsy. *Melanoma Res.* 2014 Oct;24(5):437-447.
46. Elder DE., Murphy GF. Benign melanocytic tumors (nevi). *Atlas of tumor pathology.* Washington DC:Armed Forces Institute of Pathology. 1991:40-49.
47. Busam KJ., Barnhill RL. Pagetoid Spitz Nevus:Intraepidermal Spitz tumor with prominent pagetoid spread. *Am J Surg Pathol.* 1999 Sep;19(9):1061-1067.
48. Cochran AJ. Melanocytic tumors. *Philedelphia Lippincott-Raven* 1997:136.
49. Wesselmann U., Becker LR., Bröcker EB., Le Boit PE., Bastian BC. Eosinophilic globules in Spitz nevi:no evidence for apoptosis. *Am J Dermatopathol.* 1998 Dec;20(6):551-554.
50. Mihm MC., Googe PB. Problematic pigmented lesions. *Philedelphia:Lea&Febiger.* 1990:25-35.
51. Howat AJ., Variend S. Lymphatic invasion in Spitz nevi. *Am J Surg Pathol.* 1985 Feb;9(2):125-128.
52. Aktepe F., Demir Y., Fırat P. Desmoplastik Spitz nevüs:bir olgu sunumu. *Türk Patoloji Dergisi* 2001;17(1-2):52-53.
53. Barnhill RL., Fandrey K., Levy MA., Mihm MC., Hyman B. Angiogenesis and tumor progression of melanoma.Quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest.* 1992 Sep;67(3):331-337.
54. Choi JH., Sung KJ., Koh JK. Pigmented epithelioid cell nevus:a variant of Spitz nevus? *J Am Acad Dermatol.* 1993 Mar;28(3):497-498.
55. Suster S. Hyalinizing spindle and epithelioid cell nevus.A study of five cases of a distinctive histologic variants of Spitz's nevus. *Am J Dermatopathol.* 1994 Dec;16(6):593-598.
56. Soyer HP., Breier F., Cerroni L., Kerl H. 'Tubular' structures within melanocytic proliferations:a distinctive morphologic finding not restricted to Spitz nevi. *J Cutan Pathol.* 1999 Jul;26(6):315-317.
57. Aloï F., Tomasini C., Pippione M. Agminated Spitz nevi occuring within a congenital speckled lentiginous nevus. *Am J Dermatopathol.* 1995 Dec;17(6):594-598.
58. Okun MR. Melanoma resembling spindle and epithelioid cell nevus. *Arch Dermatol.* 1979 Dec;115(12):1416-1420.
59. Le Boit PE. Pictures of a unicorn? *Am J Dermatopathol.* 2003 Feb;25(1):88-91.
60. Kamino H. Spitzoid melanoma. *Clin Dermatol.* 2009 Nov-Dec;27(6):545-555.

61. Bastian BC., Wesselmann U., Pinkel D., Le Boit PE. Molecular cytogenetics analysis of Spitz nevi shows clear differences to melanoma. *J Invest Dermatol.* 1999 Dec;113(6):1065.
62. Barnhill RL. The Spitzoid Lesion:rethinking Spitz tumors, atypical variants,'spitzoid melanoma' and risk assesment. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19:21-33.
63. Weisner T., Kutzner H., Cerroni L., Mihm MC. Busam KJ., Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology* 2016 Feb;48(2):113-131.
64. Busam KJ. Molecular pathology of melanocytic tumors. *Semin Diagn Pathol.* 2013 Nov;30(4):362-374.
65. Murali R., Wiesner T., Scolyer RA. Tumours associated with BAP-1 mutations. *Pathology.* 2013 Feb;45(2):116-126.
66. Carbone M., Ferris LK., Baumann F., Napolitano A., Lum CA., Flores EG., et al. BAP-1 cancer syndrome:malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma and MBAITs. *J Transl Med.* 2012 Aug 30;10:179.
67. Bastian BC., Le Boit PE., Pinkel D. Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol.* 2000 Sep;157(3):967-972.
68. Malumbrés M., Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;6:459-465.
69. Aoki Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat.* 2008;29:992-1006.
70. Castellano E., Santos E. Functional specificity of ras isoforms:so similar but so different. *Genes Cancer.* 2011 Mar;2(3):216-231.
71. Da Forno PD., Pringle JH., Fletcher A., Bamford M., Su L., Potter L., et al. BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumours and their possible pathogenetic significance. *Br J Dermatol.* 2009 Aug;161(2):364-372.
72. Busam KJ., Kutzner H., Cerroni L., Wiesner T. Clinical and pathologic findings of Spitz nevi and atypical spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol.* 2014 Jul;38(7):925-933.
73. Kiuri M., Jungbluth A., Kutzner H., Wiesner T., Busam KJ. Spitz tumors:Comparison of histological features in relationship to immunohistochemical stainig for ALK and NTRK-1. *Int J Surg Pathol.* 2016 May;24(3):200-206.

74. Yeh I., de la Fouchardiere A., Pissaloux D., Mully TW., Garrido MC., Vemula SS., et al. Clinical, histopathologic and genomic features of spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol.* 2015 May;39(5):581-591.
75. Wiesner T., He J., Yelensky R., Esteve-Puig R., Botton T., Yeh I., et al. Kinase fusions are frequent in spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun.* 2014;5:3116.
76. Horst BA., Terrano D., Fang Y., Silvers DN., Busam KJ. 9p21 gene locus in Spitz nevi of older individuals: absence of cytogenetic and immunohistochemical findings associated with malignancy. *Hum Pathol.* 2013 Dec;44(12):2822-2828.
77. Moore MW., Gasparini R. FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. *Diagn Pathol.* 2011 Aug 11;6:76.
78. Pardue ML., Gall JG. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1969 Oct;64(2):600-604.
79. John HA., Birnstiel ML.; Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969 Aug 9;223(5206):582-587.
80. Price CM. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Rev.* 1993 Jun;7(2):127-134.
81. Waye JS., Willard HF. Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 1987 Sep 25;15(18):7549-7569.
82. Kievits T., Devilee P., Wiegant J., Wapenaar MC., Cornelisse CJ., van Ommen GJ., et al. Direct nonradioactive in situ hybridization of somatic cell hybrid DNA to human lymphocyte chromosomes. *Cytometry.* 1990;11(1):105-109.
83. Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 1988 Nov;80(3):224-234.
84. Baumann JGJ., Pinkel D., Trask BJ., van der Ploeg M., Gray JE. *Flow cytogenetics.* Academic Press;1990:275-301.
85. Saiki RK., Scharf S., Faloona F., Mullis KB., Horn GT., Erlich HA., et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology.* 1992;24:476-480.
86. Nisson PE., Watkins PC., Menninger JC. Improved suppression hybridization with human DNA (COT-1 DNA) enriched for repetitive DNA sequences. *Focus.* 1992;13:42-45.

87. Puri PK., Ferringer TC., Tyler WB., Wilson ML., Kirchner HL., Elston DM. Statical analysis of the concordance of immunohistochemical stains with the final diagnosis in spitzoid neoplasms. *Am J Dermatopathol.* 2011 Feb;33(1):72-77.
88. Cho-Vega JH. A diagnostic algorithm for atypical spitzoid tumours:guidelines for immunohistochemical and molecular assesment. *Mod Pathol.* 2016 Jul;29(7):656-670.
89. Bergman R., Malkin L., Sabo E., Kerner H. MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:500-504.
90. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein:from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182:311-322.
91. Li LX., Crotty KA., Mc Carthy SW., Palmer AA., Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2000 Dec;22(6):489-495.
92. Bastian BC., Olshen AB., Le Boit PE. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol.* 2003;163(5):1765-1770.
93. Albertson DG., Collins C., Mc Cormick F. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* 2003;34(4):369-376.
94. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis:from fields to cancer. *Oncogene.* 2003;22(20):3081-3086.
95. Gerami P, Zembowich A. Update on flourescence in situ hybridization in melanoma:State of art. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Jul.;135(7):830-837.
96. North JP., Vetto JT., Murali R., White KP., White CR., Bastian BC. Assesment of copy number status of chromosomes 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2011 Aug;35(8):1146-1150.
97. Gerami P., Jewell SS., Morrison LE., Blondin B., Schulz J., Ruffallo T., et al. Flourescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2009 Aug;33(8):1146-1156.
98. North JP., Garrido MC., Kolaitis NA., Le Boit PE., Mc Calmont TH., Bastian BC. Flourescence in situ hybridization as an ancillary tool in the diagnosis of ambiguous melanocytic neoplasms:a review of 804 cases. *Am J Surg Pathol.* 2014 Jun;38(6):824-831.

99. Isaac AK., Lertsburapa T., Pathria MJ. Poliploidy in Spitz nevi: a not common karyotypic abnormality identifiable by fluorescence in situ hybridization . *Am J Dermatopathol.* 2010;32(2):144-148.
100. Gerami P., Mafee M., Lertsburapa T. Sensitivity of fluorescence in situ hybridization for melanoma diagnosis using RREB-1, MYB, Cep 6 and 11q13 probes in melanoma subtypes. *Arch Dermatol.* 2010;146(3):273-278.
101. Kerl K., Palmedo G., Wiesner T., Mentzel T., Rütten A., Scharer L. A proposal for improving multicolor FISH sensitivity in the diagnosis of malignant melanoma using new combined criteria. *Am J Dermatopathol.* 2012 Aug;34(6):580-585.
102. Gaiser T., Kutzner H., Palmedo G., Siegelin MD., Wiesner T., Bruckner T., et al. Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with clinical long-term follow up. *Mod Pathol.* 2010 Mar;23(3):413-419.
103. Pouryazdanparast P., Haghighat Z., Beilfuss BA., Guitart J., Gerami P. Melanocytic nevi with an atypical epithelioid cell component: clinical, histopathologic and fluorescence in situ hybridization findings. *Am J Surg Pathol.* 2011 Sep;35(9):1405-1412.
104. Zembowich A., Yang SE., Kafanas A., Lyle SR. Correlation between histologic assesment and fluorescence in situ hybridization using MelanoSITE in evaluation of histologically ambiguous melanocytic lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Dec;136(12):1571-1579.
105. Bello DM., Ariyan CE., Carvajal RD. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control.* 2013 Oct;20(4):261-281.
106. Yun J., Lee J., Jang J., Lee EJ., Jang KT., Kim JH., et al. KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in Korea. *APMIS* 2011 Jun;119(6):330-335.
107. Hansson J. Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 2010;685:134-145.
108. Gerami P., Li G., Pouryazdanparast P., Blondin B., Beilfuss B., Slenk C. A highly spesific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2012 Jun;36(6):808-817.
109. Gerami P., Jewell SS., Pouryazdanparast P., Wayne JD., Haghighat Z., Busam KJ., et al. Copy number gains in 11q13 and 8q24 are highly linked to prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Mol Diagn.* 2011 May;13(3):352-358.
110. Gammon B., Beilfuss B., Guitart J., Gerami P. Enhanced detection of spitzoid melanomas using fluorescence in situ hybridization with 9p21 as an adjunctive probe. *Am J Surg Pathol.* 2012 Jan;36(1):81-88.

111. Ferrara G., Vanna AC. Fluorescence in situ Hybridization for Melanoma Diagnosis: A Review and A Reappraisal. *Am J Dermatopathol.* 2016 Apr;38(4):253-269.
112. Busam KJ., Murali R., Pulitzer M., Mc Carthy SW., Thompson JF., Shaw HM., et al. Atypical spitzoid melanocytic tumors with positive sentinel lymph nodes in children and teenagers and comparison with histologically unambiguous and lethal melanomas. *Am J Surg Pathol.* 2009 Sep;33(9):1386-1395.
113. Egnatios GL., Ferringer TC. Clinical Follow-up of Atypical Spitzoid Tumours Analyzed by Fluorescence in situ Hybridization. *Am J Dermatopathol.* 2016 Apr;38(4):289-296.
114. Van Dijk MC., Aben KK., Van Hees F., Klaasen A., Blokx WA., Ruiter DJ., et al. Expert review remains important in the histopathological diagnosis of cutaneous melanocytic lesions. *Histopathology.* 2008 Jan;52(2):139-146.
115. Cerroni L., Barnhill RL., Elder D., Gottlieb G., Heenan P., Kutzner H., et al. Melanocytic tumors of uncertain malignant potential: results of a tutorial held at the XXIX Symposium of the International Society of Dermatopathology in Graz, October 2008. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar;34(3):314-326.
116. Vergier B., Prochazkova-Carlotti M., de la Fouchardiere M., Cerroni L., Massi D., De Giorgi V., et al. Fluorescence in situ hybridization, a diagnostic aid in ambiguous melanocytic tumors: European study of 113 cases. *Mod Pathol.* 2011 May;24(5):613-623.
117. Bogdan I., Burg G., Böni R. Spitz nevi display allelic deletions. *Arch Dermatol.* 2001 Nov;137(11):1417-1420.
118. Sini MC., Monca A., Cossu A., Budroni M., Botti G., Ascierto PA., et al. Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol.* 2008 Feb;158(2):243-250.
119. Gerami P., Wass A., Mafee M., Fang Y., Pulitzer MP., Busam KJ. Fluorescence in situ hybridization for distinguishing nevoid melanomas from mitotically active nevi. *Am J Surg Pathol.* 2009 Dec;33(12):1783-1788.
120. George E., Polissar NL., Wick M. Immunohistochemical evaluation p16INK4A, E-cadherin and cyclin D1 expression in melanoma and spitz tumors. *Am J Clin Pathol.* 2010 Mar;133(3):370-379.

121. Cesinaro AM., Schirosi L., Betelli S., Migaldi M., Maiorana A. Alterations of 9p21 analysed by FISH and MLPA distinguish atypical spitzoid melanocytic tumours from conventional Spitz's nevi but do not predict their biological behaviour. *Histopathology*. 2010 Oct;57(4):515-527.
122. Tetzlaff MT., Wang WL., Milless TL., Curry JL., Torres-Cabala CA., McLemore MS., et al. Ambiguous melanocytic tumors in a tertiary referral center: the contribution of fluorescence in situ hybridization (FISH) to conventional histopathologic and immunophenotypic analyses. *Am J Surg Pathol*. 2013 Dec;37(12):1783-1796.
123. Hayran M. Sağlık Araştırmaları için Temel İstatistik, yy, Hayran Yayıncılık. 2011;223.
124. Massi D., De Giorgi V., Mandala M. The complex management of atypical Spitz tumours. *Pathology*. 2016 Feb;48(2):132-141.
125. Moorey AL., Murali R., Mc Carthy SW., Mann GJ., Scolyer RA. Diagnosis of cutaneous melanocytic tumours by four-colour fluorescence in situ hybridization. *Pathology*. 2009;41(4):383-387.
126. Newman MD., Lertsburapa T., Mirzabeigi M., Mafee M., Guitart J., Gerami P. Fluorescence in situ hybridization as a tool for microstaging in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2009 Aug;22(8):989-995.
127. Clemente C., Bettio D., Venci A., Scopsi L., Rao S., Ferrari A., et al. A fluorescence in situ hybridization (FISH) procedure to assist in differentiating benign from malignant melanocytic lesions. *Pathologica*. 2009 Oct;101(5):169-174.
128. Fang Y., Dusza S., Jhanwar S., Busam KJ. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of melanocytic nevi and melanomas: sensitivity, specificity and lack of association with sentinel node status. *Int J Surg Pathol*. 2012 Oct;20(5):434-440.
129. Abosolo A., Vargas MT., Rios-Martin JJ., Trigo I., Arjona A., Gonzalez-Campora R. Application of fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in melanocytic lesions, using paraffin wax-embedded tissues and imprint-cytology specimens. *Clin Exp Dermatol*. 2012 Dec;37(8):838-843.
130. Wang L., Rao M., Fang Y., Hameed M., Viale A., Busam KJ., et al. A genome-wide high-resolution array-CGH analysis of cutaneous melanoma and comparison of array-CGH to FISH in diagnostic evaluation. *J Mol Diagn*. 2013 Sep;15(5):581-591.
131. Boi S., Leonardi E., Fasonella S., Contaloni C., Micciolo R. The four-color FISH probe in the diagnosis of melanocytic lesions. *Acad Dermatol Venerol*. 2010 Oct;24(10):1235-1236.

132. Gerami P., Cooper C., Bajaj S., Wagner A., Fullen D., Busam KJ., et al. Outcomes of atypical spitz tumors with chromosomal copy number aberrations and conventional melanomas in children. *Am J Surg Pathol.* 2013 Sep;37(9):1387-1394.
133. Shen L., Cooper C., Bajaj S., Liu P., Pestova E., Guitart J. Atypical spitz tumors with 6q23 deletions:a clinical, histological and molecular study. *Am J Dermatopathol.* 2013 Dec;35(8):804-812.
134. Yazdan P., Cooper C., Sholl LM., Busam KJ., RooleMaker A., Weitner BB., et al. Comperative analysis of atypical spitz tumors with heterozygous versus homozygous 9p21 deletions for clinical outcomes, histomorphology, BRAF mutation and p16 expression. *Am J Surg Pathol.* 2014 May;38(5):638-645.
135. Raskin L., Ludgate M., Iyer RK., Ackley TE., Bradford CR., Johnson TM., et al. Copy number variations and clinical outcome in atypical spitz tumors. *Am J Surg Pathol.* 2011 Feb;35(2):243-252.
136. Mason A., Wititsuwannakul J., Klump VR., Lott J., Lazova R. Expression of p16 alone does not differantiate between Spitz nevi and spitzoid melanoma. *J Cutan Pathol.* 2012 Dec;39(12):1062-1074.
137. Boone SL., Busam KJ., Marghoob AA., Fang Y., Guitart J., Martini M., et al. Two cases of multipl spitz nevi:correlating clinical, histologic and flourescence in situ hybridization findings. *Arch Dermatol.* 2011 Feb;147(2):227-231.
138. Martin V., Banfi S., Bordoni A., Leoni-Parvex S., Mazzucchelli L. Prescence of cytogenetic abnormalities in Spitz naevi:a diagnostic challenge for flourescence in situ hybridization analysis. *Histopathology.* 2012 Jan;60(2):336-346.