



## ARAŞTIRMA / RESEARCH

# Diyarbakır bölgesinde malign melanom hastalarının BRAF mutasyonu analizi

BRAF mutation analysis of malignant melanoma cases in Diyarbakır, Turkey

İbrahim İbiloğlu<sup>1</sup>, Ulaş Alabalkı<sup>1</sup>, Ayşe Nur Keleş<sup>1</sup>, Gülay Aydođdu<sup>1</sup>, Hüseyin Büyükbayram<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2020;45(4):1384-1392*

### Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to determine BRAF V600E mutation rates of malignant melanoma (MM) cases in the Diyarbakır region in this study to investigate the relationship between mutation rate of prognostic parameters. We also aimed to compare the results with values from west Turkey.

**Materials and Methods:** Between all cases of MM, including primary MM and metastatic MM diagnosed at Dicle University Medical Faculty Pathology Department between January 2014 and July 2019 were included. The BRAF V600E mutation results, which were studied with the real-time polymerase chain reaction (PCR) method, were compared with the prognostic parameters.

**Results:** In 93 patients with MM, the BRAF V600E mutation rate was 21.5% (n = 20). Trunk and head-neck tumors, cutaneous and mucosal tumors, Clark stage V tumors, tumors with a diameter of 0-2 mm, Ki-67 proliferation between 11-20%, non-ulcerous tumors, chronic sun exposure in a higher rate was detected.

**Conclusions:** BRAF mutations in Diyarbakır region were found to be lower than the value in the region in the west of Turkey. We think that the reason for this is more frequent monitoring of acral lentiginous melanoma (ALM) in our region. Although the BRAF V600E mutation was observed more in small-sized tumors, it was seen more in high Clark stage tumors, suggesting that the mutation may occur later in the advanced stages of the tumor. Studies with high case series may reveal possible correlations between BRAF and prognostic values and may be useful in patient selection for treatment.

**Keywords:** Malignant melanoma, BRAF V600E, Real-time PCR, Diyarbakır.

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada Diyarbakır yöresindeki malign melanoma (MM) vakalarında BRAF V600E mutasyon oranlarını belirlemeyi, mutasyon oranlarının prognostik parametrelerle ilişkisini araştırmayı ve sonuçları Türkiye'nin batısındaki değerler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ocak 2014-Temmuz 2019 tarihleri arasında Dicle Üniversite Tıp Fakültesi Patoloji AD'da tanı alan primer MM ve metastatik MM olmak üzere 93 MM olgusu dahil edildi. Hastaların real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çalışılan BRAF V600E mutasyon sonuçları ile prognostik parametreler karşılaştırıldı.

**Bulgular:** MM tanılı 93 hastada BRAF V600E mutasyon oranı %21,5 (n=20) olup gövde ve baş-boyun yerleşimli tümörlerde, kutanöz ve mukozal yerleşimli tümörlerde, Clark evre V tümörlerde, 0-2 mm arası çapa sahip tümörlerde, Ki-67 proliferasyonu %11-20 arasında olanlarda, ülserli olmayan tümörlerde, kronik güneş maruziyeti olanlarda daha yüksek oranda izlenmiştir.

**Sonuç:** Diyarbakır yöresinde BRAF mutasyonunu Türkiye'nin batısındaki değerlere göre daha düşük bulduk. Bunun nedeninin bölgemizde akral lentiginöz melanom (ALM)'un daha sık izlenmesi olduğunu düşünmekteyiz. Küçük çaplı tümörlerde BRAF V600E mutasyonunun daha fazla izlenmesine karşın yüksek Clark evre tümörlerde daha fazla görülmesi, mutasyonun daha sonra tümörün ileri evrelerinde de ortaya çıkabileceğini akla getirmiştir. Yüksek olgu serileri ile yapılacak çalışmalar BRAF ve prognostik değerler arasındaki korelasyonları ortaya çıkarabilir ve tedavi için hasta seçiminde yararlı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Malign melanom, BRAF V600E, Real-time PCR, Diyarbakır.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. İbrahim İbiloğlu, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Turkey. E-mail: ibilogluibrahim@hotmail.com

Geliş tarihi/Received: 05.05.2020 Kabul tarihi/Accepted: 31.08.2020 Çevrimiçi yayın/Published online: 30.12.2020

## GİRİŞ

Malign melanom (MM) kötü prognoza sahip, yüksek metastaz potansiyelli, hızlı gelişim gösteren ve yüksek mortaliteye sahip fatal seyreden bir hastalıktır<sup>1</sup>. Klinik ve histopatolojik subtipleri etnik kökenler arasında değişkenlik göstermektedir<sup>2,3</sup>. Yüzeysel yayılan malign melanom (YYMM) ve nodüler malign melanomlar (NMM) Kafkas ırkında çok sık izlenmekte iken akrallentiginöz melanom (ALM) ve mukozal malign melanomlar (MMM) Asya popülasyonlarında sık bulunmaktadır<sup>4,5</sup>. RAS/BRAF/MEK/ERK yolu bütün kanserlerin yaklaşık %30'unda mutasyona uğramış<sup>6</sup> olup BRAF geni mutasyonu kanserlerin yaklaşık %7'sinde bulunur<sup>7</sup>. BRAF, RAF ailesinin bir üyesidir. Bu aile ARAF, CRAF (RAF-1) ve BRAF'dan oluşur, bunlardan ikincisi en yüksek bazal kinaza sahiptir. BRAF, ökaryotlarda tüm sistemlerde korunan bir yol olan MAPK / ERK yolunu düzenlemek için işlev görür<sup>8</sup>. RAS / RAF / MEK / ERK yolu, hücre dışı ortam ve çekirdek arasında bir sinyal dönüştürücü görevi görür. Hormonlar, sitokinler ve çeşitli büyüme faktörleri gibi hücre dışı sinyaller, RAS ailesinden küçük G-proteinlerini etkinleştirmek için reseptörleriyle etkileşime girer.

Aktif RAS, RAF proteinlerini aktive edildikleri hücre zarına aktivasyon sağlamak ve görevlendirmek için adaptör proteinler aracılığıyla etki eder<sup>6</sup>. MEK aracılığıyla aktif BRAF sinyalleri, hücre farklılaşması, proliferasyon dahil biyokimyasal süreçler, büyüme ve apoptoz için ve transkripsiyon faktörlerini indüklemek için ERK'yi etkinleştirir. RAF, MEK'in en güçlü aktivatörüdür. Aktive RAS, RAF'ta hücre membranına katılıma izin veren, fosforilasyon durumundaki değişiklikleri teşvik eden ve kinaz aktivitesini tetikleyen konformasyonel değişiklikleri indükler<sup>9</sup>.

MM'ların çoğu, hücrenin büyümesi, çoğalması ve hayatta kalması için önemli bir sinyal iletim yolu olan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu ile ilişkili mutasyonlara sahiptir<sup>10</sup>. MAPK yolunun onkogenik aktivasyonu, en sık melanomda BRAF kinazın (olguların yaklaşık % 40-60'ında meydana gelen mutasyon yoluyla) aktivasyonu ve ikinci sıklıkta (vakaların yaklaşık % 15-30'unda) NRAS mutasyonu ile olur<sup>11-14</sup>. Melanomların yaklaşık % 50'si BRAF mutasyonları göstermektedir. MM'larda gözlenen BRAF mutasyonlarının % 90'dan fazlasını kodon 600'de tek bir nükleotid mutasyonu olan valin yerine glutamik asidin geçtiği BRAF V600E mutasyonu oluşturmaktadır. Bunu sırası ile BRAF V600R,

BRAF V600E2, BRAF V600D izlemektedir<sup>6</sup>.

BRAF mutasyonları, güneşe aralıklı şekilde maruz kalan bölgelerde ortaya çıkan melanomlarda yaygındır ve kronik güneş maruziyeti olan deride, nadiren güneşe maruz kalan veya hiç güneşe maruz kalmayan akrall bölgelerde ve mukozal membranlarda nadirdir<sup>3</sup>. BRAF V600E, başta MEK / ERK yolunun aktivitesi, yaşlanma ve apoptozisin aktivasyonu, anjiyogenez, immün cevabın olmaması ve metastaz gibi farklı melanom progresyonu mekanizmaları arasında yer alır<sup>7</sup>. BRAF V600E mutasyonlar YYMM'lar, tanı anında daha genç yaş ve trunkal tümör yerleşimi ile ilişkilidir<sup>11,15</sup>. Akrallentiginöz melanom (ALM), kutanöz malign melanom (KMM)'un nadir bir alt tipidir ve teşhis edilen tüm KMM'lerin % 5'inden azını oluşturur. KMM'nin diğer alt tipleri ile karşılaştırıldığında, ALM, önemli ölçüde daha az BRAF mutasyonu barındırır ve bu mutasyonların yaklaşık % 15'inde mevcuttur<sup>16</sup>. Kinaz inhibitörü olan Vemurafenib kullanımı ile tedavinin BRAF mutasyonu olan MM hastalarında kilometre taşı olduğu kanıtlanmıştır. Vemurafenib ilacı BRAF V600E mutasyonlu önceden tedavi edilmemiş hastalarda genel ve progresyonsuz sağkalım oranlarında iyileşme sağlamıştır bu nedenle mutasyonun varlığının bilinmesi çok önemlidir<sup>17</sup>.

BRAF mutasyonu ile ilişkili çalışmalar Türkiye'nin batısında yapılmış olup Güneydoğu Anadolu Bölgesinde böyle bir çalışma bulunmamaktadır<sup>18-23</sup>. BRAF mutasyonu ile çeşitli demografik ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkilendirilmektedir ancak Türkiye'nin doğusunda melanomlarda BRAF mutasyon sıklığı bilinmemektedir. Bu çalışma, ülkemizde Real-time PCR yöntemi ile BRAF V600E sıklığını bildirilen ilk BRAF mutasyonları serisi ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinin ilk BRAF mutasyonları verileridir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın etik kurul onayı "Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar" kurulunun 02.10.2019 tarih ve 214 numaralı kararı ile alınmış olup Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygundur.

Ocak 2014-Temmuz 2019 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD'da tanı alan MM olgularından BRAF V600E moleküler çalışması yapılanlar retrospektif olarak incelendi. Dış merkezlerden konsültasyon amacı ile gelen 15 MM olgusu, tümör çapı, Breslow kalınlığı, Clark evre

değerleri gibi prognostik parametre bilgileri içermediklerinden hariç bırakıldı. Arşivimizde geriye kalan 93 hastaya ait 56 primer MM, 29 metastatik MM ve 8 mukozal MM olgusu çalışmaya dahil edildi. Primer tümörlü olgulara Melan-A, HMB-45, S100, Vimentin ve Ki-67 immünohistokimyasal çalışmalar ile epitelde atipik tümör hücreleri varlığı ve dermiste invazyon alanları izlenerek tanıları konmuştur. Metastatik olgularda Melan-A, HMB-45, S100, Vimentin, Ki-67 immünohistokimyasal çalışmaları ile hücrelerin melanosit kökeni ortaya konularak lenf nodu, karaciğer ve beyin dokusunda infiltratif alanlar izlenerek tanı konmuştur.

### Uygulama

Hastalarda BRAF sonuçları ile yaş, cinsiyet, tümörün histolojik tipi (yüzeysel yayılan ve nodüler tip), ülser (var/yok), tümörün yerleşim yeri (kutanöz, akrall, mukozal, göz, gövde, baş-boyun ve ekstremitelerde), güneş hasarı (kronik güneş hasarı var, kronik güneş hasarı yok ve akrall bölge), Clark invazyon düzeyi (I-V arasında), Breslow kalınlığı ( $\leq 1$  mm, 1.01-2 mm, 2.01-4 mm,  $>4.01$  mm), tümör çapı (2 < mm, 2-4 mm,  $>4-5$  mm,  $\geq 5.01$ ), Ki67 proliferasyon indeksi ( $\leq 10$ , 11-20,  $\geq 21$ ) ve milimetre karedeki mitoz sayısı (40x büyütme ile 5 mikroskopik alan) gibi prognostik ve ışık mikroskopik (Eclipse E600 mikroskobu; Nikon Corporation, Tokyo, Japonya) bulgular karşılaştırıldı.

93 hastaya ait lamalar arşivden çıkarılarak yeniden tarandı. Olguların önceki patoloji raporları ile karşılaştırıldı, yukarıda belirtilen verileri raporlarda bulunmayan parametreler tek patoloji uzmanı tarafından yeniden incelenerek değerlendirildi. Clark evreleme sisteminde<sup>24</sup> MM derinliğini ölçmek için aşağıdaki beş seviye belirlenmiştir: Evre I = MM hücrelerinin epidermis ve uzantılarında bulunması; evre II = tümör hücrelerinin papiller dermise genişlemesi; Evre III = tümör hücrelerinin papiller dermise boyunca, retiküler dermise kadar ancak retiküler dermise infiltrat etmeden yayılması; Evre IV = retiküler dermisenin tutulumu; ve Evre V = deri altı yağ dokusunun tutulumu şeklindedir.

Dokusu küçük olan biyopsi materyali, taban cerrahi sınırda tümörü devam eden ve metastatik olan 28 olgunun Clark evresi doğru değerlendirilemeyeceği için skorlaması yapılmadı. Breslow kalınlığı<sup>25</sup> MM'da tümör kalınlığının epidermisenin granüler hücre tabakasının üstünden tümörün en derin uzantısına kadar ölçülmesi ile hesaplanır. Kalınlık milimetre cinsinden belirtilir. 93 hastadan metastatik olan ve

taban cerrahi sınırlarında tümörü devam eden 38 tanesi Breslow kalınlığı doğru verilemeyeceği için skorlama yapılmadı. Ayrıca 31 hastanın metastatik olması ve cerrahi sınırlarda tümörlerinin devam etmesi nedenleri ile tümör çapları verilemedi. Metastatik olgular ile başka merkeze epidermis içeren örnekleri gönderilen toplam 38 hastanın ülser varlığı açısından değerlendirmesi yapılmadı. Arşivinde daha önceden Ki-67 immünohistokimyasal çalışması yapılmamış 31 olgunun Ki-67 proliferasyon indeksi belirlenemedi. MM olgularındaki Ki-67 proliferasyon indeksleri, immünohistokimyasal incelemede tümör hücrelerinden en çok hücrenin boyandığı alandan 100 tane tümör hücresi sayılarak kaç tanesinde pozitif boyanma izlenmesine göre belirlendi.

Olguların primer ve metastatik oldukları belirtilenler dışında kalanların dosyalarına ulaşılarak incelendikten sonra primer veya metastatik olduklarına karar verildi.

### Moleküler çalışma

Formalinle fikse edilmiş dokulardan, en az dokunun % 50'sini tümörün oluşturduğu hücre blokları seçilerek 5  $\mu$  kalınlığında 4 veya 5'er adet kesit alındı. Cobas DNA izolasyon kiti (Roche, Mannheim, Germany) ile DNA izole edildi. İzole edilmiş DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometre (BioDrop, Cambridge CB4 OFJ, England) kullanılarak ölçüldü. Cobas 4800 BRAF V600E mutation test kiti (Roche, Mannheim, Germany) ile spesmenlere ait DNA'lar hazırlandı. Tam otomatik Cobas Z 480 real time PCR cihazı (Roche Diagnostic Ltd., Rotkreuz, Switzerland) ile analiz edildi.

### İstatistiksel analiz

Araştırma verilerimizin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS 21.0 for windows istatistik paket programı kullanıldı. Ölçümsel değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) ile, kategorik değişkenler sayı ve yüzde (%) ile sunuldu. Nitel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmasında Pearson Chi-kare( $\chi^2$ ), Fisher's Exact Chi-kare( $\chi^2$ ), ve Yates Chi-kare( $\chi^2$ ) analizi kullanıldı. Yaş ortalamaları için Mann-Whitney U test uygulandı. Hipotezler çift yönlü olup,  $p \leq 0.05$  ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen erkek hastaların yaş ortalaması  $58,8 \pm 18,03$ , kadın hastaların yaş ortalaması  $62,4 \pm 18,9$

idi. BRAF mutasyonlu hastaların yaş ortalamaları 52,9±20, mutasyon göstermeyenlerin 62,1±17,8 olarak saptandı. Metastatik olgular (%31,2 n=29)

dışındaki MM olgularının %42,1 (n=27)'ini ALM, %29,6 (n=19)'sını NMM, %14 (n=9)'unu YYMM ve %1,6 (n=1)'sını lentigo MM oluşturmaktaydı.

**Tablo 1. Prognostik göstergeler ile BRAF V600E ilişkisi**

	BRAF V600E (-) (n=73)	BRAF V600E (+) (n=20)	Toplam	P değeri
Erkek cinsiyet (%)	77,5 (38)	22,5(11)	49	-
Kadın cinsiyet (%)	79,5 (35)	20,5(9)	44	1,000
Erkeklerin yaş ortalamaları	59,3±18,6	56,4±15,9	58,8±18,03	0,319
Kadınların yaş ortalamaları	65,2±16,7	49,4±2,2	62,4±18,9	
Ülser varlığı				
Ülser (+)	88,9(32)	11,1(4)	36	1,000
Ülser (-)	66,6 (6)	33,3(3)	9	0,021*
Breslow kalınlığı(%)				
≤1 mm	84,8(28)	15,2(5)	33	0,320
1,01-2 mm	81,8(9)	18,2(2)	11	0,071
2,01-4 mm	100(1)	0(0)	1	1,000
>4,01 mm	50(1)	50(1)	2	0,051
Tümör çapı				
<2 mm	74,1(20)	25,9(7)	27	0,031*
2-4 mm	83,3(15)	16,7(3)	18	0,077
>4-5 mm	100(4)	0(0)	4	1,000
≥5,01	100(3)	0(0)	3	1,000
Ki67 proliferasyon indeksi (%)				
≤10	100(8)	0(0)	8	1,000
11-20	72,2(13)	27,8(5)	18	0,009*
≥21	75(27)	25(9)	36	0,092
Clark Evre (%)				
II	(6)	(0)	6	1,000
III	88,9(8)	11,1(1)	9	0,231
IV	82,3(14)	17,7(3)	17	0,064
V	75(12)	25(4)	16	0,016*
Lokalizasyon (%)				
Kutanöz (akral dışı)	48,1(13)	51,9(14)	28	0,000*
Akral	96,3(26)	3,7(1)	27	1,000
Mukozal	87,5(7)	12,5(1)	8	0,046*
Göz	(1)	(0)	1	0,816
Metastaz				
Lenf nodu	85(17)	15(3)	20	0,107
Karaciğer	83,3(5)	16,7(1)	6	0,154
Beyin	100(3)	100(0)	3	1,000
Gövde	62,5(5)	37,5(3)	8	0,005*
Baş-boyun	63,6(7)	36,3(4)	11	0,003*
Ekstremiteler	80(28)	20(7)	35	0,320
K. Güneş Hasarı (%)				
K. güneş hasarı var	66,7(28)	33,3(14)	42	0,046*
K. güneş hasarı yok	100(8)	0(0)	8	1,000
Akral	96,3(26)	3,7(1)	27	1,000

K: Kronik; \*: Anlamlı P değerleri.

Tüm olgular içerisinde BRAF V600E mutasyonu en sık akral bölge dışı MM olgularında görülmekte

(%71,4) olup ALM ve mukozal MM olgularında birer vakada (%4,3) izlenmiştir. Lenf nodu metastazı

gösteren olgulardan 3 tanesinde (%13), primeri uveal MM olan karaciğer metastazlı 6 olgudan 1 tanesinde (%4,3) BRAF V600E mutasyonu saptandı. Tüm hastaların toplam 45 tanesinde ülser verileri mevcuttu. Ülserli 45 hastanın 36'sından sadece 4 tanesinde BRAF V600E mutasyonu izlendi. Geriye kalan dokuz hastada ülser izlenmemiş olup bunlardan üçünde BRAF V600E mutasyonu saptandı. Erkek hastaların 11 tanesinde ve kadın hastaların dokuzunda BRAF V600E mutasyonu izlendi. Hastalara ait bulgular ve p değerleri tabloda sunulmuştur.

Ülseri olmayan MM olgularının %33,32'ünde BRAF mutasyonu saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P=0,021$ ). Tümör çapı 0-2 mm arası olanlarda %25,9 oranında mutasyon izlenmiştir ( $P=0,031$ ). Ki67 proliferasyon indeksi %11-20 arasında olanlarda anlamlı mutasyon mevcuttur ( $P=0,009$ ). Clark evresi V olanların %25'inde mutasyon mevcut olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P=0,016$ ). Akral bölge dışı kutanöz MM hastalarında %56,3 oranında mutasyon izlenmiş ve anlamlılık saptanmıştır ( $P=0,000$ ). Mukozal MM hastalarında ise %12,5 oranında mutasyon saptanmıştır ( $P=0,046$ ). Gövde ve baş-boyun bölgesi MM yerleşimli hastalarda sırası ile %37,5 ve %36,3 oranlarında BRAF V600 mutasyonu izlenmiş ve anlamlı farklılık bulunmuştur ( $P=0,005$  ve  $P=0,003$ ). Kronik güneş hasarı olan MM hastalarında mutasyon %33,3 oranında mevcut izlenmiştir ( $P=0,046$ ).

## TARTIŞMA

BRAFV600E, melanomda en sık görülen (>% 90) BRAF mutasyonu bölgesidir<sup>7</sup>. BRAF V600E düşük ultraviyole radyasyon etkisi, daha genç yaş ve melanokortin-1 reseptörü (MC1R) varyantları ile ilişkilidir<sup>26</sup>. BRAF mutasyonlu melanom ile güneş maruz kalma arasındaki ilişki literatürde çelişkili şekilde yer almaktadır. BRAF'daki mutasyonlar, mukozal yüzeylerde yer alan melanomlarda, avuç içi ve ayak tabanı gibi güneş ışığına daha az maruz kalan bölgelerde çok düşük oranda meydana gelir ve bu da BRAF mutasyonlu hastalığın gelişimi için güneş maruz kalmanın gerekli olduğunu gösterir<sup>12</sup>. Bu nedenle, ultraviyole radyasyon ve BRAF mutasyonu arasındaki bağlantı net bir şekilde aydınlatılamamıştır.

MM'un klinik ve histolojik alt tipleri de farklı etnik kökenlere göre değişiklik göstermektedir<sup>27,28</sup>. Örneğin, Kafkas ırkında YYMM, NMM'dan daha sık izlenmektedir ancak Asyalı hastalarda ALM daha siktir<sup>1</sup>. Akman ve arkadaşları İzmir bölgesinde

yaptıkları çalışmada MM vakalarında BRAF V600E pozitifliğini %30<sup>19</sup>, Yılmaz ve arkadaşları İstanbul bölgesindeki çalışmalarında %25.5<sup>21</sup>, Yaman ve arkadaşları 2015 yılı İzmir bölgesi çalışmalarında %22,6<sup>18</sup>, Yaman ve arkadaşları 2016 yılı İzmir bölgesi çalışmasında %62,5<sup>20</sup>, Can ve arkadaşlarının Edirne bölgesindeki çalışmalarında %36<sup>23</sup> oranında izlenmişlerdir. Bizim çalışmamızda bu oran %21,5 olup Akman ve arkadaşları ile Yaman ve arkadaşlarının 2016 sonuçlarına göre daha düşük, Yaman ve arkadaşlarının 2015 yılı çalışmaları ile Yılmaz ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerdir. Mutasyonun MM olgularındaki bölgesel bu farklılık Diyarbakır yöresinde kırsal alanlarda başörtüsü kullanımının yaygınlığı nedeni ile güneşe daha az maruz kalma ve bölgemizin coğrafik olarak Türkiye'nin Asya kıtasında kalan bölümünde bulunması olabilir.

BRAF mutasyonunu Kang ve arkadaşları 60 yaş altında<sup>1</sup>, Sheen ve arkadaşları 65 yaş altında<sup>29</sup>, İnumaru ve arkadaşları 45 yaş ve üstünde pozitif bulmuş<sup>30</sup> olup Sakaizawa ve arkadaşları BRAF pozitiflerde ortalama yaşı 50<sup>31</sup>, Zebary ve arkadaşları ALM hastalarında 57<sup>16</sup>, Akman ve arkadaşları 50<sup>19</sup>, Yaman ve arkadaşları 55.9<sup>18</sup>, Can ve arkadaşları 61,5<sup>23</sup>, Heppt ve arkadaşları 56<sup>32</sup> bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda BRAF mutasyonu gösteren hastaların yaş ortalamaları 50,4 olup Sakaizawa ve arkadaşları, Zebary ve arkadaşları ile Akman ve arkadaşlarının sonuçları ile benzerdir. Yaş ve BRAF mutasyonu arasında veriler değişken olmakla birlikte pozitif vakaların 50-60 yaş aralığında ve altındaki değerlerde yoğunlaştığı, 60 yaşın üzerinde azaldığı söylenebilir. Bu da özellikle 50-60 yaş ve altındaki hastalarda kinaz inhibitörleri ile tedavi şansı için hasta seçiminde yarar sağlayabilir.

Cinsiyet açısından BRAF mutasyonunu Sheen ve arkadaşları, Libra ve arkadaşları, Yaman ve arkadaşları, Can ve arkadaşları, Heppt ve arkadaşları erkeklerde daha fazla<sup>18,23,29,32,33</sup>, Ahmad ve arkadaşları, Akman ve arkadaşları, Zebary ve arkadaşları ile İnumaru ve arkadaşları kadın hastalarda daha fazla bulmuşlardır<sup>16,19,30,34</sup>. Biz bu çalışmada BRAF mutasyonunu erkek hastalarda daha fazla görmeye birlikte cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlemedik. Cinsiyet farklılığının BRAF mutasyonu için farklılık göstermediğini düşündürmektedir.

MM'nin klinik ve histolojik alt tipleri de etnik kökenlere göre farklılık göstermektedir<sup>27,28</sup>. Örneğin, Kafkas ırkında YYMM, NMM'den daha sık

izlenmektedir<sup>33</sup>, ancak aynı zamanda Asya ırkında ALM'lar da sık izlenmektedir<sup>34</sup>. Histolojik alt tip açısından yapılan değerlendirmelerde Yılmaz ve arkadaşları (%42,9)<sup>21</sup> ile Can ve arkadaşları (%41,1)<sup>23</sup> en sık NMM'da, Akman ve arkadaşları (%57,2)<sup>19</sup>, Heppt ve arkadaşları (%43,5)<sup>32</sup>, Yaman ve arkadaşları 2015 yılı çalışmasında (%44,4)<sup>18</sup> YYMM olgularında BRAF V600E mutasyonu bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda Yılmaz ve arkadaşları ile Can ve arkadaşları'nın sonuçlarına benzer şekilde BRAF mutasyonunu en sık NMM'da (%50) izledik. Buna göre histolojik tip açısından bölgemizdeki sonuçlar Türkiye değerleri ile benzerlik göstermekte olup bölgemizde NMM hastalarında BRAF mutasyonu daha sık görülmektedir. NMM hastalar için kötü prognoz göstergesi olmakla birlikte bu grup hastalarda BRAF mutasyonunun varlığı kinaz inhibitörlerinin kullanımında tedavi şansını verebilecektir.

ALM hastalarının Kang ve arkadaşları %15<sup>1</sup>, Sheen ve arkadaşları %6<sup>29</sup>, Heppt ve arkadaşları %3,5<sup>32</sup>, Ahmad ve arkadaşları %31<sup>34</sup>, Sakaizawa ve arkadaşları %10<sup>31</sup> Can ve arkadaşları %33,3<sup>ünde</sup><sup>23</sup> BRAF mutasyonu izlemişlerdir. Biz ALM hastalarının %3,7'sinde BRAF mutasyonu izledik. Bizim serimizde elde ettiğimiz BRAF mutasyonu oranı Sheen ve arkadaşları ile Heppt ve arkadaşları'nın sonuçları ile benzer olmakla beraber Türkiye'nin batısındaki değerlere göre oldukça düşüktür. Biz bunun sebebini bölgemizin Asya coğrafyasında bulunması, Asya ırkında ALM'un daha sık izlenmesi ve dolayısıyla ALM'larda düşük BRAF oranları gözlenmesine<sup>3</sup> bağlamaktayız.

Sheen ve arkadaşları YYMM'lu hastalarda %58<sup>29</sup>, Yılmaz ve arkadaşları %28<sup>21</sup>, İnumaru ve arkadaşları %62<sup>30</sup>, Heppt ve arkadaşları %43<sup>32</sup> oranında BRAF mutasyonu izlemişlerdir. Bizim serimizde YYMM'lu tek vaka bulunmakta ve bu vaka da BRAF mutasyonu göstermemektedir. Bu nedenle YYMM'lu olguların BRAF mutasyon durumu hakkında istatistiksel olarak anlamlı bir yorum yapamadık.

Sheen ve arkadaşları NMM hastalarında %6,7<sup>29</sup>, Yılmaz ve arkadaşları %42<sup>21</sup>, Heppt ve arkadaşları %37<sup>32</sup>, Can ve arkadaşları %70<sup>23</sup>, İnumaru ve arkadaşları %80<sup>30</sup> mutasyon izlemişlerdir. Biz NMM'lu olguların %55,5'inde BRAF mutasyonu saptadık. Bizim değerimiz Yılmaz ve arkadaşları sonucu ile yakın olup Can ve arkadaşları sonucuna göre daha düşük izlenmiştir. NMM hastalarındaki bu değerlerin yüksekliği BRAF mutasyonu ile kötü prognozu arasında bağlantı olabileceğini de aklı

getirmektedir.

Ülserli hastalarda BRAF mutasyonunu Can ve arkadaşları %57<sup>23</sup>, Kang ve arkadaşları %20<sup>1</sup>, Sheen ve arkadaşları %2,5<sup>29</sup>, Libra ve arkadaşları %50<sup>33</sup>, Ahmad ve arkadaşları %32<sup>34</sup>, Zebary ve arkadaşları %40<sup>16</sup>, Sakaizawa ve arkadaşları %48<sup>31</sup>, Akman ve arkadaşları %71<sup>19</sup>, Heppt ve arkadaşları %39<sup>32</sup>, İnumaru ve arkadaşları %36'sında<sup>30</sup> saptamışlardır. Ülserli olmayan hastalarda BRAF mutasyonunu Can ve arkadaşları %60<sup>23</sup>, Kang ve arkadaşları %25<sup>1</sup>, Sheen ve arkadaşları %20<sup>29</sup>, Libra ve arkadaşları %33<sup>33</sup>, Ahmad ve arkadaşları %27<sup>34</sup>, Zebary ve arkadaşları %40<sup>16</sup>, Akman ve arkadaşları %28<sup>19</sup>, Heppt ve arkadaşları %60<sup>32</sup>, İnumaru ve arkadaşları %45<sup>30</sup> oranında izlemişlerdir. Bizim sonuçlarımız ülserli olgularda Sheen ve arkadaşları'nın sonuçları ile ülserli hastalarda Can ve arkadaşları, Zebary ve arkadaşları ile Heppt ve arkadaşları'nın sonuçları ile benzerdir. Ülserli olmayan hastalarda BRAF mutasyonunun daha sık görüldüğü izlendi. Kötü prognoz ile ilişkili olan ülserin BRAF mutasyonları ile ters orantısı, BRAF mutasyonunun her zaman kötü prognozu gösterdiği şeklinde bir genelleme yapılamayacağını düşündürebilir. Ancak bu konuda kesin yorum yapabilmek için yüksek vaka sayılı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Lenf nodu metastazı gösteren olgularda BRAF pozitifliği çalışmalarda değişkenlik göstermekte olup Kang ve arkadaşları %22,7'sinde<sup>1</sup>, Yılmaz ve arkadaşları %17,9'unda<sup>21</sup>, Libra ve arkadaşları %86'sında<sup>33</sup>, Akman ve arkadaşları %61,9'unda<sup>19</sup>, Can ve arkadaşları %37,7'sinde<sup>23</sup> mutasyon izlemişlerdir. Bizim çalışmamızdaki değer Yılmaz ve arkadaşları'nın sonuçları ile benzer olup lenf nodu metastazlı olgularda BRAF mutasyonunu düşük oranda izledik. Ülserli hastalarda olduğu gibi lenf nodu metastazlı hastalarda BRAF varlığı ile prognoz arasında ters orantı izlenmekle birlikte bu değer farklı çalışmalarda değişkenlik göstermektedir. Bu konuda da ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tümörlerin primer lokalizasyonları bakımından BRAF mutasyonunu Ahmad ve arkadaşları (%61,4), Akman ve arkadaşları (%71,5), Sheen ve arkadaşları (%37,5), Can ve arkadaşları (%70,6) en sık baş ve boyun bölgesi tümörlerinde<sup>19,23,29,34</sup>, Yılmaz ve arkadaşları (%64,3), Yaman ve arkadaşları (%37,8), Heppt ve arkadaşları (%45,9) en sık gövde tümörlerinde<sup>18,21,32</sup>, İnumaru ve arkadaşları ekstremiteelerde (%55,5)<sup>30</sup>, Sakaizawa ve arkadaşları skalpte (%80)<sup>31</sup>, Zebary ve arkadaşları ayakta (%87)<sup>16</sup> izlemişlerdir. Bizim sonuçlarımız da BRAF

mutasyonunu Yılmaz ve arkadaşları, Yaman ve arkadaşları ile Heppt ve arkadaşları'nın sonuçları ile benzer olup en sık baş ve boyun bölgesi tümörlerinde izledik. Baş ve boyun bölgesi yüksek güneş maruziyeti altında olduğundan mutasyon varlığı ve güneş hasarı birbirleri ile ilişkili olabilir.

Sadece güneş hasarı bakımından incelendiğinde BRAF V600E mutasyonunu Yılmaz ve arkadaşları (%57,1)<sup>21</sup>, Sheen ve arkadaşları (%47,1)<sup>27</sup>, Sakaizawa ve arkadaşları (%63,6)<sup>29</sup> en sık kronik güneş maruziyeti olmayan olgularda izlemiş olup biz çalışmamızda en sık (%50) kronik güneş maruziyeti olan olgularda BRAF V600E mutasyonu izledik. Çalışmalardaki güneş hasarında BRAF V600E mutasyonun 1/2 oranında izlenmesi güneş maruziyetin MM olgularında BRAF mutasyonu ile de ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle güneş temasının azaltılmasının MM açısından önemli olduğu tekrar akla gelmiştir.

Clark Evreleri ile BRAF V600E mutasyonu gösteren hastalar birlikte incelendiğinde Libra ve arkadaşları en sık Evre IV (%50)<sup>33</sup>, Zebary ve arkadaşları Evre IV ve V (%33)<sup>16</sup>, Akman ve arkadaşları Evre IV ve V (%81)<sup>19</sup> olgularında izlemişlerdir. Heppt ve arkadaşları en sık Evre IV hastalarında mutasyon izlemiş olup yüzde oranı belirtmemişlerdir<sup>32</sup>. Bu çalışmada en sık Evre V hastalarında ve %50 oranında mutasyon izledik. Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olarak yüksek Clark evresinde izlenmiştir. Son aşama olan Clark Evre V hastalarda BRAF mutasyonun anlamlı olarak yüksek izlenmesi mutasyonun kötü prognoz belirtisi olduğunu düşündürmektedir. Düşük Clark evrelerinde mutasyonun daha az izlenmesi tümör geliştikten sonra ileri evrelerde de BRAF mutasyonunun ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. Eğer böyle bir durum gerçekleşiyor ise MM hastalarının kinaz inhibitörleri ile hedefe yönelik tedavi şansı için sonradan tekrar mutasyon bakılarak mutasyonun pozitifleşmesi ile tedavi şansı yakalayabileceklerini düşündürmüştür. Hastalığın erken evresinde mutasyonu olmayan hastaların takipleri sonrası metastaz veya nüks tümör odaklarından yeniden biyopsi alınarak BRAF mutasyonu bakılan çalışmalar bu konuyu aydınlatabileceklerdir.

Çalışmamızda tümör çapı ile BRAF mutasyonlarını karşılaştırdığımızda mutasyonun küçük 2 mm'nin altındaki çapa sahip tümörlerde anlamlı ilişki izledik ve literatürde tümör çapı ile BRAF mutasyon ilişkisini gösteren çalışmaya rastlamadık. Bu veri Clark Evresi verileri ile tezat oluşturuyor gibi görünse de

olgularımızın çoğunluğunun ALM olması ve akril bölgede dermis kalınlığının az olmasından dolayı yağ dokuya tümörün erken ulaşmasıyla açıklanabilir.

Breslow kalınlığı açısından literatürde, Can ve arkadaşları en sık 2-4 mm arasında (%40)<sup>23</sup>, Yaman ve arkadaşları en sık 4 mm üzerinde (%60)<sup>18</sup>, Akman ve arkadaşları 4 mm üzerinde (%61,9)<sup>19</sup>. İnumaru ve arkadaşları 1 mm üzeri olgularda (%73,2)<sup>30</sup>, Heppt ve arkadaşları 1 mm ve altında (%50,6)<sup>32</sup>, Libra ve arkadaşları 2 mm ve altı, 2-5 mm ve 5,01'den daha fazla olanlarda eşit oranda (%33,3)<sup>33</sup> BRAF mutasyonu izlemişlerdir. Zebary ve arkadaşları mutasyonlu olgularda ortalama kalınlığı 2,7 mm<sup>16</sup>, Sakaizawa ve arkadaşları 4,1 mm saptamışlardır<sup>31</sup>. Biz çalışmamızda kalınlık arttıkça mutasyon oranının arttığını izledik ancak olgu sayılarımızın kısıtlılığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır.

Mitoz açısından incelendiğinde Akman ve arkadaşları bir ve üzeri mitoz içeren olgularda %66<sup>19</sup>, Heppt ve arkadaşları %62<sup>32</sup>, Ahmad ve arkadaşları %30<sup>34</sup>, Yaman ve arkadaşları altı ve daha altında mitoz içeren vakalarda %64<sup>18</sup> BRAF mutasyonu izlemişlerdir. Can ve arkadaşları BRAF pozitiflerde ortalama 6-7 adet mitoz izlemişlerdir<sup>23</sup>. Bizim sonuçlarımıza göre BRAF mutasyonlu hastalarda mitoz ortalaması 4-5 adet olup Can ve arkadaşları ile benzerdir. Mutasyon ile mitoz sayısı arasında doğru orantı olabileceği düşünülmüştür. Literatürde Ki-67 proliferasyon indeksi ve BRAF mutasyonu ile ilişkili çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda kullandığımız hastalara ait prognostik ve histopatolojik veriler bütün hastalarda tam şekilde mevcut değildi. Ayrıca BRAF V600E mutasyonu dışındaki mutasyonların elimizde mevcut olmaması ve bunlar arasında kıyaslama yapılamaması çalışmamızı kısıtlamaktadır.

Histolojik alt tipleri kendi aralarında değerlendirildiklerinde NMM olgularındaki BRAF mutasyon oranları batının değerleri ile benzerlik göstermektedir. Kronik güneş maruziyeti olan tümörlerde, baş-boyun ve gövde yerleşimli tümörlerde, kutanöz ve mukozal MM olgularında, düşük çaplı tümörlerde, ülserli olmayan olgularda, Clark evre V tümörlerde, Ki-67 proliferasyon indeksi %11-20 arası olanlar ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı ilişki izlenmiştir. Lenf nodu metastazlı olgularda düşük BRAF mutasyonu izlenmiş olup anlamlı farklılık izlenmemiştir.

BRAF V600E mutasyonunun sıklığı bölgeler arasında

ve histomorfolojik tipler arasında farklılıklar gösterebilmektedir. Bu çalışma ile bölgemizde BRAF mutasyonunu Türkiye'nin batısında yapılan çalışmalara göre daha düşük olduğunu ve sebebinin de bölgemizde ALM olgularının daha sık izlenmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Clark Evresi yüksek tümörlerde mutasyonun daha çok izlenmesi tümörün ileri evrelerinde de mutasyonun ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. Clark Evresi düşük ve BRAF V600E mutasyonu negatif hastaların takip edilerek nüks tümörlerinden veya metastazlarından yeniden biyopsi ile mutasyon bakılması, hastalarda sonradan ortaya çıkabilecek mutasyonlarda hedefe yönelik kinaz inhibitörleri ile tedavi şansları sağlayabilir. Olguların sayısı yüksek ve klinikopatolojik verileri yeterli seriler ile yapılacak ileri çalışmalarda BRAF değerleri ile prognostik parametreler arasında doğru ilişkiler saptanabilir. Oluşturulacak algoritmik veriler tedavi için hasta seçimlerinde yol gösterici olabilir.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: İİ, HB, UA; Veri toplama: UA, ANK; Veri analizi ve yorumlama: İİ, HB, GA; Yazı taslağı: İİ, GA, UA; İçeriğin eleştirel incelenmesi: HB, UA, İİ; Son onay ve sorumluluk: İİ, UA, ANK, GA, HB; Teknik ve malzeme desteği: İİ; Süpervizyon: İİ, ANK; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Etik Onay:** Bu çalışmanın etik kurul onayı "Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar" kurulunun 02.10.2019 tarih ve 214 numaralı kararı ile alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarların finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Yazarın Notu:** Bu makalenin içeriği Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur (1-3 Mart 2019, Ankara, Türkiye).

**Author Contributions:** Concept/Design : İİ, HB, UA; Data acquisition: UA, ANK; Data analysis and interpretation: İİ, HB, GA; Drafting manuscript: İİ, GA, UA; Critical revision of manuscript: HB, UA, İİ; Final approval and accountability: İİ, UA, ANK, GA, HB; Technical or material support: İİ; Supervision: İİ, ANK; Securing funding (if available): n/a.

**Ethical Approval:** The Ethics Committee approved this study with the decision of the "Dicle University Faculty of Medicine non-interventional clinical research " Board dated 02.10.2019 and numbered 214.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

**Acknowledgement:** The content of this article was presented as an oral presentation at the International Congress of Hippocrat Medicine and Health Sciences (1-3 March 2019, Ankara, Turkey).

## KAYNAKLAR:

1. Kang X , Zeng Y , Liang J , et al. Aberrations and clinical significance of BRAF in malignant melanoma: a series of 60 cases in Chinese Uyghur. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:9509.
2. Sharma K , Mohanti BK , Rath GK . Malignant melanoma: A retrospective series from a regional cancer center in India. *J Can Res Ther*. 2009;5:173–80.
3. Byrd-Miles K , Toombs EL , Peck GL . Skin cancer in individuals of African, Asian, Latin-American, and American-Indian descent: differences in incidence, clinical presentation, and survival compared to Caucasians. *J Drugs Dermatol*. 2007;6:10–16.
4. Goel VK , Lazar AJ , Warneke CL et al. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006;126:154–60.
5. Sasaki Y, Niu C, Makino R et al. BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. *J Invest Dermatol*. 2004;123:177–83.
6. Garnett M, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6:313–9.
7. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949–54.
8. Robinson M, Cobb M. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:180–6.
9. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J*. 1999;18:2137–48.
10. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 2014;120:3446-56.
11. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011;29:1239-46.
12. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2135-47.
13. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:2522-9.
14. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KSM. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013;32:3009-18.
15. Liu W, Kelly JW, Trivett M et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF<sup>T1799A</sup>(V600E) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol*. 2007;127:900-5.
16. Zebary A, Omholt K, Vassilaki I, et al. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. *J Dermatol Sci*. 2013;72:284-9.
17. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl Med*. 2011;364:2507–16.
18. Yaman B, Akalin T, Kandiloglu G. Clinicopathological characteristics and mutation profiling in primary cutaneous melanoma: The Am J Dermatopathol. 2015;37:389-97.
19. Akman T, Oztop I, Baskin Y, Akbarpour M, Unal



- OU, Oflazoglu U et al. The role of BRAF mutation in patients with high-risk malignant melanoma treated with high-dose adjuvant interferon therapy. *Med Oncol.* 2015;32:440.
20. Yaman B, Kandiloğlu G, Akalin T. BRAF-V600 Mutation heterogeneity in primary and metastatic melanoma: a study with pyrosequencing and immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol.* 2016;38:113-20.
  21. Yilmaz I, Gamsizkan M, Kucukodaci Z, Berber U, Demirel D, Haholu A et al. BRAF, KIT, NRAS, GNAQ and GNA11 mutation analysis in cutaneous melanomas in Turkish population. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015;58:279.
  22. Sener E, Yildirim P, Tan A, Gokoz O, Tezel GG. Investigation of BRAF mutation analysis with different technical platforms in metastatic melanoma. *Pathol-Res Pract.* 2019;213:522-30.
  23. Can N, Tastekin E, Yalta TD, Sut N, Korkmaz S, Usta U et al. Braf v600 mutation profile of metastatic melanoma in the thrace region of Turkey. *Turkish Journal of Pathology.* 2018;34:158-164.
  24. Clark WH Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. *Adv Bioi Skin.* 1967;8:621-47.
  25. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172:902-8.
  26. Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM, Elder DE, Hulley B, Minghetti P et al. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science.* 2019;313:521-2.
  27. van't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, Boot AJ, Ruiters DJ, Osanto S et al. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol.* 1989;9:3114-6.
  28. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene.* 1989;4:1363-74.
  29. Sheen Y-S, Liao Y-H, Liao J-Y, Lin M-H, Hsieh Y-C, Jee S-H et al. Prevalence of BRAF and NRAS mutations in cutaneous melanoma patients in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2016;115:121-7.
  30. Inumaru JSS, Gordo KIF, Fraga Junior AC, Silva AMTC, Leal CBQS, Ayres FM, et al. Analysis of the BRAF V600E mutation in primary cutaneous melanoma. *Genet Mol earch.* 2014;13:2840-8.
  31. Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, Ito T, Fujisawa Y, Ogata D et al. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.* 2015;80:33-7.
  32. Heppt MV, Siepmann T, Engel J, Schubert-Fritschle G, Eckel R, Mirlach L et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer.* 2017;17:536.
  33. Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti L et al. Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle.* 2005;4:1382-4.
  34. Ahmad F, Avabhrath N, Natarajan S, Parikh J, Patole K, Das BR. Molecular evaluation of BRAF V600 mutation and its association with clinicopathological characteristics: First findings from Indian malignant melanoma patients. *Cancer Genet.* 2019;231-232:46-53.
  35. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol.* 1994;102:285-90.
  36. van Elsas A, Zerp SF, van der Flier S, Krüse KM, Aarnoudse C, Hayward NK et al. Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol.* 1996;149:883-93.