

Melanositik Lezyonlarda Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH) Yönteminin Kullanımı

USE OF FLUORESCENCE IN-SITU HYBRIDIZATION (FISH) IN MELANOCYTIC LESIONS

 Yasemin ÇAKIR¹,  Banu LEBE^{1,2}

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Patoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Dermatopatoloji pratiğinin önemli bir bölümünü oluşturan melanositik proliferasyonlar banal nevüsten melanoma kadar değişen geniş bir lezyon grubunu kapsamaktadır. Bu lezyonların bir kısmında benign ve malign ayrımı histopatolojik bulgular ile kolayca yapılırken, bir grup lezyonda ise net histopatolojik tanı verilememektedir. Son zamanlarda, bu grubu oluşturan lezyonların ayırıcı tanısında ve klinik davranışının tahmininde yardımcı bir moleküler test olarak floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yönteminin kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Özellikle geniş bir prob setini (6p25, 6q23, 8q24, 9p21, 11q13) içeren FISH testi kullanımının yüksek oranda duyarlılık ve özgüllük ile ayırıcı tanıda yardımcı olabileceği ve FISH testi sonuçlarının prognoz hakkında bilgi verebileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, yanlış negatif ve yanlış pozitif FISH sonuçları göz önünde bulundurularak sonuçların mutlaka histopatolojik bulgular eşliğinde değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu derlemede, FISH yöntemini farklı melanositik lezyon alt gruplarında, farklı kriterler ile değerlendiren çalışmalar özetlenecektir.

Anahtar kelimeler: Floresan in-situ hibridizasyon, FISH, melanom, melanositik lezyonlar

ABSTRACT

Melanocytic proliferations, including a spectrum of lesions ranging from melanocytic nevi to melanoma, are one of the major groups of daily dermatopathology practice.

Yasemin ÇAKIR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
E-posta: pth.yasemincakir@gmail.com

 orcid.org/0000-0002-1394-6474

While a part of these lesions can be distinguished easily as benign or malign, a group of lesions cannot be diagnosed exactly with only histopathologic features. In recent years, much research has been done about using fluorescence in situ hybridization (FISH) for differential diagnosis and to predict the clinical behaviour of these ambiguous lesions.

The results have shown that using of FISH test with a probe set (6p25, 6q23, 8q24, 9p21, 11q13) can be an ancillary molecular test to diagnose with high sensitivity and specificity, and the FISH results can provide prognostic information. However, FISH results should be evaluated with histopathologic findings due to high rates of false negativity or false positivity of the test. In the current review, the research investigating FISH method in different melanocytic lesion subgroups with different evaluation criteria will be summarized.

Keywords: Fluorescence in-situ hybridization, FISH, melanoma, melanocytic lesions

Melanositik lezyonlar dermatopatoloji pratiğinde önemli bir yer tutmakta olup bazı olgularda doğru histopatolojik tanıyı vermek zorlayıcı olabilmektedir. Bu şekildeki zorlu melanositik lezyonlarda benign ve malign ayrımının yapılması hastanın tedavi ve takip süreçlerinin uygun olarak belirlenebilmesi için önem taşımaktadır. Melanositik lezyonların tanısında histopatolojik değerlendirme altın standart olarak kabul edilse de özellikle histolojik olarak belirsiz melanositik lezyonlarda bu ayırıcı tanının yapılmasında yardımcı moleküler testlere gerek duyulabilmektedir (1-2).

Melanom ve nevüslerde karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) ile 2000'li yılların başlarında yapılan genetik çalışmalarda, iki grup arasında kromozomal kopya sayısı değişiklikleri bakımından anlamlı farklar bulunmuştur (3-4). Bastian ve arkadaşları (3), formalinde fikse parafine gömülü (FFPE) dokuları kullanarak yaptıkları çalışmalarında, 32 melanom örneğinde 1, 6, 7, 9 ve 10. kromozomlar başta olmak üzere çok sayıda gende kayıp veya kazanım bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, melanomlarda %96 oranında kromozomal değişiklik saptanırken; nevüslerde Spitz nevüsler dışında kopya sayısı değişikliği saptanmamıştır. Spitz nevüslerde izlenen değişiklik *HRAS* (11p15) kazanımı olup, bu değişiklik melanom örneklerinde saptanmamıştır (4). Ancak, CGH yönteminin doku korelasyonunun olmaması, lezyona eşlik eden non-neoplastik hücrelerin (lenfositler veya benign

deri dokusu) örneğin saflığını etkilemesi, doğru değerlendirme için örneğin en az %30-50 oranında genomik değişikliğe sahip hücre içermesi gerekliliği gibi kısıtlayıcı yönleri mevcuttur (5). Bu nedenle, günlük pratikte çok daha kolay şekilde uygulanabilen floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak melanositik lezyonlardaki genomik değişiklikleri saptamaya yönelik çalışmalar, 2005 yılı sonrasında literatürde hızla yer almaya başlamıştır. FISH kullanılarak yapılan ilk çalışmalarda, 9p21 ve 6q kaybı ile 8q24 kazanımının melanom progresyonu yönünde kanıt oluşturduğu öne sürülmüştür (6-7).

2009 yılında Gerami ve arkadaşları (8), FISH yöntemi ile prob seti çalışmasının yüksek duyarlılık ve özgüllük ile benign ve malign melanositik lezyonları ayırt ettiğini, aynı zamanda belirsiz histolojiye sahip melanositik lezyonların klinik davranışı hakkında fikir verebileceğini gözlemleyen öncü bir çalışma yayınlamışlardır. İlerleyen yıllarda, aynı veya genişletilmiş bir prob setini kullanarak yapılan onlarca çalışmanın bir kısmında benzer duyarlılık ve özgüllük oranları rapor edilirken, özellikle histolojisi belirsiz lezyonları içeren çalışmalarda daha düşük duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmiştir (9-14).

Derlememizde, Gerami ve arkadaşlarının ilk çalışmasından bugüne dek, FISH yönteminin melanositik lezyonların hem ayırıcı tanısında ve hem de prognoz

taininde yardımcı bir test olarak kullanılmasına yönelik yapılan çalışmalar özetlenecektir.

Nevüs-Melanom Ayırımında FISH Yöntemi

Gerami ve arkadaşları tarafından yapılan (8), melanomlarda FISH yöntemi ile prob seti kullanılmasında öncülük eden ilk çalışmada, 4 kohort seti çalışmaya dahil edilmiştir. 97 melanom ve 95 nevüs içeren ilk kohort setinde, CGH yöntemi ile belirlenen 9 kromozoma ait 14 adet bölge hedeflenmiştir. 6p25 (*RREB1*), sentromer 6

(*CEP6*), 6q23 (*MYB*), 7q34 (*BRF*), 11q13 (*CCND1*), 17q25 (*TK1*) ve 20q13 (*ZNF217*) bölgelerini hedefleyen problemlerin iki grubun ayırımında önemli olduğu bulunmuştur. Daha sonra aynı kohort grubunda, bu problemler üçlü ve dördümlü setler halinde çalışılarak en yüksek tanılabilir doğruluğa sahip grup; 6p25, *CEP6*, 6q23 ve 11q13 olarak belirlenmiştir (Bu lokuslar ve ilişkili genler ile ilgili bilgiler Tablo 1’de özetlenmiştir.).

Tablo 1. Melanositik lezyonlarda FISH testinde kullanılan problemler *

Lokus	Gen İsmi	Fonksiyon
6p25	<i>RREB1</i> (Ras responsive element binding protein 1)	RAS sorumlu elemanları (RRE) bağlayan transkripsiyon faktörünü kodlar. Bağlanma sonrası Ras/Raf ilişkili hücre farklılaşması uyarılır.
6q23	<i>MYB</i> (V-MYB avian myeloblastosis viral oncogene homolog)	DNA bağlayıcı bir proteini kodlar. Hücre proliferasyonunun kontrolünde görev alır.
8q24	<i>MYC</i> (V-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)	Hücre döngüsü, apoptozis ve hücrel transformasyon ile ilişkili transkripsiyon faktörünü kodlar.
9p21	<i>CDKN2A</i> (Cyclin-dependant kinase inhibitör 2A)	Siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) inhibitörlerini ve p16’yı kodlayan varyantları vardır. Hücre döngüsünün kontrolünde görev alır.
11q13	<i>CCND1</i> (Cyclin D1)	CDK4 ve CDK6 ile etkileşime giren bir proteini kodlar. Siklin D1/CDK4 kompleksi oluşturarak hücre döngüsünün ilerlemesinde görev alır.
CEP6	6. kromozom için sentromerik prob	
CEP9	9. kromozom için sentromerik prob	

* 17 numaralı kaynak temel alınarak hazırlanmıştır.

51 melanom ve 58 nevüs içeren ikinci kohort grubunda ise, bu dördümlü prob seti için en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip değerlendirme parametreleri ve eşik (cut-off) değerler saptanmıştır. Buna göre; 6p25 ile hücrelerin %29’undan fazlasında 2’den fazla sinyal varlığı,

11q13 ile hücrelerin %38’inden fazlasında 2’den fazla sinyal varlığı, 6p25 ile hücrelerin %55’inden fazlasında sentromer 6’dan daha fazla sinyal varlığı, 6q23 ile hücrelerin %40’ından fazlasında sentromer 6’dan daha az sinyal varlığı kriterler olarak belirlenmiş, bu koşullardan en az

birine sahip olgular FISH pozitif olarak kabul edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Literatürde melanositik lezyonlar için kullanılması önerilen FISH kriterleri

Önerilen Sınıflamalar		
Gerami Kriterleri (2009)	<ul style="list-style-type: none"> • %29'dan fazla hücrede <i>RREB1</i> sinyal sayısı ≥ 2 • %38'den fazla hücrede <i>CCND1</i> sinyal sayısı ≥ 2 • %55'den fazla hücrede <i>RREB1</i> sinyal sayısı > CEP6 sinyal sayısı • %40'dan fazla hücrede <i>MYB</i> sinyal sayısı < CEP6 sinyal sayısı 	
Gaiser veya Abbott Kriterleri (2010)	<ul style="list-style-type: none"> • %63'den fazla hücrede anormal <i>RREB1</i> sinyali varlığı • Hücre başına ortalama <i>CCND1</i> sinyal sayısı ≥ 2.5 • Hücre başına ortalama <i>MYB</i> sinyal sayısı ≥ 2.5 • CEP6'ya göre <i>MYB</i> sinyal kaybı izlenen hücre ≥ 31 	
Neogenomics Kriterleri (2011)	<ul style="list-style-type: none"> • %16'dan fazla hücrede <i>RREB1</i> sinyal sayısı ≥ 2 • %19'dan fazla hücrede <i>CCND1</i> sinyal sayısı ≥ 2 • %53'den fazla hücrede <i>RREB1</i> sinyal sayısı > CEP6 sinyal sayısı • %42'den fazla hücrede <i>MYB</i> sinyal sayısı < CEP6 sinyal sayısı 	
Genişletilmiş Prob Setinde Önerilen Sınıflamalar ve Gerekçeleri		
Gerami Kriterleri (2012)	<ul style="list-style-type: none"> • %29'dan fazla hücrede <i>RREB1</i> sinyal sayısı > 2 • %29'dan fazla hücrede <i>CCND1</i> sinyal sayısı > 2 • %29'dan fazla hücrede <i>MYC</i> sinyal sayısı > 2 • %29'dan fazla hücrede <i>CDKN2A</i> homozigot delesyonu varlığı 	<p><i>MYC</i> kazanımının kötü prognoz ile ilişkisi (28, 30) Artmış test duyarlılığı ve özgüllüğü (29, 30)</p>
Neogenomics Kriterleri (2016)	<ul style="list-style-type: none"> • %29'dan fazla hücrede <i>RREB1</i> sinyal sayısı > 2 • %29'dan fazla hücrede <i>CCND1</i> sinyal sayısı > 2 • %29'dan fazla hücrede <i>MYC</i> sinyal sayısı > 2 • %29'dan fazla hücrede <i>CDKN2A</i> homozigot delesyonu varlığı • Borderline pozitif grup; sinyal anormalliği saptanan hücre oranı; <ul style="list-style-type: none"> - <i>RREB1</i> için %17-29 - <i>CCND1</i> için %20-29 - <i>MYC</i> için %11-29 - <i>CDKN2A</i> %11-29 	

*Her bir kriterde, maddelerden birinin varlığında FISH testi sonucu pozitif kabul edilmektedir.

En fazla kopya sayısı değişikliği izlenen alanlar sinyal sayımı için seçilerek mümkünse en az 3 sahada rasgele

seçilmiş 10 adet nükleus 64x veya 100x objektif altında değerlendirilmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında

belirlenmiş olan dörtlü prob seti, histolojik olarak şüphe içermeyen 83 melanom ve 86 nevüs olgusunda çalışılmıştır. Yazarlar, melanomlarda 72/83 olguda pozitif, nevüslerde 82/86 olguda negatif FISH sonucu elde ederek, prob setinin özgüllüğünü %95,4, duyarlılığını %86,7 olarak rapor etmişlerdir. Pozitif FISH sonucu saptanan nevüslerden ikisinin Spitz nevüs, ikisinin displastik nevüs morfolojisine sahip olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, yazarlar, en yüksek ayırt ediciliği 11q13 probunda saptadıklarını bildirmişlerdir (8). Aynı grup araştırmacı, aynı prob seti ve kriterleri kullanarak melanom alt tipleri ve farklı problemler arasındaki tanı duyarlılığını karşılaştırdıkları çalışmalarında, en yüksek tanısal duyarlılığı akrallentiginöz melanomlarda (%100), en düşük tanısal duyarlılığı ise yüzeysel yayılan melanomlarda (%81,4) saptamışlardır. En yüksek duyarlılığa sahip kriter, 6p25 kazanımı (%74,8) olarak bulunmuştur. Ayrıca, yazarlar, problemler ile melanom örneğinin alındığı bölgenin güneş ışığı maruziyeti arasında ilişki saptamışlardır. Buna göre; 11q13 lokusu ile ilgili değişiklikler, kronik güneş ışığına maruz kalan bölgelerdeki melanomlarda daha sık olarak izlenmekteydi (15). Bu çalışmada akrallentiginöz melanom sayısının diğer alt tiplere göre oldukça az olması (3 olgu) istatistiksel karşılaştırmayı etkilemiş olabilir.

19 adet lentiginöz junctional melanom ve 17 adet benign lentiginöz nevüs içeren, aynı prob setini ve kriterleri kullanan diğer bir çalışmada ise; melanomların %84'ünde pozitif FISH sonucu, nevüslerin tamamında negatif FISH sonucu bildirilmiştir. Kromozomal kopya sayısı değişikliği saptanan olguların %94'ünde saptanan değişikliğin 6p25 kazanımı olduğu rapor edilmiştir (9). Morey ve arkadaşlarının (10) yaptığı bir çalışmada ise, 10 metastatik melanom, 10 primer melanom ve 20 benign nevüs olgusunda aynı prob setini ve kriterleri kullandıklarında nevüs melanom ayırımında %90 duyarlılık ve %95 özgüllük bildirmişlerdir. En sık saptadıkları anormallik, önceki çalışmalardan farklı olarak, olguların %70'inde görülen 11q kazanımı olarak bildirilmiştir (10).

Fang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (14), 50 nevüs, 50 primer melanom, 15 metastatik melanom içeren serilerinde, Gerami kriterleri ile 6p25, 6q23, 11q13, CEP6 problemlerini çalışarak %82 duyarlılık ve %98 özgüllük saptanmıştır. Ayrıca FISH testi pozitif olan melanom

olgularından 25'inde sentinel lenf nodu durumu incelenmiştir. Metastaz saptanan 5 olgunun 3'ünde FISH testinin pozitif, 2'sinde negatif olduğu saptanmış olup, FISH testi ile sentinel lenf nodu metastazı arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Olguların takiplerinde ise, 9 adet FISH negatif primer melanom olgusundan 6'sında metastaz geliştiğini bildirmişlerdir. Yazarlar bu sonuçlardan yola çıkarak, melanositik lezyonlarda FISH kullanımında ciddi sınırlılıklar olduğunu ve mutlaka histopatolojik bulgular ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (14). FISH testi sonuçları ile hastaların klinik takiplerinde metastaz gelişme durumunu karşılaştıran başka bir çalışmada ise, ortanca takip süresi 35 ay olan, 144 melanom olgusunda 6p25, 6q23, 11q13, CEP6 prob seti, Gerami kriterlerine göre değerlendirilmiştir (16). Araştırmacılar, metastatik olan ve olmayan gruplar arasında FISH testi pozitifliği bakımından anlamlı fark bulmuştur ($p=0,02$). Melanoma bağlı ölüm izlenen olguların (27 olgu) ise %96,7'sinde FISH testi pozitif olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre, yazarlar FISH testi pozitifliğinin metastaz gelişme riski ve melanoma bağlı ölüm açısından anlamlı olduğunu saptayarak, çok değişkenli analizde FISH testi pozitifliğinin melanomlarda bağımsız bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir ($p=0,04$) (16).

Literatürde aynı prob seti için farklı değerlendirme kriterleri kullanan çalışma grupları bulunmaktadır. FISH sinyalleri için kullanılan eşik değerlerin deneysel olarak elde edilmesi, farklı laboratuvar koşulları ve değerlendiricinin deneyimi, kriterleri oluşturan maddeleri ve eşik değerleri etkilemektedir. Örneğin, literatürde Neogenomics kriterleri olarak geçen başka bir değerlendirme kriterini kullanan, 157 nevüs ve 167 melanom içeren çalışmada duyarlılık %83,8, özgüllük %98,1 bulunmuştur. Değerlendirmede kullanılan eşik değerler ise şu şekildedir; 6p25 ile hücrelerin %42'sinden fazlasında 2'den fazla sinyal varlığı, 11q13 ile hücrelerin %19'undan fazlasında 2'den fazla sinyal varlığı, 6p25 ile hücrelerin %53'ünden fazlasında CEP6'dan daha fazla sinyal varlığı, 6q23 ile hücrelerin %42'sinden fazlasında CEP6'dan daha az sinyal varlığı, (Tablo 2). Aynı olgu grubunda Gerami kriterleri uygulandığında ise duyarlılık %65, özgüllük %98,7 olarak saptanmıştır (12).

Farklı eşik değerlerine ve maddelere sahip üçüncü bir değerlendirme kriteri ise literatürde Gaiser veya Abbott kriterleri olarak isimlendirilmektedir. Bu kriter başlığı altında kullanılan maddeler şu şekildedir; %63'den fazla hücrede anormal 6p25 sinyali varlığı, hücre başına ortalama 11q13 sinyal sayısı $\geq 2,5$, hücre başına ortalama 6q23 sinyal sayısı $\geq 2,5$, %31'den fazla hücrede CEP6'ya göre 6q23 sinyal kaybı varlığı (Tablo 2). Bu kriterleri 6 adet Spitz nevüs ve 12 adet Spitzoid melanomda değerlendiren bir çalışmada, duyarlılık %87,5, özgüllük %100 bulunmuştur (17).

Literatürde, melanositik lezyonlarda kullanılan temel prob seti için farklı değerlendirme kriterleri ve bu kriterleri kullanan farklı çalışmalar bulunmasına rağmen aynı olgu serisinde farklı değerlendirme kriterlerinin özgüllük ve duyarlılık sonuçlarını karşılaştıran çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu çalışmalardan birinde; histolojik tanısı net olan 163 melanom olgusunda 6p25, 6q23, 11q13 ve CEP6'dan oluşan prob seti, hem Gerami ve Gaiser kriterlerine göre hem de bu kriterlerin kombinasyonuna göre değerlendirilmiştir. Buna göre sadece Gerami ve sadece Gaiser kriterleri kullanıldığında sırasıyla olguların %74,2'sinde ve %69,3'ünde FISH testi pozitif bulunmuştur. Kriterler kombine edildiğinde ise bu değer %82,2'ye yükselmiştir. Yazarlar, bu sonuçlardan yola çıkarak, kombine kriterleri kullanmanın yalancı negatif sonuçları azaltabileceği yorumunda bulunmuşlardır (18). Ancak, bu durum yanlış pozitiflik oranlarını da arttırabileceği gibi, olguların takip bilgilerinin çalışmaya dahil edilmesi daha net bir sonuç elde edilmesini sağlayabilirdi.

Belirsiz Histolojiye Sahip Melanositik Lezyonlarda FISH Yöntemi

Kesin tanıya sahip nevüs ve melanom olgularını içeren çalışmalarda histopatoloji ile FISH sonuçları karşılaştırılarak elde edilen duyarlılık ve özgüllük değerlerini hesaplamak histolojisi belirsiz lezyonlar söz konusu olduğunda çoğunlukla mümkün değildir. Öte yandan, günlük pratikte yardımcı bir moleküler teste ihtiyaç duyulan olgular ise genellikle bu grup melanositik lezyonlar olmaktadır. Bu nedenle, özellikle lezyonların metastaz geliştirme riski gibi prognostik verilerin tahmini

açısından FISH yönteminin bu grup lezyonlarda kullanımını araştıran pek çok çalışma yapılmıştır.

Gerami ve arkadaşlarının melanositik lezyonlarda FISH prob seti kullanımı konusunda öncü çalışmasında, 4. kohort grubunda 27 adet histolojisi belirsiz melanositik lezyon incelenmiştir. Bu olguların her biri için en az 5 yıllık takip süresince metastaz gelişip gelişmediği not edilmiştir. Buna göre, yazarlar, metastaz izlenen 6 olgunun tümünde FISH testinin pozitif olduğunu rapor ederek, hastaliksız sağ kalım süresi ile FISH testi sonucu arasında anlamlı ilişki saptamışlardır ($p=0,003$) (8).

Başka bir grup araştırmacı, ortalama 65 ay takip süresine sahip, 12'si histolojisi belirsiz melanositik lezyon (olguların çoğunluğu Spitz nevüs ve Spitzoid melanom ayırıcı tanısında zorlanan olgulardan oluşmaktaydı.) olmak üzere 22 olgu içeren serilerinde 6p25, 6q23, 11q13 ve CEP6 prob setini, Gaiser kriterlerine göre değerlendirmişlerdir (11). Bu çalışma ayrıca, literatürde gözlemciler arası uyumu değerlendiren az sayıda çalışmadan biri olduğu için önem taşımaktadır. Gözlemciler arası uyum orta düzeyde (Kappa değeri: 0,4-0,6) bildirilmiştir. FISH testi sonuçları ve hastaların takiplerinde metastaz gelişip gelişmediği bilgileri karşılaştırıldığında, duyarlılık %50, özgüllük %60 olarak saptanmıştır (11).

Vergier ve arkadaşlarının (13) yaptığı çalışmada ise yarısını Spitzoid melanositik lezyonların oluşturduğu 90 melanositik lezyonda 6p25, 6q23, 11q13 ve CEP6 prob seti Gerami kriterlerini göre değerlendirilerek, olguların 5 yıllık takip süresince nüks ve metastaz verileri kaydedilmiştir. Buna göre; klinik gidişe göre karşılaştırıldığında, sadece histopatolojik inceleme ile %95 duyarlılık, %52 özgüllük, sadece FISH testi ile %43 duyarlılık, %80 özgüllük bildirilmiştir. FISH testi sonuçları, histopatolojik inceleme ile birlikte değerlendirildiğinde ise; duyarlılık %90'a, özgüllük %76'ya yükselmiştir. Bu çalışmada, FISH testi pozitif olan olguların hastaliksız sağ kalım süreleri daha kısa saptanmakla birlikte bu fark, Gerami ve arkadaşlarının çalışmasının aksine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (8-13).

Belirsiz histolojiye sahip melanositik lezyonları içeren serilerinde dördü prob setini (6p25, 6q23, 11q13 ve

CEP6) Gerami kriterlerine göre değerlendiren diğer bir çalışmada, 9 adet tanı zorluğu yaratan melanositik lezyona (3 Spitz nevüs, 2 konjenital nevüs, 2 melanom, 1 displastik nevüs, 1 derin penetran nevüs) FISH testi uygulanmış ve 4 tanesinde (2 Spitz nevüs ve 2 konjenital nevüs) pozitiflik saptanmıştır. Spitz nevüs olgularında FISH sonucu sonrası yapılan değerlendirmede histopatolojik tanı değiştirilmezken, ilk tanısı konjenital nevüs olan olgular melanom tanısı almıştır (19). Gerami kriterlerini kullanarak North ve arkadaşlarının (20) yaptığı diğer bir çalışma ise yaklaşık yarısını Spitzoid tümörlerin oluşturduğu 754 adet belirsiz histolojiye sahip olguda, 124 olguda pozitif, 630 olguda negatif FISH sonucu saptanmıştır. Sonrasında yapılan histopatolojik inceleme ile pozitif FISH sonucuna sahip olguların %5'i nevüs tanısı alırken, negatif FISH sonucuna sahip olguların %7,9'u malign tanısı almıştır. Ek olarak, displastik nevüs-melanom ayrımı için incelenen olgularda en sık izlenen anormallik 6p25 kazanımı iken, Spitzoid tümörlerde en sık bulgu 6q23 kaybı imiş. Yazarlar, FISH testinin melanositik lezyonlar için özgüllüğünün kesin olmadığını ve sonuçların histopatolojik değerlendirme ile korele edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (20). Bu çalışma, literatürde en fazla olgu sayısına sahip çalışma olduğu için önem taşımaktadır.

Abásolo ve arkadaşlarının (21), 3'ü sitolojik dokundurma (imprint) materyali, 47'si FFPE doku örneği olmak üzere 50 melanositik lezyonda (31 melanom, 10 benign nevüs, 9 histolojik olarak belirsiz olgu) 6p25, 6q23, 11q13, CEP6 problemlerini kullandıkları çalışmalarında, Gaiser kriterlerine göre değerlendirme yapmışlardır. Buna göre, %100 duyarlılık ve %94,1 özgüllük bildirmişlerdir. 9 adet histoloji belirsiz lezyondan sadece birinde (intradermal nevüs- nevoid melanom ayrımı) FISH testi pozitifliği saptamışlar, bu olgunun da takibinde 14. yılda metastaz geliştiğini rapor etmişlerdir. Ancak araştırmacılar, tüm olgu serisinin takip süresi hakkında bilgi vermemişlerdir. Ayrıca, 3 adet melanom olgusunda, tümör yüzeyinden dokundurma ile elde ettikleri sitolojik materyalleri kullanmışlardır, ancak kullanılan mevcut protokolün sitolojik materyaller için kullanımı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (21).

Başka bir çalışmada, çoğunluğunu Spitzoid tümörler ve displastik nevüslerin oluşturduğu 140 olguyu

histopatolojik olarak; atipik nevüs (olasılıkla benign), borderline lezyonlar ve olasılıkla malign melanom şeklinde 3 gruba ayırdıktan sonra, 6p25, 6q23, 11q13, CEP6 prob seti Neogenomics kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Buna göre, histolojik olarak atipik nevüslerin tamamında negatif FISH sonucu, borderline olguların %30'unda ve olasılıkla malign melanom olarak gruplandırılan olguların %48'inde pozitif FISH sonucu elde edilmiştir. Histopatolojik değerlendirme ve FISH sonuçlarını kombine ettiklerinde, borderline grupta olan ve FISH testi pozitif olan 10 olguyu olasılıkla malign melanom şeklinde raporlamışlardır. Ayrıca yazarlar, literatür ile uyumlu olarak, Spitzoid tümörlerde ve displastik nevüslerde en sık görülen kromozomal değişikliğin farklı olduğunu; sırasıyla 6q23 kaybı ve 6p25 kazanımı, belirtmişlerdir (22).

Benzer şekilde, histolojik olarak belirsiz melanositik lezyonlarda, 6p25, 6q23, 11q13 ve CEP6 prob setini, Neogenomics kriterlerine göre değerlendirerek yapılan iki çalışmadan ilkinde %50 duyarlılık ve %87,5 özgüllük bildirilmiştir (23). Bu çalışmada, olgular histopatolojik incelemeye göre ön planda benign (24 olgu) ve ön planda malign (10 olgu) olmak üzere sınıflandırılmış olup FISH testi sonrasında yazarlar hiçbir olguda ilk tanılarının değişmediğini rapor ederek özellikle pozitif FISH testi sonuçlarının, klinik ve histopatolojik bulgular ile birlikte yorumlanması gerektiğini belirtmişlerdir (23). Diğer çalışmada ise, yazarlar, 21 olguluk serilerinde (5 melanom, 2 MelTUMPs, 10 atipik Spitzoid tümör, 4 Spitz Nevüs), tüm melanom olgularında ve 1 MelTUMPs olgusunda pozitif FISH sonucu, Spitzoid lezyonlarda ise negatif FISH sonucu elde etmişlerdir. FISH testi pozitif olan MelTUMPs olgusunun takibinde lenf nodu metastazı ve uzak metastaz gelişmesi üzerine yazarlar, FISH testinin kötü klinik gidiş ile ilişkili olabileceği yorumunda bulunmuştur (24). Ancak çalışmada olgu sayısının az olması böyle bir çıkarımın güvenilirliğini zorlaştırmaktadır.

Bazı araştırmacılar ise Spitzoid neoplazilerde görülen genetik özelliklerin konvansiyonel melanomlardan daha farklı olduğunu ve bu nedenle genel olarak kullanılan temel prob setinin ayırt ediciliğinin bu grup lezyon için düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir (25-26). Bu hipotez ile planlanan, atipik Spitzoid tümörleri içeren iki adet çalışmanın birinde, 38 atipik Spitzoid tümörden 6'sında

pozitif FISH testi sonucu elde edilmiştir. Bu 6 olgudan biri lenf nodu metastazı geliştirirken, lenf nodu metastazı saptanan 4 olgudan 3'ünde FISH testi ile kromozomal anormallik saptanmamıştır (25). Benzer bir diğer çalışmada ise, 8'i sentinel lenf nodu metastazına, 1'i uzak metastaza sahip 16 atipik Spitzoid tümörden hiçbirinde FISH testi pozitifliği saptanmamıştır (26). Bu iki çalışmada, yazarlar farklı değerlendirme kriterlerini kullanmakla birlikte, tümü FISH testi sonuçlarının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini önermişlerdir.

Kesin histopatolojik tanıya sahip nevüs ve melanom serilerini içeren çalışmalar gibi, belirsiz histolojiye sahip lezyonlarda da temel dörtlü prob setinde (6p25, 6q23, 11q13, CEP6) farklı değerlendirme kriterlerini karşılaştıran çok az çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların en güncel olanında; displastik nevüs ve erken evre melanomlarda FISH testinin faydasını araştırmak için 50 adet displastik nevüs ve 59 adet melanom (37 melanoma in situ) olgusu incelenerek, Gerami ve Gaiser kriterleri karşılaştırılmıştır. Gerami kriterlerine göre %94,9 duyarlılık ve %94 özgüllük saptanırken, Gaiser kriterleri uygulandığında %93,2 duyarlılık ve %90 özgüllük saptanmıştır. Ayrıca, yazarlar literatürde bildirilenin aksine en duyarlı değerlendirme kriteri maddesini 6p25 kazanımı değil 11q13 kazanımı (her iki değerlendirme kriteri için) olarak bulmuşlardır (27).

Genişletilmiş FISH Prob Seti Kullanan Çalışmalar

Melanositik lezyonlarda, FISH prob setinin kullanımı ile ilgili yayınlar birikmeye başladıkça özellikle histolojisi belirsiz olup kesin tanı verilemeyen olgular için testin ayırt ediciliğinin düşük olduğunu bildiren çalışmalar artmıştır (11-13). Bunun üzerine, ilk prob setini ek lokuslar ile geliştirerek duyarlılık ve özgüllük oranlarının artırılması hedeflenmiştir. 8q24 (*MYC*) kazanımının melanositik lezyonlarda kötü prognoz ile ilişkilendiren ve 9p21 (*CDKN2A*) probunun temel sete eklenmesinin duyarlılığı arttırdığını (%70'ten %85'e) saptayan çalışmalar özellikle bu iki lokusun aday olarak incelenmesine yol açmıştır (28-29).

Sonrasında Gerami ve arkadaşları (30) ilk prob setini belirlediklerine benzer şekilde, 4 farklı kohort setini içeren bir çalışma dizayn etmişlerdir. Bu çalışmada ilk basamak olarak, 31 melanom ve 34 nevsten oluşan ilk

kohort setinde CGH çalışmalarının sonuçlarına dayanarak 18 prob çalışılarak iki grup arasında sinyal bakımından anlamlı fark sergileyen lokuslar belirlenmiştir. 49 melanom ve 51 nevüs içeren ikinci kohort setinde, problemleri gruplar halinde değerlendirdiklerinde, 6p25 (*RREB1*), 8q24 (*MYC*), 9p21 (*CDKN2A*), 11q13 (*CCND1*) prob setinin melanom ve nevüs olguları arasında daha yüksek ayırt ediciliğe sahip olduğunu saptamışlardır. Devamında ise 72 melanom ve 85 nevüs olgusunda en uygun eşik değerlerini şu şekilde belirlemişlerdir; %29'dan fazla hücrede 6p25 kazanımı, %29'dan fazla hücrede 11q13 kazanımı, %29'dan fazla hücrede 8q24 kazanımı, %29'dan fazla hücrede 9p21 homozigot delesyonu varlığı. Bu maddelerden birinin varlığında FISH testi sonucu pozitif olarak kabul edilmiştir (Tablo 2). Buna göre, 51 melanom ve 51 nevüs içeren son kohort setinde %94 duyarlılık ve %98 özgüllük elde etmişlerdir. Ki bu değerler ilk prob seti kullanıldığında (6p25, 6q23, 11q13, CEP6) sırasıyla %75 ve %96 imiş (30). Araştırmacılar, başka bir çalışmada, geliştirdikleri yeni prob setine ait sonuçları, FISH testinin düşük duyarlılığa sahip olduğu lezyon grubu olarak tanımlanan atipik Spitzoid tümörlerde, klinik izlem bilgileri ile karşılaştırmışlardır. Buna göre, 5 yıllık takip süresine sahip 75 atipik Spitz tümörü (11'inde sentinel lenf nodu metastazı veya uzak metastaz geliştirmiş) içeren çalışmalarında, 9p25 ve 11q13 kazanımı ve 9p21 kaybı daha kötü klinik davranış ile ilişkili saptanmıştır (31).

Bu yeni dörtlü prob seti yerine ilk prob setini 9p21 ve/veya 8q24 ile kombine ederek çalışan çalışmalar da mevcuttur (32-34). Kesin histopatolojik tanıya sahip, akral yerleşimli 44 melanom ve 36 nevüs olgusunda iki ayrı prob seti olarak 6p25, 6q23, 11q13, CEP6 ve 8q24 seti ile 9p21/CEP9 setini uygulayan bir çalışmada, ilk setin duyarlılığı %70,5, ikinci setin duyarlılığı %59,1 bulunurken her iki set kombine edildiğinde %88,6 duyarlılık elde edilmiştir (32). Her üç durum için ise özgüllük %100 olarak bulunmuştur. Duyarlılığı en yüksek anormallik ise 8q24 kazanımı olarak bulunmuştur. Araştırmacılar her prob için Gerami kriterlerini kullanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, her bir prob için FISH testi sonuçları kötü prognoz göstergesi olan histopatolojik parametreler ile karşılaştırılmış, 9p21 kaybı ve 8q24 kazanımı ile ülserasyon varlığı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Yazarlar bu sonuçtan yola

çıkarak bu iki kriterin kötü prognoz ile ilişkilendirilebileceği yorumunu yapmışlardır (32).

Histopatolojik olarak net tanı verilemeyen belirsiz melanositik lezyonlarda ilk prob seti ile 9p21 probunu kombine eden bir diğer çalışmada, çoğunu atipik Spitzoid tümörlerin oluşturduğu 73 olgudan sadece birinde ilk prob seti negatifken 9p21 kaybı saptanmıştır. Yazarlar bu çalışmada 9p21 kaybını, hücrelerin %33'ünden fazlasında homozigot delesyon varlığında mevcut kabul etmişler, diğer problemler için Gerami kriterlerini uygulamışlardır (34).

Benzer şekilde, temel dörtlü prob setini 9p21 probu ile kombine eden güncel bir çalışmada, 24 Spitzoid melanositik lezyondan (8 melanom, 2 atipik Spitzoid tümör, 13 Spitz nevüs, 1 sellüler mavi nevüs), dokuzunda (8 melanom ve 1 atipik Spitzoid tümör) pozitif FISH sonucu saptamışlardır. Bu çalışmada ise, 9p21 probu için hücrelerden %30'undan fazlasında homozigot delesyon varlığı kayıp olarak kabul edilerek diğer problemler Gerami kriterlerine göre değerlendirilmiştir (33). İlk prob seti ile 9p21 lokusunu hedefleyen prob kombine eden başka bir çalışmada, çoğunluğunu Spitzoid lezyonların oluşturduğu 70 adet histolojisi belirsiz melanositik lezyonda, FISH testi duyarlılığı %62, özgüllüğü %100 bulunmuştur. Yazarlar, lezyon gruplarını ayrı ayrı değerlendirdiklerinde ise test duyarlılığı; Spitzoid tümörler için %60, nevoid lezyonlar için ise %63 olarak saptanmıştır (35). Bu çalışma hem olgu sayısının görece fazla olması hem de zorlayıcı olguların farklı alt grupları için ayrı ayrı duyarlılık oranı araştırıldığı için önem taşımaktadır.

İlk prob setinde olduğu gibi 9p21 ve 8q24 lokusunu içeren setlerde de farklı gruplar tarafından farklı değerlendirme kriterleri kullanılmıştır. Örneğin, Neogenomics laboratuvarları yeni dörtlü prob setinde, Gerami kriterlerine benzer şekilde, hücrelerin en az %29'unda kromozomal anormallik varlığı halinde, 6p25 kazanımı, 8q24 kazanımı, 6q23 kaybı ve 9p21 kaybı kabul etmelerine rağmen farklı olarak, her bir prob için "borderline pozitif" alt grubu oluşturmuşlardır. Buna göre; 6p25 kazanımı için %17-29 hücrede, 11q13 kazanımı için %20-29 hücrede, 8q24 kazanımı için %11-29 hücrede, 9p21 kaybı için %11-29 hücrede anormal sinyal varlığını borderline pozitif kategorisinde kabul etmişlerdir (36,37)

(Tablo 2). Bu prob setini ve kriterleri kullanarak yapılan ilk çalışmada, net histopatolojik tanı verilemeyen 37 melanositik lezyon öncelikle benign ve öncelikle malign olmak üzere iki grup halinde incelenmiştir. Borderline pozitif gruptaki olgular için de FISH testi sonucunu pozitif kabul edildiğinde, araştırmacılar %39 duyarlılık ve %84 özgüllük saptamışlardır. Yazarların olgulara verdikleri son histopatolojik tanı ile FISH sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Takiplerinde (ortanca takip süresi 20 ay) metastaz gelişen beş olgunun ise 3'ünün negatif, 2'sinin pozitif FISH testi sonucu olduğunu belirterek yapılan istatistiksel karşılaştırmada, FISH testi sonucu ile metastaz gelişme durumu arasında anlamlı bir fark saptamamışlardır (36). Aynı kriterleri kullanarak, Minca ve arkadaşlarının (37) yaptığı çalışmada, 39 kesin histopatolojik tanıya sahip ve 78 histolojik olarak belirsiz melanositik lezyonda, sırasıyla, testin duyarlılığı %93 ve %56; özgüllüğü ise %100 ve %83 bulunmuştur. Borderline pozitif FISH sonucuna sahip olgular pozitif gruba dahil edildiklerinde her iki grupta da testin duyarlılığında artış, özgüllüğünde azalma gözlenmiştir. Histolojik olarak net tanı verilemeyen olguların farklı grupları için FISH testi duyarlılığını ayrı ayrı hesaplandığında, atipik Spitzoid tümörler için %50, displastik nevüs- nevoid melanom ayrımı yapılamayan olgular için ise %62 duyarlılık bulmuşlardır. Yazarlar, ek bir bilgi olarak, kendi serilerinde yanlış negatif FISH sonucu saptanan bir olguda, mevcut prob setinde bulunmayan 6q23 lokusunda anormallik saptadıklarını belirtmişlerdir. Buradan yola çıkarak, 6q23 lokusunu içeren bir prob setinin ayırıcı tanıda daha faydalı olacağını vurgulamışlardır (37).

SONUÇ

Son yıllarda, moleküler patoloji laboratuvarlarında yeni nesil dizileme (NGS) yönteminin yaygın kullanımı, hedeflenebilir mutasyonların saptanması gibi faydalar sağlamasına rağmen melanositik lezyonların ayırıcı tanısında FISH testi önemini korumaktadır. Bunun temel nedeni, melanom/nevüs ayrımında önemli bir belirteç olan kromozomal kopya sayısı değişikliklerinin saptanmasında FISH testinin daha uygun bir test olmasıdır.

Literatürde, benign ve malign melanositik lezyonların ayırımında FISH testi ile yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmiştir. Günlük pratikte daha sık olarak yardımcı bir teste ihtiyaç duyulan histolojik olarak belirsiz melanositik lezyon alt grubunda ise veriler hala tartışmalı olmakla birlikte umut vericidir. Daha güvenilir sonuçlar elde edilip FISH testinin bu amaçla kullanımının yaygınlaşması için daha geniş olgu serilerini ve daha uzun takip sürelerini içeren ileri çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ensslin CJ, Hibler BP, Lee EH, Nehal KS, Busam KJ, Rossi AM. Atypical Melanocytic Proliferations: A Review of the Literature. *Dermatol Surg.* 2018 Feb;44(2):159–74.
2. Ferrara G, Argenziano G. The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic Neoplasms: Suggestions From Routine Practice. *Front Oncol.* 2021;11:675296.
3. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1998 May 15;58(10):2170–5.
4. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol.* 2003 Nov;163(5):1765–70.
5. Gerami P, Zembowicz A. Update on Fluorescence In Situ Hybridization in Melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:8.
6. Casorzo L, Luzzi C, Nardacchione A, Picciotto F, Pisacane A, Risio M. Fluorescence in situ hybridization (FISH) evaluation of chromosomes 6, 7, 9 and 10 throughout human melanocytic tumorigenesis: Melanoma Research. 2005 Jun;15(3):155–60.
7. Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, et al. Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. *Br J Cancer.* 2001 Jan 5;84(1):72–9.
8. Gerami P, Jewell SS, Blondin B, Legator M, Charzan S, Lertsbarapa T, et al. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) as an Ancillary Diagnostic Tool in the Diagnosis of Melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(8):11.
9. Newman MD, Mirzabeigi M, Gerami P. Chromosomal copy number changes supporting the classification of lentiginous junctional melanoma of the elderly as a subtype of melanoma. *Mod Pathol.* 2009 Sep;22(9):1258–62.
10. Morey AL, Murali R, McCarthy SW, Mann GJ, Scolyer RA. Diagnosis of cutaneous melanocytic tumours by four-colour fluorescence in situ hybridisation. *Pathology.* 2009 Jun;41(4):383–7.
11. 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):413–9.
12. Moore MW, Gasparini R. FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. *Diagn Pathol.* 2011 Dec;6(1):76.
13. Vergier B, Prochazkova-Carlotti M, de la Fouchardière A, 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):613–23.
14. 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):434–40.
15. Gerami P, Mafee M, Lurtsbarapa T, Guitart J, Haghighat Z, Newman M. Sensitivity of Fluorescence In Situ Hybridization for Melanoma Diagnosis Using RREB1, MYB, Cep6, and 11q13 Probes in Melanoma Subtypes. *Arch Dermatol [Internet].* 2010 Mar 1 [cited 2022 Aug 3];146(3). Available from: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archdermatol.2009.386>
16. North JP, Vetto JT, Murali R, White KP, White CR, Bastian BC. Assessment of Copy Number Status of Chromosomes 6 and 11 by FISH Provides Independent Prognostic Information in Primary Melanoma. *American Journal of Surgical Pathology.* 2011 Aug;35(8):1146–50.

17. Requena C, Rubio L, Traves V, Sanmartín O, Nagore E, Llombart B, et al. Fluorescence in situ hybridization for the differential diagnosis between Spitz naevus and spitzoid melanoma: FISH in Spitz naevus versus spitzoid melanoma. *Histopathology*. 2012 Nov;61(5):899–909.
18. Kerl K, Palmedo G, Wiesner T, Mentzel T, Rütten A, Schärer L, et al. A Proposal for Improving Multicolor FISH Sensitivity in the Diagnosis of Malignant Melanoma Using New Combined Criteria. *The American Journal of Dermatopathology*. 2012 Aug;34(6):580–5.
19. Ferrara G, Misciali C, Brenn T, Cerroni L, Kazakov DW, Perasole A, et al. The Impact of Molecular Morphology Techniques on the Expert Diagnosis in Melanocytic Skin Neoplasms. *Int J Surg Pathol*. 2013 Oct;21(5):483–92.
20. North JP, Garrido MC, Kolaitis NA, LeBoit PE, McCalmont TH, Bastian BC. Fluorescence In Situ Hybridization as an Ancillary Tool in the Diagnosis of Ambiguous Melanocytic Neoplasms: A Review of 804 Cases. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014 Jun;38(6):824–31.
21. Abásolo A, Vargas MT, Ríos-Martín JJ, Trigo I, Arjona A, González-Cámpora R. Application of fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in melanocytic lesions, using paraffin wax-embedded tissues and imprint-cytology specimens: FISH as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2012 Dec;37(8):838–43.
22. Zembowicz A, Yang SE, Kafanas A, Lyle SR. Correlation Between Histologic Assessment and Fluorescence In Situ Hybridization Using MelanoSITE in Evaluation of Histologically Ambiguous Melanocytic Lesions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2012 Dec;136(12):1571–9.
23. 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. *American Journal of Surgical Pathology*. 2013 Dec;37(12):1783–96.
24. DeMarchis EH, Swetter SM, Jennings CD, Kim J. Fluorescence In Situ Hybridization Analysis of Atypical Melanocytic Proliferations and Melanoma in Young Patients. *Pediatr Dermatol*. 2014 Sep;31(5):561–9.
25. Massi D, Cesinaro AM, Tomasini C, Paglierani M, Bettelli S, Dal Maso L, et al. Atypical Spitzoid melanocytic tumors: a morphological, mutational, and FISH analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2011 May;64(5):919–35.
26. 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):243–52.
27. Lai Y, Wu Y, Liu R, Lu A, Zhou L, Jia L, et al. Four-color fluorescence in-situ hybridization is useful to assist to distinguish early stage acral and cutaneous melanomas from dysplastic junctional or compound nevus. *Diagn Pathol*. 2020 Dec;15(1):51.
28. Gerami P, Jewell SS, Pouryazdanparast P, Wayne JD, Haghghat Z, Busam KJ, et al. Copy number gains in 11q13 and 8q24 [corrected] are highly linked to prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Mol Diagn*. 2011 May;13(3):352–8.
29. 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):81–8.
30. Gerami P, Li G, Pouryazdanparast P, Blondin B, Beilfuss B, Slenk C, et al. A Highly Specific and Discriminatory FISH Assay for Distinguishing Between Benign and Malignant Melanocytic Neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology*. 2012 Jun;36(6):808–17.
31. Gerami P, Scolyer RA, Xu X, Elder DE, Abraham RM, Fullen D, et al. Risk assessment for atypical spitzoid melanocytic neoplasms using FISH to identify chromosomal copy number aberrations. *Am J Surg Pathol*. 2013 May;37(5):676–84.
32. Su J, Yu W, Liu J, Zheng J, Huang S, Wang Y, et al. Fluorescence in situ hybridisation as an ancillary tool in the diagnosis of acral melanoma: a review of 44 cases. *Pathology*. 2017 Dec;49(7):740–9.
33. Redon S, Guibourg B, Talagas M, Marcorelles P, Uguen A. A Diagnostic Algorithm Combining

- Immunohistochemistry and Molecular Cytogenetics to Diagnose Challenging Melanocytic Tumors. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2018 Nov;26(10):714–20.
34. Muhlbauer A, Momtahn S, Mihm MC, Wang J, Magro CM. The correlation of the standard 5 probe FISH assay with melanocytic tumors of uncertain malignant potential. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2017 Jun;28:30–6.
 35. Reimann JDR, Salim S, Velazquez EF, Wang L, Williams KM, Flejter WL, et al. Comparison of melanoma gene expression score with histopathology, fluorescence in situ hybridization, and SNP array for the classification of melanocytic neoplasms. *Mod Pathol*. 2018 Nov;31(11):1733–43.
 36. Al-Rohil RN, Curry JL, Torres-Cabala CA, Nagarajan P, Ivan D, Aung PP, et al. Proliferation indices correlate with diagnosis and metastasis in diagnostically challenging melanocytic tumors. *Human Pathology*. 2016 Jul;53:73–81.
 37. Minca EC, Al-Rohil RN, Wang M, Harms PW, Ko JS, Collie AM, et al. Comparison between melanoma gene expression score and fluorescence in situ hybridization for the classification of melanocytic lesions. *Mod Pathol*. 2016 Aug;29(8):832–43.