

İNVAZİV MELANOMLARDA CD271 VE BRAF EKSPRESYONUNUN KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CD271 AND BRAF EXPRESSION WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS BY IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD IN INVASIVE MELANOMA

Afife UĞUZ¹, Nermin KARAHAN²

¹ Karaman Eğitim-Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Laboratuvarı, Karaman, TÜRKİYE

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

Cite this article as: Uğuz A, Karahan N. İnvaziv Melanomlarda CD271 ve BRAF Ekspresyonunun Klinikopatolojik Parametrelerle ve Prognoz ile İlişkisinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Araştırılması. Med J SDU 2023; 30(2): 193-202.

Öz

Amaç

Amaç: İnvaziv melanomun (İM) en önemli prognostik faktörleri patolojik evreleme ve metastaz varlığı olarak bilinmektedir. Patolojik evrelemede tümör boyutu, invazyon derinliği, ülserasyon, mitotik indeks önem arz etmektedir. Çalışmamızda BRAF V600E ve CD271'in immünohistokimyasal (İHK) ekspresyonları ile klinikopatolojik parametreler ve prognoz ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Süleyman Demirel Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Aralık 2010 - Mayıs 2017 tarihleri arasında tanı almış 47 İM olgusu incelendi. Bu olgulara BRAF V600E ve CD271 belirleyicileri uygulandı. Bu belirteçlerin primer ve metastatik İM'lerde ve sağkalım ile ilişkisi immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı. Ayrıca primer ve metastatik İM'lerin ülser, lenfositik infiltrasyon, pigmentasyon, mitoz, Breslow kalınlığı, metastaz yapısı yapmaması, yaş, cinsiyet ve sağkalım ile ilişkisi araştırıldı.

Bulgular

Primer İM'ler ve metastatik İM'ler karşılaştırıldığında ülserasyon, mitotik indeks açısından, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Breslow tümör kalınlığı, lenfositik infiltrasyon, pigmentasyon, CD271 ve BRAF V600E ekspresyonu açısından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sağkalım ile ilişkilerine bakıldığında Breslow tümör kalınlığı, ülserasyon, BRAF V600E ekspresyonu şiddeti, BRAF V600E ekspresyonu olmayanlar ile olanlar arasındaki ve BRAF V600E ekspresyon şiddeti 3+ olanlar ile diğerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Cinsiyet, pigmentasyon, BRAF V600E ekspresyon yüzdesi, CD271 ekspresyon şiddeti, CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Çalışmamızda Primer İM'si olan bireylerin yaşları 35-93 arasında değişmekte olup ortalama $64,12 \pm 20,35$, metastatik İM grubundaki bireylerin yaşları 35-89 arasında değişmekte olup ortalama $69 \pm 13,42$ idi. Yaş yönünden iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: N.K. / nerminkarahan@sdu.edu.tr

Müracaat tarihi/Application Date: 20.03.2023• Kabul tarihi/Accepted Date: 09.04.2023

ORCID IDs of the authors: A.U: 0000-0002-3886-5099; N.K: 0000-0003-0883-4037

Sonuç

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilerde BRAF V600E ekspresyonu prognoz ile ilişkili olduğu gözük-mektedir. BRAF V600E ekspresyonu olmayanlarda yüksek sağkalım oranları varken ekspresyon şiddeti yüksek olanlarda sağkalımın azaldığı bulundu. Çalışmamızda CD271 ekspresyon şiddeti ve yüzdesi açısından primer ve metastatik İM gruplarında ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık.

Anahtar Kelimeler: BRAF, CD271, İmmünohistokimya, İnvaziv melanom, Prognostik faktörler

Abstract

Objective

Metastasis and pathological staging are considered the primary prognostic indicators for invasive melanoma (IM). Pathological staging is determined by evaluating tumor size, depth of invasion, ulceration, and mitotic index. Our study aims to explore the relationship between the prognosis of BRAF V600E and CD271 and their immunohistochemical expressions, as well as clinicopathological parameters.

Materials and Methods

Our study analyzed 47 cases of IM that were observed between December 2010 and May 2017 at Süleyman Demirel University's Department of Pathology. These cases were assessed using BRAF V600E and CD271 markers, and their correlation with primary and metastatic IM, as well as survival rates, were examined using immunohistochemical analysis. We also investigated the relationship between referral, lymphocytic infiltration, pigmentation, mitosis, Breslow depth, lack of metastasis screening, age, gender, and survival to provide a comprehensive understanding of the factors that may influence the disease progression and patient outcomes.

Results

The age of the primary IM patients ranged from 35 to 93 years old, with an average of 64.12 ± 20.35 years. The age of the metastatic IM patients ranged from 35 to 89 years old, with an average of 69 ± 13.42 years. Our analysis did not reveal any statistically significant differences in age between these two groups. Significant statistical differences were observed between primary IM and metastatic IM in terms of ulceration and mitotic index. However, there were no significant differences between these two groups in Breslow tumor thickness, lymphocytic infiltration, pigmentation, or the expression of CD271 and V600E. In terms of survival, statistically significant differences were observed in relation to Breslow tumor thickness, ulceration, and the intensity of BRAF V600E expression, as well as between individuals with and without expression of BRAF V600E, specifically in cases with a 3+ expression intensity. No significant differences were observed in relation to gender, pigmentation, BRAF V600E percentage of expression, CD271 expression intensity, or survival. We did not determine a statistically significant difference between primary and metastatic IM groups and survival in terms of CD271 expression severity and percentage in our study.

Conclusion

In summary, our findings suggest that the expression of BRAF V600E is associated with prognosis, with patients without this expression exhibiting a higher survival rate. However, our results indicate that the survival rate decreases as the intensity of expression increases.

Keywords: BRAF, CD271, immunohistochemistry, invasive melanoma, prognostic factors

Giriş

İnvaziv melanom (İM) nöroektodermal kökenli pigment üreten melanositlerin malignitesi olarak tanımlanmaktadır (1, 2). İM insidansı tüm dünyada diğer tümörlerden daha hızlı şekilde artmaktadır. Her yıl tüm dünyada 160.000 yeni vaka tanı alırken 48.000 ölüm rapor edilmektedir (3). Erken evre primer İM tanı için yapılan cerrahi rezeksiyon sıklıkla tedavi edicidir, fakat lokal metastazı olan hastalarda prognoz daha kötü seyredebilmektedir. Uzak metastazlı hastalarda sağkalım ve konvansiyonel kemoterapiye yanıt pek

bildirilmemiştir (4). Melanositik biyolojide hızla anlaşılan buluşlarda yeni moleküler testlerin geliştirilmesiyle tümör prognozu ve sınıflandırılmasının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır (5). İM'lerin melanositlerdeki genetik anormalliklerin birikiminden kaynaklanan genetik kompleks bir hastalık olduğunun kanıtları da günden güne artmaktadır. İM'lerin çoğunda mitoz aktive eden protein kinaz (MAPK) yolağının hiperaktivasyonunun invazyon, sağkalım ve hücre proliferasyon regülasyonunda kritik oyuncu olduğu tanımlanmıştır (6). En sık görülen mutasyon BRAF proteininde 600. dizideki valinin yerine glutamik asi-

din geçmesiyle (V600E) oluşan mutasyonudur. Bu mutasyonla kinaz aktive olarak kalır (7). Primer İM'lerde %33-%47 oranında ve metastatik İM'lerde %41-55 oranında BRAF onkogenini aktive eden mutasyon vardır (7, 8).

İM'lerin tümörögenezi ve metastazında, tümörün oluşup yayılmasına neden olan kendini sürekli yenileyen kanser kök hücrelerinin etkili olduğu anlaşıldı (1, 9). İM nöral krest kök hücrelerinden köken alan melanositlerin fenotipik özelliklerini gösterirler (1, 10).

CD271, düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörüdür. p75 ve sinir büyüme faktörü reseptörü (NGF-R) adlarıyla da bilinmektedir. Düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü nöral krestten köken alan hücrelerin yüzeyinde ekspresyon edilirler. Birçok nöral tümörde CD271 ekspresyonu gösterilmiştir (11, 12). CD271, tümör kök hücre belirteçlerindedir. CD271 ekspresyon eden tümörler CD271 negatif olan İM'lerden daha yüksek metastaz potansiyeli ve daha kötü prognoza sahiptir (9). Özellikle CD271 ekspresyonu gösteren İM'lerde beyin metastazı artmış ve CD271 ekspresyonu kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (1).

Bu çalışma ile Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış primer ve metastatik İM olgularında BRAF V600E ve CD271 ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemle belirlenmesi, prognostik faktörler ve sağkalım ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Aralık 2010 - Mayıs 2017 tarihleri arasında tanı almış 47 İM olgusu incelendi. Bu olgulara BRAF V600E ve CD271 belirleyicileri uygulandı. Bu belirteçlerin primer ve metastatik İM'lerde ve sağkalım ile ilişkisi immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı. Ayrıca primer ve metastatik İM'lerin ülser, lenfositik infiltrasyon, pigmentasyon, mitoz, Breslow kalınlığı, metastaz yapıp yapmaması, yaş, cinsiyet ve sağkalım ile ilişkisi araştırıldı.

%10'luk formalin solüsyonu ile tespit edilmiş dokulara ait tüm hematoksilin&eoazin (H&E) boyalı kesitler arşivden çıkarıldı. Bunlar incelenerek uygun İM odaklarını içeren kesitler belirlendi. Seçilen kesitlere ait rutin doku takibi ile hazırlanmış parafin bloklar tespit edildi. Parafin bloklardan Poly-L-Lysine ile kaplı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alınıp sonrasında avidin-biyotin peroksidaz İHK'sal olarak BRAF V600E (Ventana, Mouse Monoclonal Antibody, clone VE1, kullanıma

hazır form), CD271 (LSBio, Rabbit Monoclonal Antibody, clone EP1039Y, 1:100) boyandı. Bu çalışma Helsinki Deklarasyonuna göre yapılmıştır.

Değerlendirme

Çalışmadaki histolojik değerlendirmede olgulara ait bütün H&E boyalı preparatlar, ışık mikroskopunda incelendi. Olgulara ait klinik bilgiler patoloji ve onkoloji rapor arşivinden elde edildi. Breslow kalınlığı da aynı mikroskopta mikrometre ile ≤ 1 mm, 1.01–2.0 mm, 2.01–4.0 mm ve >4 mm olarak sınıflandırıldı. Ülser var ya da yok olarak belirtildi. Mitoz, x40'luk büyütmede mitotik figürlerin en çok olduğu alandan başlayarak 1mm²'ye tamamlanana kadar sayıldı. Pigmentasyon var ya da yok olarak belirtildi. Lenfositik infiltrasyon var ya da yok belirtildi. Her bir İHK'sal boya için eksternal kontrol preparatları hazırlandı.

BRAF V600E ekspresyonu değerlendirilirken, sitoplazmik boyanma esas alındı. Boyanmanın en yüksek olduğu alan belirlenerek yüzde oranı verildi. Boyanma yüzde ve şiddet olarak gruplara ayrıldı. Şiddet olarak 0, 1+ (zayıf pozitif), 2+ (orta şiddette pozitif), 3+ (kuvvetli pozitif) yüzde olarak <10 , %10-50, >50 şeklinde değerlendirildi (13).

CD271 ekspresyonu değerlendirilirken, sitoplazmik boyanma esas alındı. Boyanmanın en yüksek olduğu alan belirlenerek yüzde oranı verildi. Boyanma yüzde ve şiddet olarak gruplara ayrıldı. Şiddet olarak 0, 1+ (zayıf pozitif), 2+ (orta şiddette pozitif), 3+ (kuvvetli pozitif) yüzde olarak <10 , %10-50, >50 şeklinde değerlendirildi (14).

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın verileri SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, America) programına yüklendi. Verilerin değerlendirilmesinde 2x2 düzenlerde Ki-kare, çok gözlü düzenlerde Ki-kare testi, Kaplan-Meier analizi kullanıldı. Verilerimiz tablolarda olgu sayısı ve yüzdesi şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

Bulgular

Primer İM'si olan bireylerin yaşları 35-93 arasında değişmekte olup ortalama $64,12 \pm 20,35$, metastatik İM grubundaki bireylerin yaşları 35-89 arasında değişmekte olup ortalama $69 \pm 13,42$ idi. Yaş yönünden iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0,310$; $p<0,05$). Primer İM'si olan bireylerin 10'u (%58,9) erkek, 7'si (%41,1) kadın, metastatik İM grubundaki bireylerin 19'u (%62,4) erkek, 11'i (%36,6) kadın olup cinsiyet yönünden gruplar arası fark anlamlı bulunmadı ($p:0,760$) (Tablo 1).

The American Joint Committee on Cancer (AJCC)'

Tablo 1

Primer ve metastatik İM'lerde klinik ve histolojik parametrelerin karşılaştırılması

Özellikler	Primer İM n=17	Metastatik İM n=30	P değeri
Cinsiyet			
Kadın (%)	7 (%41,1)	11 (%36,6)	0,760
Erkek (%)	10 (%58,9)	19 (%62,4)	
Yaş			
ortalama	64,12	69	0,310
ortanca	59	71,5	
	Primer İM n= 17 (%)	Metastatik İM n=11 (%)	P değeri
Ülser			
Var	10 (%58,8)	11 (%100)	0,000
Yok	7 (% 41,2)	0 (% 0)	
	Primer İM n= 17 (%)	Metastatik İM n=11 (%)	P değeri
Mitoz			
< 2/ mm ²	2 (% 11,8)	0 (% 0)	0,02
≥ 2/ mm ²	15 (% 88,2)	11 (% 100)	

ye göre primer İM'lu hastaların 1'i (%5,8) Evre 1A, 1'i (%5,8) Evre 1B, 4'ü (%23,5) Evre 2A, 3'ü (%17,6) Evre 2B, 8'i (%47) Evre 2C bireylerden oluşurken metastatik İM'lu bireylerin 9'u (%30) Evre 3 iken, 21'i (%70) Evre 4'ten oluşmaktaydı (Bu parametrede Khi-kare dağılışı ile ilgili varsayımlar yerine getirilemediğinden test istatistiğine ait sonuçlar verilememiş ve yüzdeler ile açıklanmıştır). Primer İM'lerin hepsi kutanöz İM'lerdir. Evre 3 ve Evre 4 İM hastalarının 11'inin primeri kutanöz kaynaklıdır, 19'unun primerinin tanısına ait bilgi bulunmamaktadır.

Ülser: Primer İM'lerde 7 olguda (%41,2) ülser bulunmazken, 10 olguda (%58,8) ülser görüldü. Metastatik İM'lerde 0 olguda (%0) ülser bulunmazken, 11 olgunun tamamında (%100) ülser görüldü. Primer ve metastatik İM'lar, ülser yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,000) (Tablo 1).

Mitoz: Primer İM'lerde <2/mm² mitoz görülen 2 olgu (%11,8), ≥2/mm² mitoz görülen 15 olgu (%88,2) saptandı. Metastatik İM'lerde <2/mm² mitoz görülen 0 (%0), ≥2 /mm² mitoz görülen 11 olgu (%100) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'ler mitoz yönünden karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı pozitif

doğrusal bir ilişki vardır (p:0,02) (Tablo 1).

Breslow kalınlığı: Primer İM'lerde Breslow kalınlığı < 1.0 mm olan 2 olgu (%11,8), 1.01–2.0 mm olan ve 2.01–4.0 mm olan 3'er olgu (%17,6) ve > 4 mm olan 9 olgu (%52,9) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde ise ≤ 1.0 mm olan 0 olgu (%0), 1.01–2.0 mm ve 2.01–4.0 mm olan 1'er olgu (%10) ve > 4 mm olan 8 olgu (%80) bulunmaktaydı. Primer İM'lerde ve metastatik İM'lerde, Breslow kalınlığı yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,358).

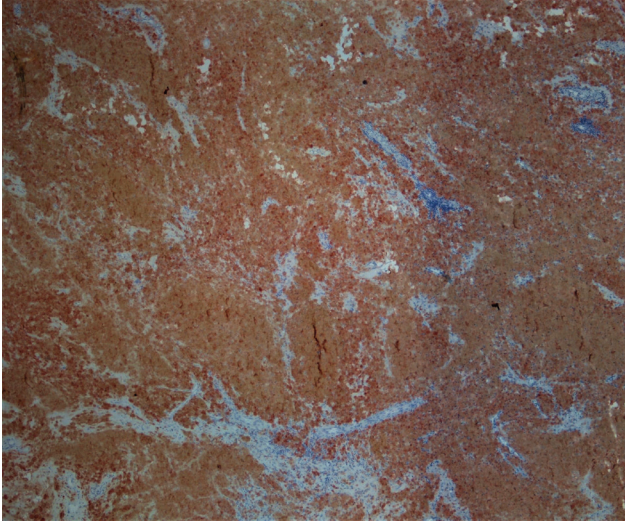
Lenfositik infiltrasyon: Primer İM'lerde lenfositik infiltrasyon yapan 5 olgu (%29,4), lenfositik infiltrasyon yapmayan 12 olgu (%70,6) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde lenfositik infiltrasyon yapan 3 olgu (%30) lenfositik infiltrasyon yapmayan 7 olgu (%70) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'lerde lenfositik infiltrasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,974).

Pigmentasyon: Primer İM'lerde pigmentasyon olan 4 olgu (%23,5), pigmentasyon olmayan 13 olgu (%76,5) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde ise pigmentasyon olan 4 olgu (%36), pigmentasyon olmayan 7 olgu

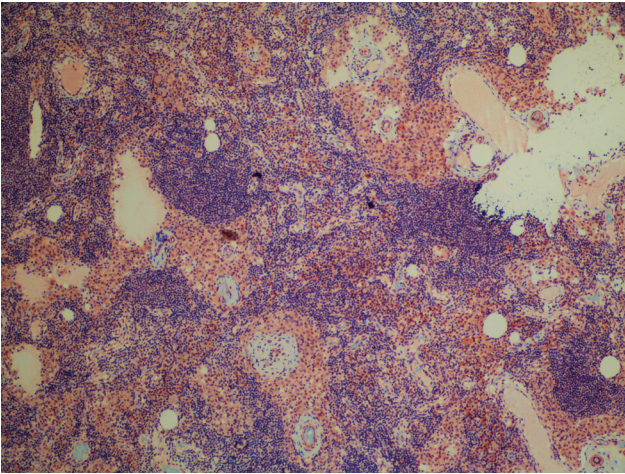
(%64) bulunmaktaydı. Primer İM'lerde ve metastatik İM'lerde pigmentasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,376).

BRAF V600E ekspresyonu: Primer İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti negatif olan 4 olgu (%23,5), 1+ olan 3 olgu (%17,6), 2+ olan 6 olgu (%35,3), 3+ olan 4 olgu (%23,5) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti 0 olan 9 olgu (%30), 1+ olan 7 olgu (%23,3), 2+ olan 6 olgu (%20), 3+ olan 8 olgu (%26,6) bulunmaktaydı. Primer İM'lerde ve metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,803) (Resim 1 ve 2).

Primer İM'lerde BRAF V600E ekspresyon yüzdesi



Resim 1
Metastatik lenf nodunda 2+ BRAF V600E boyanması (H&E x40)



Resim 2
Metastatik lenf nodunda 1+ BRAF V600E boyanması (H&E x40)

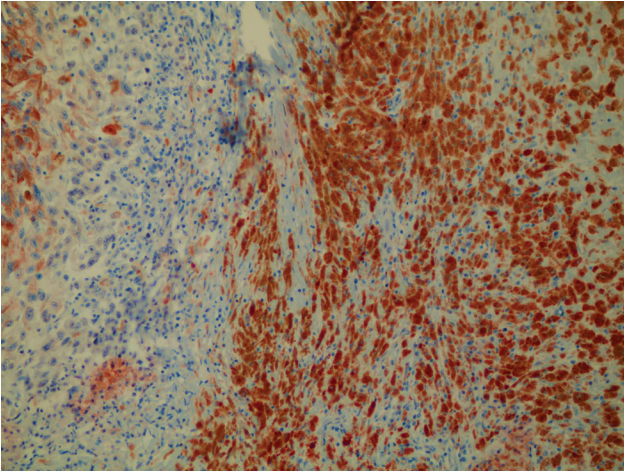
negatif olan 4 olgu (%23,5), <%10 olan 0 olgu (%0), %10-50 olan 3 olgu (%17,6), >%50 olan 10 olgu (%58,8) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu yüzdesi % 0 olan 9 (%30), <%10 olan 2 (%6,6), %10-50 olan 6 (%20), >%50 olan 13 (%43,3) olgu bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu yüzdesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,602).

Primer ve metastatik İM'lerde her olguda BRAF V600E ekspresyonu şiddeti (negatif, 1+, 2+, 3+) BRAF V600E ekspresyonu yüzdesi (negatif, < %10, %10-50, > %50) sırasıyla 0, 1, 2, 3 şeklinde puanlanmıştır. Her olgu kendi içinde puanları toplanarak istatistiksel olarak bakılmıştır. Primer İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 4 olgu (%23,5), 2 olan 0 olgu (%0), 3 olan 2 olgu (% 11,8), 4 olan 1 olgu (% 5,9), 5 olan 7 olgu (%41,1), 6 olan 3 olgu (%17,6) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 8 olgu (%26,7), 2 olan 1 olgu (%3,3), 3 olan 2 olgu (%6,6), 4 olan 8 olgu (%26,7), 5 olan 7 olgu (%23,3), 6 olan 4 olgu (%13,3) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puan açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,456).

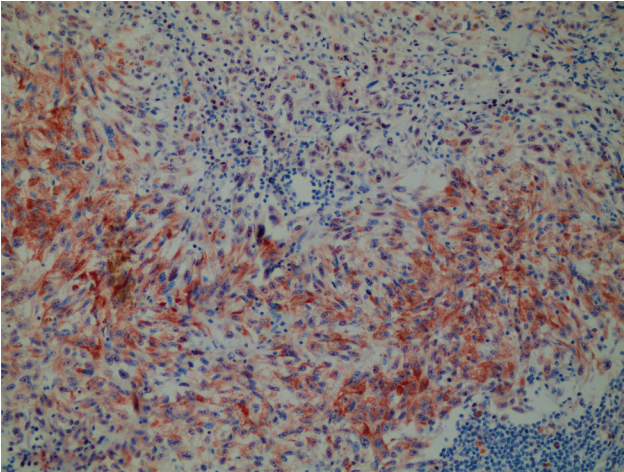
CD271 ekspresyonu: Primer İM'lerde CD271 ekspresyonu şiddeti negatif olan 1 olgu (%5,9), 1+ olan 1 olgu (%5,9), 2+ olan 5 olgu (%29,4), 3+ olan 10 olgu (%58,8) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu şiddeti 0 olan 2 olgu (%6,6), 1+ olan 3 olgu (%10), 2+ olan 4 olgu (%13,3), 3+ olan 21 olgu (%70) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,837) (Resim 3,4).

Primer İM'lerde CD271 ekspresyon yüzdesi negatif olan 1 olgu (%5,9), <%10 olan 3 olgu (%17,6), %10-50 olan 6 olgu (%35,3), >%50 olan 7 olgu (%41,2) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu yüzdesi %0 olan 2 olgu (%6,6), <%10 olan 3 olgu (%10), %10-50 olan 4 olgu (%13,3), >%50 olan 21 olgu (%70)olgu bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu yüzdesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,214; p<0,05).

Primer ve metastatik İM'lerde her olguda CD271 ekspresyonu şiddeti (negatif, 1+, 2+, 3+ ve CD271) ekspresyonu yüzdesi (negatif, <%10, %10-50, > %50) sırasıyla 0, 1, 2, 3 şeklinde puanlanmıştır. Her olgu



Resim 3
Metastatik lenf nodunda 3+ CD 271 boyanması (H&E x100)



Resim 4
Metastatik lenf nodunda 2+ CD 271 boyanması (H&E x100)

kendi içinde puanları toplanarak istatistiksel olarak bakılmıştır. Primer İM'lerde CD271 ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 1 olgu (%5,9), 2 olan 0 olgu (%0), 3 olan 2 olgu (% 11,8), 4 olan 4 olgu (% 23,5), 5 olan 5 olgu (%29,4), 6 olan 5 olgu (%29,4) bulunmaktaydı. Metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puanı 0 olan 2 olgu (%6,6), 2 olan 1 olgu (%3,3), 3 olan 1 olgu (%3,3), 4 olan 5 olgu (%16,6), 5 olan 3 olgu (%10), 6 olan 18 olgu (%60) bulunmaktaydı. Primer ve metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi toplam puan açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,258).

Sağkalım Analizleri: Olguların tanı anından bugüne kadar izlemleri incelendi. Primer İM'si olan bireylerin 1-51 ay arasında izlendiği bunların da 3'ünün (%17,6)

öldüğü, metastatik İM'li bireylerin 1-77 ay arasında izlendiği bunların 7'sinin (% 23,3) öldüğü görüldü.

Primer İM'li ölüm olan 3 bireyin hepsi tanı anında evre 2c olarak değerlendirilirken metastatik İM'li ölüm olan bireylerin 5'i (%71,4) Evre 3, 2'si (%28,5) Evre 4 olarak değerlendirildi. Sağkalım ilişkileri Kaplan-Meier Analizi ile değerlendirildi. Cinsiyet, ülser, mitoz, pigmentasyon, lenfositik infiltrasyon, Breslow kalınlığı, BRAF V600E ekspresyon şiddeti, BRAF V600E ekspresyon yüzdesi, CD271 ekspresyon şiddeti, CD271 ekspresyon yüzdesinin puan olarak değerinin sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi.

Kadınların 6'sı (%60), erkeklerin 4'ünde (%40) ölüm olmuştur. Kadın ve erkekler arasında sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,765; %95 CI:24,512-34,724) (%95 CI: Confidence Interval (Güven Aralığı)).

Breslow kalınlığı ≤ 1.0 mm olan 3 olgu, 1.01–2.0 mm olan 3 olgu ve 2.01–4.0 mm olan 4 olgunun hiçbirinde ölen olmazken ≥ 4 mm olan 18 olguda 5 olguda (%27,8) ölüm olmuştur. Breslow kalınlığı ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,000; %95 CI: 24,512- 34,724) (Tablo 2).

Ülser olan olguların 5'i (%23,8) ölüm olurken ülser olmayan olgularda ölen yoktur. Ülser ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,02; %95 CI: 24,512- 34,724) (Tablo 2).

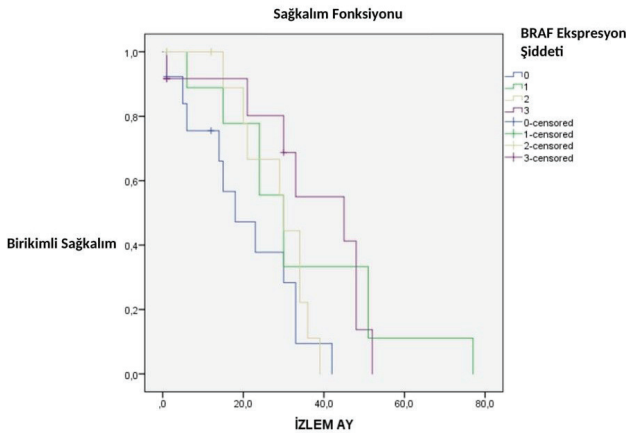
Pigmentasyon olan olguların 1'inde (%12,5) ölüm olurken pigmentasyon olmayan olguların 4'ünde (%20) ölüm olmuştur. Pigmentasyon ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,02; %95 CI: 24,512- 34,724) (Tablo 2).

BRAF V600E ekspresyon şiddeti 0 (0 puan) olan 13 (%), 1+ (1puan) olan 10 (%), 2+ (2 puan) olan 12, 3+ (3 puan) olan 12 olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin BRAF V600E ekspresyon şiddetine bakıldığında; şiddeti 0 olan 2 (%15,4), 1+ olan 10 (%10,0), 2+ olan 12 (%25), 3+ olan 12 (%33,3) olgu bulunmaktadır. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,037; %95 CI: 24,512- 34,724) (%95 CI: Confidence Interval (Güven Aralığı) (Tablo 2 – Şekil 1).

BRAF V600E ekspresyon yüzdesi %0 (0 puan) olan 13, <%10 (1puan) olan 2, %10-50 (2puan) olan 9, >%50 (3puan) olan 23 olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin BRAF V600E ekspresyon yüzdesine bakıldığında; %0 olan 2 (%16,7), <%10 olan 0 (%0), %10-50 olan 2 (%22,2), >%50 olan 6 (%26,1) bulunmaktadır. BRAF

Tablo 2 Sağkalım analizleri

Breslow kalınlığı	N	% 95 CI	P değeri
≤ 1 mm	3		0,000
1,01 – 2 mm	3		
2,01 – 4 mm	4		
≥4 mm	18		
Ülser			
Var	21	16,054-27,664	0,02
Yok	7	31,567-47,290	
Pigmentasyon			
Var	8	6,013-13,239	0,668
Yok	20	3,413-21,354	
BRAF V600E Ekspresyon Şiddeti			
0 (Negatif)	13	13,04 – 28,22	0,037
1 (1 +)	10	19,97 – 48,46	
2 (2 +)	12	23,29 – 34,03	
3 (3 +)	12	27,12 – 46,82	



Şekil 1

Sağkalım eğrisi. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisi.

V600E ekspresyon yüzdesi ile sağkalım karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,066; %95 CI: 24,512- 34,724).

BRAF V600E ekspresyon şiddeti 0 puan olan 13 (%27,6) , 1, 2, 3 puan olan 34 (%72,4) olgu bulunmaktaydı. Ölenlerin BRAF V600E ekspresyon şiddeti; 0 puan olan 2 (%15,4), 1, 2, 3 puan olan 34 (%23,5) bulunmaktadır. BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile

sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,012; %95 CI: 24,512- 34,724).

BRAF V600E ekspresyon şiddeti ve yüzdesi puanları toplamı 3 puan olan 13 (%27,6) , 2, 4, 5, 6 puan olan 34 (%72,3) olgu bulunmaktaydı. Ölenlerde; 3 puan olan 2 (%15,4), 2, 4, 5, 6 puan olan 34 (%23,5) olgu bulunmaktadır. BRAF toplam puan 3 ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,029; %95 CI: 24,512- 34,724).

CD271 ekspresyon şiddeti 0 (0 puan) olan 3 (%6,3), 1+ (1 puan) olan 4 (%8,5), 2+ (2 puan) olan 9 (%19,1), 3+ (3 puan) olan 31 (%65,9) olgu bulunmaktadır. Ölenlerin CD271 ekspresyon şiddeti; şiddeti 0 olan 0 (%0), 1+ olan 2 (%50), 2+ olan 2 (%22,2), 3+ olan 6 (%19,4) olgu vardır. CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,520; %95 CI: 24,512- 34,724).

CD271 ekspresyon yüzdesi %0 (0 puan) olan 3 (%6,3), <%10 (1puan) olan 6 (%12,7), %10-50 (2 puan) olan 10 (%21,3), >%50 (3 puan) olan 28(%59,6) olgu bulunmaktadır. Ölenlerin CD271 ekspresyon yüzdesi; %0 olan 0 (%0), <%10 olan 2 (%33,3), %10-50 olan 2 (%20), >%50 olan 6 (%21,4) olgu vardır. CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,231; %95 CI: 24,512- 34,724).

Tartışma

İM tüm deri kanserlerinin %4-5'ini ve deri kanserlerine bağlı ölümlerin de %75'ini oluşturmaktadır (2, 15). Uzak metastazlı İM hastaları tipik olarak kötü prognoza sahiptir ve beş yıllık sağkalım oranları yaklaşık % 16 ve medyan sağkalım bir yıldan azdır (16). I. ve II. evre İM'lerde prognostik faktörler: güçlü prognostik olanlar (sağkalım açısından bağımsız prediktif faktörler): Breslow tümör kalınlığının artması, ülser varlığı, mitotik indeksin artması; zayıf prognostik faktörler; yaşın artması, erkek cinsiyet, baş-boyun lokalizasyonu, Clark level'in artması, yüzeysel dışındaki alt tipler, lenfovasküler invazyon varlığı, perinöral invazyon varlığı, regresyonun olması tümörü infiltrate eden lenfositlerin olmaması olarak sınıflandırılabilir (17). Literatürde yer alan diğer çalışmalarda ise CD271 ekspresyonunun İM'nin prognostik faktörlerinden olan Breslow kalınlığı, Clark level, sentinel lenf nodu durumu, patolojik evresi, rekürens, ölüm ile önemli bir korelasyonu gösterilememiştir (1, 9).

Primer İM'lerde ve metastatik İM'lerde BRAF V600E ekspresyonu şiddeti açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Literatürde, konu hakkında birbiriyle çelişen veriler yer almaktadır. Ancak, Bhandaru ve arkadaşları AJCC evre I'den evre III'e ilerledikçe yüksek BRAF ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını ve evre III'den IV'e ilerledikçe anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir (18). Chen ve arkadaşları lenf nodu metastazı ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı ilişki bildirmişlerdir (19). Shinozaki ve arkadaşları eşzamanlı lenf nodu metastazı ile ilişkili primer tümörlerde BRAF mutasyon sıklığı biraz daha yüksek bulurken, lenf nodu metastazı olmayan primer İM'lere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulmamışlardır (20). Bunun aksine Eigentler ve arkadaşları ilk tanıdaki tümör evresi ile BRAF mutasyonu arasında anlamlı ilişki olduğunu bildirmişlerdir (21).

Primer İM'lerde ve metastatik İM'lerde lenfositik infiltrasyon yönünden karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Lenfosit infiltrasyonu ile tümör hücresi tipi, pigmentasyon, atipi, mitotik sayı ve hastanın cinsiyeti ve yaşı arasında anlamlı bir ilişki gösteremedik. Başka bir çalışmada invazyon seviyesi, tümör tipi ve lenfosit infiltrasyonu arasında bizim çalışmamıza benzer şekilde anlamlı bir ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir (22).

Primer İM'lerde ve metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu şiddeti ve yüzdesi açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Fakat CD271 ekspresyonunun şiddet ve yüzdesinin toplam puan olarak değerlerine bakıldığında

da en yüksek puan olan 6 puanı alan olgu sayısının primer İM'lerde % 29,4 oranında, metastatik İM'lerde % 60 oranında bulduk. Bu durumda yeterli olgu sayısında metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonunun daha fazla olduğu görülebilir. Guo ve arkadaşları yine bizim çalışmamızda olduğu gibi primer ve metastatik İM'lerde CD271 ekspresyonu arasında fark bulmamışlardır (1). Mohamed ve arkadaşları bizim çalışmamıza benzer şekilde, CD271 ile Breslow, evre, lenf nodu durumu ile ya da sağkalım ile ilişki bulamamışlardır (9). CD271'in nörotropik invaziv İM'lerde eksprese edildiğini, buna karşın perinöral invazyonu olmayan invaziv İM'lerde CD271 ekspresyonu bulunmadığını gösteren çalışmalar vardır (23). Ayrıca İM'lerde CD271 pozitif olanların daha invaziv olduğu ve beyin invazyonun sık olduğu bilinmektedir (11). Bizim çalışmamızda da primer İM'lerde CD271 pozitif olan olgularda CD271 pozitifliğini tümörün daha derin alanlarında daha fazla olduğunu ya da ekspresyon şiddetinin arttığını gözlemledik. Ayrıca metastatik ve primer İM'lerde büyük damarların çevresine ve perinöral invazyon alanında CD271 ekspresyon şiddetinin diğer alanlardan daha fazla olduğunu beyin invazyonu yapan vakaların hepsinde de CD271 ekspresyonu olduğunu gözlemledik.

BRAF V600E ile CD271 arasında ekspresyon şiddeti ve yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. CD271 ekspresyonunun invaziv tümörlerle ilişkilendirilmesi tam aksine BRAF V600E'nin evre III'den evre IV'e geçerken ekspresyonun azaldığını gösterilmesi bu iki belirtecin invazyon ve metastaz üzerinde benzer etkisinin olmadığını göstermektedir (11,18).

BRAF V600E ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. BRAF ekspresyonunun bağımsız bir prognostik faktör olmadığını gösteren veriler de yer almaktadır (6, 18, 20, 24).

CD271 ekspresyon şiddeti ile sağkalım ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. CD271 ekspresyon yüzdesi ile sağkalım karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; Beretti ve arkadaşları CD271 ve sağkalım arasında önemli ilişki bildirdiler (10). Gambichler ve arkadaşları CD271 ile yaş arasında negatif ölümle pozitif korelasyon bildirmişlerdir (25).

Bu verilere ilave olarak çalışmamızda, primer ve metastatik İM'lerde arasında ülser varlığı ve mitoz sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Metastatik İM'lerde hepsinde ülser tespit ettik. Bu durum metastatik İM gelişene kadar ülserasyonun da olduğu şeklinde ya da ülserasyon olanlar da metas-

taz gelişmesinin daha kolay olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ülserasyonun tek başına İM'nin prognostik bir faktörü olduğu bilinmektedir (26). Mitoz sayısında ile pozitif doğrusal bir ilişki vardır mitoz sayısı arttıkça lokal İM'den metastatik İM'ye ilerlemektedir. Tümör kalınlığı arttıkça mitotik indeks arttığını gösteren çalışmalar vardır aynı zamanda mitoz metastatik İM'lu hastalarda prognozu etkilemektedir (17).

Çalışmamızda Breslow tümör kalınlığı ile primer ve metastatik İM'lerde arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Fakat primer İM'lerde tümör kalınlığı ≥ 4 mm olanlar %52,9 iken metastatik İM'lerde bu oran % 82'dir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da yeterli olgu sayısı sağlandığında aradaki orantısal fark göz önüne alındığında metastatik İM'lerde tümör kalınlığının daha fazla olduğunu görebiliriz.

Çalışmamızda pigmentasyon varlığı ve tümöre lenfositik infiltrasyon açısından primer ve metastatik İM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Fakat lenfositik infiltrasyon ve pigmentasyon varlığının her iki grupta da benzer oranlarda ve aynı vakalarda olması lenfositik infiltrasyonun pigmentasyon olan olgularda olduğunu düşündürdü. Ancak bununla ilgili daha çok olgu sayısı olan çalışmalar yapılması fayda sağlayacaktır.

Çalışmamızda cinsiyet, pigmentasyon varlığı açısından sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlemedik. Fakat Breslow kalınlığı ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulduk ve Breslow kalınlığı arttıkça sağkalım oranları düşmektedir. Ülser varlığı ve sağkalım arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulduk. Ülser olanlarda sağkalım oranlarının düştüğünü belirledik.

Sonuç

Çalışmamızda CD271 ekspresyon şiddeti ve yüzdesi açısından primer ve metastatik İM gruplarında ve sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlemedik. Fakat CD271 ekspresyonunun şiddet ve yüzdesinin toplam puan olarak değerlerine bakıldığında en yüksek puan olan 6 puanı alan olgu sayısının primer İM'lerde % 29,4 oranında, metastatik İM'lerde % 60 oranında olduğunu belirledik.

Çalışmamızda BRAF V600E ekspresyon şiddeti ve yüzdesi açısından primer ve metastatik İM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmadı ve her grupta benzer şiddet ve yüzde oranlarında ekspresyon görüldü. Fakat BRAF V600E ekspresyonunun sağkalımla istatistiksel olarak anlamlı ilişkisini bulduk. Ayrıca BRAF V600E ekspresyonu olmayanlarla şid-

deti ne olursa olsun ekspresyon olanlar arasında da sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Bu durum da BRAF V600E ekspresyonunun evreden bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini gösterebilir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için gerekli etik kurul onayı, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nda 28.09.2016 tarihinde 154 karar no'lu rapor ile alındı. Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yürütülmüştür.

Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

Finansman

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi tarafından 4811-TU1-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

Verilerin Ulaşılabilirliği

Tüm veriler makalede mevcuttur.

Yazar Katkıları

N.K: Çalışmanın planlanması, metodoloji, makalenin yazılması, finansman eldesi, kaynakların sağlanması, A.U: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

Kaynaklar

1. Guo R, Fierro-Fine A, Goddard L, Russell M, Chen J, Liu CZ, et al. Increased expression of melanoma stem cell marker CD271 in metastatic melanoma to the brain. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(12):8947-51.
2. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob J-J, Halpern A, et al. Melanoma. *J Nat Rev Dis Primers.* 2015;1(1):1-20.
3. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2014;383(9919):816-27.
4. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic classification of cutaneous melanoma. *J Cell.* 2015;161(7):1681-96.
5. Cooper C, Sorrell J, Gerami P. Update in molecular diagnostics in melanocytic neoplasms. *Adv Anat Pathol.* 2012;19(6):410-6.
6. Rutkowski P, Gos A, Jurkowska M, Switaj T, Dzierwinski W, Zdzienicki M, et al. Molecular alterations in clinical stage III cutaneous melanoma: Correlation with clinicopathological features and patient outcome. *Oncol Lett.* 2014;8(1):47-54.
7. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1239-46.

8. Mar VJ, Liu W, Devitt B, Wong SQ, Dobrovic A, McArthur GA, et al. The role of BRAF mutations in primary melanoma growth rate and survival. *Br J Dermatol*. 2015;173(1):76-82.
9. Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. Tumor stem cells (CD271, c-kit, SOX10) in Melanomas: prognostic and outcome implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(2):142-5.
10. Beretti F, Manni P, Longo C, Argenziano G, Farnetani F, Cesinaro A, et al. CD271 is expressed in melanomas with more aggressive behaviour, with correlation of characteristic morphology by in vivo reflectance confocal microscopy. *J British Journal of Dermatology*. 2015;172(3):662-8.
11. Marconi A, Borroni RG, Truzzi F, Longo C, Pistoni F, Pellacani G, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α and CD 271 inversely correlate with melanoma invasiveness. *J Experimental Dermatology*. 2015;24(5):396-8.
12. Sigal AC, Keenan M, Lazova R. P75 nerve growth factor receptor as a useful marker to distinguish spindle cell melanoma from other spindle cell neoplasms of sun-damaged skin. *J The American Journal of dermatopathology*. 2012;34(2):145-50.
13. Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE, Ladstein RG, Akslen LA. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. *J British journal of cancer*. 2016;114(7):801-8.
14. Lazova R, Tantcheva-Poor I, Sigal AC. P75 nerve growth factor receptor staining is superior to S100 in identifying spindle cell and desmoplastic melanoma. *J Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;63(5):852-8.
15. Shenenberger DW. Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. *Am Fam Physician*. 2012;85(2):161-8.
16. Evans RD, Kopf AW, Lew RA, Rigel DS, Bart RS, Friedman RJ, et al. Risk factors for the development of malignant melanoma—I: Review of case-control studies. *J The Journal of dermatologic surgery*. 1988;14(4):393-408.
17. Bartlett EK, Karakousis GC. Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(2):215-27.
18. Bhandaru M, Ardekani GS, Zhang G, Martinka M, McElwee KJ, Li G, et al. A combination of p300 and Braf expression in the diagnosis and prognosis of melanoma. *BMC Cancer*. 2014;14(1):398.
19. Chen G, Dudley J, Tseng LH, Smith K, Gurda GT, Gocke CD, et al. Lymph node metastases of melanoma: challenges for BRAF mutation detection. *Hum Pathol*. 2015;46(1):113-9.
20. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res*. 2004;10(5):1753-7.
21. Eigentler T, Assi Z, Hassel JC, Heinzerling L, Starz H, Berneburg M, et al. Which melanoma patient carries a BRAF-mutation? A comparison of predictive models. *J Oncotarget*. 2016;7(24):36130.
22. Larsen TE, Grude TH. A Retrospective Histological Study of 669 Cases of Primary Cutaneous Malignant Melanoma in Clinical Stage I: 3. The Relation between the Tumour-Associated Lymphocyte Infiltration and Age and Sex, Tumour Cell Type, Pigmentation, Cellular Atypia, Mitotic Count, Depth of Invasion, Ulceration, Tumour Type and Prognosis. *J Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology*. 1978;86(1-6):523-30.
23. Chan MM, Tahan SR. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75 NGFR) as a marker of perineural invasion in malignant melanomas. *J Journal of cutaneous pathology*. 2010;37(3):336-43.
24. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhonen S, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2003;9(9):3362-8.
25. Gambichler T, Petig AL, Stockfleth E, Stucker M. Expression of SOX10, ABCB5 and CD271 in melanocytic lesions and correlation with survival data of patients with melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2016;41(7):709-16.
26. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.