



Malign melanomada prognostik histopatolojik özellikler ile nm23 ve p16 ekspresyonunun karşılaştırılması

Comparison of prognostic histopathological features in malignant melanoma with the expression of nm23 and p16 proteins

Şule Özsoy, Selda Seçkin*

Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye
*Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Yozgat, Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışmada malin melanomalarda (MM) prognostik faktörler ile nm23 ve p16 ekspresyonu arasındaki korelasyonun araştırılıp, prognostik faktör olarak değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Kırk malin melanoma olgusunun HE kesitlerinde Breslow indeksi, Clark Level, ülserasyon varlığı ve lenfositik infiltrasyon durumu belirlenmiştir. Ayrıca tümör lokalizasyonlarının UV ışın maruziyeti de tespit edilmiştir. Tümörden hazırlanan kesitlere nm23 ve p16 antikorları uygulanmış immünreaktivite semikantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Olgularda yaygınlığına göre nm23 protein ekspresyonu lenfosit infiltrasyonu ile orantılı ($p=0,00$), Breslow indeksi ile ters orantılı ($p=0,022$) olarak saptanırken, Clark Level ($p=0,082$) ve ülserasyon ($p=0,25$) ile istatistiksel olarak ilişki saptanmamıştır. Yoğunluğuna göre nm23 ekspresyonu, lenfosit infiltrasyonu ile orantılı ($p=0,00$), Breslow indeksi ($p=0,002$), Clark Level ($p=0,004$) ve ülserasyon ($p=0,014$) ile ters orantılı olarak saptanmıştır. Yaygınlık ve yoğunluğuna göre p16 protein ekspresyonu lenfosit infiltrasyonu ($p=0,003$ $p=0,012$) ile, yoğunluğuna göre ise ülserasyon ($p=0,014$) ile korele bulunmuştur. Breslow indeksi ($p=0,129$, $p=0,174$) ve Clark Level ($p=0,072$, $p=0,08$) ile istatistiksel olarak korelasyon saptanmamıştır. UV ışın maruziyeti ile nm23 ($p=0,877$ $p=0,563$) ve p16 ($p=0,471$ $p=0,810$) ekspresyonu istatistiksel olarak korele bulunmamıştır.

Sonuç: Olgularda p16 ekspresyonu ile çoğu prognostik faktörlerle istatistiksel korelasyon bulunmamakla birlikte bulgular az da olsa prognozla korele olabileceğini ve ekspresyon farklılıklarının anlaşılıp tanımlanması için daha geniş olgu serilerinde çalışmaların gerekliliğini düşündürmüştür. Bulgular nm23 ekspresyonunun prognostik faktörlerle belirgin korelasyon olduğunu göstermektedir. Nm23 ekspresyonunun, prognostik faktörlere ek bir parametre olabileceği, prognostik faktörlerle korele olmayan progres ve survileri açıklayabileceği düşünülmüştür. (Türkderm 2015; 49: 147-52)

Anahtar Kelimeler: Malign melanoma, prognostik faktörler, p16, nm23

Summary

Background and Design: The aim of the study was to evaluate the correlation between prognostic histopathological factors in malignant melanoma (MM) and the expression of nm23 and p16 proteins and to investigate the value of these proteins as a prognostic factor.

Materials and Methods: Breslow index, Clark level, presence of ulceration and lymphocytic infiltration were evaluated in HE sections of 40 malignant melanoma cases. UV light exposure of tumor locations was also recorded. Nm23 and p16 antibodies were applied on the tumor sections and immunoreactivity was evaluated semi-quantitatively.

Results: According to the extent of expression, nm23 protein was correlated with lymphocytic infiltration ($p=0,00$), where it was inversely proportional with Breslow index ($p=0,022$). No statistically significant correlation was determined between expression of this protein and Clark level ($p=0,082$) and ulceration ($p=0,25$). According to the intensity, expression of nm23 protein was correlated with lymphocytic infiltration ($p=0,00$) and it was inversely proportional with Breslow index ($p=0,002$), Clark level ($p=0,004$) and ulceration ($p=0,014$). The expression of p16 protein was correlated with lymphocytic infiltration according to both extensiveness and intensity ($p=0,003$, $p=0,012$, respectively), but it was correlated with ulceration according to intensity only ($p=0,014$). No statistically significant correlation of expression of p16 protein with Breslow index ($p=0,129$, $p=0,174$) and Clark level ($p=0,072$, $p=0,08$) was determined. UV light exposure and expression of both nm23 ($p=0,877$, $p=0,563$) and p16 ($p=0,47$, $p=0,810$) proteins were not statistically correlated.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Şule Özsoy, Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye
Tel.: +90 505 767 23 01 E-posta: suleozsoy38@my.net.tr **Geliş Tarihi/Received:** 31.08.2014 **Kabul Tarihi/Accepted:** 16.01.2015

Conclusion: In our study, although we did not find any statistically significant correlation between expression of p16 protein and the majority of the prognostic factors, our findings suggest slight correlation with prognosis that additional studies of larger series are needed to define the expression differences. Our findings indicate prominent correlation between the expression of nm23 protein and prognostic factors. The expression of nm23 protein is thought to be an additional parameter to prognostic factors and it might explain the progress and survival that are not correlated with prognostic factors. (Türkderm 2015; 49: 147-52)

Key Words: Malign melanoma, prognostic factors, p16, nm23

Giriş

Malin melanomanın (MM) prognozunu etkileyen faktörler büyük oranda belirlenmiştir. Bunlardan evrelemede yer alanlar Clark Level, Breslow İndeksi, ülserasyon, lenf nodu durumu, satellit lezyonlar, intranazal metastazlar, uzak metastazlar ve serum LDH seviyesidir. Ancak mitotik aktivite, lenfositik infiltrasyon, tümörü oluşturan hücrelerin özellikleri, vasküler invazyon, yaş, cinsiyet ve tümör lokalizasyonu da prognozda önemli olduğu düşünülen parametrelerdir.

Clark ve ark. 386 evre 1 MM olgusunda prognostik faktörleri araştırmış, 0,76 mm'den daha ince olan olgularda %3,3 oranında metastaza bağlı ölüm saptamışlardır¹. Ayrıca bazı kalın melanomalı olgularda (4 mm<) şaşırtıcı olarak beklenenden daha uzun sürvi gözlenmiştir.

Bu durum metastaz riski olan olguları belirlemek ve tedaviyi yönlendirmek için yeni prognostik faktörlere ihtiyaç olduğunu göstermiştir^{2,3}. Bu açıdan araştırılan proteinlerden biri metastaz süpresör gen ekspresyonu sonucu oluşan bir nükleozid difosfat kinaz olan nm23, diğeri de tümör süpresör gen ürünü ve CDK inhibitörü olan p16 proteinleridir.

Nm23 proteininin birçok insan ve hayvan sistemlerinde düşük oranda ekspresyonu tümör veya transforme hücrelerin yüksek metastatik potansiyeli ile orantılı bulunmuştur⁴. Bu durum bu genin metastaz süpresör gen olarak görev yaptığını düşündürmüştür⁴.

Puig ve ark. melanoma oluşumuna neden olan süpresör gen lokalizasyonunun 9p21 olduğunu saptamışlardır. 9p delesyonlarının çok kötü prognozla ilişkili bulunması, bu lokalizasyonda birden fazla tümör süpresör gen bulunabileceğini düşündürmüştür. P16'da bunlardan birisidir^{5,6}.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza 40 MM olgusu dahil edildi. Olguların yaş, cinsiyet ve tümör lokalizasyonlarına ait bilgiler arşivden elde edildi. Buna göre UV ışınlarına maruziyeti değerlendirildi.

UV ışın maruziyeti olan alanlar baş, boyun ve üst ekstremitte distali, olmayan alanlar ise gövde, üst ekstremitelerin proksimali ve alt ekstremitte olarak belirlendi.

Olgulara ait HE preparatlar prognostik öneme sahip Clark Level, Breslow İndeksi, ülserasyon ve lenfositik infiltrasyon açısından değerlendirmek üzere yeniden incelendi. Clark Level, Breslow İndeksi belirlendi. Ülserasyon bulunup bulunmadığı saptandı. Lenfositik infiltrasyon tümör çevresi ve içindeki lenfositik infiltrasyon dikkate alınarak,

- +++ : Tümör çevresi ve içinde yoğun lenfositik infiltrasyon,
- ++ : Tümör çevresi ve içinde orta derecede yoğunlukta lenfositik infiltrasyon,
- + : Tümör çevresi ve içinde hafif lenfositik infiltrasyon,
- : Tümör çevresinde ve içinde nadir lenfosit varlığı olarak değerlendirildi.

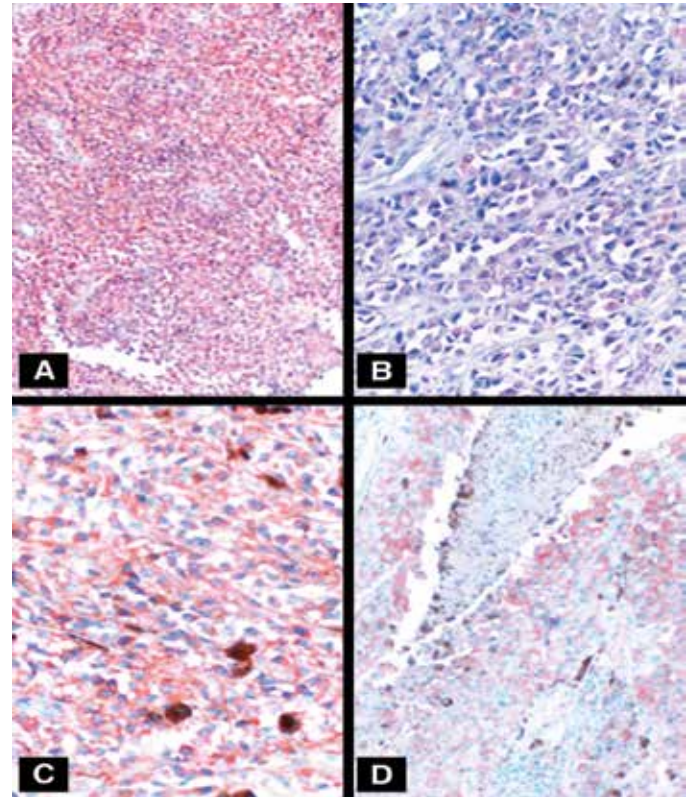
Her olgudan tümörün en iyi temsil edildiği bir parafin blok seçildi, kesitler alındı ve immünohistokimyasal olarak nm23 protein (NDP Kinase/nm23 ab-1, Rabbit Polyclonal Antibody, Neomarkers) ve p16 protein (p16 INK4a Ab 4, Mouse Monoclonal Antibody, Lab Vision) uygulandı.

Her iki antikor ile boyanmalar semikantitatif olarak hücrelerdeki yaygınlığına göre:

- +++ : Tümör hücrelerinin %50'nden fazlasında boyanma (Resim 1A, Resim 2A),
- ++ : Tümör hücrelerinin %10-50'sinde boyanma,
- + : Tümör hücrelerinin %10'undan azında boyanma (Resim 1B, Resim 2B),
- : Tümör hücrelerinde boyanma izlenmedi şeklinde değerlendirildi. Her iki antikor ile boyanmalar semikantitatif olarak yoğunluğuna göre,
- +++ : Tümör hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik boyanma (Resim 1C, Resim 2C),
- ++ : Tümör hücrelerinde orta derecede sitoplazmik boyanma,
- + : Tümör hücrelerinde zayıf sitoplazmik boyanma (Resim 1D, Resim 2D),
- : Tümör hücrelerinde boyanma izlenmedi şeklinde değerlendirildi.

İstatistiksel analiz

Olgular her bir parametre açısından gruplandırıldı ve kodlandırıldı. İki nitelikli değişkenler arasındaki farkı karşılaştırmak amacıyla Pearson's Ki-kare testi kullandı. İki gruptaki ortalamaları karşılaştırmak amacıyla



Resim 1. A) Yaygınlığına göre +++ nm23 boyanması (x100). B) Yaygınlığına göre + nm 23 boyanması (x200). C) Yoğunluğuna göre +++ nm 23 boyanması (x200). D) Yoğunluğuna göre + nm 23 boyanması (x200)

Mann-Whitney U testi uygulandı. İki gruptan fazla grupta ortalamaları karşılaştırmak amacı ile varyans analizi yapıldı.

Bulgular

Çalışmamızda 21 kadın 19 erkek hastaya ait 40 malin melanom olgusu değerlendirildi. Hastaların ortalama yaşı 62 (22-84) idi. Olgularda nm23 proteini yaygınlığı azaldıkça Breslow indeksinde artış gözlenmiştir. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p=0,022). Olgularda nm23 proteini yoğunluğu azaldıkça Breslow indeksinde artış gözlenmiştir. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. (p=0.002) Clark Level I düşük olan olgularda yoğunluğuna göre daha çok nm23 ekspresyonu gözlenmiştir. Korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,004). Olgularda yoğunluğuna göre nm23 ekspresyonu ile ülserasyon arasında korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,023). Olgularda yaygınlığına göre nm23 ekspresyonu arttıkça lenfosit infiltrasyonunun da arttığı gözlenmiştir. Bu iki parametre arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır (p=0,000). Olgularda yoğunluğuna göre nm23 ekspresyonu arttıkça lenfosit infiltrasyonunun da arttığı gözlenmiştir. Bu iki parametre arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır (p=0,000).

Olgularda yoğunluğuna göre p16 protein ekspresyonu ile ülserasyon arasında anlamlı ilişki gösterilmiş olup p16 ekspresyonunun yoğunluğu azaldıkça ülserasyonun arttığı belirlenmiştir (p=0,014). Olgularda

yaygınlığına göre p16 protein ekspresyonu lenfositik infiltrasyonla korele bulunmuştur (p=0,003). Olgularda yoğunluğuna göre p16 protein ekspresyonu lenfositik infiltrasyonla korele bulunmuştur (p=0,012).

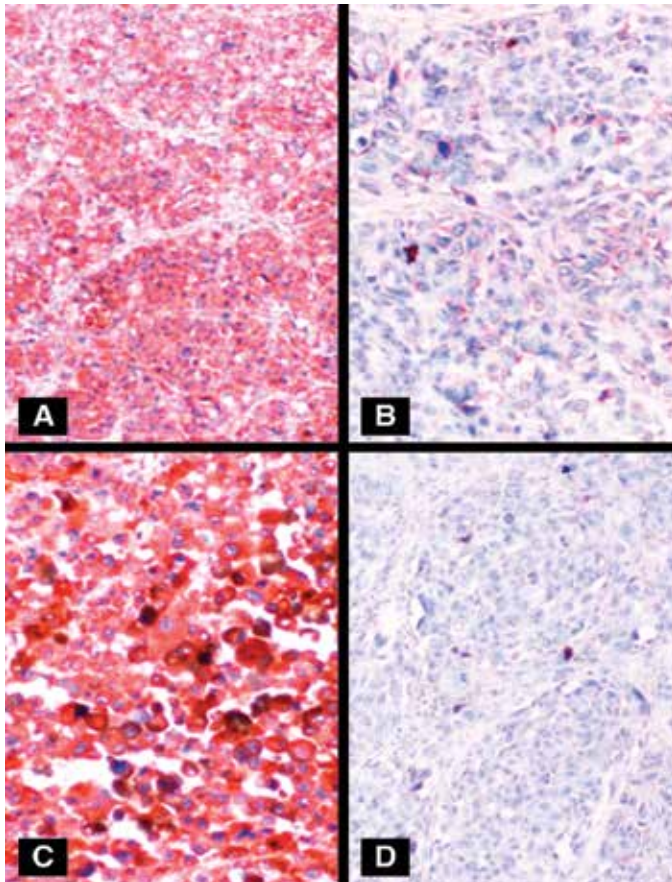
Olgularda yaygınlığına göre nm23 protein ekspresyonunu ile Clark Level arasında anlamlı korelasyon izlenmemektedir. Ancak Clark Level'i yüksek olan olgularda daha az ekspresyon olduğu dikkati çekmektedir. Olgularda yaygınlık ve yoğunluğuna göre p16 ekspresyonu ve Clark Level arasında korelasyon saptanmamıştır. Olgularda yaygınlık (p=0,129) ve yoğunluğuna göre (p=0,174) p16 ekspresyonu ve Breslow indeksi arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Ancak Breslow indeksi ≤ 1 mm olan olguların çoğunda +++/++ boyanma izlenirken, Breslow indeksi >4 mm olan olguların çoğunda -/+ boyanma gözlenmiştir.

Olgularda yaygınlığına göre nm23 ekspresyonu ile ülserasyon arasında korelasyon saptanmamıştır (p=0,25). Olgularda yaygınlığına göre p16 ekspresyonu ile ülserasyon arasında korelasyon saptanmamıştır (p=0,327). Olguların %59'u güneş gören, %41'i güneş görmeyen alanlarda bulunmaktadır. Olgularda nm23 ve p16 ekspresyonu ile UV ışınları arasında ilişki saptanmamıştır (Tablo 1).

Tartışma

Melanoma prognozunda en önemli histopatolojik prognostik faktör tümör kalınlığıdır. Tümör kalınlığı değerlendirmesi ilk olarak 1969'da Clark tarafından yapılmıştır. 1970'de Breslow da oküler mikrometre yardımıyla tümör kalınlığını ölçmüştür. Daha sonra başka araştırmacıların da yaptıkları çalışmalarla Breslow indeksi prognostik faktör olarak belirlenmiştir^{2,3}.

Ülserasyon, evreleme sisteminde yer alan ikinci önemli histopatolojik prognostik faktör olarak bilinmektedir¹. Ülserasyon hızlı büyümenin bir göstergesi olduğundan kötü prognostik faktörlerdendir. Lenfositik infiltrasyon Clark ve ark. tarafından incelenmiş, artan lenfosit infiltrasyon iyi prognoz ile ilişkili olarak belirlenmiştir. Ancak survisi prognostik faktörlerle uyumlu olmayan malin melanoma olgularını gösteren çalışmalar yeni prognostik faktörlerin araştırılmasına neden olmuştur¹. Leone ve ark. MM'nin hayvan modellerinde nm23 proteininin tümör hücrelerindeki etkisini araştırmışlardır⁷. Bu çalışmada kültüre edilmiş MM hücrelerine ve tümörlere nm23 proteini transfer etmişlerdir. nm23 transferi yapılan melanoma hücrelerinin, yapılmayanlara göre daha geç primer tümör oluşturdukları ve geç metastaz yaptıklarını bulmuşlardır⁷. Novak ve ark. nm23 proteininin metastaz supresyonunda bir çok mekanizmanın bulunduğunu göstermişlerdir⁸. Başka bir çalışmada, hayvan tümörlerinde nm23 RNA seviyelerine bakılmıştır⁹. Melanoma hücrelerinde düşük nm23 RNA seviyesi ile metastaz orantılı olarak bulunmuştur. Ayrıca yüksek RNA seviyeleri ve immünolojik cevap korele bulunmadığı için melanoma hücrelerindeki intrinsik agresivite ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür⁹. Ayrıca düşük nm23 ekspresyonunun metastaz oranını arttırdığını ve nm23'e ait gen ekspresyonunun regülasyonunun tümör tedavisinde kullanılabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır^{10,11}. Hart ve Easty makalelerinde nm23 geninin tümör hücrelerinde sellüler diferansiyasyon ve morfolojik patern oluşumuna katkısının olup olmadığı konusunda şüpheler bulunduğunu bildirmişlerdir¹². Bir çalışmada metastatik lenf nodlarındaki nm23 ekspresyonu araştırılmıştır. Metastazlardaki yüksek nm23 ekspresyonunun sürvi ile orantılı olduğu anlaşılmıştır¹³. Bunun gibi sürvi ile nm23 protein ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunan başka çalışmalar da vardır¹⁴⁻¹⁷.



Resim 2. A) Yaygınlığına göre +++ p16 boyanması (x100). B) Yaygınlığına göre + p16 boyanması (x200). C) Yoğunluğuna göre +++ p16 boyanması (x200). D) Yoğunluğuna göre + p16 boyanması (x100)

Tablo 1. Olguların prognostik faktörler ve boyanma paternleri açısından dağılımı

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Ülserasyon	Lenfositik infiltrasyon	UV maruziyeti	Clark Level	Breslow İndeksi (mm)	nm23 yaygınlık	nm23 yoğunluk	p16 yaygınlık	p16 yoğunluk
1	E	59	+	-	+	4	16	++	++	++	++
2	K	70	+	+	-	5	25	+++	++	++	++
3	K	60	-	++	+	4	5	+++	+++	+++	+++
4	E	52	-	+	-	4	4	+++	+++	++	++
5	K	70	-	-	-	5	6,3	++	+	-	-
6	K	84	+	++	+	4	2,8	+++	++	++	+
7	E	60	-	-	+	3	7	++	++	+++	++
8	K	55	+	-	+	5	30	+	+	+	+
9	E	-	+	-	+	5	21	++	+	-	-
10	K	70	-	+++	+	5	6	+++	++	+++	++
11	E	-	+	+	+	4	7	++	+	-	-
12	E	55	-	++	+	4	9	+++	++	+++	++
13	E	70	-	+	+	5	4	+++	+++	+	+
14	E	71	+	-	-	5	13	+	+	-	-
15	K	63	+	-	-	5	10	-	-	++	+
16	E	62	-	+	-	3	1	++	++	++	++
17	K	80	+	-	+	5	14	+	+	-	-
18	E	65	+	-	+	5	15	-	-	-	-
19	K	-	-	+++	-	1	1,1	+++	+++	+	+
20	K	50	-	-	-	2	0,3	++	++	+	+
21	K	-	-	-	+	5	6	++	++	-	-
22	E	76	+	-	+	4	6,5	++	+	-	-
23	K	60	-	++	-	4	2,3	+++	++	-	-
24	K	-	-	++	+	1	0,6	+++	+++	+++	++
25	K	59	-	+++	+	4	2	+++	+++	+++	+++
26	K	54	+	+	-	4	5,5	++	++	+	+
27	K	-	-	++	Bilinmiyor	5	4,5	+++	+++	+++	++
28	K	-	+	+	+	3	1,12	+++	++	++	+
29	K	80	-	-	-	3	5	++	+++	+	+
30	E	-	+	-	-	3	4	+++	++	++	+
31	E	68	-	-	-	5	8	++	+	-	-
32	K	65	-	+	+	2	1	++	++	+	+
33	K	70	-	-	-	1	0,5	+++	+++	++	++
34	E	58	-	+	+	3	1,35	+++	+++	++	+
35	K	22	+	+	+	4	1,5	++	+	-	-
36	E	53	-	+	+	4	3,48	+	+	+++	++
37	E	81	-	-	-	3	2	-	-	-	-
38	E	40	-	-	-	1	-	++	++	++	++
39	E	47	-	+	+	4	2,4	+	+	++	+
40	E	45	-	-	-	5	8	+	+	+	++

Nm23 protein ekspresyonu tümörlere göre farklılıklar göstermektedir. Yapılan bir araştırmada nöroblastoma gibi agresiv tümörlerde yüksek oranlarda eksprese edilmesi bu gendeki mutasyonların tümörlere göre farklılıklar gösterip kompleks yapı ve fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmüştür¹⁸. Çalışmamızda nm23 protein ekspresyonunun, Breslow indeksi ve Clark Level'i yüksek olan (Breslow indeksi >4 mm ve Clark Level IV/V) 3 olguda yüksek (+++) olması, Breslow indeksi 2 mm Clark Level'i 3 olan bir olguda eksprese edilmemesi gende farklı mutasyonlar olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca eksprese edilen proteinin, agresiv tümörlerde artışı izlenen ve tümör süpresyonunda etkisi olmayan nm23-1 proteini olabileceği akla gelmektedir. Bununla birlikte bazı Breslow indeksi >4 mm olan malin melanoma olgularında sürvi beklenenden daha uzun olabilmekte veya Breslow indeksi <1 mm olan olgularda metastazlar saptanabilmektedir. Bizim çalışmamızda Breslow indeksi >4 mm olan 3 olguda nm23 ve p16 protein ekspresyonu (+++/++) yüksek bulunurken, Breslow indeksi 2 mm olan bir olguda ise nm23 ve p16 ekspresyonu izlenmemiştir. Bazı Breslow indeksi <1 mm olan olgularda metastaz izlenebileceği gibi, Breslow indeksi >4 mm olan olgularda da beklenenden daha uzun sürvi olabileceği bilinmektedir. Dolayısıyla olguların progresleri ile birlikte değerlendirilmelerinin daha sağlıklı olacağı belirlenmiştir.

Tümörjenik fazdaki MM olgularında nm23 ekspresyonu aynı tümörde heterojenite göstermektedir. Epidermis ve üst dermisteki tümör hücrelerinde daha çok ekspresyon izlenirken, derin dermis ve subkutan dokudaki hücrelerde daha az ekspresyon olduğu dikkati çekmiştir. Bu da lezyon kalınlığı arttıkça diferensiasyonun azalması daha agresiv bir seyir gösterebileceğini düşündürmüştür.

Yaygınlığına göre nm23 ekspresyonu Breslow indeksi ve lenfosit infiltrasyonu ile korele bulunmuştur. Clark Level ile yaygınlığına göre nm23 protein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da p değeri 0,05'e yakın olduğundan (0,082) az da olsa ilişki bulunabileceği düşünülmüştür. Nm23 boyanma yoğunluğu ise Clark Level, Breslow indeksi, ülserasyon ve lenfositik infiltrasyon ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki göstermektedir.

Özellikle yoğunluk açısından nm23 ekspresyonunun MM olgularında prognostik faktör olarak kullanılabilirliği, özellikle düşük Clark Level ve Breslow indeksli olup klinik seyri kötü olan olguların daha erken tanımlanmasını sağlayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca derin dermis ve subkutan dokudaki tümör hücrelerinde nm23 proteininin daha az eksprese olması, güvenli marjinlere rağmen agresiv seyir ve rekürrenlerle ilişkili olabileceğini akla getirmiştir.

CDK inhibitörü olan p16'da prognostik değeri araştırılan faktörlerden birisidir. Ayrıca DNA da oluşan hasar nedeniyle p16 ekspresyonunda azalmanın yol açtığı melanositlerde proliferasyon artışı ve sürvi ile ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır^{19,20}. Bir başka çalışmada ise, 102 agresiv nodüler MM olgusunda p16 ekspresyonunun rekürrenlerde ve metastatik olgularda daha düşük olduğunu saptamışlar ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığını düşünmüşlerdir²¹. Nevüsler ve malin melanomalarda p16 ekspresyonu araştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur^{16,22}. Ayrıca bir çalışmada Clark Level, Breslow indeksi ve hücre proliferasyonu ile p16 protein ekspresyonu ters orantılı olarak saptanmıştır. p16 protein ekspresyonundaki azalmanın MM progresinde önemli rol oynadığı ve majör süpresör gen olduğu sonucuna varılmıştır^{23,24}. Pavay ve ark., 208 MM olgusunda, tümör kalınlığı ve mitotik indeks arttıkça p16 protein ekspresyonunun azaldığını gözlemişlerdir. Ayrıca daha agresiv

seyirli olan nodüler MM'lerde p16 ekspresyonunun diğer tiplere göre daha az olduğunu saptamışlardır²⁵. Piccinin ve ark. ise p16 protein ekspresyonunun, tümör oluşumunda ve progresyonunda ancak çok küçük bir rol oynadığını tespit etmişlerdir²⁶. Ayrıca düşük p16 protein ekspresyonunun kötü prognoz ve hücre proliferasyonu ile korele olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır²⁷⁻²⁹.

Bizim çalışmamızda yaygınlığına göre p16 ekspresyonu sadece lenfosit infiltrasyonu ile korele bulunmuştur. Clark Level ile istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte p değeri 0,05'e yakın (p=0,08) olduğu için az da olsa ilişki olabileceği düşünülmüştür. Diğer parametreler ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda yoğunluğuna göre p16 protein ekspresyonu arttıkça lenfosit infiltrasyonunun arttığı ancak ülserasyonun azaldığı gözlenmiştir. Breslow indeksi >4 mm olan MM olgularının %36,5'inde p16 protein ekspresyonu yüksek oranda (+++/++), %62,5'inde ise düşük oranda (+/-) bulunmaktadır. Ayrıca Breslow indeksi <1 mm olan MM olgularının hepsinde p16 protein ekspresyonu gözlenmektedir. Bunların %33,3'ünde +, %66,7'sinde ++ ekspresyon gözlenmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, tümör kalınlığı ile p16 protein ekspresyonu arasında ilişki olabileceği akla gelmektedir. P16 protein ekspresyonu ile Clark Level arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte p değeri 0,05'e yakındır (p=0,08).

Çalışmamızda sadece yoğunluğuna göre p16 ekspresyonu ülserasyon ve lenfositik infiltrasyon ile korele bulunmuştur. Ülserasyon tümör hücrelerinin hızlı büyümesinin bir göstergesidir. Tümör çevresinde ve içerisinde olan lenfositik infiltrasyon tümör proliferasyonunu azaltmakta ve düşük Breslow indeksinde kalmasına neden olmaktadır. Bulgular p16 ekspresyonunun azlığının tümörü hücre proliferasyonu ve agresiv seyri ile birlikte olabileceğini düşündürmüştür. Ancak diğer prognostik parametrelerle istatistiksel korelasyon saptanmaması p16 protein ekspresyonunun prognoza etkisini tartışmalı kılmaktadır.

Olgulardaki nm23 ve p16 protein ekspresyonlarının birbirleri ile korele oldukları saptanmıştır. Nm23 proteini ekspresyonu +++ olan olguların çoğunda p16 protein ekspresyonu da +++ olarak bulunmuştur. Nm23 proteini + olan olguların çoğunda p16 protein ekspresyonu da + olarak gözlenmiştir. Nm23 ve p16 protein ekspresyonları yapılan birçok çalışmada malign melanomaların histopatolojik prognostik faktörleri ile korele olarak bulunmuştur. Bu iki parametrenin birbirleri ile de korele olması prognostik değerleri açısından önem taşımaktadır.

UV ışınlarının mutajenik etkileri bilinmektedir. UV ışınları etkilerini DNA üzerinde dimerler oluşturarak yaparlar. Piepkorn ve Washington, makalelerinde UV ışınlarının DNA da oluşturdukları kırıklar ve dimerler nedeniyle bu mutasyon ve kromozomal delesyonların da tümör süpresör genlerde olmasının melanoma gelişimini başlattığını bildirmişlerdir^{18,24}. MM'nin UV ışınları ile oluşturulan hayvan modellerinde p16 tümör süpresör geninin etkilendiği saptanmıştır³⁰. Ayrıca Jarret ve ark. hayvan deneylerinde UV ile oluşturulmuş melanomalarda yüksek metastaz potansiyeli saptamışlardır³¹. Bizim çalışmamızda UV ışın maruziyeti ile nm23 ve p16 protein ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Bulgular malin melanoma oluşumunda ve prognozunda UV ışınından başka faktörlerin de rol oynayabileceğini veya malin melanomalarda gen mutasyonlarının farklılık gösterebileceğini düşündürmüştür.

Sonuç

MM'lerde yoğunluğuna göre nm23 protein ekspresyonunun prognostik faktör olarak kullanılabilirliği düşünülmüştür. Ancak nodal tutulum, uzak

metastaz ve sürvi gibi klinik verilerle birlikte değerlendirildiğinde daha anlamlı sonuçlar elde edilebilecektir. P16 protein ekspresyonu ile çoğu prognostik parametre arasında istatistiksel korelasyon saptanmamıştır. Bulgular p16 protein ekspresyonunun prognostik faktör olarak değer bulması ve ekspresyon farklılıklarının anlaşılması için, daha geniş olgu serilerinde çalışılmasının anlamlı olacağını düşündürmektedir.

Etik Kurul Onayı: Araştırma Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nde tez olarak 9 sene önce gerekli izinler alınarak yapılmış tez olarak kabul görmüştür ancak bu tarihte etik kurul onayı istenmediğinden böyle bir belge alınmamıştır.

Hasta Onayı: Retrospektif çalışma olduğu için alınmamıştır.

Konsept: Şule Özsoy, Selda Seçkin

Dizayn: Şule Özsoy, Selda Seçkin

Veri Toplama veya İşleme: Şule Özsoy, Selda Seçkin

Analiz veya Yorumlama: Şule Özsoy, Selda Seçkin

Literatür Arama: Şule Özsoy

Yazan: Şule Özsoy

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarların finansal desteği yoktur.

Kaynaklar

- Clark WH, Elder DB, Giveny D, et al: Model Predicting Survival in stage I Melanoma Based on Tumor Progression. *J. Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-904.
- Mangini Li N, Bhawan J: New prognostic factors of cutaneous melanoma: a review of the literature. *Journal Cutan Pathol* 2002;29:324-40.
- Vincent Liu, Nihm M C: Pathology of malignant melanoma. *Surg Clin N Am* 2003;831:31-60.
- Backer JM, Mendola JB, Kovacs I, et al: Chromosomal localization and nucleoside diphosphate kinase activity of human metastasis suppressor genes NM 23-1 and NM 23-2. *Oncogene* 1993;8:497-502.
- Puig S, Ruiz A, Lazara C, et al: Chromosome 9p Deletions In Cutaneous Malignant Melanoma Tumors. The Minimal Deleted Region Involves Markers outside the p13 (CDKN2) Gene. *Am J Hum Genet* 1995;57:395-402.
- Piepkorn M, Washington DS: Melanoma genetics: An update with focus on the CDKN2A (P16) tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:705-22.
- Leone A, Flatow U, King CR, et al: Reduced Tumor Incidence Metastatic Potential and Cytokine Responsiveness of nm23- Transfected Melanoma Cells. *Cell* 1991;65:1:25-35.
- Novak M, Jarret SG, McCorkle JR, Mellon I, Kaetzel DM: Multiple mechanism underlie metastasis suppressor function of NM23 H1 in melanoma. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2011;384:433-8.
- Monola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J: Prognostic Factors in Metastatic Melanoma; A Pooled Analysis of Eastern Cooperative Oncology Group Trials. *J Clin Oncol* 2000;18:3782-93.
- Prabhu W, Siddikuzzaman, Grace VM, Guruvayoorappan C. Targetting tumor metastasis by regulating Nm23 gene expression. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:3539-48.
- Boissan M, Lacombe ML: NM23, an example of a metastasis suppressor gene. *Bull Cancer* 2012;99:431-40.
- Hart JR, Easty D: Identification of genes controlling metastatic behaviour. *B J Cancer* 1991;63:9-12.
- Xerri L, Grob J-J, Battyán Z, Gouvernet J, Hassoun J, Bonerandi JJ: NM23 expression in metastasis of malignant melanoma is a predictive prognostic parameter Correlated with Survival. *Br J Cancer* 1994;70:1224-8.
- Halmes SC, Mackie RM: The value of NM23 expression as an independent prognostic indicator in primary thick melanoma. *J Cutan Pathol* 1996;23:344-9.
- Lacombe ML, Xavier S, Lasca L, Vonica A, Wallet V, Thierry JP, Veron M: Overexpression of Nucleoside Diphosphate Kinase (NM23) in Solid Tumours. *Eur J Cancer* 1991;27:1302-7.
- Pacifico MD, Grover R, Richman PI, Buffa F, Daley FM, Wilson GD: nm23 as a prognostic marker in primary cutaneous melanoma: evaluation using tissue microarray in a patient group with long-term follow up. *Melanoma Res* 2005;15:435-440.
- Ferrari D, Lombardi M, Ricci R, Michiara M, Santini M, De Panfilis G: Dermatopathological indicators of poor melanoma prognosis are significantly inversely correlated with the expression of NM23 protein in primary cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* 2007;34:705-12.
- Hailat N, Keim DR, Melhem DF, et al: High levels of p19/nm23 Protein in Neuroblastoma Are Associated with Advanced Stage Disease and with N-myc Gene Amplification. *J Clin Invest* 1991;88:341-5.
- Fung C, Pupo GM, Scolyer RA, Kefford RF, Rizzo H: P16(INK4a) deficiency promotes DNA hyper-replication and genetic instability in melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26:236-46.
- Straume O, Suiland L, Akslen LA: Loss of Nuclear p16 Protein Expression Correlates with Increased Tumor Cell Proliferation (Ki-67) and Poor Prognosis in Patients with Vertical Growth Phase Melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1845-53.
- Staume O, Akslen LA: Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of Cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1997;74:535-9.
- De Andrade BA, Leon JE, Carlos R, Delgado-Aznerio W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP: Immunohistochemical expression of p16, p21, p27 and cyclin D1 in oral nevi and melanoma. *Head Neck Pathol* 2012;6:297-304.
- Ghiarzo P, Villaggio B, Serento AR, et al: Expression and Localization of Mutant p16 proteins in Melanocytic Lesions From Familial Melanoma Patient. *Hum Patol* 2004;35:25-33.
- Talve L, Saurioja I, Collon Y, Punnonen K, Ekfors T: Loss of Expression of the p16 INK4/ CDKN2 gene in Cutaneous Malignant Melanoma Correlates with Tumor Cell Proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 1997;24:255-9.
- Parvey SJ, Cummings MC, Whileman DC, et al: Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res* 2002;12:539-47.
- Piccinin S, Dogluonu C, Maestro R, et al: P16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int J Cancer* 1997;74:26-30.
- Kostov M, Mijovic Z, Mihailovic D, Cerovic S, Stajanic M, Jelic M: Correlation of cell cycle regulatory proteins (p53 and p16) and bcl-2 oncoprotein with mitotic index and thickness of primary cutaneous malignant melanoma. *Bosn J Basic Med Sci* 2010;10:276-81.
- Fauri J, Ricardi F, Diehl E, et al: P16 protein expression in primary cutaneous malignant melanoma with positive end negative lymph node biopsies: Particular aspects of a study performed at the hospital de clinicas de porto alegre brazil *Can J Plast Surg* 2011;19:77-81.
- Karim RZ, Li W, Sanki A, et al: Reduced p16 and increased cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. *Int JSurg Pathol* 2009;17:361-7.
- Strickland FM, Pathak S, Multan AS, Pelley RP, Donawho CK: Molecular Characterization of new Melanoma Cell Line from C3H Mice Induced by Ethanol plus Ultraviolet Radiation. *Cancer Res* 2003;63:3503-10.
- Jarret SG, Novak M, Harris N, Merlino G, Slominski A, Kaetzel DM: NM23 deficiency promotes metastasis in UV induced mouse model of human melanoma. *Clin Exp Metastasis* 2013;30:25-36.