

Malign melanom olgularında intratümöral mast hücre miktarı ile histopatolojik prognostik parametrelerin karşılaştırılması

Comparison of prognostic parameters, intratumoral mast cells and epidermal changes in malignant melanoma patients

Özben Yalçın¹, Zeynep Betül Erdem²

¹Prof. Dr. Cemil Taşçoğlu Şehir Hastanesi, Patoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

²Başakşehir Şehir Hastanesi, Patoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

İletişim: Zeynep Betül Erdem

Başakşehir Şehir Hastanesi, Patoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

e-mail: zberdem@gmail.com

ÖZET

Amaç: Malign melanom (MM), insidansı giderek artan, melanositlerden köken alan bir neoplazidir. Mast hücrelerinin alerjik olaylardaki rolü iyi bilinmekte ancak solid tümörlerde mikroçevre ve prognoz ile ilişkileri kesinlik kazanmamıştır. MM'da epidermal değişikliklerin önemli bir prognostik parametre olan ülser gelişimi ve tümör hücre büyümesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada prognostik önemi kanıtlanmış parametreler ile mast hücreleri ve epidermal değişiklikler arasındaki ilişkiyi göstermek amaçlandı.

Materyal ve Metodlar: Çalışmamıza Ocak 2015-Şubat 2019 tarihleri arasında eksizyonel biyopsi ile MM tanısı alan 40 olgu dahil edilmiştir. Olguların H&E boyalı preparatlarından epidermal değişiklikler (bazoskuamoz dejenerasyon varlığı, incelleme, rete oluşumu, epidermis-dermis arası kleft oluşumu), plazma hücre sayısı ve ek olarak yapılan Giemsa histokimyasal boyası ile intratümöral mast hücre sayısı değerlendirilmiştir. Bu bulgular prognostik parametreler ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Olguların %32'si (n=13) kadın, %67.5'u (n=27) erkekti. Bazoskuamoz dejenerasyon varlığına göre Clark seviyesi, ülserasyon, lenfositik infiltrasyon arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Mast hücre sayısı ile Breslow kalınlığı, ülserasyon, lenfosit infiltrasyonu, mitoz sayısı ile anlamlı ilişki saptanmadı. Plazma hücre varlığına göre prognostik faktörler ile anlamlı farklılık saptanmış olup zeminde nevüs görülen olgularda plazma hücreleri sayıca daha düşüktür.

Sonuç: Olguların çoğunda epidermal değişikliklerin gözlenmesi, bu bulgunun malign melanomun histopatolojik karakteristik bulgularından biri olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda epidermal değişikliklerin ülser gelişiminin öncüsü olabileceği öne sürülmektedir, bu da prognostik öneminin olabileceğini gösterir. Çalışmamızda intratümöral mast hücreleri ile prognostik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi. Mast hücrelerinin hem pro-tümör hem anti-tümör etki gösteriyor olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: epidermal değişiklikler, malign melanom, mast hücreleri

SUMMARY

Aim: Malignant Melanoma (MM) is a neoplasia originates from melanocytes. The incidence of MM has been increasing. The role of mast cells in allergic reactions is well known but their relationship with microenvironment and prognosis in solid tumors is uncertain. It is thought that epidermal changes in MM may be related to ulcer development and tumor cell growth which are important prognostic factors. The aim of the study is to show the relationship between proven parameters, mast cells and epidermal changes.

Materials and Methods: Forty patients diagnosed with MM by excisional biopsy between January 2015-February 2019 were included in the study. Plasma cell count and epidermal changes (presence of baso-squamous degeneration, thinning, formation of rete, kleft formation between of epidermis and dermis) were evaluated from H&E stained specimens. The intratumoral mast cell counts was evaluated with Giemsa. These findings were compared with prognostic factors.

Results: MM cases consisted of 32% (n=13) female and 67% (n=27) male. There was no significant difference between Clark level, ulceration and lymphocytic infiltration according to presence of basosquamous degeneration. There was no significant relation between mast cells count and Breslow thickness, ulceration, lymphocyte infiltration and mitosis count. There was a significant difference with prognostic factors according to the presence of plasma cells. According to the presence of plasma cells, there was a significant difference with prognostic factors. Plasma cell number was lower in the cases with nevus at the beginning of the tumor.

Conclusion: The observation of epidermal changes in the majority of cases suggests that this finding may be one of the histopathological characteristic findings of malignant melanoma. Some studies suggest that epidermal changes may be the precursor to ulcer development, suggesting that it may have prognostic significance. In our study, there was no statistically significant relationship between intratumoral mast cells and prognostic parameters. Mast cells are thought to have both pro-tumor and anti-tumor effects.

Keywords: epidermal changes, malignant melanoma, mast cells

GİRİŞ

Malign Melanom (MM) tüm dünyada insidansı en hızlı artan kanser türlerinden biridir. Kutanöz maligniteler arasında bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinoma göre daha az görülmeyle birlikte (kutanöz maligniteler arasında) en sık mortalite nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde 265.000 yeni MM tanısı konmuş ve 60.000 hastalığa bağlı ölüm gerçekleşmiştir (1). MM patogeneziyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmaktadır ancak net veriler halen elde edilememiştir.

Malign melanomu oluşturan tümör kitlesi, diğer solid tümörlerde de olduğu gibi, yalnızca kanser hücrelerinden değil aynı zamanda tümör mikroçevresi olarak da adlandırılan, konak hücreleri ile ekstraselüler matriks elemanlarından oluşur. Tümörün progresyonu, regresyonu veya metastaz yapması kanser hücrelerinin bu çevre ile etkileşimine bağlıdır.

Tümör mikroçevresini oluşturan immunité-ilişkili hücreleri makrofajlar, dendritik hücreler, myeloid-kökenli supresör hücreler, T hücreleri, mast hücreleri ve natural killer hücreler oluşturur ve her birinin tümör gelişiminde kritik rolü vardır (2).

Mast hücreleri kemik iliğindeki spesifik progenitör hücrelerden köken alan hücrelerdir, dolaşımda bulunmazlar. Allerjik reaksiyonlar, inflamasyon, otoimmunité ve T-hücre aracılı immün yanıtta önemli rolleri vardır. Ulaştıkları periferik dokuda perivasküler yerleşim gösterirler; fagositoz yaparlar, antijenleri işlerler, sitokin üretirler, fizyolojik rolü olan mediyatörler salgırlar.

Yapılan çalışmalarda kutanöz malignitelerin içleri ve çevrelerinde (intratümöral ve peritümöral) inflamatuvar infiltrattan bağımsız olarak mast hücrelerinin toplandığı gösterilmiştir (3-6). Bu hücrelerin çok sayıda etki oluşturduğu bilinmektedir ancak nihai rolleri aydınlatılamamıştır. Dual rolleri olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda büyümeye destek verdikleri gösterilirken bir kısım çalışmada ise inhibisyon yaptıkları bildirilmektedir (7,8). Tümör mikroçevresine göre mast hücrelerinin hangi paternde sekresyon yapacağı belirlenmektedir (8).

Tümörögenезis, immunité ve inflamasyon arasında kompleks bir ilişki vardır (2). Yapılan çalışmalarda mast hücrelerinin özellikle 4 mekanizma üzerinden tümör büyümesine katkı sağladıkları gösterilmiştir; 1) immunsupresyon, 2) anjiyogenez, 3) ekstraselüler

matriks yıkımı, 4) mitogenez (mitotik aktivitede artış) (9). Özellikle meme karsinomları ile yapılan çalışmalarda mast hücrelerinin tümör agresifliği ile ilişkili olduğunu saptayan çalışmalar mevcuttur (9-11).

Çalışmamızın amacı günlük pratikte (rutin hematoksilen eozin boyası ile) ayırımı kimi zaman net olarak yapılamadığı mast hücrelerini histokimyasal yöntem yardımıyla ayırt ederek, bu hücrelerin prognostik önemi kanıtlanmış parametreler; Breslow kalınlığı, ülserasyon, mitoz varlığı, tümörü infiltre eden lenfositler ve malign melanomdaki epidermal değişiklikler; bazoskuamoz dejenerasyon, incelleme, rete oluşumu, epidermis-dermis arası kleft oluşumu ile ilişkisini saptamaktır.

MATERYAL VE METODLAR

Çalışmamıza Ocak 2015-Şubat 2019 tarihleri arasında SBU Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde eksizyonel biyopsi ile MM tanısı alan, hazır boyalı lamalarına ve parafin bloklarına ulaşılabilen 40 olgu dahil edildi. İnsizyonel biyopsi/punch biyopsi ile tanı alan olgular, tam eksizyonu yapılmayan olgular, rekürren lezyonlara ait biyopsi materyalleri çalışmaya dahil edilmedi. Olguların H&E boyalı preparatlarından epidermal değişiklikler; bazoskuamoz dejenerasyon varlığı, incelleme, rete oluşumu, epidermis-dermis arası kleft oluşumu, plazma hücre sayısı ve ek olarak yapılan Giemsa histokimyasal boyası ile intratümöral mast hücre sayısı değerlendirildi. Mast hücre sayısı için x400 büyütme ile intratümöral 10 alan değerlendirildi. Bu bulgular patoloji raporunda belirtilen, genel kabul görmüş prognostik önemi olan parametreler; tümör kalınlığı, tümörü infiltre eden plazma hücreleri, tümörü infiltre eden lenfositler, ülserasyon, mitoz, lenfovasküler invazyon ile karşılaştırıldı. Tüm olgulara ait H&E ve Giemsa boyalı kesitler iki patolog tarafından incelendi.

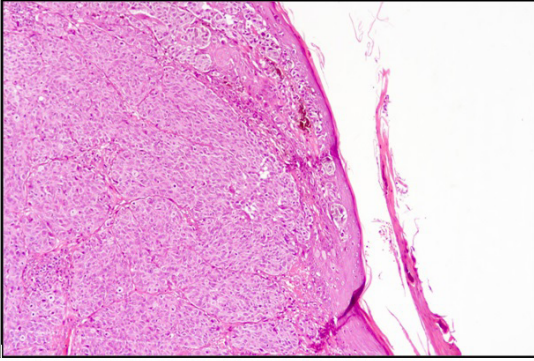
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) kullanıldı. Nicel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, Fisher-Freeman-Halton Exact testi ve Fisher's Exact test kullanıldı. Anlamlılık en az $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

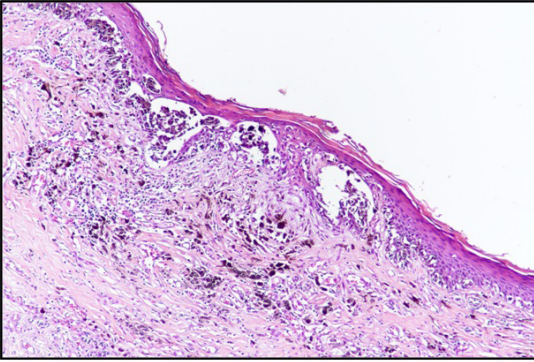
BULGULAR

Çalışmamızda 40 olguya ait örnekler incelendi. Olguların %32'si (n=13) kadın, %67.5'i (n=27) erkekti. Olguların

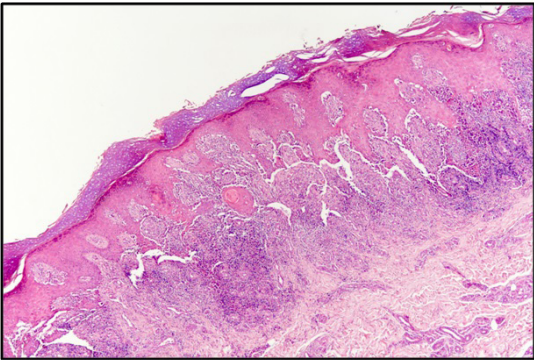
%70'i (n=28) yüzeysel yayılan MM, %25'i (n=10) nodüler MM, %5'i (n=2) akral MM tanısı almıştı. Olguların %95'inde (n=38) epidermal incelleme (Şekil 1), rete kaybı ve epidermis-dermis arası kleft oluşumu (Şekil 2 ve 3) izlenmiş olup, %47,5'inde (n=19) bazoskuamöz dejenerasyon (Şekil 4) varlığına göre Clark evresi, Breslow kalınlığı, ülserasyon, tümörü infiltrate eden lenfosit miktarı, mitoz sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0.05$). Mast hücre sayısı (Şekil 5 ve 6) ile Breslow kalınlığı, Clark seviyesi, ülserasyon, tümörü infiltrate eden lenfosit miktarı, mitoz sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0.05$). Plazma hücreleri sayıca az görülen olgularda zemine nevus saptanma oranı daha yüksek bulundu ($p=0.046$).



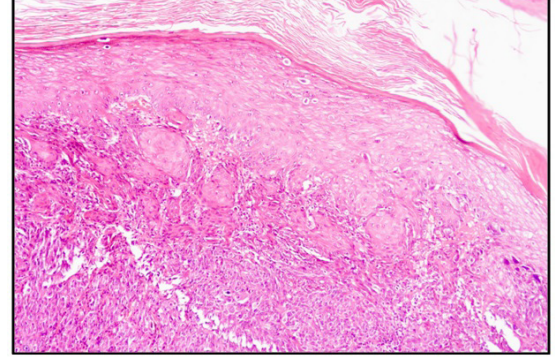
Şekil 1. Epidermal incelleme (H&E, 100x)



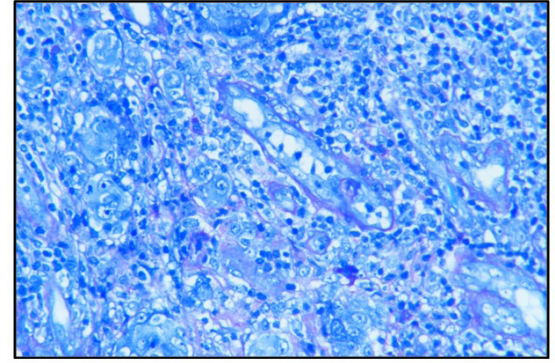
Şekil 2. Epidermis-dermis arası ayrışma (H&E, 100x)



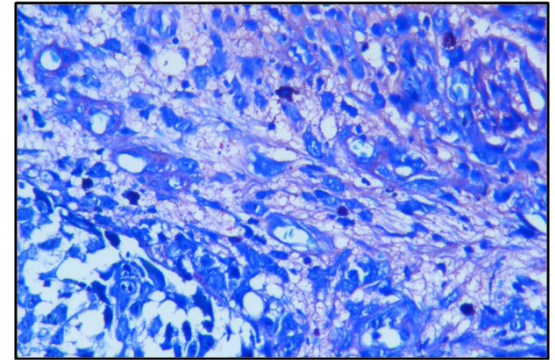
Şekil 3. Epidermis-dermis arası ayrışma ve bazal skuamöz dejenerasyon (H&E 40x)



Şekil 4. Bazal skuamöz dejenerasyon (H&E, 100x)



Şekil 5. İntratümöral mast hücreleri (Giemsa, 400x)



Şekil 6. İntratümöral mast hücreleri (Giemsa, 400x)

TARTIŞMA

Malign melanom tüm cilt kanserlerinin %4'ünü oluşturmaktadır. Ancak cilt kanserlerine bağlı ölümlerde ilk sırada yer alır (9). Günümüze dek mast hücrelerinin solid maligniteler ile ilişkisini araştıran çok sayıda araştırma yürütülmüş olsada bu hücrelerin tümör gelişimi üzerindeki etkileri hala belirsizdir.

Çalışmamızda MM'daki prognostik önemi kanıtlanmış histopatolojik parametreler ile epidermal değişiklikler ve intratümöral mast hücreleri arasındaki ilişki araştırıldı.

Olguların çoğunda epidermal değişikliklerin (epidermal incelme, rete kaybı ve epidermis-dermis arası kleft oluşumu) saptanması, bu bulguların MM'un karakteristik histopatolojik bulgularından biri olabileceğini düşündürdü. Literatürde epidermal değişikliklerin MM'ü spitz nevüs ve displastik nevüs gibi lezyonlardan ayırt etmede kullanılabileceği belirtilmektedir (12,13). Bazı çalışmalarda epidermal değişikliklerin ülser gelişiminin öncüsü olduğu bildirilmektedir (12,14). Ülserasyonun önemi kanıtlanmış bir kötü prognostik parametre olduğu bilindiğinden epidermiste ki rete kaybı, kleft oluşumu gibi değişiklikler prognostik açıdan anlamlı olabilir (14). Ancak bu konuyla ilgili ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca tümör derinliği az olan ve yalnızca radyal büyüme fazı gösteren olgularda epidermal değişikliklerin görülme olasılığı yüksektir (12).

Çalışmamızda intratümöral mast hücreleri ile prognostik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi. Literatürde kutanöz malignitelere tümör mikroçevresinde mast hücre birikimi, karsinogenez ve metastaz ile ilişkili bulunmuştur (7,15). Cohen ve ark. (16) bazal hücreli karsinomlar ile yaptıkları çalışmalarında mast hücre yoğunluğu ile prognostik parametreler arasında ilişki bulamamıştır. Bu verinin aksine yapılan çoğu çalışmada bazal ve skuamöz hücreli karsinomlarda mast hücre yoğunluğu agresif varyantlarda daha fazla bulunmuştur (16-18).

Mast hücreleri tümör bölgesinde üretilen vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ana kaynağıdır. VEGF, en potent anjiyogenik faktörlerden birisidir; endotel hücrelerinde mitozu artırarak neovaskularizasyona ve hipermobilitayı indükleyerek proangiyogenik faktörlerin ekstraselüler matrikse ulaşmasına yardımcı olur (3,19). Yapılan çalışmalar da tümör kitlesinin konak ile etkileşim bölgesinde neovaskularizasyonu uyardığını göstermiştir (3). Tümör büyüme kapasitesinin kan akımına bağlı olduğu dikkate alındığında, bu özellik ile mast hücrelerinin büyüme ve metastaza katkı sağlayacağı şeklinde yorumlanabilir (20).

Melanomların, benign nevus ve in-situ melanom olguları ile karşılaştırıldığı bir çalışmada artmış mast hücre yoğunluğu ile mikrovaskularizasyon ilişkili bulunmuştur (21). Başka bir çalışmada ise metastatik MM'larda vasküler alanın metastaz yapmayanlara göre iki kat fazla olduğu gösterilmiştir (22). Peritümöral mast hücre miktarı, mikrovasküler yoğunluk, melanom progresyonu ve prognoz ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (3).

hücrelerinden-yoksun HPV (Human Papilloma Virus) ile enfekte fareler aynı şartlardaki yabancı-tip fareler ile karşılaştırıldığında mast hücre yoksun grupta tümör anjiyogenezi ve büyümede ciddi derece baskılanma saptanmıştır (23). Bu çalışmadan elde edilen verilerin aksine, Schitteck ve ark.'nın yaptıkları çalışmada mast hücrelerinden yoksun farelerin mast hücre mevcut gruba kıyasla daha fazla metastaz geliştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın hipotezi mast hücreleri tarafından salınan histaminin endotel hücrelerinde prostasiklin sentezini arttırdığı, prostasiklinin ise antimetastatik rol üstlendiği yönündedir (24).

Mast hücrelerinin tümör gelişimi üzerindeki negatif etkisini destekleyen diğer bir hipotezde salgıladıkları IL-1, IL-6 ve TNF-a gibi mediyatörlerin tümör büyümesini ve anjiyogenezi inhibe ettikleri; TLR-2 reseptör aktivasyonu ile de tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler oluşturdukları yönündedir (25,26). Başka bir çalışmada ise histaminin H1 reseptörleri üzerinden tümör hücre proliferasyonunu arttırdığı, H2 reseptörleri üzerinden ise immun sistemi baskıladığı gösterilmiştir (7).

Ayrıca mast hücreleri IL-8 üretir. IL-8'in matriks metalloproteinazlarını aktive ederek anjiyogenik aktiviteye katkı sağladığı düşünülmektedir (27). Yapılan bir çalışmada vertikal büyüme fazındaki melanomların %50'sinde, metastatik melanomların %100'ünde, radyal büyüme fazındaki melanomların ise hiçbirinde IL-8 ekspresyonu saptanmamıştır (27).

Çalışmamızda mast hücrelerinin tespiti için histokimyasal yöntemin kullanılmış olması çalışmanın kısıtlılıklarından biridir. Yapılan çalışmalarda immunhistokimyasal yöntem ile hücre sayımının daha spesifik ve sensitif olduğu gösterilmiştir (6). Mast hücrelerinin tümörojenik etkilerini göstermek için (immunhistokimyasal yardımı ile neovaskularizasyon artışının tespiti gibi) ek bir belirteç/yöntem kullanılmamıştır, bu da mast hücrelerinin tümör gelişimi üzerindeki pozitif ya da negatif etki profilinin aydınlatılmasında eksiklik oluşturmuştur. Bir diğer eksiklik ise bulguların benign/displastik melanositik lezyonlar ile karşılaştırılmamasıdır.

SONUÇ

Mast hücreleri günümüzde fizyolojik ve patolojik rolleri ile büyük bir ilgi konusudur. Günümüze dek yapılan çalışmalar ile hem tümörü inhibe edici hemde büyümesini destekleyici yönde bulgular elde edilmiştir. Çalışmamızda prognostik faktörler ile ilişki saptanmamıştır ancak geniş vaka serileri ile yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile anlamlı sonuçlar elde

edileceğini düşünmekteyiz. Mast hücrelerinin görevi aydınlatıldığında bu hücrelere ve salgıladıkları sitokinlere/mediyatorlere spesifik tedaviler üretilebilir ve böylece tümör gelişiminin kontrol altına alınması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Melanoma of Skin. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>.
2. Wang J, Li D, Cang H, Guo B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Med*. 2019;8(10):4709-21.
3. Tóth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S, Kawamoto N. Cutaneous malignant melanoma: correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol*. 2000;31(8):955-60.
4. Cawley E, Hoch-Ligeti C. Association of tissue mast cells and skin tumors. *Arch Dermatol*. 1961;83:146-50.
5. Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Teté S, et al. Role of Mast Cells in Tumor Growth. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;34(4):315-22.
6. Rajabi P, Bagheri A, Hani M. Intratumoral and Peritumoral Mast Cells in Malignant Melanoma: An Immunohistochemical Study. *Adv Biomed Res*. 2017;6(39).
7. Theoharides T, Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol*. 2004;25(5):235-41.
8. Varricchi G, Galdiero MR, Marone G, Granata F, Borriello F, Marone G. Controversial role of mast cells in skin cancers. 2017;26(1):11-17.
9. Ch'ng S, Wallis RA, Yuan L, Davis PF, Tan ST. Mast cells and cutaneous malignancies. *Mod Pathol*. 2006;19:149-59.
10. Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin Rev Allergy&Immunology*. 2019.
11. Glajcar A, Szpor J, Pacek A, Tyrak KE, Chan F, Streb J, et al. The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment. *Virchows Arch*. 2017;470(5):505-15.
12. Hantschke M, Bastian BC, LeBoit PE. Consumption of the Epidermis A Diagnostic Criterion for the Differential Diagnosis of Melanoma and Spitz Nevus. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(12):1621-25.
13. Walters RF, Groben PA, Busam K, Millikan RC, Rabinovitz H, Cognetta A, et al. Consumption of the Epidermis: A Criterion in the Differential Diagnosis

of Melanoma and Dysplastic Nevi That is Associated With Increasing Breslow Depth and Ulceration. *Am J Dermatopathol*. 2007;29(6):527-32.

14. Seckin S, Ozgun E. The importance of Consumption of the epidermis in Malignant Melanoma and Correlation with Clinicopathological Prognostic Parameters. *Turkish J Pathol*. 2011;27:15-56.
15. Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med*. 2001;193(6):23-6.
16. Cohen M, Rogers G. The significance of mast cells in basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(3):515-17.
17. Humphreys T, Monteiro M, Murphy G. Mast cells and dendritic cells in basal cell carcinoma stroma. *Dermatologic Surg*. 2000;26:200-04.
18. Erkilic S, Erbagci Z. The significance of mast cells associated with basal cell carcinoma. *J Dermatol*. 2001;28(6):312-15.
19. Aoki M, Pawankar R, Niimi Y, Kawana S. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;130:216-23.
20. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:4-6.
21. Duncan LM, Richards LA, Mihm MCJ. Increased mast cell density in invasive melanoma. *J Cutan Pathol*. 1998;25(1):11-15.
22. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate- thickness (0.76–4.0 mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol*. 1988;133(2):419-23.
23. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, et al. Inflammatory mast cells upregulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*. 1999;13:1382-97.
24. Schitteck A, Issa HA, Stafford JH, Young D, Zwillling B, James AG. Growth of pulmonary metastases of B16 melanoma in mast cell-free mice. *J Surg Res*. 1985;38(1):24-28.
25. Aris M, Barrio MM, Mordoh J. Lessons from Cancer Immunoediting in Cutaneous Melanoma. *Clin Dev Immunol*. 2012.
26. Oldford SA, Haidl ID, Howatt MA, Leiva CA, Johnston B, Marshall JS. A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth. *J Immunol*. 2010;185(11):7067-76.
27. Singh RK, Varney ML, Bucana CD, Johansson SL. Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res*. 1999;9(4):383-7.