

Pojavnost mutacije gena BRAF u displastičnom nevusu i melanomu in situ

Prkačin, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:700509>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Prkačin

Pojavnost mutacije gena BRAF u displastičnom nevusu i melanomu *in situ*

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Prkačin

Pojavnost mutacije gena BRAF u displastičnom nevusu i melanomu *in situ*

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u suradnji s Klinikom za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice, Klinikom za onkologiju i nuklearnu medicinu te Kliničkim zavodom za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“.

Voditelji rada:

Akademkinja Mirna Šitum,
Doc. dr. sc. Ivan Šamija

Zahvale:

Neizmjereno zahvaljujem akademkinji Mirni Šitum na mentorstvu i stručnom vodstvu, na samoj ideji oko teme istraživanja, nesebičnom poticanju i kontinuiranoj podršci tijekom izrade doktorske disertacije, kao i tijekom mog cjelokupnog stručnog i znanstvenog napredovanja. Akademkinji zahvaljujem i za poticajnu radnu sredinu, prenošenje znanja, stručnost, iskrenost i kontakte.

Veliko hvala dugujem doc. dr. sc. Ivanu Šamiji, komentoru, na stručnom vodstvu, kontinuiranim detaljnim uputama za poboljšanje kvalitete disertacije i podršci bez koje ovo istraživanje ne bi bilo moguće i ovaj rad ne bi bio završen. Najljepše zahvaljujem prof. dr. sc. Majdi Vučić na ustupanju podataka, stručnosti, podršci i preporukama oko izrade samog istraživanja.

Hvala svim mojim kolegama s Klinike za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice koji su me podržavali i bodrili tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala Bojanu na ljubavi, beskrajnoj podršci, poticanju i strpljenju.

Hvala Franu i Dori na njihovoj bezuvjetnoj ljubavi i postojanju.

Naposljetku, hvala mojim roditeljima, braći, mojoj sestri i Josipu na beskrajnoj podršci, ljubavi i nepokolebljivoj vjeri u moj uspjeh.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Melanom kože	1
1.1.1	Epidemiologija melanoma	2
1.1.2	Biologija melanocita i melanoma	6
1.1.3	Nasljedni melanom	7
1.1.4	Molekularni i genetski aspekti etiologije i patogeneze melanoma	8
1.1.5	Čimbenici rizika i prevencija	11
1.1.6	Klinička slika	13
1.1.7	Patohistološka slika	14
1.1.8	Dijagnostika	16
1.1.9	Stupnjevanje	18
1.1.10	Prognostički čimbenici	20
1.1.11	Liječenje	22
1.2	Displastični nevusi i melanom	24
1.3	Lentigo maligna i lentigo maligni melanom	25
1.4	Gen i protein BRAF	26
1.4.1	Građa i funkcija	26
1.4.2	Mutacije gena BRAF i rak	26
1.4.3	Mutacije gena BRAF i melanom	27
1.4.4	Mutacije gena BRAF i nevusi	28
1.4.5	Određivanje mutacija gena BRAF	28
1.4.6	Inhibitori proteina BRAF u liječenju melanoma	29
2	HIPOTEZA	31
3	CILJEVI RADA	32
4	ISPITANICI I METODE	33
4.1	Ispitanici	33
4.2	Priprema uzoraka tkiva	33
4.3	Izolacija DNK	33
4.4	Određivanje koncentracije i čistoće DNK	34
4.5	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	34
4.6	Analiza rezultata lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu	35
4.7	Statistička obrada	36
5	REZULTATI	37
5.1	Struktura ispitanika	37
5.2	Mutacije u genu BRAF	38
5.3	Mutacije u genu BRAF kod displastičnih nevusa i melanoma <i>in situ</i>	39
5.4	Povezanost mutacija u genu BRAF s drugim demografskim i kliničkim varijablama	40
5.4.1	Mutacije u genu BRAF i spol	40
5.4.2	Mutacije u genu BRAF i dob	41
5.4.3	Mutacije u genu BRAF i lokalizacija	43
5.4.4	Mutacije u genu BRAF i veličina promjene	44
5.4.5	Mutacije u genu BRAF i prethodna dijagnoza melanoma	45
6	RASPRAVA	47
7	ZAKLJUČCI	52
8	SAŽETAK	53
9	SUMMARY	54
10	LITERATURA	55
11	ŽIVOTOPIS	60

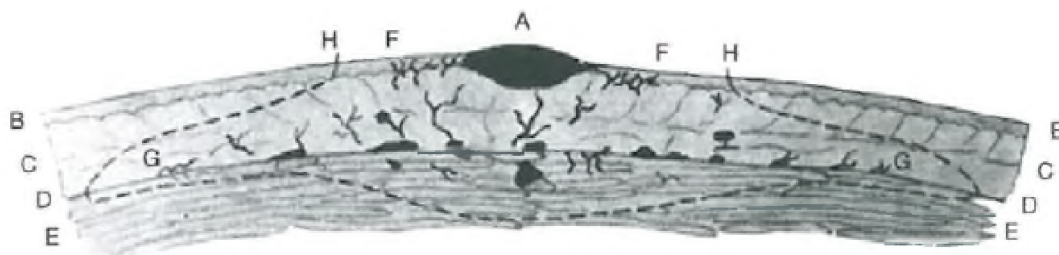
1 UVOD

1.1 Melanom kože

Najraniji pisani dokaz o melanomu potječe iz 18. stoljeća čiji je autor bio John Hunter (1). Međutim, prvi autor koji je melanom opisao kao bolest bio je Laenneca 1806. godine. Prvi istraživački radovi o melanomu mogu se pripisati Williamu Norrisu (1820.), koji je otkrio mnoga danas prihvaćena obilježja melanoma (epidemiološka, patološka, klinička obilježja i liječenje melanoma). Pojam *melanom* prvi je upotrijebio Robert Carswell 1834. godine u SAD-u. Budući da je bila riječ o novootkrivenoj bolesti, zanimanje za melanom u drugoj polovici XIX. stoljeća bilo je vrlo veliko. Oliver Pemberton je godine 1858. objavio seriju od 60 bolesnika s melanomom te zapazio da je to bolest odraslih ljudi i da se izuzetno rijetko pojavljuje u djece (1). Opisao je prvi slučaj melanoma kod pripadnika crne rase, lokaliziran u području stopala, te je zaključio da nijedan tadašnji oblik liječenja nije učinkovit u zaustavljanju bolesti. Sir Jonathan Hutchinson opisao je godine 1857. subungvalni melanom i preporučio „ranu amputaciju“ zahvaćenog prsta (1,2). Iako je široka ili radikalna ekscizija melanoma bila prihvaćen način liječenja s kojim su se slagali svi koji su liječili ovu bolest, pitanje disekcije regionalnih limfnih čvorova bilo je poprilično kontroverzno potkraj XIX. stoljeća.

Početkom XX. stoljeća došlo se do zaključka da kirurško liječenje melanoma, osim široke ekscizije, mora uključivati i disekciju regionalnoga limfnog bazena, bez obzira na to jesu li limfni čvorovi palpabilni ili nisu, budući da su čvorovi u većini slučajeva „inficirani“.

Melanom je proglašen najmalignijim od svih kožnih tumora, iako su opisani i slučajevi koji ne govore u prilog tom pravilu (npr. bolesnik koji je nakon operacije melanoma živio još 20 godina) (1). William Sampson Handley, na temelju samo jedne obdukcije, opisao je 1907. preporuke za kirurško liječenje melanoma koje su se kao takve održale čak punih 50 godina. Navedeni je autor zagovarao kružnu eksciziju od 3 do 5 cm od ruba tumora s podminiranjem kože i potkožnoga tkiva te sa širokom resekcijom mišićne fascije i podležeg mišića (Slika 1.) (1).



Slika 1. Preporučeni način ekscizije melanoma koji je opisao Handley godine 1907. Iscrtkana linija HH označava ekscizat kože, potkožnoga tkiva, mišićne fascije i mišića.

(IZVOR: McLeod GR, Davis NC, Sober AJ. A history of melanoma. From Hunter to Clark. U: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, ur. Cutaneous Melanoma. 4. izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing Inc. 2003; 1-12.)

Patolozi Sophie Spitz i Arthur Allen opisali su 1948. zaseban tip nevusa u djece, koji se patohistološki može zamijeniti s melanomom. Nazvan je benigni juvenilni melanom, a potom je naziv izmijenjen u Spitzin nevus. Navedeni autori prvi su opisali ulceraciju melanoma kao glavni nepovoljni prognostički čimbenik (1).

Vincent McGovern, patolog iz Australije, najpoznatiji je, međutim, po organiziranju i predsjedanju brojnim međunarodnim kongresima i simpozijima kojima je cilj bio donošenje konsenzusa i zajedničkog protokola u liječenju melanoma.

Pod njegovim je vodstvom u Sydneyju 1972. održan kongres Internacionalnog društva za borbu protiv raka, na kojem su prihvaćene jedinstvena nomenklatura i terminologija patohistoloških nalaza te je usvojena klasifikacija melanoma (opisao ju je Clark godine 1967.). Deset godina poslije predsjedao je skupom koji je za cilj imao reviziju postojeće klasifikacije (3,4). Osim navedenog, McGovern je prvi upozorio na to da je izloženost Sunčevu svjetlu važan rizični čimbenik u patogenezi melanoma. U svojim je člancima proučavao utjecaj različitih patohistoloških obilježja melanoma (debljine, ulceracije, mitotičkog indeksa i regresije) na prognozu bolesnika (1,3).

Alexander Breslow, profesor patologije iz Washingtona, ostvario je izuzetan doprinos u istraživanju melanoma kože, ističući debljinu primarnog tumora kao primarni prognostički pokazatelj lokaliziranog melanoma (1). S obzirom na to da je navedeni pokazatelj kvantitativan, jednostavan za mjerenje i reproducibilan, Breslow je godine 1969., započeo praćenje prognoze u skupinama bolesnika s različitom debljinom tumora. Zaključak njegovih studija na relativno malom broju bolesnika bio je da debljine tumora od 0 do 0,75 mm, 0,76 do 1,5 mm i 1,6 do 3 mm, te iznad 3,1 mm čine četiri različite grupe s obzirom na prognostički ishod. Multinacionalna studija koja je obuhvatila 284 bolesnika s melanomom iz Registra bolesnika s melanomom Svjetske zdravstvene organizacije pokazala je 1978. godine da je debljina tumora bolji prediktor metastaziranja i petogodišnjeg preživljenja od bilo kojega drugog patohistološkog pokazatelja (5). Breslow je naknadno proširio svoje istraživanje, uključujući veličinu okolnoga zdravog tkiva oko tumora koju obuhvaća ekscizat. Tadašnji standard široke lokalne ekscizije bio je zdravi rub kože od 4 do 5 cm oko melanoma. Rezultati studije pokazali su da je pojava lokalnog recidiva melanoma bila veća ako je zdravi rub široke lokalne ekscizije bio manji od prihvaćenog standarda (6).

Wallace H. Clark, Jr. osnovao je godine 1996. prvu multidisciplinarnu Kliniku za dijagnostiku i liječenje pigmentiranih lezija u Općoj bolnici Massachusetts. Tvorac je tzv. Clarkovih stupnjeva invazije melanoma koji su u kombinaciji s Breslowljevom klasifikacijom omogućili precizniju klasifikaciju te praćenje bolesnika s melanomom. Opisao je Clarkov nevus, priznati rizični čimbenik za nastanak melanoma i postavio temelje za proučavanje obiteljskog melanoma (7). Sinonimi za taj nevus su: B-K nevus, atipična mola, displastični nevus. Clark je prvi prikazao multifaktorijalni prognostički model u predviđanju preživljenja bolesnika s melanomom koji je obuhvatio spol, lokalizaciju tumora, debljinu tumora, mitotički indeks, prisutnost ili odsutnost regresije te stupanj imunološkog odgovora organizma (1,8).

Melanom se može razviti bilo gdje na koži, međutim, češće se javlja na pojedinim dijelovima tijela, različito kod žena (potkoljenice) i muškaraca (trup). Melanom kože je zloćudni tumor melanocita (pigmentnih stanica neuroektodermalnog podrijetla). S obzirom da se melanom najčešće nalazi na koži to uglavnom omogućava jednostavnu i brzu detekciju (9). Za razliku od drugih zloćudnih tumora, melanom kože ima izvrsnu prognozu ako je dovoljno rano otkriven i kirurški uklonjen (po mogućnosti u *in situ* fazi ili barem dok je tanji od 0,75 mm, mjereno metodom po Breslowu) (10), dok se uznapredovala bolest teško liječi te često završava smrću.

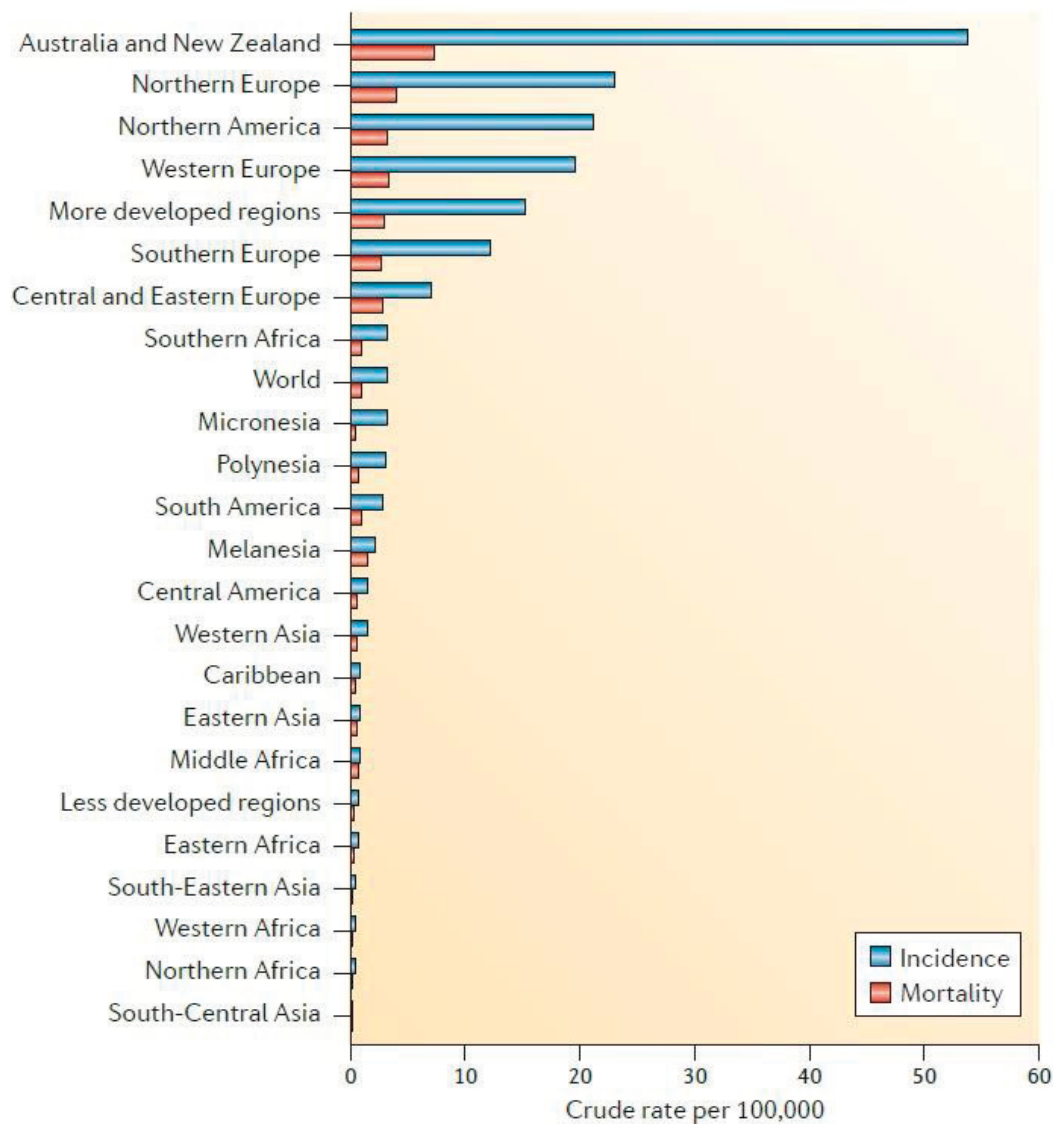
1.1.1 Epidemiologija melanoma

Melanom je u zadnjih 20 godina postao jedan od najčešćih tumora u Zapadnom svijetu s najbrže rastućom incidencijom od svih zloćudnih tumora (11).

Među bjelačkom populacijom, najčešći je melanom kože, dok je među populacijama jače pigmentacije kože, s područja Afrike i Azije, izraženija pojava melanoma sluznica, ali s dosta nižom incidencijom

(9). Specifičnost ovog oblika tumora odražava se u vrlo značajnim razlikama u incidenciji s obzirom na geografski položaj zahvaćene populacije, što se uglavnom pripisuje utjecaju ultraljubičastog (UV, engl. *ultraviolet*) zračenja, odnosno međudjelovanju UV zračenja i fenotipskih osobina (boja kože). Brojni epidemiološki podatci, osim utjecaja UV zračenja, sugeriraju nadalje znatan utjecaj spola i genskih čimbenika na patohistološke osobine i anatomske lokalizacije melanoma (10).

Najveća incidencija melanoma kože zabilježena je u Australiji i Novom Zelandu (Slika 2.), državama s populacijom pretežno svijetle pigmentacije kože, gdje stopa incidencije, objavljena u istraživanju iz 2013. godine, iznosi između 50 i 60 novooboljelih slučajeva na 100 000 stanovnika u godini dana. Među europskim stanovništvom, stopa incidencije novooboljelih iznosi oko 20 slučajeva na 100 000 stanovnika, a među stanovnicima Sjedinjenih Američkih Država (SAD) oko 30 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje. Suprotno ovim rezultatima, stopa incidencije novooboljelih slučajeva u državama Afrike i Azije iznosi otprilike 1 na 100 000 stanovnika godišnje (12). Rezultati ovih istraživanja upućuju na zaključak da je pigmentacija kože jedna od važnih svojstava koja utječu na pojavnost i razvoj melanoma kože (10).

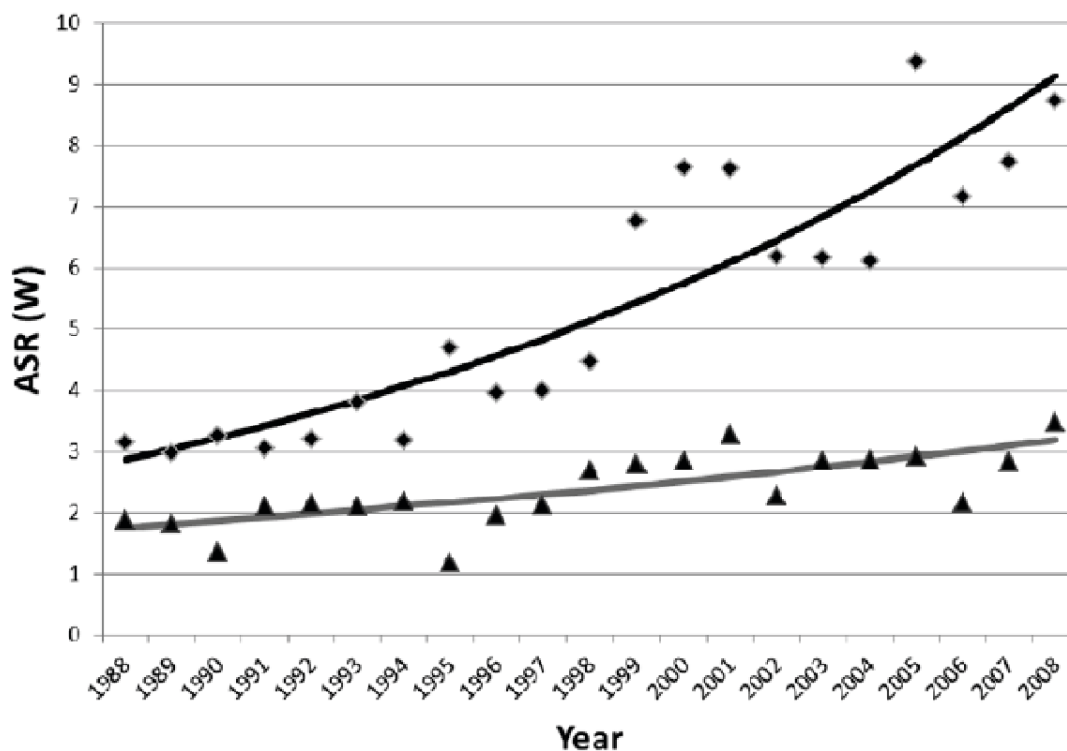


Slika 2. Stopa incidencije melanoma i smrtnosti u svijetu.

(IZVOR: Erdman F, Lortet-Tieurent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, Bray F.

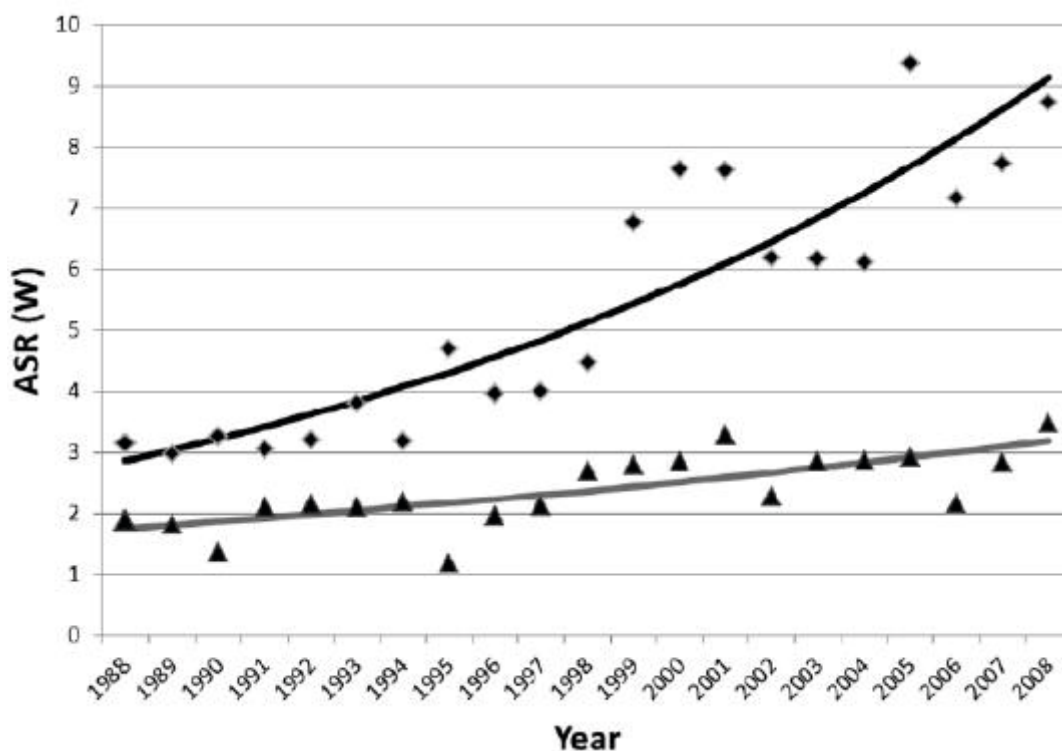
International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? Int J Cancer 2013;132:385-400.)

Unatoč neprestalnom globalnom porastu incidencije melanoma, stopa mortaliteta bilježi znatno slabiji porast. U SAD-u je u razdoblju od 1982. do 2011. stopa smrtnosti bila konstantna, uz dvostruko veću stopu incidencije u istom razdoblju (10). Istodobno se oko 75 % smrti od raka kože pripisuje melanomu.



Slika 3. Stopa incidencije melanoma (rombovi) i mortaliteta (trokuti) muške populacije u Republici Hrvatskoj. (IZVOR: Barbarić J, Znaor A. Incidence and mortality trends of melanoma in Croatia. *Croat Med J* 2012;53:135-40.)

Od 1988. do 2008. u Hrvatskoj je od melanoma umrlo 1569 muškaraca i 1323 žene (10). U istom razdoblju stopa smrtnosti porasla je 45 % za muškarce i 50 % za žene (Slika 3. i 4.). Prema podacima iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo broj oboljelih od melanoma od 2007.-2015. godine je 2353 žena i 2620 muškaraca (13). Prema istim podacima u Hrvatskoj je u 2015. godini bilo 287 novoboljelih žena, te 362 novooboljela muškarca, dakle ukupno 649 novooboljelih od melanoma u 2015. godini. Iste godine, melanom bio na devetom mjestu najčešćih sijela raka u Hrvatskoj kod muškaraca već drugu godinu za redom, te je po prvi puta bio na desetom mjestu kod žena (13). Prema podacima epidemiološke studije Referentnog centra za melanom Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske, koja je uključila više od 700 bolesnika s melanomom (provedena u razdoblju od 2002. do 2007. g.), srednja vrijednost debljine melanoma u trenutku postavljanja dijagnoze bila je 2,24 mm, što je još uvijek značajno više od europskog prosjeka (10).



Slika 4. Stopa incidencije melanoma (rombovi) i mortaliteta (trokuti) ženske populacije u Republici Hrvatskoj (IZVOR: Barbarić J, Znaor A. Incidence and mortality trends of melanoma in Croatia. *Croat Med J* 2012;53:135-40.)

Pojam gradijenta zemljopisne širine uveden je još 1950-tih godina i prema njemu incidencija melanoma u nekoj populaciji opada s povećanjem zemljopisne širine. Uzme li se u obzir heterogenost promatrane populacije s obzirom na boju kože, prilikom istraživanja incidencija melanoma, detaljne analize subpopulacija pokazuju značajne razlike u incidenciji melanoma između primjerice tamnopusih Maora i doseljene bijele populacije u Novom Zelandu i Australiji ili razlike između crnaca i hispanaca s jedne te bijelaca s druge strane u SAD-u. Tako očitovane razlike smatraju se dokazom etiološke važnosti međudjelovanja okolišnih čimbenika (UV zračenje) i individualne predispozicije. Istraživanja vremenskog utjecaja izlaganja Sunčevoj svjetlosti na rizik za razvoj melanoma na temelju 25 objavljenih kliničkih studija pokazala su da je omjer izgleda za razvoj melanoma 1,57 za intermitentno, a 0,73 za kronično izlaganje Sunčevoj svjetlosti (14). Jednim istraživanjem utjecaja umjetnih izvora UV zračenja na 1518 dermatoloških pacijenata utvrđen je znatno povišeni rizik od melanoma u osoba koje su se koristile umjetnim izvorima UV zračenja, uz omjer izgleda 1,64, a za žene do dobi od 45 godina uz znatno veći omjer izgleda od 3,2 (15).

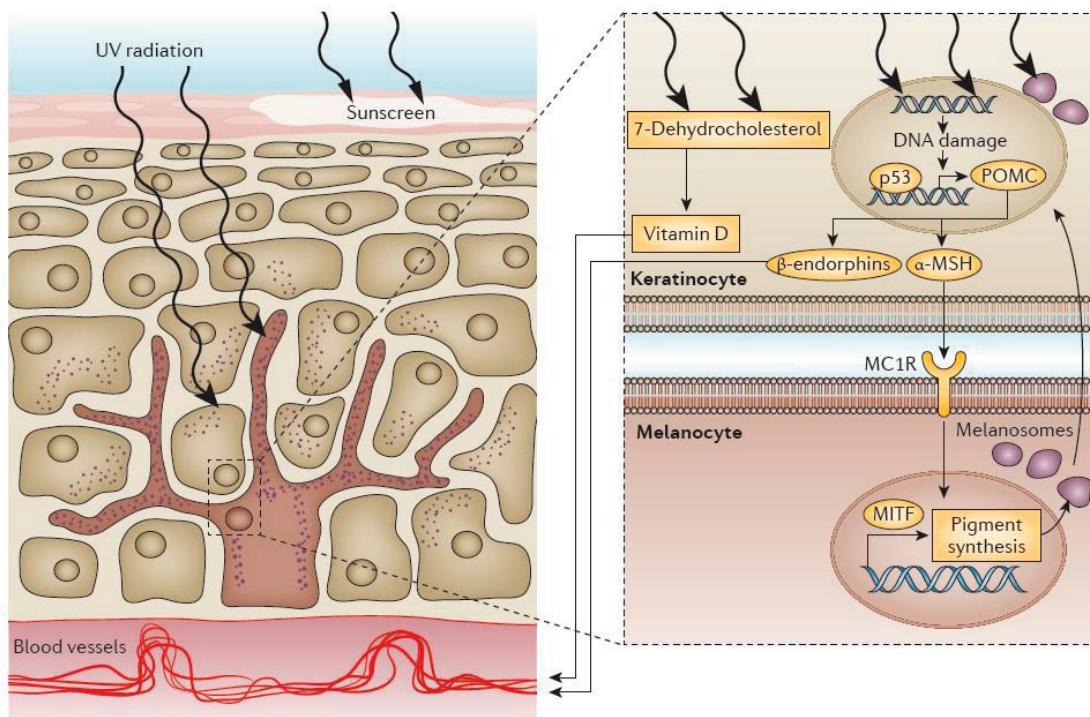
Istraživanja utjecaja spola na stopu incidencije melanoma na populaciji žena i muškaraca iz SAD-a u razdoblju između 1950. i 2007. pokazuju porast incidencije melanoma kod žena 9 puta, a kod muškaraca 17 puta. Slični rezultati dobiveni su i kod istraživanja populacija s područja Australije, središnje Europe i Skandinavije (16).

S obzirom na anatomsku lokalizaciju, podatci ukazuju da melanom na trupu ima vrhunac incidencije u 5. i 6. desetljeću života, a melanom glave i vrata u 8. desetljeću života. Ranije kliničke studije prikazuju veću učestalost melanoma na leđima i ramenima u muškaraca, odnosno na donjim udovima u žena, što se često tumači i kao dokaz o važnosti intermitentnog izlaganja UV zračenju u patogenezi melanoma (10).

1.1.2 Biologija melanocita i melanoma

Zreli melanociti su stanice koje se najčešće nalaze u bazalnom sloju epidermisa te u folikulima dlake i nekim unutarnjim organima. Uloga melanocita u stvaranju pigmenta (melanina) razlikuje ih od svih drugih stanica u ljudskom tijelu. Melanin nastaje u malim membranom omeđenim granulama, melanosomima, u kojima se i pohranjuje sve dok se egzocitozom ne otpusti u izvanstanični prostor epidermisa (17). Susjedne stanice, keratinociti, uslijed izlaganja UV zračenju, luče čimbenike koji reguliraju preživljenje, diferencijaciju, proliferaciju i pokretljivost, čime potiču melanocite na proizvodnju melanina i učinak tamnjenja kože (18). Pigmenti koje stvaraju melanociti sintetiziraju se pomoću melanosomskog enzima tirozinaze te su građeni od raznih kemijskih spojeva koji se klasificiraju u crvene/plave pigmente (feomelanin) i smeđe/crne pigmente (eumelanin) (19, 20).

Izlaganje melanocita ultraljubičastom zračenju uzrokuje pojavu oštećenja DNK u epidermalnim melanocitima, što uzrokuje stabilizaciju p53 i aktivaciju transkripcije gena za proopiomelanokortin (POMC). POMC se posttranslacijski cijepa na više manjih peptida, među kojima je i α -melanocit-stimulirajući hormon (α -MSH). MSH podražuje melanokortinski receptor (MC1R) te tako stimulira signalni put unutar melanocita kojim se aktivira gen za mikroftalmijski transkripcijski faktor (MITF), koji potiče ekspresiju enzima za sintezu pigmenta te ostale molekule i enzime potrebne za pakiranje, sazrijevanje i sekreciju melanosoma (19). Enzim odgovoran za sintezu melanina naziva se tirozinaza (EC 1.14.18.1). Tirozinaza sintetizira melanin dualnom aktivnošću iz tirozina (L-Tyr). Najprije nastaje 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), a zatim L-DOPA kinon, koji se nakon niza preinaka pretvara u melanin. Melanosomi ispunjeni melaninom kreću se unutar citoplazmatskih izdanaka melanocita te dolaze do keratinocita, gdje apsorbiraju i raspršuju energiju ultraljubičastog zračenja. U uzajamnom djelovanju između keratinocita i melanocita, koje dovodi do pigmentacije kože, važni su čimbenici brzina stvaranja melaninskih zrnaca u melanocitima, unošenje zrnaca u keratinocite te njihov konačni razmještaj u njima (21, 22).



Slika 5. Utjecaj UV zračenja na nastanak melanoma.

(IZVOR: Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A. Melanoma Nat Rev Dis Prim 2015;1:1-20. Ustupljeno ljubaznošću autora Schadendorf D)

Drugi važan čimbenik u regulaciji funkcije melanocita je melatonin, indolna molekula koja nastaje u pinealnoj žlijezdi (epifizi) i inhibira funkciju melanocita u uvjetima smanjene svjetlosti. Melanociti reagiraju i na parakrine faktore rasta, a maligni melanociti sami stvaraju faktore rasta koji stimuliraju rast melanoma (22).

Ljudi svijetle kože i crvene kose najčešće imaju polimorfizme u genu *MC1R*, koji uzrokuju smanjenje aktivnosti receptora *MC1R* (11). Takvi polimorfizmi kod ljudi su povezani s povećanim rizikom za razvoj melanoma (23).

Melanom se razvija iz melanocita displastičnih i dobroćudnih nevusa, ali i *de novo*. Prelazak normalnih melanocita u stanice melanoma uvjetovan je brojnim čimbenicima okoline i mikrookoline (UV zrake), kao i unutarstaničnim čimbenicima. Komunikacija među stanicama, parakrina komunikacija, autokrina regulacija, homeostatski mehanizmi, uključujući diferencijaciju, mirovanje, proliferacijske i apoptotičke odgovore utječu na integritet melanocita. Narušavanje bilo kojeg od tih procesa dovodi do stvaranja dobroćudnih i displastičnih nevusa te melanoma (10).

1.1.3 Nasljedni melanom

Obiteljski melanom čini oko 10% svih slučajeva melanoma te obiteljska povijest melanoma otprilike udvostručava rizik od obolijevanja od melanoma (24). Kod obitelji s barem dva oboljela člana, melanom se u prosjeku javlja u mlađoj životnoj dobi nego što je prosječna, javljaju se multipli primarni melanomi, a prema nekim autorima i multipli atipični nevusi, odnosno displastični nevusi (10).

Iako pacijenti s genetskim predispozicijama imaju znatno veći rizik od obolijevanja, većina slučajeva melanoma je sporadična. Nasljedni aleli odgovorni za sklonost razvoja melanoma mogu biti visokorizični, koji su rjeđi, i niskorizični koji su puno prisutniji u populaciji, ali se rijetko vežu uz glavne uzročnike oboljenja od melanoma. Visokorizični se vežu za obiteljsko nasljeđe melanoma, a niskorizični za sporadične slučajeve (25). S obzirom da sporadični slučajevi čine oko 90 % oboljenja, najvažniji uzročnik maligne transformacije melanocita najvjerojatnije se nalazi među okolišnim faktorima. Sekvenciranje tumorskih genoma pokazalo je da melanomi nose najveću količinu mutacija DNK od svih ljudskih tumora, s tim da se najveći broj tih mutacija odnosi na one uzrokovane UVA i UVB zračenjem, kao što su C>T tranzicije koje nastaju kao posljedica stvaranja pirimidinskih dimera (9).

Genetičkim istraživanjima obiteljskog melanoma pomoću metode analize povezanosti (engl. *linkage analysis*) identificirano je nekoliko suspektnih genskih lokusa koji upućuju na zaključak da se radi o autosomno-dominantnom načinu nasljeđivanja sklonosti za razvoj melanoma. Te studije također upozoravaju da je općenito sklonost melanomu povezana s raznorodnim genskim i konstitucijskim čimbenicima, kao što su rasa, tip kože, podrijetlo, dob te broj, veličina i pigmentacija nevusa (10).

Brojne genetičke studije nasljednih svojstava obitelji sklonih razvoju melanoma pokazale su povezanost bolesti s 9p21 lokusom kromosoma 9 te se taj lokus naziva lokusom obiteljskog melanoma. U toj je regiji česta pojava gubitka heterozigotnosti (LOH, engl. *loss of heterozygosity*) povezana s razvojem melanoma. Kod 25-40 % slučajeva obiteljskog melanoma identificiran je inaktiviran gen *CDKN2A* (inhibitor ciklin-ovisne kinaze 2A, engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), koji kodira za dva tumor-supresorska proteina, p16(INK4A) i p14ARF (engl. *alternative reading frame*), koji se prepisuju s različitih prvih egzona te s alternativnih promotora. Protein p16 zaustavlja stanični ciklus između G1 i S faze inhibicijom ciklin-ovisne kinaze CDK4 u stanicama s oštećenom DNK ili s aktiviranim onkogenima. p16 vezanjem za CDK4 inhibira fosforilaciju proteina Rb. Defosforilirani protein Rb je aktivan te se kao takav veže za

transkripcijski faktor E2F koji vezanjem proteina Rb prestaje biti transkripcijski aktivan pa ne dolazi do transkripcije gena reguliranih E2F transkripcijskim faktorom koji su važni za prelazak iz G1 u S fazu staničnog ciklusa (25). Mutacije u genu za p16 dovode do toga da p16 ne može inhibirati fosforilaciju proteina Rb, stoga stanice koje nose tu mutaciju neregulirano ulaze u diobe, što u suradnji s drugim signalima rasta može rezultirati razvojem melanoma (24).

Protein p14ARF veže se na protein MDM2 i time ga inaktivira. Aktivan MDM2 ubikvitinacijom označava proteine za degradaciju, između ostalih i protein p53, koji uslijed oštećenja DNK zaustavlja stanični ciklus kako bi se omogućio popravak oštećene DNK. Mutacija u genu za p14ARF uzrokuje prekomjernu ubikvitinaciju i razgradnju p53, što pogoduje razvoju melanoma (24).

U oko 50 % slučajeva oboljelih od obiteljskog melanoma dokazana je povezanost haplotipa u regiji 9p21. Konstitutivne mutacije *CDKN2A* gena rjeđe su u tim obiteljima, i procjenjuju se na 25-40 %. U ukupnoj populaciji oboljelih od melanoma, konstitutivne mutacije *CDKN2A* gena nalaze se vrlo rijetko, u oko 1 % slučajeva ili rjeđe. Iako spomenute i neke druge činjenice upućuju na zaključak da *CDKN2A* nije nužan preduvjet za nastanak melanoma, ako mutacija *CDKN2A* postoji, vrlo je vjerojatno da će doći do razvoja melanoma, i to često multiplih melanoma (24).

Osim mutacija u genu *CDKN2A*, kod obitelji sklonih razvoju melanoma utvrđena je i konstitutivna mutacija gena *CDK4*, koji se nalazi nizvodno od *CDKN2A* i kodira za ciklin-ovisnu kinazu 4 (*CDK4*, engl. *cyclin-dependent kinase 4*) (25).

Ostali geni koji su u istraživanjima dovedeni u vezu s obiteljskim melanomom, iako značajno manje jednoznačno, jesu *CDK6*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN2D* i *p53* (10).

1.1.4 Molekularni i genetski aspekti etiologije i patogeneze melanoma

Melanocitne neoplazme obuhvaćaju lezije od benignih, zvane melanocitni nevusi do malignih lezija, koje se nazivaju melanomi. Sve one potječu od melanocita, podrijetlom iz neuralne pukotine, koje se tijekom razvoja smještaju u koži, očima i, u puno manjoj mjeri, na drugim organima u tijelu. Stoga, melanociti mogu procesom maligne transformacije razviti vrlo različite oblike melanoma. Najčešći oblik melanoma je melanom kože izazvan kroničnim izlaganjem kože jakim Sunčevim zrakama (26). Prelazak normalnih melanocita u stanice melanoma uvjetovan je kompleksnim interakcijama između genskih, konstitucijskih te okolišnih čimbenika. Najrizičniji faktori za razvoj melanoma su povijest melanoma u obitelji, brojni benigni ili atipični nevusi te prethodno obolijevanje od melanoma. Jedan od najutjecajnijih okolišnih čimbenika, iako ne nužan preduvjet za razvoj bolesti, je izlaganje melanocita UV zrakama. Osim toga, narušavanje vitalnih unutarstaničnih i međustaničnih procesa dovodi do stvaranja dobroćudnih i displastičnih nevusa te melanoma. Razumijevanje i poznavanje rane preobrazbe melanocita, metastatskih procesa i regulacijskih mehanizama važni su za buduće ciljne terapije melanoma. Istraživanja epigenetičkih i genetičkih događaja značajno su pridonijela razumijevanju nastanka i ponašanja melanoma (10).

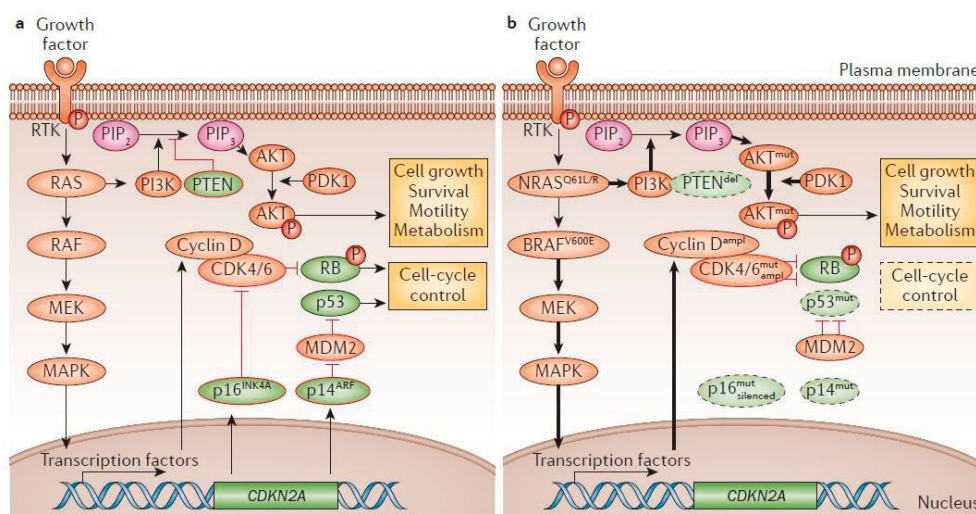
Melanom se razvija iz melanocita ili iz dobroćudnih nevusa, koji su dio normalne homeostaze kože. Clarkov model razvoja melanoma opisuje histološke promjene koje prate transformaciju melanocita u stanice melanoma. Histološke karakteristike tipične za svaki korak progresije vidljive su manifestacije genetskih promjena koje ih uzrokuju (22). Prijelaz melanocita i dobroćudnih nevusa u melanom praćen je burnim genetskim i fenotipskim promjenama koje progresijom i rastom primarnog melanoma mogu dalje napredovati, uz razvoj angiogeneze, i pojačanim metastatskim potencijalom do metastatskog mela-

noma (10). Istraživanja sekvenci velikog broja genoma pokazala su ogromnu genetičku složenost melanoma, s tisućama mutacija, delecija, amplifikacija, translokacija i DNK metilacija prisutnih u genomima pojedinih slučajeva melanoma (27).

Geni koji se povezuju s razvojem raka svrstavaju se u dvije skupine: onkogeni (promijenjeni geni čija povećana aktivnost pridonosi razvoju karcinoma) i tumor-supresorski geni (normalni geni koji sudjeluju u regulaciji rasta i razvoja, čija smanjena aktivnost pogoduje razvoju karcinoma). Proteinski produkti tih gena često su čimbenici rasta koji, u izmijenjenom obliku ili kad se pojačano eksprimiraju, pomažu zloćudnu proliferaciju. Prema nekim istraživanjima, za melanom najznačajniji tumor-supresorski geni su p53, p16, p21 i Rb, dok među onkogene treba ubrojiti: RAS, RAF, JUN, FOS, MYC te PDGF, IGF 1 i VEGF, no posljednjih godina niz se povećava (27).

Pojavom mutacija u genima za ključne regulatore staničnog rasta, proizvodnja autokrinih faktora rasta i nedostatak adhezijskih receptora narušavaju unutarstaničnu signalizaciju melanocita, zbog čega oni mogu izbjeći regulaciju keratinocitima.

Kao posljedica, melanociti neograničeno proliferiraju i šire se, što dovodi do formiranja nevusa ili madeža (18). Preobrazbom melanocita u melanom nastupa razdoblje autokrine produkcije vlastitih čimbenika rasta koji pridonose autonomnom tumorskom rastu. Aktiviraju se putevi onkogenog RAS, a kroz sekundarne glasnike kao što je ciklički adenozin monofosfat (cAMP) i diacilglicerol (DAG), aktiviraju se i putevi prijenosa signala cAMP/PKA i IP3K/DAG/PKC. Uz to, u melanocitima BRAF aktivira MAPK signalni put koji potiče rast stanica. Glavno obilježje raka jest prekomjerna proliferacija. Proliferacija započinje kada čimbenik rasta prepozna i veže se na svoj receptor na membrani stanice. Melanomske stanice posjeduju zapanjujući repertoar prekomjerne produkcije hormona, vlastitih čimbenika rasta i citokina te njihovih receptora, čime mogu samoregulirati vlastiti rast, odnosno ubrzati razvoj i diobu. U melanomskim stanicama, između ostalog, utvrđena prekomjerna ekspresija: receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGF-R), receptora za trombocitni čimbenik rasta (PDGFR- α i PDGFR- β), inzulinu sličnog čimbenika rasta (IGF 1 i 2), citokina, interleukina 1 α , 1 β , 6, 7, 8 β , 10 i 12, TNF- α te interferona γ i β . Interakcijom sa svojim receptorima, mnogi od tih čimbenika djeluju na proliferaciju melanomskih stanica kao i na njihovu diferencijaciju, a mogu i stimulirati angiogenezu. Mutacije RAS-protoonkogenog u oko 5-6 % humanih melanoma pojavljuju se najčešće u regijama izloženim Sunčevim zrakama, a i one su češće povezane s prekomjernom ekspresijom receptora za EGF.



Slika 6. Signalni put u melanomu: a) normalni put u zdravoj stanici, b) kod melanoma, u mutiranoj stanici.

(IZVOR: Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A. Melanoma Nat Rev Dis Prim 2015;1:1-20. Ustupljeno ljubaznošću autora Schadendorf D.)

U melanocitima, prijenos signala počinje putem onkogena *RAS* (Slika 6.). Protein *RAS* nalazi se u membrani u dva oblika, inaktivnom GDP obliku i aktivnom GTP obliku. Prijenos signala počinje vezanjem čimbenika rasta na receptor na membrani, nakon čega se aktiviraju G proteini. Vezanjem *RAS* proteina započinje dimerizacija membranskog receptora i aktivacija tirozin-kinaza te autofosforilacija specifičnih tirozinskih rezidua na unutarstaničnim dijelovima receptora. Regrutacijom citosolnih SOS proteina i vezanjem na *RAS* dolazi do promjene u konformaciji *RAS*-a i njegove fosforilacije, odnosno aktivnog *RAS*-GTP. Mutirani gen *RAS* može uzrokovati neprekidnu aktivaciju proteina *RAS*, time stalno potičući proliferaciju stanica i inhibiranje apoptoze. Najznačajniji član skupine proteina koje aktivira *RAS* za melanom jest protein-kinaza *RAF*. Aktivacija *RAS* proteina pokreće kaskadu fosforilacija u citoplazmi do aktiviranja *RAF*-a putem *RAS*-*RAF*-*MEK*-*ERK* kinaznog puta (10). Ovaj signalni put u melanocitima je aktiviran faktorima rasta kao što su faktor matičnih stanica (*SCF*), fibroblastni faktor rasta (*FGF*) i faktor rasta hepatocita (*HGF*). Istraživanjima je dokazano da je *ERK* hiperaktiviran u više od 90 % humanih melanoma. Najčešće mutirani gen ovog signalnog puta kod melanoma je *BRAF*, jedan od tri humana *RAF* gena (uz *ARAF* i *CRAF*) (18). Gen *BRAF* mutiran je u više od 50 % slučajeva melanoma, a *N-RAS* u oko 20 %. U oko 80-90 % slučajeva aktivirajuća mutacija u *BRAF*-u je supstitucija glutaminske kiseline valinom na poziciji 600 (*V600E*), koja izaziva aktivaciju kaskade signalnog puta *MAPK* neovisnu o *RAS*-u. Mitogenima aktivirani putevi protein-kinaza poznati pod nazivom *MAPK* (engl. *mitogen-activated protein kinase pathways*) putevi su prijenosa signala kroz citoplazmu, kojima se kaskadama fosforilacija signal prenosi do jezgre gdje se pokreće transkripcija ciljnih gena. *MAPK* je glavni, evolucijski očuvan, mehanizam kontrole transkripcije u eukariota. Protein-kinaze u tim putevima kaskadno se aktiviraju fosforilacijama. Jednom aktiviran (fosforilirani protein) može migrirati u jezgru, te fosforilirati i aktivirati transkripcijske čimbenike. U tim signalnim putevima počinje proliferacija i diferencijacija, ali se također potiče melanogeneza i inhibira apoptoza (10).

Progresija melanoma prema invazivnom i metastatskom fenotipu povezana je s gubitkom ekspresije receptora za tirozin-kinazu *C-KIT*, koja ima ključnu ulogu u rastu i diferencijaciji embrionalnih melanoblasta. Protoonkogen *C-KIT* kodira tirozinski transmembranski receptor iz porodice *PDGF*.

MITF (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*) je transkripcijski čimbenik koji ima ključnu ulogu u rastu i diferencijaciji pigmentiranih stanica, te u sintezi melanina, i uključen je u brojne signalne puteve (npr. *MAPK*, *WNT*, β -katenin). *MITF* u melanomu je onkogen koji, osim u proliferaciji, sudjeluje i u putevima apoptoze i prekomjerno je aktivan u 10-20 % melanoma (10). Manje je eksprimiran u stanicama melanoma nego u melanocitima, a povećana razina *MITF* proteina u stanicama melanoma smanjuje proliferaciju čak i u prisutnosti onkogena *BRAF*. Protein *MITF* nužan je za preživljenje stanice te u kombinaciji s *V600E* mutiranim *BRAF*-om onkogenom omogućuje transformaciju melanocita, prvenstveno jer osigurava esencijalne funkcije za preživljenje stanice i pridonosi proliferaciji (22).

Sljedeće obilježje raka je poremećen stanični ciklus, u kojem stanice zbog nekog poremećaja neprestano ulaze u mitozu. Stanični ciklus odvija se u nekoliko faza međusobno odvojenih i reguliranih kinazama ovisnima o ciklinu i njihovim regulatornim podjedinicama ciklinima. Inhibiranjem bilo koje faze staničnog ciklusa usporava se prolazak stanice kroz ciklus i tako odgađa mitozu. Tumorski supresori *p53* te inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu poput *p16*, *p15*, *p21* i *p27*, negativni su regulatori progresije ciklusa koji podržavaju stanično mirovanje. Kritičnu ulogu u normalnom odvijanju staničnog ciklusa u melanocitima ima ekspresija *p16*. Kinaze ovisne o ciklinu u *G1* fazi pozitivni su regulatori ciklusa.

Najčešće promjene gena povezanih s regulacijom staničnog ciklusa kod melanoma su: inaktivirajuća mutacija gena *CDKN2A*, gena koji kodira za dva tumor supresorska gena *p16(INK4A)* i *p14ARF* (kod slučajeva obiteljskih melanoma); te inaktivirajuća mutacija u drugom tumor supresorskom genu, fosfatazi i homologu tenzina (*PTEN*) (kod sporadičnih slučajeva). Tumor supresorski gen *p16 (INK4A)* regulira ulazak staničnog ciklusa u *S*-fazu tako da inhibira ciklin-ovisnu kinazu (*CDK4*). Jedan od proteina koji

sudjeluju u toj točki regulacije staničnog ciklusa je i Rb (retinoblastoma) protein. Određeni tipovi melanoma nose mutaciju u CDK4 koja blokira vezanje INK4A koji ju inhibira te tako osigurava neometano napredovanje staničnog ciklusa. Drugi tumor supresorski protein, p14ARF, zaustavlja stanični ciklus i potiče staničnu smrt nakon oštećenja DNK ili nakon što razni onkogeni ili nedostatak funkcionalnog proteina Rb potaknu neprirodnu proliferaciju stanica (22).

Osim promjene u signalnim putevima u stanicama melanoma, prilikom maligne transformacije melanocita događa se i velika promjena u metaboličkim putevima stanice. Najveća promjena metaboličkog puta stanica melanoma je pojačavanje glikolize te pojačana sinteza laktata iz piruvata, čak i u prisutnosti dovoljnih količina kisika, čime se piruvat odvlači od procesa oksidacije na mitohondrijima. Ta pojava opisana je 1920. godine te se naziva Warburgov učinak, prema istraživaču Ottu Warburgu. Istraživanja su pokazala usku povezanost aktivnosti V600E mutiranog BRAF-a i Warburgovog učinka. Dokazano je da genetička ili kemijska inhibicija V600E mutiranog BRAF-a u stanicama melanoma smanjuje učinkovitost glikolitičkih enzima i prijenosnika glukoze (27).

Apoptoza ili programirana stanična smrt dio je normalne fiziologije stanica kojom se uklanjaju oštećene stanice te tako obnavlja tkivo. U normalnim se stanicama nakon oštećenja pokreću mehanizmi popravka, a ako je oštećenje nepopravljivo, pokreće se apoptoza. Vrlo važno obilježje tumorskih stanica su poremećaji puteva kojima stanice ulaze u apoptozu, uslijed čega dolazi do prekomjerne ekspanzije populacije oštećenih stanica koje dovode do neoplazije. Jedan od glavnih modulatora apoptoze je Bcl-2, a njegova povećana ekspresija nađena je u stanicama melanoma.

Povećana aktivnost telomeraze daljnja je važna karika u zloćudnom razvoju jer narušava normalnu angiogenezu. Angiogeneza je ključni korak u progresiji tumora, posebno važna za opstanak i rast melanoma te za procese metastaziranja. Potpomognuta je čimbenicima rasta kao što su vaskularni endotelni čimbenik rasta stanica VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) i bazični fibroblastni čimbenik rasta FGF- β (engl. *fibroblast growth factor* β).

Prodiranjem melanomskih stanica u okolno tkivo započinje metastatska faza melanoma, pri čemu važnu ulogu igra sinteza i lučenje vlastitih metaloproteina matriksa te kaspaza u okolno tkivo. Na početku metastatskog širenja, odvajaju se melanomske stanice od primarnog tkiva i kreću se kroz izvanstanični matriks te limfni i krvožilni sustav, da bi dosegle udaljena mjesta na kojima će nastaviti svoj rast. Adhezijske molekule na površini stanice specifično se vežu na ligande susjednih stanica, izmjenjujući međusobno informacije i prenoseći signale u stanicu kroz interakcije s kinazama i receptorima čimbenika rasta. Većina staničnih adhezijskih molekula spada u tri velike obitelji: integrine, imunoglobuline i kadherine. Sve tri uključene su u progresiju melanoma.

1.1.5 Čimbenici rizika i prevencija

Uzroci i čimbenici rizika za razvoj melanoma složeni su te se mogu podijeliti u dvije skupine: čimbenici domaćina i okolišni čimbenici. Prema dosadašnjim istraživanjima, najrizičniji čimbenici domaćina su obiteljska povijest obolijevanja od melanoma, brojni benigni i atipični nevusi te prethodno dijagnosticiran melanom (22).

Osobe koje su prethodno obolijevale od melanoma ili od nemelanomskog raka kože imaju trostruko veći rizik za obolijevanje od melanoma. Rizik za obolijevanje od melanoma povezan je i s poviješću obolijevanja od drugih malignih oboljenja mozga, dojke, prostate i drugih, te obolijevanjem od sarkoma, limfoma, leukemije i tumora središnjeg živčanog sustava u djetinjstvu (28).

Povećan broj nevusa (više od 100) uvelike povećava rizik od melanoma, čak i kad se radi o nevusima uredne kliničke i dermatoskopske slike. Osobe s više od 50 melanocitnih nevusa imaju peterostruko veći rizik za razvoj melanoma od osoba s manje od 10 melanocitnih nevusa. Prisutnost jednog ili više displastičnih nevusa kod osobe povećava rizik za razvoj melanoma, isto kao i prisutnost velikog kongenitalnog melanocitnog nevusa ili malih do srednje velikih kongenitalnih melanocitnih nevusa. Poznato je da samo 25-40 % melanoma nastaje iz nevusa te da i u osoba s velikim brojem nevusa većina melanoma nastaje *de novo*. Stoga se smatra da atipični nevusi ili veliki broj urednih nevusa predstavljaju biljeg povećanog rizika, a ne toliko prisutnost „premaligne“ promjene iz koje se potencijalno može razviti melanom (10).

S obzirom na pigmentaciju kože, razlikujemo populacije većeg i manjeg rizika od nastanka melanoma. Istraživanja su pokazala da najčešće obolijevaju osobe svijetle puti, crvene ili svijetle kose te plavih očiju s pjegama koje brzo zadobiju opekline prilikom izlaganja Sunčevim zrakama te teško potamne. Pripadnici tamnoputih populacija imaju 10 do 20 puta niže stope melanoma od svjetloputih osoba (10).

Obiteljska povijest melanoma povećava rizik od obolijevanja članova obitelji do 1,74 puta u odnosu na osobe bez obiteljske povijesti melanoma. Oko 10 % oboljelih od melanoma ima pozitivnu obiteljsku povijest melanoma (28). Smatra se da otprilike jedna trećina bolesnika s obiteljskim melanomom ima mutacije *CDKN2A* gena, dok su mutacije u genu *CDK4* mnogo rjeđe. Druge genske anomalije koje se susreću u melanomima zabilježene su u genima *MC1R*, *NRAS*, *BRAF*, *APAF-1*, *PTEN*, *TP53* i dr. (10).

UV zračenje je najpoznatiji okolišni rizični čimbenik za razvoj melanoma, iako treba naglasiti da nisu svi melanomi povezani s izlaganjem Sunčevim zrakama. Razlike u relativnoj izloženosti UV zrakama, s obzirom na geografsku širinu, mogu pojasniti velike geografske razlike u stopama incidencije melanoma (Poglavlje 1.1.1). Iako se svaki oblik izlaganja UV zrakama smatra rizičnim za razvoj melanoma, najopasnije je intermitentno, odnosno povremeno intenzivno izlaganje UV zrakama, kod kojeg dolazi do izlaganja onih dijelova tijela koji nisu uobičajeno i svakodnevno izloženi Sunčevoj svjetlosti te često rezultira opeklinama s mjehurima. Smatra se i da opekline s mjehurima stečene u ranom djetinjstvu udvostručuju mogućnost obolijevanja od melanoma u kasnijoj životnoj dobi (28). Međunarodna agencija za istraživanje raka potvrdila je izravnu povezanost izlaganja UV zrakama u solariju i rizika od melanoma, te da osobe koje se sunčaju u solarijima prije 35. godine imaju 75 % veći rizik od razvoja melanoma nego one koje se nikada nisu sunčale u solariju (28). Brojna znanstvena istraživanja otkrila su biološke dokaze o UV-induciranoj karcinogenezi melanoma. UVA zračenje oštećuje DNK proizvodima slobodnih kisikovih radikala, dok UVB uzrokuje apoptozu keratinocita te nastanak ciklobutan pirimidin dimera (CPD) i fotoprodukata, koji posjeduju citotoksično, mutageno i karcinogeno djelovanje. CPD nastaje u melanocitima kemijski generiranom energijom (kemoekscitacijom) uz prisutnost melanina. Uslijed izlaganja melanocita UV zračenju nastaju superoksid (O_2^-) i dušikov oksid (NO) koji uzrokuju degradaciju melanina i ulazak fragmenata melanina u staničnu jezgru. Ekscitirani fragmenti melanina prenose visoku energiju fotona na DNK u jezgri te nastaje CPD koji uzrokuje ključnu C → T mutaciju. Stoga, možemo zaključiti da melanin, osim zaštitne uloge, može imati i karcinogenu ulogu (10, 28).

Izlaganje Sunčevim zrakama smatra se jedinim rizičnim faktorom melanoma koji je moguće prevenirati. Mjere zaštite od Sunčeva zračenja (fotozaštita) koje je potrebno primijeniti ovise o tipu kože i trenutnom UV indeksu. Najosjetljiviji podtipovi kože, prema Fitzpatricku, su 1 i 2, a UV indeks u hrvatskom priobalju usred ljetnog dana iznosi 11. Prva mjera fotoprotekcije podrazumijeva izbjegavanje izlaganja suncu, ponajviše između 10 i 16 sati, nošenje fotoprotektivne odjeće (izrađena prema posebnim standardima za osiguravanje visoke zaštite od UV zračenja), kapa, šešira i naočala. Prilikom izlaganja Sunčevom svjetlu, potrebno je na kožu nanositi fotoprotektivna sredstva u obliku krema za sunčanje. One sadrže aktivne kemijske sastojke koji osiguravaju zaštitu od sunca apsorpcijom, refleksijom i raspršivanjem UV zraka. SPF (engl. *Sun Protection Factor*) označava stupanj zaštite samo od UVB zračenja te ovisi o količini, vrsti filtra i zaštitnoj supstanciji. Razina faktora označava količinu UV zračenja koja uzrokuje eritem kože zaštićene zaštitnim faktorom u odnosu na nezaštićenu kožu (npr. preparati s SPF-om 15 štite kožu

od UVB zračenja 15 puta dulje u odnosu na izlaganje suncu bez nanošenja zaštitnog sredstva). Prilikom odabira kreme za sunčanje, važno je pravilno odabrati proizvod ovisno o tipu kože (razina SPF-a) i uvjetima u kojima se koriste (kreme otporne na znoj i vodootporne kreme). Uz to, kreme za sunčanje potrebno je obilato i redovito nanositi (10).

Osim melanina u koži, važnu ulogu u zaštiti od UV zračenja ima i vitamin D koji nastaje uslijed izlaganja Sunčevoj svjetlosti, ali se može unijeti i hranom. Istraživanja pokazuju da vitamin D ima imunosupresivno djelovanje te da povremeno umjereno izlaganje suncu može imati zaštićen (foto adaptivan) učinak povišene razine vitamina D u koži (10).

S obzirom na već spomenutu činjenicu da je melanom kože jednostavno kirurški odstraniti nedugo nakon njegove pojave, rano otkrivanje i dijagnosticiranje drugi je važan oblik prevencije loših ili kobnih posljedica melanoma. Samostalan pregled kože uključuje prepoznavanje promjena u pigmentaciji, nepravilnim oblicima sklonim mijenjanju oblika, a ukoliko se tako nešto primijeti, potrebno je javiti se dermatologu na pregled. Ako dermatolog pregledom ustanovi da je osoba rizična za nastanak melanoma, što je najčešće kod bolesnika sa sindromom displastičnog nevusa, preporučuju se daljnji pregledi svakih pola godine do godinu dana. Uslijed dijagnoze suspektnog melanoma ili melanocitne lezije nejasnog zloćudnog potencijala, ista se ekscidira u cijelosti i šalje na patohistološku dijagnostiku (10).

1.1.6 Klinička slika

Glavno kliničko obilježje melanoma je pigmentirana promjena koja se kroz vrijeme od nekoliko mjeseci do godine dana mijenja. Tipične promjene karakteristične za melanom mogu primijetiti i sami bolesnici, a određuju se prema pravilima za prepoznavanje melanoma u kliničkom statusu i za samopregled kože u bolesnika, a nazivaju se pravila ABCDEFG. Svaka asimetrija promjene (A – *asymmetry*), neoštra ograničenost od okolne kože (B – *border*), nejednolikost u pigmentaciji (C – *color*), promjer veći od 5 mm (D – *diameter*), promjena koja se izdiže iznad razine kože ili se mijenja kroz vrijeme (E – *elevation or evolution*), koja izaziva osjećaj svrbeža, peckanja ili boli kod bolesnika (F – *feeling*) te koja raste (G – *growth*), pobuđuje sumnju na melanom. Ostale opisane promjene u melanocitnim lezijama na koži koje pobuđuju sumnju na melanom su krvarenje, klinički znakovi upale te pojava erozija i/ili ulceracija. Kliničari se u svakodnevnoj praksi oslanjaju i na znak „ružnog pačeta“ (engl. *ugly duckling sign*). Poznato je da osoba ima određeni tip nevusa na koži te svaka lezija koja se ističe, odnosno „iskače“ među drugim promjenama na koži može biti potencijalni melanom (10).

Prema histopatološkim obilježjima, najčešće se razlikuju ovi tipovi melanoma:

a) površinsko šireći tip melanoma (SSM), koji se najčešće pojavljuje u ljudi bijele rase i čini 70-80 % svih melanoma. Može se pojaviti na bilo kojoj anatomske lokalizaciji, a najčešće se pojavljuje na trupu u muškaraca i donjim udovima u žena. Klinički je SSM u svojoj horizontalnoj fazi rasta smeđe crna makula nepravilnih rubova, dok je u vertikalnoj fazi rasta dijelom iznad razine kože, papilomatozne površine i na palpaciju gruba, a može biti prisutna i ulceracija.

b) nodularni melanom (NM), koji se pojavljuje u 15-30 % svih slučajeva melanoma. Pojavljuje se podjednako u oba spola, a najčešće anatomske lokalizacije su trup, glava i vrat. Klinički je NM dobro ograničen čvor sjajne površine, relativno jednoliko pigmentiran s ulceracijom ili bez nje te obično jače pigmentacije nego SSM.

c) **lentigo maligni melanom (LMM)**, koji čini 5-15 % svih tipova melanoma. Češće se dijagnosticira u žena, i to na aktinički oštećenoj koži, osobito nosu i obrazima. LM je smeđe, nejednoliko pigmentirana makula različita oblika, veličine 3-6 cm u promjeru, koja raste godinama. Horizontalna faza rasta traje i do 15 godina prije nego se nastavi vertikalna faza rasta. Pojava crne pigmentacije ili nodula unutar LM-a pokazuje napredovanje u invazivni LMM.

d) **akrolentiginozni melanom (ALM)**, koji je najrjeđi oblik i čini 2-8 % svih melanoma, iako je u ljudi crne i žute rase te Hispanaca taj tip melanoma najčešći. Najčešće se pojavljuje u muškaraca, a nastaje na neobraslim područjima kože, tj. na dlanovima i tabanima; općenito na okrajinama i subungvalno. U početnom stadiju rasta (nekoliko mjeseci ili godina) pojavljuje se kao smeđe pigmentirana makula nepravilnih rubova koja se razvija u nodularnu leziju veličine do 3 cm. Subungvalni tip razvija se iz matice (matriksa) nokta, a rjeđe iz ležišta nokta (hiponihij) ili nabora nokta (paronihij). Klinički ga obilježava longitudinalna smeđa ili crna linija na nokatnoj ploči, koja rastom dovodi do destrukcije nokatne ploče i distrofije nokta uz nastanak ulceracije i krvarenja.

Tipovi melanoma koji se u svakodnevnoj kliničkoj praksi rjeđe susreću su amelanotični, dezmoplastični, verukozni i nevoidni te melanom nepoznata primarnog sijela (10).

1.1.7 Patohistološka slika

Primarni melanomi kože nastaju ili unutar melanocitnog nevusa ili kao *de novo* proliferacija zloćudnih melanocita. Melanomi u svom razvoju prolaze kroz dvije faze rasta, radijalnu i vertikalnu. Radijalna ili horizontalna faza rasta je faza u kojoj se tumorske stanice nalaze unutar epidermisa (*melanoma in situ*) ili u epidermisu i papilarnom dermisu s tek nekoliko tumorskih stanica u papilarnom dermisu, ali bez formiranja tumorske mase (*melanoma microinvasivum*) (26).

Melanom *in situ* odnosi se na tumor koji nije prošao iz epidermisa preko bazalne membrane u sloj dermisa. Obilježavaju ga proliferacija pojedinačnih atipičnih melanocita s povećanim jezgrama koji zauzimaju više slojeve unutar epidermisa te njihovo nakupljanje u iregularna junkcionalna gnijezda. Razvoj melanoma *in situ* može se odvijati prema dva osnovna principa razvoja, lentiginoznim i pagetoidnim (26, 29).

Proliferacija melanoma *in situ* započinje umnažanjem melanocita u bazalnim slojevima epidermisa, tzv. lentiginozna proliferacija melanocita koji postupno konfluiraju. Uz arhitekturne promjene, odvija se i povećanje citološke atipije melanocita uz vidljivo povećanje, pleomorfizam i hiperkromaziju jezgara i prominentne nukleole. Citoplazma takvih melanocita obično je povećana i sadržava različito veliku količinu melanina ili su vidljive retrakcije citoplazme koje rezultiraju pojavom svijetlog prostora oko jezgre. Citološka atipija naglašenija je u tumorima koji se razvijaju na suncem oštećenoj koži i akralnoj koži, a karakterizira ju epitelioidni ili vretenasti oblik melanocita. S vremenom dolazi do nakupljanja atipičnih melanocita u iregularna, različito velika junkcionalna gnijezda koja se nepravilno izdužuju i konfluiraju. Uz to su gnijezda atipičnih melanocita nepravilno razbacana duž epidermisa i prisutna su ne samo na vrhovima epidermalnih produljaka, već i lateralno te iznad subpapilarnog dijela epidermisa. Pojedinačni atipični melanociti razvojem lezije počinju infiltraciju u više slojeve epidermisa (tzv. pagetoidno širenje) koja započinje u središnjem dijelu lezije, a s vremenom se širi kroz cijelu leziju. Razina pagetoidne ek-

stenzije također varira od nježnije suprabazalne ekstenzije u lezijama kao što je lentigo maligna pa do jasne i naglašene ekstenzije melanocita čak i u kornealni sloj epidermisa u nekim lezijama melanoma *in situ* (26).

Sljedeći stadij razvoja melanoma je mikroinvazivni melanom, koji kao i melanom *in situ* nema metastatski potencijal. Nastaje kada nakon razvoja melanoma *in situ* dođe do daljnje proliferacije melanocita i invazije papilarnog dermisa u obliku pojedinačnih tumorskih stanica, odnosno manjih gnijezda. Uz to je vidljiva gusta infiltracija limfocita u papilarnom dermisu, kao i brojni melanofagi te krvožilna proliferacija (26).

Vertikalna ili tumorogena faza rasta je faza dermalne invazije s formiranjem tumorske mase. Melanom u vertikalnoj fazi mora sadržavati ili gnijezda unutar dermisa koja su veća od najvećih gnijezda u epidermisu ili, bez obzira na veličinu gnijezda, prisutnu mitotičku aktivnost u tumorskim stanicama u dermisu (26).

Melanomi se tradicionalno na temelju histološkog izgleda čitave promjene dijele na četiri osnovna histološka podtipa: površinsko šireći, nodularni, *lentigo maligna* i akralni melanom (26).

Površinsko šireći melanom – SSM (engl. *superficial spreading melanoma*) čini 70 % svih slučajeva melanoma. Najčešće nastaje na koži povremeno izloženoj suncu ili na neizloženoj koži, i to na trupu u muškaraca ili na donjim udovima u žena. Arhitekturne promjene u epidermisu čine slabu omeđenost područja melanocita, prevladavanje pojedinih melanocita nad melanocitnim gnijezdom, nepravilna distribucija melanocita, prisutnost melanocita iznad bazalne membrane te diskohezivna gnijezda melanocita (30). Histološki, epidermis je iregularno zadebljan i stanjen, a epidermalni produljci su obično izgubljeni, odnosno zaravnjeni. Stanice intraepidermalnog melanoma su velike, s velikim citoplazmama i jezgrama te brojnim jezgricama (30). Atipični melanociti pojedinačno ili u različito velikim gnijezdima pagetoidno infiltriraju kroz epidermis, a manja gnijezda atipičnih stanica mogu dosegnuti razinu granularnog i rožnatog sloja epidermisa. Veće tumorske stanice nalaze se u nakupinama u donjim dijelovima epidermisa te u papilarnom dermisu. Razvojem vertikalne faze, tumorske stanice proliferiraju u obliku većih, iregularnih gnijezda, slabije kohezivnih stanica koje infiltriraju dermis (26). Kako nakupine stanica prodiru u dermis, gnijezda postaju manja te se na kraju mogu naći pojedinačne stanice koje kruže između nakupina kolagena (30). U dermisu koji je zadebljan tumorskom invazijom nađu se uz različito gusti infiltrat limfocita i stromalne promjene koje obuhvaćaju fibroplaziju, angiogenezu i dilataciju krvnih žila (26).

Nodularni melanom – NM ima primarno razvijenu vertikalnu fazu rasta tumora te je brzorastući tumor s rastom lezije u svega nekoliko mjeseci. Od svih melanoma 10–15 % ih otpada na nodularni histološki podtip melanoma (26). Za razliku od SSM-a, područje stanica melanoma omeđeno je ostrim rubovima jer ekstenzija intraepidermalnog sadržaja malignih stanica nije lateralna kao kod SSM-a (30). Histološki, epidermis iznad tumora je tanak ili ulceriran, vrlo rijetko zadebljan. Funkcionalna komponenta je minimalna i treba ju tražiti na rubovima lezije, a pagetoidna ekstenzija melanocita u stanjenom epidermisu obično izostaje ili je tek jedva prisutna. Dermalna komponenta karakterizirana je kohezivnim nakupinama ili manjim gnijezdima koja imaju ekspanzivni tip rasta. Tumorske stanice najčešće su epiteloidne, ali mogu biti prisutni i drugi tipovi stanica (vretenaste, velike mononuklearne ili multinuklearne, male epiteloidne nalik na nevocite). Citološki atipični melanociti imaju povećane, hiperkromatske jezgre prominentnih nukleola. Tumorske stanice imaju obilnije citoplazme, povećan omjer jezgra/citoplazma s različitom količinom melanina u citoplazmama, obično u obliku velikih granula (26).

Lentigo maligni melanom – LMM čini oko 10 % svih melanoma te je, po definiciji, melanom koji invadira dermis (26, 30). Razvija se u starijih osoba na kronično suncu izloženoj koži te se na periferiji lezije često nađu karakteristike *lentigo maligna* (*in situ* faza lentigo malignog melanoma). Smatra se da je rizik prelaska lentigo maligna u lentigo maligni melanom 5-30 %. Histološki, tumor je u početku obilježen melanocitnom proliferacijom u bazalnim slojevima epidermisa (lentiginozna proliferacija), koja s vremenom postaje kontinuirana i u obliku manjih gnijezda tumorskih stanica koje priliježu jedna uz drugu uzduž epidermo-dermalne granice te znatno premašuju broj bazalnih keratinocita. Žarišno se nađe i pagetoidno širenje atipičnih tumorskih stanica u zrnati sloj epidermisa. Epidermis je ujednačeno stanjen za razliku od SSM-a kod kojeg je nepravilno zadebljan i stanjen. Atipični melanociti na epidermalnoj granici zadržavaju vretenasti oblik i formiraju gnijezda koja zahvaćaju epidermalne adneks te otkapavaju u dermis. Citološki, tumorske su stanice pretežno izdužene, vretenasta oblika, kontrahirane citoplazme. Progresijom melanoma, tumorske stanice postaju više epiteloidne prominentnih nukleola, a mogu se naći i multinuklearne tumorske stanice. Jezgre tumorskih stanica su polimforne, hiperkromatske i povećane (26).

Akrolentiginozni melanom – ALM razvija se na rukama i nogama te u žarištu nokta, na genitalijama i mukoznim membranama. Na taj histološki podtip otpada manje od 5 % melanoma, iako se on češće pojavljuje u određenim etničkim skupinama, kao npr. u afroamerikanaca, američkih Indijanaca i Azijaca. Histološki, u početnoj se fazi nalaze veliki atipični melanociti s prominentnim dendritima u bazalnom dijelu epidermisa. U kasnijim se fazama rasta gnijezda tumorskih stanica nalaze na vrhovima dermalnih papila te prelaze u vertikalnu fazu rasta, s vretenastim stanicama koje mogu pokazivati dez-moplaziju (26). Intraepidermalne stanice ALM-a odgovaraju onima kod lentigo maligne (30). Dermalna komponenta tumora obično je građena od vretenastih tumorskih stanica, ali se žarišno nalaze i izrazito polimorfne stanice. Citološki atipični melanociti su i vretenasti i ovalni, a prominentne su i pigmentirane atipične dendritičke stanice (26).

Uz te osnovne histološke podtipove melanoma postoje i brojni drugi podtipovi koji se pojavljuju nešto rjeđe i čija morfologija može diferencijalno-dijagnostički sličiti drugim melanocitnim i nemelanocitnim lezijama te je važno poznavati njihova histološka obilježja (26).

1.1.8 Dijagnostika

Većina melanoma je pigmentirana te se nalazi na površini kože, što čini melanom jedinstvenim među malignim tumorima i omogućava detekciju u ranim razvojnim stadijima. Unatoč tome, učestalost nevusa i drugih pigmentiranih benignih lezija koje su potencijalni prekursori ili nalikuju na melanom ograničava jednostavnost izbora lezija za daljnja složenija ispitivanja (9).

Klinička dijagnostika melanoma može se promatrati na tri razine: pregled specijalista dermatologa, pregled liječnika opće medicine i samopregled od strane pacijenta. Pri pregledu se promatra pigmentacija lezije, njezina građa (rubovi, simetričnost), veličina (promjer), topografija, dinamika rasta i lokalizacija. ABCDEFG pravilo (vidi Poglavlje 1.1.6.) vrlo je korisno pri kliničkoj evaluaciji pigmentiranih lezija, ali primjena dodatnih drugih metoda važna je kako se s većom sigurnošću ne bi previdjeli rani stadiji melanoma (10).

Dermatoskopija je neinvazivna *in vivo* dijagnostička metoda u dermatologiji koja omogućuje bolju vizualizaciju kože tako da morfološke strukture i boje promjena kože, inače nevidljive golim okom, postaju vidljive. Uz pomoć optičkog instrumenta – dermatoskopa, moguće je analizirati strukture u području epidermisa, bazalne membrane i papilarnog dermisa (10). Primjena ove tehnologije pokazala se učinkovitom kod dijagnostike primarnog melanoma kože te u svrhu smanjenja broja nepotrebnih biopsija i ekscizija benignih kožnih neoplazmi (9). Metoda koja se najčešće primjenjuje u praksi je „Algoritam u dva koraka“, kojim se u prvom koraku određuje radi li se o melanocitnoj ili nemelanocitnoj promjeni. Da bi se promjena smatrala melanocitnom, mora imati neku od struktura tipičnih za melanocitne promjene (pigmentna mrežica, pigmentna globula, homogena pigmentacija, radijalni tračci i paralelni uzorak). U drugom koraku odlučuje se je li promjena dobroćudna (nevus) ili zloćudna (melanom). Postupak je u tom slučaju ili ekscizija ili digitalna dermatoskopija (10).

Zlatnim standardom dijagnostike melanoma smatra se patohistološka analiza lezije obojene hemalaun-eozinom uz znanje vrhunskog patologa te dobra klinička anamneza lezije i pacijenta. Uz klasične patohistološke parametre, često se koristi imunohistokemijsko bojanje koje omogućava jasnije razlikovanje stanica melanoma od dobroćudnih melanocitnih lezija te identifikaciju rijetkih podtipova melanoma (9). Najčešće rabljena protutijela u imunohistokemijskoj analizi melanocitnih lezija su HMB45, protein S100, melan A (MART-1), NKI-C3 i Ki67. HMB45 je protutijelo koje se najčešće rabi u imunohistokemijskoj analizi primarnih i metastatskih melanoma. To monoklonsko protutijelo veže se na glikoprotein koji se nalazi u premelanosomima te reagira s melanosomskim stanicama, junkcionalno smještenim nevusnim stanicama i fetalnim melanocitima, ali ne reagira sa zrelim melanocitima, odnosno s dermalno smještenim nevusnim stanicama. Osim u melanomima, HMB45 može biti pozitivan u rijetkim melanosomskim tumorima kao što su pigmentirani švanom, sarkom svijetlih stanica, limfangiomatoza i angiomolipom (10). Istražuju se i druge komplementarne metode koje bi mogle pomoći u diferencijalnoj patohistološkoj dijagnostici melanoma. Tako je na primjer komercijalno dostupna fluorescentna *in situ* hibridizacija – FISH (engl. *fluorescence in situ hybridization*) koja koristi četiri specifične nukleinske kiseline probe pokazala osjetljivost od 85 % i specifičnost od 95 % kod patohistološke dijagnostike benignih i malignih lezija (9).

Radiološka dijagnostika melanoma zastupljena je u analizi primarnog procesa, određivanju stupnja proširenosti bolesti (engl. *staging*), važnim kontrolnim postoperativnim pregledima radi praćenja tijeka bolesti te otkrivanju eventualnih sekundarnih infiltracija. Visokorezolutni ultrazvuk najzastupljeniji je radiološka metoda u medicinskom dijagnostičkom pregledu bolesnika s melanomom kože koji je i najčešće sijelo tog tumora. Primjena *Color Dopplera* i *Power Dopplera* u nekim slučajevima, ovisno o stupnju prokrvljenosti, može dokazati postojanje patološke vaskularizacije. Ultrazvukom se analizira i dio regije oko tumora, oko 10 cm, radi otkrivanja satelitskih (popratnih) i prijelaznih metastaza te put limfne drenaže radi procjene prisutnosti i karakteristika regionalnih limfnih čvorova (10). Ultrazvučna dijagnostika posebno je važna u praćenju bolesnika s operiranim melanomom.

Dijagnostičke analize stupnja proširenosti melanoma najčešće se provode pomoću FDG-PET (fluoro-deoksiglukoza-pozitronska emisijska tomografija) dijagnostičkih postupaka. FDG-PET/CT (FDG-PET kompjutorizirana tomografija) cijelog tijela daje mogućnost prikaza primarnog tumora i metastatskih lezija u svim tkivima, što je važno jer melanom može metastazirati u različite organske sustave: pluća, jetru, kosti, mozak, potkožno tkivo, mišiće, gastrointestinalni trakt, omentum, mezenterij i limfne čvorove različitih regija. FDG-PET se načelno ne preporučuje kao metoda za utvrđivanje dijagnoze u onkoloških bolesnika, nego se primjenjuje u bolesnika sa sumnjom na melanom koji je lokaliziran u regijama koje su teže dostupne biopsiji, radi određivanja optimalnog mjesta za biopsiju ili traženja potencijalno drugog primarnog sijela bolesti (npr. melanom očne pozadine) (10).

1.1.9 Stupnjevanje

Sustav stupnjevanja melanoma AJCC-a (engl. *American Joint Committee on Cancer*) je opće prihvaćen, a temelji se na obilježjima primarnog tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i utvrđivanju udaljenih metastaza (M) (Tablica 1.-3.). Prilikom revizije klasifikacije 2010. i 2018. godine, uvrštena je stopa mitozu umjesto stupnja invazije tumora prema Clarku prilikom određivanja T1 kategorije. Prisutnost jedne ili više mitozu/mm² u melanomu debljine do 1 mm smatra se lošim prognostičkim čimbenikom te se takvi tumori svrstavaju u skupinu T1b. Klinička klasifikacija uzima u obzir podatke utvrđene fizičkim pregledom, patohistološki nalaz primarnog tumora te rezultate slikovnih pretraga. Određivanje metastaza u limfnim čvorovima, prema AJCC-u, vrši se imunohistokemijskom metodom.

Tablica 1. T klasifikacija određivanja stadija bolesti melanoma.

T klasifikacija		
TX	ne može se odrediti primarno sjelo	
T0	nema dokaza za primarni tumor	
Tis	<i>in situ</i> melanom	
T1	a	debljina ≤ 1,0 mm, bez ulceracije, stopa mitozu < 1/mm ²
	b	debljina ≤ 1,0 mm, ulcerirani tumor i/ili stopa mitozu ≥ 1/mm ²
T2	a	debljina 1,01-2,0 mm, bez ulceracije
	b	debljina 1,01-2,0 mm, ulcerirani tumor
T3	a	debljina 2,01-4,0 mm, bez ulceracije
	b	debljina 2,01-4,0 mm, ulcerirani tumor
T4	a	debljina > 4,0 mm, bez ulceracije
	b	debljina > 4,0 mm, ulcerirani tumor

Tablica 2. N kategorija klasifikacije određivanja stadija bolesti melanoma.

N klasifikacija		
NX	ne mogu se odrediti regionalni limfni čvorovi	
N0	nema širenja u regionalne limfne čvorove	
N1	a	mikrometastazama zahvaćen 1 regionalni limfni čvor
	b	makrometastazama zahvaćen 1 regionalni limfni čvor
N2	a	mikrometastazama zahvaćena 2 ili 3 regionalna limfna čvora
	b	makrometastazama zahvaćena 2 ili 3 regionalna limfna čvora
	c	satelitske ili <i>in transit</i> metastaze bez zahvaćanja limfnih čvorova
N3	metastaze u 4 ili više limfnih čvorova ili zahvaćanje paketa limfnih čvorova ili satelitske/ <i>in transit</i> metastaze sa zahvaćanjem limfnih čvorova	

Tablica 3. M kategorija klasifikacije određivanja stadija bolesti melanoma.

M klasifikacija		
M0	nema udaljenih metastaza	
M1	a	udaljene metastaze kože, potkožnog tkiva ili limfnih čvorova; uredni LDH
	b	plućne metastaze; uredni LDH
	c	ostale visceralne metastaze ili bilo koja udaljena metastaza uz povišen LDH

Tablica 4. Klinička i patološka klasifikacija melanoma.

Klinička klasifikacija				Patološka klasifikacija			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3b	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	bilo koji T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					bilo koji T	N3	M0
IV	bilo koji T	bilo koji N	M1	IV	bilo koji T	bilo koji N	M1

Nakon utvrđivanja T, N i M kategorija određuje se stadij bolesti (I-IV) koje nam govori o prognozi i predviđenom preživljenju bolesnika. Stadij I i II označuju lokaliziranu bolest, stadij III proširenost na regionalne limfne čvorove, a stadij IV postojanje udaljenih metastaza (Tablica 4.).

U slučaju nepoznata primarnog sijela i metastaza otkrivenih u limfnom čvoru, koži ili potkožnom tkivu pretpostavka je da su regionalne te se svrstavaju u III. stadij. Ostale metastaze (metastaze u visceralne organe) bez poznata primarnog sijela svrstavaju se u IV. stadij i kategoriziraju prema M klasifikaciji, tj. ovisno o lokalizaciji i serumskom LDH-u (10).

1.1.10 Prognostički čimbenici

Kao prognostički čimbenici melanoma prepoznati su različiti klinički, patohistološki i molekularni čimbenici (10).

U kliničke čimbenike za melanom pripadaju dob, spol i anatomska lokalizacija tumora. Prosječna životna dob u kojoj se dijagnosticira melanom opala je u posljednjih nekoliko desetljeća pa se u tom periodu sve češće melanom dijagnosticira u mlađih osoba u dobi od 25-40 godina. Melanom je najčešći zloćudni tumor u žena bijele rase u dobi od 25 do 29 godina. Pokazano je da mlađi bolesnici s melanomom dulje preživljavaju nego bolesnici starije dobne skupine (više od 60 godina), što je naglašenije u muškaraca nego u žena (10). Zabilježena je podjednaka učestalost pojavljivanja melanoma u muškaraca i žena, viša incidencija melanoma u muškaraca iznad 45. godine te bolja stopa preživljenja u žena nego u muškaraca s melanomom (10). Smatra se da je bolja prognoza u žena rezultat činjenice da one više pozornosti poklanjaju svom izgledu i ranije zapažaju promjene na koži te se stoga kod žena melanom dijagnosticira u ranijem stadiju, dok je relativno tanak. Melanom se može razviti na bilo kojem dijelu tijela, ali je primijećeno da kod muškaraca najčešće nastaje na trupu, a kod žena na nogama. Smatra se da je razlog tome vjerojatno u stilu života, kulturi, odijevanju i običajima. Proučavanjem anatomske lokalizacije kao prognostičkog čimbenika, pokazano je da melanomi smješteni na udovima imaju bolju prognozu od onih smještenih u području glave, vrata i trupa (10).

Kod melanoma koji nisu dijagnosticirani na koži, pokazano je da najbolje preživljenje imaju bolesnici s melanomom oka, lošiju prognozu bolesnici s melanomom sluznice, a najlošiju bolesnici s melanomom anorektalne sluznice (10).

Patohistološki prognostički čimbenici melanoma su: debljina tumora, histološki tip tumora, prisutnost ulceracije, prisutnost regresije, broj mitozâ/mm² (stopa mitozâ), prisutnost i količina tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL), limfo-kapilarna invazija te mikroskopski sateliti (10).

Clark je 1967. uveo prvi prognostički model za melanom kože, koji procjenjuje dubinu invazije melanoma u pet razina ovisno o infiltraciji tumorskih stanica u pojedine anatomske slojeve kože. Clarkova klasifikacija određena je prema stupnjevima:

Clark I – tumor je ograničen na epidermis; *melanoma in situ*

Clark II – tumorske su stanice probile bazalnu membranu i infiltriraju dio papilarnog dermisa, ali ga ne ispunjavaju u cijelosti

Clark III – tumorske su stanice u cijelosti ispunile papilarni sloj dermisa, ali ih se ne nalazi u retikularnom dermisu

Clark IV – tumorske stanice infiltriraju retikularni dermis

Clark V – tumorske stanice ispunjavaju dermis i infiltriraju potkožno tkivo.

Brojne multicentrične studije provedene do danas pokazale su da Clarkova klasifikacija nije pokazala statističku značajnost kao prognostički čimbenik. Anatomske razine prema Clarku bile su nužne za super klasifikaciju pT1 lezija u 6. izdanju TNM klasifikacije *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

Anatomske razine su u 7. izdanju AJCC klasifikacije zamijenjene brojem mitozu u subklasifikaciji pT1 lezija (T1a ili T1b), ali se u tekstu i komentaru tablica Clark IV ili V označuje kao tercijarni kriterij za određivanje T1b stadija lezija bez ulceracije i „u kojima se ne može odrediti broj mitozu“ (26).

Određivanje debljine tumora prema Breslowu smatra se trenutno najboljim prognostičkim čimbenikom kod oboljelih od melanoma kože (26). Breslow je 1970. mjerenje debljine tumora mjerio okularnim mikrometrom i uveo pet stadija. Maksimalna debljina tumora mjeri se kalibriranim okularnim mikrometrom pod pravim kutom u odnosu na okolnu kožu. Debljina se mjeri od vrha granularnog sloja epidermisa kože ili, ako je lezija ulcerirana, od baze ulkusa do najdublje točke tumorske invazije. Danas je u upotrebi modificirana Breslowljeva klasifikacija od I do IV (u odnosu na nekadašnju od I do V):

Breslow I – debljina manja ili jednaka 0,75 mm

Breslow II – debljina 0,76 – 1,5 mm

Breslow III – debljina 1,51 – 4 mm

Breslow IV – debljina veća od 4 mm.

Broj mitozu (stopa mitozu, engl. *mitotic rate*) kao prognostički čimbenik kod melanoma kože navodi se kao broj mitozu na kvadratni mm vertikalne faze rasta tumora (u literaturi kao mitotički indeks ili kao stopa mitozu). Preporučuje se da se mitoze broje u tzv. *hot spotu*, a ukoliko se ne može pronaći *hot spot* i mitoze su nepravilno razbacane po cijeloj leziji, treba nasumce izabrati nekoliko područja, prebrojiti mitoze i prosječan broj označiti kao broj mitozu (26). Istraživanja su pokazala lošiju prognozu kada je u primarnom melanomu nađena jedna ili više mitozu na mm².

Ulceracija je dominantan prognostički čimbenik u melanoma kože koji se treba potvrditi na mikroskopskoj razini. Ulceracija melanoma definira se kao kombinacija sljedećih obilježja: manjak epidermisa u punoj debljini (uključuje manjak rožnatog sloja i bazalne membrane), postojanje reaktivnih promjena (tj. depoziti fibrina, neutrofilii) istanjenje, brisanje ili reaktivna hiperplazija okolnog epidermisa u odsutnosti traume ili nedavnih kirurških zahvata. Preživljenje bolesnika s melanomom stadija I i II u 10 godina je 50 % kod ulceriranih tumora, odnosno 78% kod neulceriranih tumora (26).

Prisutnost limfocitnog infiltrata unutar tumora koji je između i u kontaktu s pojedinačnim tumorskim stanicama vertikalne faze rasta (TIL, *tumor infiltrating lymphocytes*) je povoljan prognostički čimbenik melanoma kože (26). Kategorizacija tumor-infiltrirajućih limfocita uključuje semikvantifikaciju:

TIL-ovi se ne mogu identificirati: nema limfocita ili su prisutni, ali ne infiltriraju tumor.

TIL-ovi su rijetki: limfociti infiltriraju tumor samo žarišno, ali ne uzduž cijele baze vertikalne faze rasta.

TIL-ovi gusti: limfociti difuzno infiltriraju cijelu bazu vertikalne faze ili cijelu invazivnu komponentu melanoma (26).

Regresija tumorskih stanica je djelomični ili potpuni spontani nestanak primarnog tumora, a posljedica je interakcije imunološkog sustava domaćina sa zloćudnim stanicama tumora. Smatra se da je prisutna u oko 13 % svih melanoma (10). Spontana regresija najčešće se uočava u radijalnoj fazi rasta melanoma, a može biti fokalna, parcijalna ili rijetko kompletna. Smatra se da regresija tumorskih stanica u radijalnoj fazi omogućuje bijeg i razvoj vertikalne faze koja izbjegne obrambeni imunološki mehanizam

organizma (26). Najnovija meta-analiza koja je uključila 14 studija i 10 098 bolesnika s melanomom, upućuje da je kod melanoma s regresijom znatno manji rizik od razvoja mikrometastaza u regionalnim limfnim čvorovima u odnosu na melanome bez regresije, za razliku od prijašnjeg vjerovanja da je pojava regresije melanoma loš prognostički čimbenik (10).

Satelitoze i *in-transit* metastaze su neovisni, nepovoljni prognostički čimbenici koji povećavaju rizik za lokalni recidiv tumora i u slučajevima široke ekscizije. Satelitske lezije su žarišta tumorskih stanica smještene u dermisu ili subkutisu diskontinuirano od glavne tumorske mase na udaljenosti od 2 cm, a veći su od 0,05 mm u promjeru. *In-transit* metastaza definira se kao tumor u koži ili potkožju udaljen više od 2 cm od primarnog tumora, ali unutar područja drenaže najbližih regionalnih limfnih čvorova (26, 10).

1.1.11 Liječenje

Prvi i najvažniji terapijski izbor u liječenju melanoma je kirurška ekscizija u cijelosti, uz patohistološku analizu. Kao kod primarnog i lokaliziranog oblika melanoma, kirurško liječenje važno je i kod proširene bolesti radi potpunog uklanjanja ili smanjenja tumorske mase u limfnim čvorovima i/ili unutarnjim organima kako bi ostali onkološki terapijski izbori imali bolji učinak.

Primarna dijagnostička ekscizijska biopsija u cijelosti sa zdravim rubom kože i potkožja oko suspektne promjene provodi se s uskim slobodnim rubovima od nekoliko milimetara. Brojna istraživanja melanoma za melanome *in situ* preporučuju eksciziju s rubom zdrave kože i potkožja 0,5 do 1 cm uz patohistološku analizu.

Melanom, ovisno o debljini primarnog tumora, može rano metastazirati u regionalne limfne čvorove, zbog čega se u prošlosti radio opsežan kirurški zahvat kojim su se preventivno uklanjali regionalni limfni čvorovi. Unaprijeđenjem tehnike i metodologije, identificiran je limfni čvor stražar (engl. *sentinel lymph node*, *SNL*), odnosno limfni čvor u koji se drenira limfni vod koji polazi direktno iz tumora. Studije su utvrdile da je SLN najvjerojatnije prvo mjesto metastaze te ako je SLN histološki negativan, vrlo je mala vjerojatnost da ostali limfni čvorovi u toj regiji sadržavaju metastatsku bolest (10). Uloga biopsije limfnih čvorova stražara (SLNB) jest omogućiti detaljan histopatološki pregled usmjeren na samo nekoliko odabranih limfnih čvorova, smanjiti opseg operacije i postoperativnog morbiditeta te, na temelju histopatološkog nalaza SLN-a, predvidjeti prognozu, poboljšati planiranje terapije i stopu preživljenja. Nakon što se lokalizacija SLN-a obilježi markerom, slijedi kirurški postupak. Intraoperativno se gama-sondom prelazi preko regije gdje se nalazi SLN te se označi na koži iznad koje sonda daje najjači signal. Učini se ekscizija čvora te se još jednom utvrdi da se radi o vrućem čvoru, prelazeći gama-sondom preko ekscidiranog materijala. Svi ekscidirani čvorovi šalju se na patohistološki pregled kojim se utvrđuje je li došlo do invazije stanica melanoma u limfne čvorove. Ako u SLN-u nema tumorskog tkiva, nije potrebna daljnja disekcija, a ako je limfni čvor zahvaćen tumorom, potrebno je učiniti terapijsku disekciju svih preostalih limfnih čvorova u regiji (10).

Poznato je da se u trećine bolesnika s melanomom razvijaju udaljene metastaze. U 86 % bolesnika metastaze su lokalizirane u jednom organu i to najčešće u koži, limfnim čvorovima, plućima, mozgu, jetri i gastrointestinalnom traktu. Kirurška terapija metastatske bolesti može biti palijativna (češće) ili kurativna (rjeđe). Kirurško liječenje melanoma s udaljenim metastazama opterećeno je vrlo lošom prognozom i s petogodišnjim preživljenjem manjim od 2,3 % (10). Kurativni pokušaji u liječenju metastatskog melanoma moraju biti pažljivo planirani, a moraju se uzeti u obzir i svi negativni aspekti takva liječenja. Parametri koje treba uzeti u obzir pri planiranju kurativnog kirurškog liječenja metastatskog melanoma su mogućnost potpunog uklanjanja, lokalizacija metastaza, solitarne ili multiple metastaze, interval nastanka metastaza nakon uklanjanja primarnog melanoma.

Najpovoljniji rezultati kirurškog liječenja bilježe se nakon liječenja metastaza u koži i potkožju, s mogućim petogodišnjim preživljenjem 20-30 %, dok su najlošiji rezultati u liječenju metastaza u mozgu, jetri i nadbubrežnoj žlijezdi (10).

Radioterapija (RT) kao oblik lokaliziranog onkološkog liječenja koji utječe na smanjenje vitaliteta tumorskih stanica može biti korisna terapijska opcija u pojedinim slučajevima bolesnika s melanomom. Neke od važnih uloga radioterapije u liječenju melanoma su: kao adjuvantna terapija nakon kompletne resekcije primarne lezije ili metastatskih regionalnih limfnih čvorova, kao elektivna terapija regionalnih čvorova koji nisu operirani, a pod visokim su rizikom od subkliničke bolesti, kao palijativna terapija udaljenih metastatskih sijela ili lokalnih/lokoregionalnih recidiva, te rijetko, kao definitivna terapija primarnog sijela. Rezultati *in vitro* studija na kulturama stanica pokazali su visoku intrinzičnu sposobnost stanica melanoma za stanični oporavak od subletalnih oštećenja DNK uzrokovanih ionizirajućim zračenjem. Međutim, pretkliničke i kliničke studije pokazale su da melanom može biti osjetljiv na radioterapiju, osobito kad se primjenjuju više doze po frakciji od standardnih (10).

RT se može primijeniti i kao adjuvantna terapija (terapija za uklanjanje eventualno prisutne nedetektibilne mikroskopske ostatne bolesti nakon radikalne operacije sijela bolesti) nakon operacije kod primarnih melanoma povezanih s visokom stopom lokalnih recidiva unatoč adekvatnoj eksciziji, te osobito u slučaju postojanja pozitivnih margina nakon operacije, uz nemogućnost reekscizije (10).

Kemoterapija se primjenjuje kod bolesnika s uznapredovanim stadijem melanoma s ciljem smanjenja simptoma i produljenja života pacijenata.

U monoterapiji metastatskog melanoma najčešće se primjenjuje citostatik dakarbazin (5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-karboksamid [DTIC]), koji spada u skupinu alkilirajućih agensa. Princip djelovanja zasniva se na metilaciji DNK, pri čemu nastaje O6-metildeoksigvanozin (O6-MDG). Ukupna stopa odgovora na dakarbazin je u rasponu od 10-20 %, a u manje od 5 % bolesnika dolazi i do kompletne remisije. Češći je odgovor na terapiju u bolesnika s metastazama u koži, potkožnom tkivu i/ili limfnim čvorovima, u odnosu na ostale bolesnike (10).

Termozolid (4-metil-5-okso-2,3,4,6,8-pentazabiciklo(4.3.0)nona-2,7,9-trien-9-karboksamid) je oralni alkilirajući agens mehanizma sličnog dakarbazinu, s time da mu je za djelovanje potrebna konverzija u aktivni DNK-metilirajući agens MTIC. Zbog male molekularne mase (194 Da), termozolid prolazi kroz krvno-moždanu barijeru te je stoga pogodan za liječenje primarnih tumora središnjeg živčanog sustava, kao i metastaza u navedenom području, osobito onih nastalih širenjem melanoma (10).

Derivati nitrozureje, karmustin (BCNU), lomustin (CCNU) i fotemustin, alkilirajući su agensi čije se citotoksično djelovanje temelji na inhibiranju DNK polimeraze, enzima koji popravljala lomove lanaca DNK. Stope odgovora karmustina i lomustina slične su onima kod dakarbazina te su u rasponu od 10 do 20 %. Najviše stope odgovora primijećene su u bolesnika s kožnim, potkožnim, nodalnim i plućnim presadnicama (10).

Paklitaksel i docetaksel, antimitotički agensi koji spadaju u skupinu taksana, citostatični su agensi čija se aktivnost temelji na poticanju nakupljanja tubulina u mikrotubulima te inhibiciji depolimerizacije tubulina, čime zaustavljaju mitozu u proliferirajućim stanicama (10).

S ciljem poboljšanja rezultata liječenja metastatskog melanoma, kliničari su razvili polikemoterapijske protokole liječenja. Najčešće primjenjivani polikemoterapijski protokoli su Dartmouth (CBDT) i CVD. Usporedbom protokola CVD i dakarbazina nisu nađene statistički značajne razlike. Jedno kliničko istraživanje pokazalo je da dodavanje citokina (interleukin 2 i interferon gama) kemoterapiji (imunobiokemoterapija) omogućuje statistički značajno poboljšanje u stopi odgovora u odnosu na bolesnike liječene samo kemoterapijom, ali uz više nuspojava (10).

Uz nove ciljane lijekove koji su ušli u redovnu kliničku praksu, poput BRAF-inhibitora, MEK-inhibitora i njihove kombinacije te imunoterapije (anti CLA4 protutijela, anti PD-1 protutijela), uloga kemoterapije u bolesnika s metastatskim melanomom značajno se smanjila (10).

Istraživanja mutacija u zloćudnim tumorima utvrdila su da u visokom postotku melanoma postoje mutacije u MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) staničnom signalnom putu koji je odgovoran za regulaciju rasta i proliferaciju tumorskih stanica. Te mutacije dovode do neregulirane aktivacije MAPK kinaznog signalnog puta, što dovodi do prekomjerne stanične proliferacije, aktivacije angiogeneze i sprječavanja apoptoze. BRAF i MEK inhibitori su lijekovi koji se selektivno vežu upravo na te mutirane kinaze i tako blokiraju proliferaciju stanica melanoma. Bolesnici kod kojih je potvrđena BRAF mutacija nakon podvrgavanja liječenju BRAF inhibitorima (vemurafenib, dabrafenib) postižu znatno produljenje razdoblja do pojave bolesti u odnosu na kemoterapiju te duže preživljenje (10). Unatoč brzoj i učinkovitoj kliničkoj odgovoru na terapiju BRAF inhibitorima, u oko 50-60 % bolesnika već nakon 6-7 mjeseci terapije dolazi do progresije bolesti zbog razvoja rezistencije na lijek (10). Tetrametinib je prvi MEK inhibitor odobren za liječenje bolesnika s metastatskim BRAF mutiranim melanomom. MEK inhibitori djeluju na istom signalnom putu kao i BRAF inhibitori. Istraživanja pokazuju da se primjenom kombinacije MEK i BRAF inhibitora postiže bolji terapijski učinak u odnosu na primjenu samo BRAF inhibitora (10).

Imunoterapija pruža mogućnosti djelovanja na mehanizme koje zloćudni tumori iskorištavaju za izbjegavanje uništenja od strane imunološkog sustava. Osnovni princip djelovanja imunoterapije je iskorištavanje vlastitog imunološkog sustava u borbi protiv melanoma poticanjem protutumorskog imunološkog odgovora. Prva učinkovita imunoterapija bila je primjena ipilimumaba. Ipilimumab je protutijelo koje djeluje protiv antigena 4 citotoksičnih limfocita T, CTLA-4, te na taj način potiče kontinuiranu aktivaciju limfocita i uništavanje tumorskih stanica. Kasnije su se pojavila anti-PD-1 protutijela (nivolumab i pembrolizumab) veće učinkovitosti i manje toksičnosti (10,31).

Imunoterapija zloćudnih tumora, pa tako i uznapredovanih ili metastatskih melanoma, postaje temelj sustavnog onkološkog liječenja, omogućujući dugotrajne odgovore na terapiju, produljenje preživljenja te potencijalne dugotrajne remisije bolesti koje ponekad traju godinama te su, po nekima, najbliže izlječenju (10).

1.2 Displastični nevusi i melanom

Displastični nevusi su neoplazme benignih i malignih histopatoloških karakteristika te otežavaju mogućnost jasne dijagnoze. Klinički, displastični nevus definira se kao smeđa nakupina promjera od najmanje 5 mm, varijabilne pigmentacije, asimetrične građe i/ili nepravilnih ili nejasnih rubova. Američki nacionalni institut zdravlja (engl. *US National Institute of Health* (NIH)) definirao je displastični nevus kao leziju s arhitekturnim poremećajima, kao što su premošćivanje melanocitnih gnijezda između epidermalnih produljaka, subepidermalne fibroplazije, dermalne limfocitne infiltracije i lentigne melanocitne hiperplazije s vretenastim ili epitelioidnim melanocitnim stanicama nakupljenim u gnijezda varijabilne veličine (10). Nalaze se na svim dijelovima tijela, ali ipak nešto češće u području glave, vrata i prsnog koša. Razvijaju se u adolescenciji, ali se za razliku od običnih nevusa nastavljaju razvijati i u četvrtom desetljeću života (10).

Nedavna genetička istraživanja pokazala su da nevusi karakterizirani kao benigne lezije imaju samo jednu mutaciju koja sudjeluje u stvaranju melanoma, BRAF V600E mutaciju, dok tzv. intermedijarne lezije, odnosno displastični nevusi imaju brojne mutacije koje dovode do nastanka melanoma. Neke od tih mutacija aktiviraju MAPK signalni put. Dodatne mutacije su mutacije u *TERT* promotoru i hemizi-

gotne promjene gena *CDKN2A*. Displastični nevusi imaju ukupno veći broj mutacija nego benigne lezije, ali manji broj nego maligne lezije te zbog toga upućuju na činjenicu da bi se displastične nevuse trebalo svrstavati u intermedijarnu kategoriju nevusa (10).

Sindrom displastičnog nevusa najčešće se pojavljuje kod osoba s genetskom predispozicijom za razvoj melanoma, a karakteriziraju ga brojni displastični nevusi povezani s rizikom nasljednog melanoma. Razvijaju se *de novo*, a ne iz postojećeg nevusa na koži. Displastični nevusi pojavljuju se i sporadično, u malim skupinama ili putem samo jednog displastičnog nevusa na tijelu pacijenta. Sekvenciranjem je utvrđen evolucijski tijek razvoja displastičnog nevusa, kojim je pokazano da nastaju preko više valova klonalne ekspanzije. Jedno od glavnih histopatoloških obilježja displastičnog nevusa je kronični limfocitni infiltrat u fibrozni papilarni dermis, što upućuje na kroničnu interakciju između neoplastičnih stanica displastičnog nevusa i imunološkog sustava (10).

Unatoč navedenim morfološkim i biološkim sličnostima displastičnog nevusa i melanoma, rizik od razvoja melanoma iz displastičnog nevusa vrlo je nizak. Displastični nevus može ostati stabilan desecima godina. Uklanjanje svih nevusa s tijela ne može ukloniti rizik za razvoj melanoma te bi se s vremenom pojavili novi nevusi i, eventualno, *de novo* melanom (32).

Postoje jasni dokazi da su osobe s brojnim displastičnim nevusima izložene povećanom riziku za razvijanje melanoma tijekom života. Nekonzistentna upotreba i različita značenja pojma displastični nevus stvorile su značajnu i nerazriješenu kontroverzu i konfuziju oko odgovarajućeg tretmana (32). Koreliranje genetičkog statusa s histopatološkim i kliničkim karakteristikama displastičnog nevusa moglo bi pomoći rasvijetliti definiciju kategorije displastičnog nevusa (29).

1.3 *Lentigo maligna* i *lentigo maligni melanom*

Lentigo maligna (LM) jedan je od oblika melanoma *in situ*. Predstavlja prekursorsku leziju lentigo malignog melanoma (LMM), kojemu treba do nekoliko desetaka godina da se razvije iz LM. *Lentigo maligna* je nejednoliko smeđe pigmentirana makula različita oblika, veličine 3–6 cm u promjeru, koja raste godinama (21). Najčešće se pojavljuje kod starijih osoba na dijelovima tijela koji su najviše izloženi suncu, na glavi i vratu, te najčešće nije vezan za prekursorski melanocitni nevus. Karakterističnu pojavu čine konfluentni melanociti duž epidermalno-dermalne granice koji se često pružaju unutar epitela. Stanice su najčešće hiperkromatske i male. Jezgrin kromatin je gust, a jezgrice neprimjetne (30). Veliki melanociti raspoređeni su kao individualne jedinice ili u malim nakupinama u bazalnom sloju epidermisa, za razliku od pagetoidnih koje su skupljene u gnijezda (29). Horizontalna (lentiginozna) faza rasta može trajati i do 15 godina tijekom kojih se melanom može proširiti i do nekoliko kvadratnih centimetara, prije nego se nastavi vertikalna faza rasta invazivnog tumora. Pojava crne pigmentacije ili nodula unutar LM-a pokazuje napredovanje u invazivni LMM (10).

Lentigo maligni melanom (LMM) čini 4–15 % svih invazivnih tipova melanoma. Po definiciji, to je melanom koji zahvaća dermis. Atipični melanociti prisutni su samostalno i u nakupinama u obliku gnijezda u dermisu. Stanice su hiperkromatske i atipične te im nedostaje vezikularna jezgra i eozinofilne jezgrice koje se mogu vidjeti kod drugih tipova melanoma. Ako su prisutna, melanocitna gnijezda međusobno su razdvojena i vise s atrofičnog epidermisa prodirući u dermis. Stanice gnijezda su pleomorfne, a neke i vrlo male (30).

1.4 Gen i protein BRAF

BRAF (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) je član obitelji RAF proteinskih kinaza koje imaju tri člana: ARAF, BRAF i CRAF. Homolozi sva tri odgovarajuća gena nađeni su kod svih kralježnjaka. Produkti *RAF* gena sudjeluju u MAPK signalnom putu, koji povezuje izvanstanične signale s transkripcijskom regulacijom. Dio je RAS/RAF/MEK/ERK signalne kaskade koji preko niza koraka osigurava mehanizam za amplifikaciju signala, ali i platformu za modulaciju signala preko drugih faktora (33).

1.4.1 Građa i funkcija

Protein BRAF, kao i druga dva člana obitelji RAF, ima tri konzervirane regije u svojoj proteinskoj strukturi: CR1, CR2 i CR3. CR1 i CR2 su regulatorne domene, a CR3 je kinazna domena. CR1 građena je od RAS-vezne domene i domene bogate cisteinima, koje mogu vezati dva iona cinka. CR1 sadrži RAS-veznu domenu na koju se on veže i prenosi do plazmatske membrane. CR2 je domena bogata serinima i treoninima. Sadrži mjesto koje se, kad je fosforilirano, može vezati na regulatorni protein. Vezanje tog proteina je inhibitorno. CR3 je protein kinazna domena koja se nalazi pored C-kraja. Sadrži regije važne za aktivaciju RAF proteina. Fosforilacija dva ključna aminokiselinska ostatka T⁵⁹⁹ i S⁶⁰² ključna je za aktivaciju BRAF proteina. Prije kinazne domene nalazi se SSYY motiv koji se također fosforilira. Kod BRAF proteina, S⁴⁴⁶ je konstitutivno fosforilirano, a umjesto tirozina ima ostatke aspartata (D⁴⁴⁸D⁴⁴⁹), za razliku od druga dva RAF proteina kod kojih se serinski i tirozinski aminokiselinski ostatak moraju fosforilirati da bi proteini bili aktivni. Iz tog razloga aktivacija BRAF-a zahtijeva manje fosforilacijskih koraka (33, 34).

Protein kinazna domena proteina BRAF sastoji se od N-terminalnog i C-terminalnog ogranka. N-terminalni ogranak manji je i građen je od β -ploča, a C-terminalni ogranak, veći, od α -zavojnica. Katalitički aktivno mjesto nalazi se u pukotini između većeg i manjeg ogranka. Ogranci se pomiču tako da otvaraju i zatvaraju pukotinu aktivnog mjesta. Otvorena pukotina omogućava vezanje ATP-a u aktivno mjesto i otpuštanje ADP-a. Zatvaranjem pukotine katalitički aktivni ogranci aminokiselina dolaze u područje aktivnog mjesta (33).

1.4.2 Mutacije gena BRAF i rak

Prije 30-ak godina *RAF* je identificiran kao onkogen te kao takav određen za jedan od ključnih faktora proliferacije stanica raka. BRAF je jedini RAF protein koji je učestalo mutiran u stanicama raka. Razlog je vjerojatno u strukturi aktivnog mjesta koje zahtijeva manji broj mutacija kako bi bio konstitutivno aktivan. Godine 2002. otkriveno je da je BRAF mutiran u mnogim karcinomima te da se većina mutacija događa na jednom kodonu koji se nalazi u aktivnom mjestu proteina, kodonu 600, na kojem se događa zamjena valina za glutamat (35).

Mutacije *BRAF* gena identificirane su kod 66 % melanoma i, u manjem postotku, kod drugih tumora kao što su karcinomi štitnjače, debelog crijeva, jajnika, pluća i želudca te kod nekih sarkoma. Najčešća mutacija *BRAF* gena je transverzija T > A na poziciji 1799, koja rezultira supstitucijom valina za glutamat na poziciji 600 proteina BRAF. Mutirana aminokiselina nalazi se između T⁵⁹⁹ i S⁶⁰², čija je fosforilacija nužna za aktivnost BRAF proteina. Smatra se da mutacija V600E oponaša T⁵⁹⁹/S⁶⁰² fosforilaciju te na taj

način čini BRAF konstitutivno aktivnim. Ova sumnja potvrđena je otkrićem da V600E mutirani BRAF (BRAF^{V600E}) ima povećanu kinaznu aktivnost u odnosu na protein divljeg tipa te da ima transformacijski kapacitet (35). Na taj se način kinazna aktivnost BRAF proteina znatno povećava te pojačava proliferaciju stanica raka. BRAF^{V600E} neosjetljiv je na negativnu povratnu spregu za inhibiciju MEK/ERK signalnog puta. Stanične linije koje eksprimiraju BRAF^{V600E} ovise o njegovoj aktivnosti za proliferaciju i preživljenje te ne trebaju RAS za proliferaciju (34, 36).

Osim kod melanoma, mutacije BRAF gena predstavljaju jednu od najčešćih onkogenih lezija kod karcinoma štitnjače. Kao i kod melanoma, BRAF i RAS mutacije te RET/PTC preslagivanja međusobno su isključivi, vjerojatno jer svi utječu na aktivaciju MEK/ERK signalnog puta. BRAF je glavni RAS efektor, a ukoliko je RAS mutiran, BRAF mu više nije potreban za aktivaciju. BRAF^{V600E} mutacija najčešća je kod papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitnjače, a najčešće nije prisutna kod folikularnih tiroidnih karcinoma i folikularnih adenoma koji najčešće imaju RAS mutacije. Preslagivanje kromosoma 7q koji nosi BRAF i AKAP9 gene nađeno je kod djece izložene zračenju nakon nesreće u Černobilu, koja boluju od tumora štitnjače (34).

Proliferativna aktivnost staničnih linija melanoma *in vivo* uvelike je ovisna o BRAF^{V600E}. Istraživanja su pokazala da utišavanje BRAF^{V600E} u stanicama uspostavljenog tumora onemogućava njegovo daljnje napredovanje. U nekim staničnim linijama utišavanje BRAF^{V600E} rezultira kompletnom regresijom tumora. Taj učinak uzrokovan je gubitkom proliferacije, povećanom apoptozom i infiltracijom makrofaga (34).

1.4.3 Mutacije gena BRAF i melanom

BRAF mutacije češće su kod melanoma na trupu, u bolesnika kod kojih se melanom javio u mlađoj dobi i u slučajevima kada melanom nije praćen kroničnim oštećenjem okolne kože od sunca. Od histoloških tipova, površinsko šireći melanom ima najveću učestalost BRAF mutacija, dok su BRAF mutacije rijetke kod akralnog melanoma, melanoma sluznice i lentigo maligna melanoma. BRAF mutacije povezane su s lošijom prognozom u bolesnika koji nisu liječeni BRAF inhibitorima. U velikoj većini slučajeva kod melanoma se BRAF mutacije ne preklapaju s drugim onkogenim mutacijama kao što su NRAS ili KIT mutacije.

Ispitivanja utjecaja BRAF^{V600E} mutacije na stanice melanoma pokazala su da ona potiče proliferaciju i osigurava preživljenje stanica melanoma, ali se njezina onkogeni aktivnost ispoljava isključivo u prisutnosti drugih faktora. Jedan takav faktor je mikroftalmijski transkripcijski faktor (MITF) koji je jedan od ključnih faktora za život melanocita. Odgovoran je za preživljenje, održavanje, diferencijaciju i pigmentaciju melanocita. S obzirom da je uključen u staničnu diferencijaciju, ali i preživljenje, MITF može djelovati kao onkogen i tumor supresorski gen. Konstitutivna aktivacija MEK/ERK signalnog puta uslijed BRAF^{V600E} mutacije uzrokuje smanjenje koncentracije MITF-a. Nedostatak ekspresije MITF u humanim melanocitima uzrokuje negativnu regulaciju p16 i p21, kao i hiperfosforilaciju pRB-a. Ukoliko je MITF prekomjerno eksprimiran u kombinaciji s mutacijom BRAF^{V600E}, stanice melanocita eksprimiraju faktore koji ih odvođe u onkogeni transformaciju, hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DN}. U skladu s protoonkogenom ulogom MITF proteina, kod stanica melanoma primijećena je pojačana ekspresija MITF gena, najčešće u kombinaciji s mutantnim BRAF-om i inaktiviranim p16 signalnim putem (33).

1.4.4 Mutacije gena BRAF i nevusi

Osim kod stanica raka, istraživanja su pokazala povećanu frekvenciju *BRAF*^{V600E} mutacija kod nevusa. Nevusi su građeni od melanocita u mirovanju i benigni su, što znači da ne pokazuju ili pokazuju vrlo malo potencijala za prodor u okolno tkivo te manjak metastatskog potencijala. Inicijalni rast benignog tumora prati stabilizacija veličine i gubitak svih proliferacijskih aktivnosti. Benigni tumori mogu dijeliti onkogene mutacije sa svojim malignim dvojnicima pa se stoga neki od njih smatraju za prekursorske lezije s potencijalom napredovanja u maligno stanje. Melanocitni nevus (madež), mali benigni tumor melanocita u koži, je upravo dobar primjer takve pojave. Kako bi iz *BRAF*-mutantnih melanocita nastale stanice melanoma, potrebne su dodatne genetičke i metaboličke promjene (36).

Nevusi, kao i melanomi, najčešće sadrže *BRAF* mutacije (82 %). U kombinaciji s prethodno opisanom ulogom *BRAF*^{V600E} u melanomu, *BRAF* je uključen u najranije stadije razvoja melanoma. Razlikuje se nekoliko tipova nevusa s međusobno različitim frekvencijama *BRAF* mutacija. *BRAF* mutacije gotovo se uopće ne pojavljuju kod Spitz i „plavih“ nevusa. Njihova prisutnost kod kongenitalnih (prisutni od rođenja) i stečenih nevusa je učestala (36).

Mutacija u genu *BRAF* pojavljuje se u većini melanocitnih nevusa, u vertikalnoj fazi rasta melanoma i u metastatskim melanomima, ali se rijetko pojavljuje u radialnoj fazi rasta melanoma (10 %), koja se smatra inicijalnom malignom lezijom koja prethodi vrlo invazivnoj leziji. Stoga se može pretpostaviti da *BRAF* mutacija može biti stečena u ranim fazama melanoma koja dovodi do klonalne ekspanzije i progresije tumora (37).

1.4.5 Određivanje mutacija gena BRAF

Određivanje mutacija gena *BRAF* razvija se ponajprije s ciljem razvoja lijekova za rak s molekularno usmjerenim mehanizmima djelovanja te za odabir bolesnika koji su kandidati za liječenje tim lijekovima. Uspješan primjer ovakve strategije je razvoj *BRAF* inhibitora vemurafeniba, zajedno s testom za određivanje *BRAF* mutacija *cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (RT-PCR test)*, što je 2011. godine rezultiralo odobrenjem vemurafeniba za liječenje tumora od strane američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) (38).

Liječenje melanoma vemurafenibom, dabrafenibom i trametinibom odobreno je samo u bolesnika s melanomom koji ima V600 mutacije gena *BRAF*. Vemurafenib i dabrafenib mogu potaknuti staničnu proliferaciju i nastanak raka zbog paradoksalne aktivacije RAS-RAF-MEK-ERK signalnog puta u stanicama koje nemaju mutiran gen *BRAF*, što objašnjava čestu pojavu karcinoma pločastih stanica i keratoakantomu u bolesnika liječenih vemurafenibom i dabrafenibom (39).

Određivanje mutacija gena *BRAF* najčešće se provodi kod bolesnika s metastatskim ili neoperabilnim melanomom, iako u posljednje vrijeme neki stručnjaci zagovaraju određivanje mutacija u svih bolesnika s melanomom visokog rizika (AJCC – *American Joint Committee on Cancer* stadij IIb ili više) ili čak u svih bolesnika nakon što im se postavi dijagnoza melanoma (40). U prilog toj tezi ide činjenica da su ponekad jedini dostupni uzorci tkiva u trenutku kad se utvrdi metastatska bolest stari uzorci biopsije primarnog melanoma, a sa starošću uzorka povećava se mogućnost neuspjeha određivanja *BRAF* mutacija (10).

Mutacija gena *BRAF* najčešće se određuje u uzorcima tkiva uklopljenim u parafin. Čimbenici koji mogu utjecati na neuspjeh određivanja *BRAF* mutacija su starost uzorka, loša fiksacija i izražena mela-

ninska pigmentiranost. Izuzetno je važan udio stanica raka u uzorku koji mora biti visok da bi rezultat određivanja BRAF mutacija bio pouzdan (10).

Istraživanja Jurowske i sur. upućuju na važnost prikupljanja uzoraka te tvrde da korak koji izvodi patolog, odnosno izbor tkiva s dovoljno tumorskih stanica (5-20 %, ovisno o osjetljivosti metode) te tkiva bez širokog područja nekroza, krvi ili melanina, čini ključan korak za pouzdano testiranje, neovisno o izboru metode (27).

Za određivanje BRAF mutacija u uzorcima tkiva melanoma mogu se primijeniti različite metode koje se međusobno razlikuju prema specifičnosti, osjetljivosti, cijeni, vremenu i stručnosti potrebnima za analizu te drugim parametrima (41, 42, 43).

Neke od metoda su imunohistokemija s VE1 protutijelom specifičnim za V600E mutirani BRAF, analiza krivulje taljenja DNK, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR), sekvenciranje prema Sangeru, pirosekvenciranje i neke druge metode. Za razliku od spomenutih metoda, cjelokupna analiza genoma (engl. *whole genome analysis*, WGA), osim detekcije pretpostavljenih mutacija, može identificirati dodatne genetičke promjene koje nadilaze postavljene parametre spomenutih metoda. WGA otvara mogućnost za otkrivanje prethodno nepoznatih mutacija u genomima melanoma i za ispitivanje učinkovitosti terapija kod određenih profila mutacija ili polimorfizama (32).

U SAD-u je vemurafenib odobren od strane FDA za liječenje bolesnika u kojih su BRAF mutacije određene testovima koji se zasnivaju na metodi *real-time* PCR cobas* 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche Molecular Systems INC.) kao pratećim dijagnostičkim testom, dok je za liječenje dabrafenibom i trametinibom propisan prateći dijagnostički test THxID BRAF Kit (bioMerieux, Inc.) (10). U Europskoj uniji nije propisan prateći dijagnostički test za određivanje BRAF mutacija vezano uz primjenu ta tri lijeka. Cobas test pokazao je visoku osjetljivost od > 95 % za određivanje V600E BRAF mutacija, visoku specifičnost za određivanje V600 BRAF mutacija s manje od 1% lažno pozitivnih rezultata, mali postotak neuspjelih analiza i sposobnost pouzdane detekcije V600E BRAF mutacija prisutnih u samo 5% alela u uzorku (44). Cobas testom mogu se detektirati i V600K i V600D mutacije, ali s nižom osjetljivošću i pragom detekcije te nije moguće razlučiti različite mutacije (44). To je potencijalna manjkavost tog testa jer iako je vemurafenib odobren u SAD-u samo za liječenje bolesnika s V600E mutacijom, pokazalo se da je učinkovit i u bolesnika s V600K mutacijom gena BRAF (45).

Na osnovi analize BRAF mutacija u jednoj metastatskoj leziji, donosi se odluka o liječenju multiplih metastaza, a vrlo često i na osnovi analiza arhivskog uzorka prvotne metastaze ili primarnog melanoma. Pokazano je da se različiti dijelovi iste melanomske lezije mogu razlikovati prema prisutnosti BRAF mutacija (46). Što se tiče intertumorske heterogenosti, neka su istraživanja pokazala visoku podudarnost, a druga relativno visoku nepodudarnost među različitim melanomskim lezijama (primarni melanom i različiti metastaze) u pojedinim bolesnika u pitanju BRAF mutacija (47-50). Ti nam rezultati očigledno pokazuju da su potrebna daljnja istraživanja prije donošenja jasnih zaključaka o heterogenosti melanoma s obzirom na BRAF mutacije u pojedinim bolesnika (10).

1.4.6 Inhibitori proteina BRAF u liječenju melanoma

Napredak u razumijevanju funkcije BRAF proteina doveo je do otkrića da je *BRAF* gen mutiran u mnogo različitih oblika raka te da ta mutacija uzrokuje povećanu proliferaciju stanica raka. Većina mutacija pojavljuje se na kodonu 600 koji se nalazi u aktivnom mjestu BRAF proteina, a zamjenjuje se valin

s glutamatom (V600E). Pojavljuje se u polovici melanoma i, u varirajućem postotku, kod brojnih drugih karcinoma (51). Ti podatci bili su dovoljno snažan poticaj znanstvenicima na istraživanje učinaka inhibicije aktivnosti proteina BRAF u terapiji metastatskog melanoma (34).

Prvi inhibitor RAF proteina koji je prošao klinička ispitivanja bio je sorafenib, 2000. godine. Kako je njegovo otkriće prethodilo otkriću BRAF, CRAF i ARAF mutacija u stanicama raka, naknadno mu je utvrđeno djelovanje na inhibiciju funkcije CRAF proteina. Sorafenib je kompetitivni inhibitor CRAF proteina koji se, umjesto ATP-a, veže u aktivno mjesto kinazne domene CRAF-a. Trenutno se koristi u liječenju raka bubrežnih stanica, hepatocelularnog karcinoma i karcinoma štitnjače. S obzirom da je BRAF, a ne CRAF mutacija jedan od najvećih uzročnika melanoma, sorafenib nema nikakvog utjecaja na razvoj bolesti u bolesnika s metastatskim melanomom (52).

Tsai i sur. su 2008. godine dizajnirali potentni specifični inhibitor BRAF^{V600E} kinaze, PLX4720. Istraživanjima su utvrdili da PLX4720 inhibira rast stanica koje sadrže BRAF^{V600E} mutaciju za 50 % te da snažnije djeluje na stanice s mutacijom nego na stanice s BRAF proteinom divljeg tipa. Kasnije je dizajniran analogni inhibitor, PLX4032, koji se pokazao kao potentniji i specifičniji za mutiranu BRAF kinazu od PLX4720 te je podvrgnut kliničkim istraživanjima pod nazivom vemurafenib (52). Selektivnost za mutirani protein uzrokovana je preferentnim vezanjem vemurafeniba za enzim u aktivnom stanju, a mutacija upravo dovodi enzim u stanje aktivne konformacije, za razliku od sorafeniba koji se preferentnije veže za enzim u inaktivnoj konformaciji. Kasnija istraživanja pokazala su da svi ATP-kompetitivni RAF inhibitori (uključujući vemurafenib, sorafenib i dabrafenib) uzrokuju paradoksalnu aktivaciju MAP kinaznog puta kod stanica s divljim tipom BRAF-a, što je objašnjenje za čestu pojavu karcinoma kože i keratoakantoma u bolesnika liječenih vemurafenibom. Divlji tip RAF proteina najčešće se nalazi u fosforiliranom autoinhibitorskom stanju. U određenim koncentracijama, inhibitori RAF-a ometaju autofosforilaciju RAF-a te na taj način omogućuju njegovu dimerizaciju s RAS proteinom, koja stimulira aktivaciju MEK-a odgovornog za proliferaciju stanica. Veća koncentracija RAF inhibitora potpuno blokira aktivaciju RAF proteina, a time i fosforilaciju MEK-a (53).

Nakon što je odobrena upotreba BRAF inhibitora u liječenju melanoma, pacijenti oboljeli od melanoma s mutacijom u BRAF proteinu imaju dulje preživljenje od pacijenata s divljim tipom BRAF-a, što je obrnuto od situacije prije upotrebe ovih lijekova. Osim vemurafeniba, u liječenju melanoma koristi se još jedan inhibitor BRAF-a, dabrafenib odobren 2013. godine, te MEK inhibitor, trametinib. Osim pozitivnih učinaka inhibitora BRAF-a, postoji sumnja da mogu potaknuti proliferaciju premalignih stanica koje imaju RAS mutacije u tkivima pluća, crijeva ili gušterače (33). Ispitivanje utjecaja vemurafeniba na pacijentima oboljelim od melanoma rezultiralo je s 53 % pacijenata koji su pozitivno reagirali na tretman, od kojih je kod 6 % potpuno uklonjena bolest nakon tretmana u trajanju od 6-7 mjeseci (36).

Ipak, većina pacijenata pokazuje rezistenciju na lijek nekoliko mjeseci nakon inicijalnog odgovora. Pretpostavlja se kako bi istovremeno ciljanje BRAF-a i MEK-a moglo prevenirati određene mehanizme rezistencije, barem s ciljem povećanja perioda djelovanja lijeka. Mehanizmi onkogeneze uzrokovane djelovanjem RAF proteina mogu uključivati dodatne nepoznate signalne puteve, biokemijske funkcije i dodatne supstrate RAF onkoproteina (53). Kombiniranje inhibitora BRAF-a i MEK-a s imunoterapijom pokazalo se još učinkovitije u liječenju melanoma. Ispitivanje utjecaja anti-CTLA-4 monoklonskih protutijela ipilimumaba i anti-PD monoklonskog protutijela MDX-1106 pokazalo je veliku učinkovitost u liječenju metastatskih melanoma. Nadalje, pokazalo se da vemurafenib poboljšava imuno prepoznavanje antigen-specifičnim stanicama kod melanoma (37). Brojni slučajevi pokazuju određene specifičnosti u mehanizmima djelovanja lijekova za melanom pa je za najkvalitetnije rezultate liječenja potrebno pristupiti svakom slučaju individualno i kombinirati nekoliko lijekova u liječenju melanoma (53).

2 HIPOTEZA

HIPOTEZA:

Razlika u prevalenciji mutacija u genu BRAF između displastičnog nevusa i melanoma *in situ* nije statistički značajna.

3 CILJEVI RADA

CILJEVI RADA:

1. Odrediti i međusobno usporediti učestalost V600 mutacija gena *BRAF* u displastičnim nevusima i melanomima *in situ*.
2. Odrediti postoji li povezanost između prisutnosti V600 mutacija gena *BRAF* i različitih anamnestičkih, kliničkih i patohistoloških varijabli.

4 ISPITANICI I METODE

4.1 Ispitanici

U ispitivanje je uključeno 182 bolesnika oba spola u dobi od 12 do 91 godine života s displastičnim nevusima i melanomom *in situ* koji su dijagnosticirani i liječeni u Ambulanti za dermatološku onkologiju Klinike za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice, te patohistološki i imunohistokemijski potvrđeni u Zavodu za patologiju Ljudevit Jurak KBC Sestre Milosrdnice u razdoblju od 2005. do 2016. godine. Od navedena 182 uzorka, u ovom istraživanju je obrađeno i uključeno njih 175, budući da kvaliteta njih 7 nije bila dostatna za molekularnu obradu BRAF mutacije. Arhivirani patohistološki materijal koristio se uz obaviješteni pristanak bolesnika te uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Sestre Milosrdnice. Svi su uzorci prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima, na način da su privatnost i zaštita tajnosti podataka u potpunosti bili osigurani, u prvom redu, dodjelom šifre svakom preparatu.

4.2 Priprema uzoraka tkiva

Analizirani su uzorci tkiva fiksirani formalinom i uklopljeni u parafin pohranjeni na Zavodu za patologiju Ljudevit Jurak KBC Sestre Milosrdnice. Svi uzorci i odgovarajući patohistološki nalazi pregledani su od strane patologa kako bi se potvrdilo da se zaista radi o tkivu displastičnih nevusa, odnosno melanoma *in situ*. Nakon što je patolog na uzorcima označio dio koji odgovara displastičnom nevusu, odnosno melanomu *in situ*, ostatak materijala i parafin uklonjen je sterilnim skalpelom prije rezanja na mikrotomu. Za svaki je uzorak ovisno o njegovoj veličini napravljeno 2 do 5 rezova tkiva debljine 8 µm koji su pohranjeni u označene polipropilenske epruvete od 2 mL.

4.3 Izolacija DNK

Neposredno nakon što su pripremljeni rezovi tkiva i pohranjeni u polipropilenske epruvete, iz njih je izolirana DNK u Laboratoriju Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC Sestre Milosrdnice. Za izolaciju DNK korišten je QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) slijedeći upute proizvođača.

Rezovima tkiva dodano je 1 mL ksilena (Kemika, Zagreb, Hrvatska), snažno je vorteksirano 10 sekundi, inkubirano na sobnoj temperaturi 5 minuta te centrifugirano 2 minute pri 16000 G na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Ksilena dodan u ovom koraku služi dabi se uklonio parafin iz uzoraka. Nakon centrifugiranja, uklonjen je supernatant te je na talog dodano 1 mL 96%-tnog etanola (Kemika). Etanol je dodan da bi se uklonili ostatci ksilena. Uzorak s dodanim etanolom pomiješan je vorteksiranjem te je uslijedilo centrifugiranje 2 minute pri 16000 G na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415R. Nakon centrifugiranja pažljivo je uklonjen sav supernatant te su uzorci inkubirani u otvorenim epruvetama 15 minuta na 37°C u termomikseru Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf) kako bi ispario sav preostali etanol. Talog je resuspendiran u 180 µL pufera za lizu iz kita (ATL pufer), dodano je 20 µL proteinaze K koja je dio kita za izolaciju DNK te je inkubirano 1 sat na 56°C u termomikseru Eppendorf Thermomixer Comfort kako bi se lizirale stanice. Uslijedila je inkubacija na 90°C, kojom se postiže uklanjanje modifikacija molekule DNK do kojih je

došlo uslijed fiksiranja formalinom. Nakon inkubacije na 90°C, dodano je 2 µL RNaze A (100 mg/mL) (Qiagen, Hilden, Njemačka) i inkubirano 2 minute na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 200 µL pufera AL iz kita, dobro promiješano vorteksiranjem pa dodano 200 µL 96 %-tnog etanola i ponovno dobro promiješano vorteksiranjem. Čitav tako dobiven lizat prebačen je u QIAamp MinElute kolonu iz kita koja je prethodno stavljena u polipropilensku epruvetu od 2 mL za skupljanje eluata.

Uslijedilo je nekoliko centrifugiranja u različitim puferima kako bi se postiglo vezanje DNK za kolonu i ispiranje drugih tvari koje kontaminiraju DNK. Prvo je zatvorena kolona centrifugirana 1 minutu pri 6000 G na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415R. Nakon centrifugiranja, epruveta sa skupljenim eluatom je bačena, kolona prebačena u novu čistu polipropilensku epruvetu od 2 mL te je na kolonu dodano 500 µL prvog pufera za ispiranje kolone iz kita (pufer AW1). Uslijedilo je ponovno centrifugiranje 1 minutu pri 6000 G na sobnoj temperaturi, nakon čega je epruveta sa skupljenim eluatom bačena, kolona prebačena u novu čistu polipropilensku epruvetu od 2 mL te je na kolonu dodano 500 µL drugog pufera za ispiranje kolone iz kita (pufer AW2). Nakon još jednog centrifugiranja 1 minutu pri 6000 G, kolona je prebačena u čistu epruvetu te je centrifugirano 3 minute pri 16000 G kako bi se membrana na koloni potpuno osušila. U posljednjem koraku izolacije na kolonu koja je prebačena u čistu polipropilensku epruvetu od 1,5 mL dodano je 80 µL ATE pufera iz kita, zatvorena kolona je zatim inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi te centrifugirana 1 minutu pri 16000 G. Na taj način je čista genomska DNK isprana iz kolone u 80 µL ATE pufera. Epruveta s DNK označena je i pohranjena na -20°C.

4.4 Određivanje koncentracije i čistoće DNK

Koncentracija i čistoća izolirane DNK određena je mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama od 260nm i 280nm koristeći nanospektrofotometar NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington DE, SAD) na Zavodu za onkološku patologiju Klinike za tumore KBC Sestre milosrdnice. Kao slijepa proba pri tome je korišten ATE pufer iz kita za izolaciju DNK.

4.5 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

U uzorcima DNK izdvojenim na ranije opisan način iz uzoraka tkiva displastičnih nevusa i melano-*in situ* određena je prisutnost mutacija V600E i V600K u genu BRAF koristeći za svaku od te dvije mutacije specifičan TaqMan® Mutation Detection Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) u kombinaciji s TaqMan® Mutation Detection Reference Assay-om za gen BRAF (Applied Biosystems). Ovakav postupak određivanja specifičnih mutacija zasniva se na umnažanju lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR), gdje se sMutation Detection Assay-om umnaža samo odsječak DNK koji sadrži točno određenu mutaciju (u našem slučaju mutaciju V600E, odnosno V600K gena BRAF) ukoliko je prisutna, dok se s Reference Assay-om u drugoj reakciji s istim uzorkom DNK umnaža regija istog gena (u našem slučaju gena BRAF) koja ne sadrži mutacije, niti polimorfizme.

Određivanje mutacija gena BRAF provedeno je na uređaju za real-time PCR Applied Biosystems 9700 (Applied Biosystems) u Laboratoriju Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC Sestre Milosrdnice koristeći program 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems). Reakcijske smjese priređene su u pločici

s bunarićima prilagođenoj za PCR u stvarnom vremenu (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems). Za svaku reakciju je u jednom bunariću pomiješano: 10 µL TaqMan® Genotyping Master Mix-a (Applied Biosystems), 4 µL DNK radne koncentracije 6,25 µg/mL, 2 µL TaqMan® Mutation Detection Assay-a odnosno TaqMan® Mutation Assay Reference Assay-a i 4 µL deionizirane vode u ukupnom volumenu od 20 µL. Za svaki analizirani uzorak pripremljene su tri reakcijske smjese u tri bunarića: s Mutation Detection Assay-em za V600E mutaciju (BRAf_476_mu; Assay ID: Hs00000111_mu), za V600K mutaciju (BRAf_473_mu; Assay ID: Hs00000769_mu) i s Reference Assay-em (BRAf_rf; Assay ID: Hs00000172_rf). TaqMan® Genotyping Master Mix sadrži AmpliTaq Gold® DNA polimerazu, smjesu deoksinukleotida bez dUTP-a, pasivnu referentnu boju ROX i pufer koji omogućuje optimalne uvjete za PCR reakciju. Korišteni TaqMan® Mutation Detection Assay-i sastoje se od para neobilježenih specifičnih početnica za PCR i specifične TaqMan probe s FAM fluorescentnom bojom na 5' kraju i nefluorescentnim prigušivačem (engl. *quencher*) na 3' kraju.

Nakon što je pripremljena reakcijska smjesa u pločici s bunarićima za sve uzorke, pločica je prekrivena optičkom ljepljivom folijom i stavljena u uređaj za PCR u stvarnom vremenu na kojem je zatim pokrenuta sama PCR reakcija. Uvjeti u kojima se odvijala PCR reakcija bili su sljedeći: 10 minuta na 95°C, 5 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 92°C i 1 minute na 58°C, 40 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 92°C i 1 minute na 60°C. U svakoj je reakciji uz uzorke analizirana i negativna kontrola (adekvatan uzorak za kojeg je ranije potvrđeno da nema V600E ni V600K mutacije gena BRAF) te pozitivne kontrole, posebno za V600E i posebno za V600K mutacije (uzorci za koje je ranije potvrđeno da imaju V600E odnosno V600K mutacije gena BRAF).

4.6 Analiza rezultata lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Po završetku real-time PCR reakcije analizirane su dobivene krivulje umnažanja kako bi se usporedbom vrijednosti graničnog ciklusa (C_T , engl. *threshold cycle*) uzoraka analiziranih s početnicama za V600E i V600K mutacije gena BRAF (Mutation Detection Assay) i onih s početnicama za sam gen BRAF (Reference Assay) odredilo jesu li u uzorku prisutne mutacija V600E, odnosno V600K gena BRAF. Prije same analize provjereno je da sve krivulje umnažanja imaju karakterističan oblik te da pozitivne i negativna kontrola imaju odgovarajuće rezultate. Za određivanje C_T vrijednosti, prag (*threshold*) je podešen na 0,2.

Za svaki uzorak za svaku mutaciju zatim je izračunana ΔC_T vrijednost prema sljedećoj formuli:

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Mutation Detection Assay})} - C_{T(\text{Reference Assay})}$$

Uzorci koji su imali ovako izračunanu ΔC_T vrijednost veću od 9,96 proglašeni su negativnima za mutaciju, dok su uzorci s ΔC_T vrijednosti manjom ili jednakom 9,96 proglašeni pozitivnima za V600E, odnosno V600K mutaciju gena BRAF.

4.7 Statistička obrada

Prilikom statističke obrade koristile su se metode deskriptivnog prikaza podataka te metode inferencijalne statistike. U sklopu deskriptivne analize podatci su prikazani tablično u obliku apsolutnih frekvencija, postotaka i mjera centralne tendencije, te grafički pomoću dijagrama. U ovisnosti o distribuciji dobivenih podataka koristile su se parametrijske ili neparametrijske statističke metode. Ukoliko se utvrdilo odstupanje promatranih varijabli od normalne (Gaussove) distribucije, testiranje je provedeno pomoću neparametrijskih inačica testova odnosno Hi kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom i Mann-Whitneyevim U testom, a u slučaju normalne distribucije koristile su se parametrijske inačice testova.

Pouzdanost svih testova, prilikom testiranja, postavljena je na 95% ($p < 0,05$), na osnovu dobivenih signifikantnosti donesena je odluka o prihvatanju ili odbacivanju postavljenih hipoteza, dok su sve mjerene p vrijednosti biti dvostrane.

U svrhu statističke analize korišten je statistički program Statistica (inačica 13.0) čiju licencu za uporabu posjeduje Medicinski fakultet u Zagrebu (54).

5 REZULTATI

5.1 Struktura ispitanika

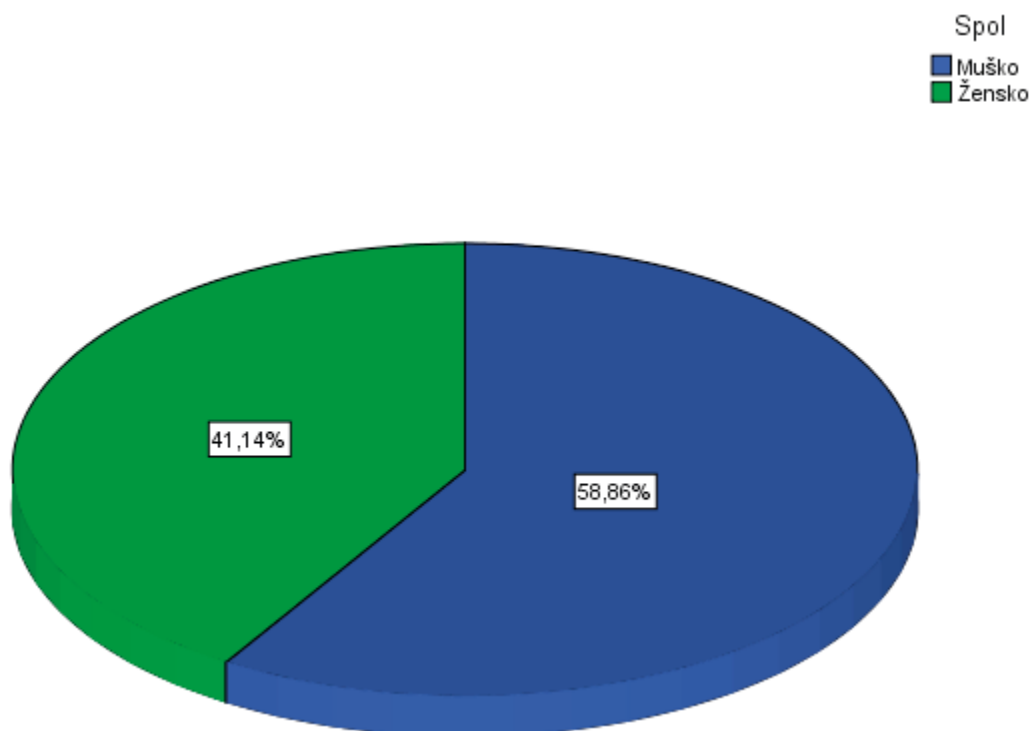
U ovom istraživanju ukupan broj ispitanika bio je 175. Najveći broj pacijenata, njih 106 (60,6%), imali su displastični nevus (ND), dok je njih 69 (39,3%) imalo melanom *in situ* (MIS). Među bolesnicima s MIS, njih 28 (16,0% od ukupnog broja) imalo je LM (lentigo maligna).

Tablica 5. Brojnost pacijenata po dijagnozi

		Broj	%
Dijagnoza	ND	106	60,6%
	MIS	41	23,4%
	LM	28	16,0%
	Ukupno	175	100,0%

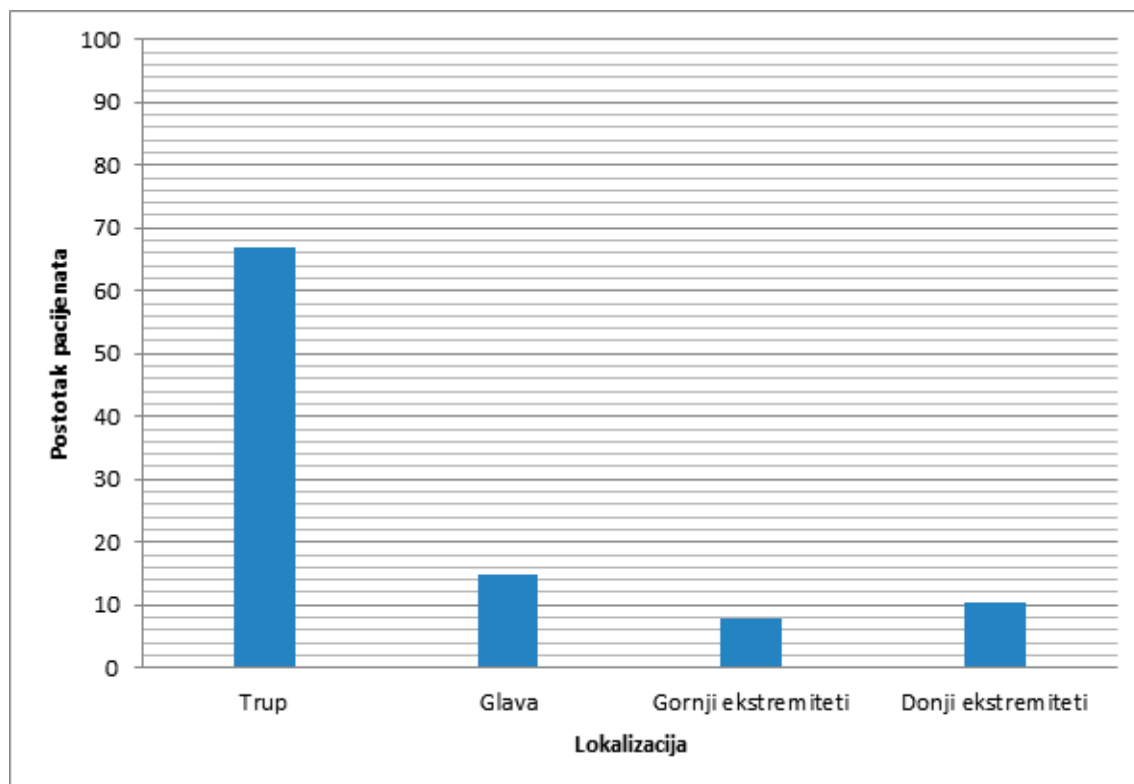
* ND – displastični nevus, MIS – melanom *in situ*; LM – lentigo maligna

Od ukupnog broja ispitanika (175), 103 su bili muškarci (58,9%), a 72 (41,1%) su bile žene.



Slika 7. Spolna struktura ispitanika.

Pogledaju li se podaci za dob ekscizije, može se uočiti daje prosječna dob ekscizije 53 godine, uz prosječno odstupanje (standardna devijacija) od 18,7 godina. Minimalna vrijednost, tj. starost najmlađeg pacijenta bilaje 12 godina, dok je maksimalna vrijednost, tj. starost najstarijeg pacijenta bila 91 godinu. Najčešća primarna lokalizacija lezije bila je trup u 66,9% slučajeva (117 pacijenata), zatim glava u 14,9% slučajeva (26 pacijenata), u 10,3% slučajeva lezija je bila na donjim ekstremitetima (18 pacijenata), dok je u 8% slučajeva (14 pacijenata) primarna lokalizacija na gornjim ekstremitetima.



Slika 8. Grafički prikaz učestalosti lezije (melanoma ili displastičnog nevusa) na određenim dijelovima tijela.

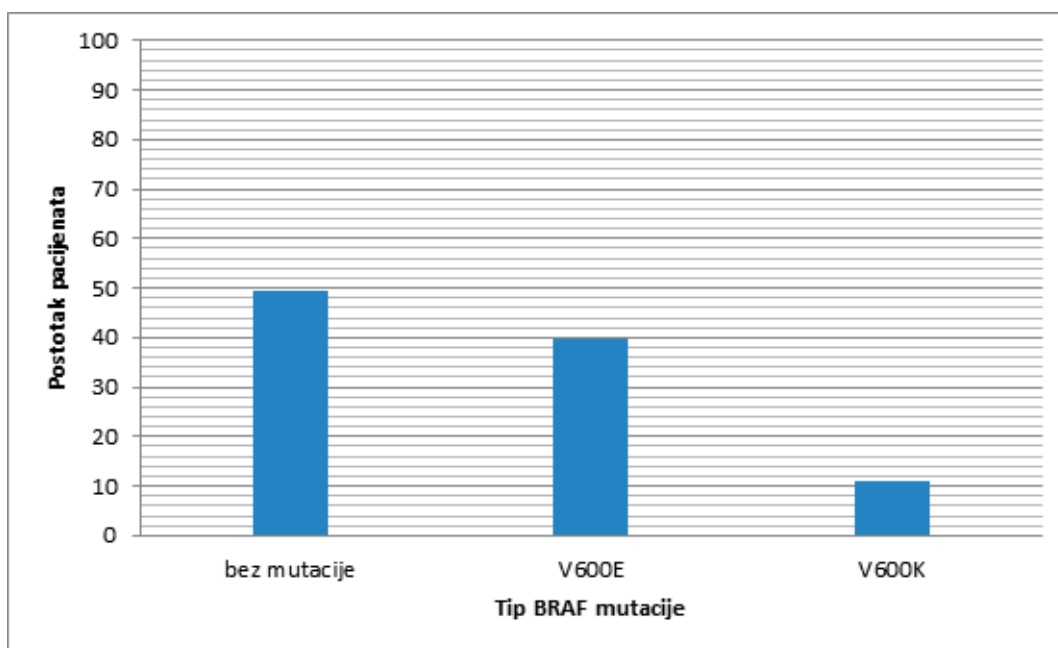
Analizira li se veličina promjena, vidi se da je najveća bila 5,3 cm, najmanja 0,3 cm, uz srednju vrijednost od 1,2 cm i standardnu devijaciju 0,6 cm.

U istraživanju je analizirano i koliki je broj pacijenata imao prethodno dijagnosticiran melanom kao primarnu dijagnozu.

Od ukupnog broja pacijenata (njih 175), broj ispitanika bez prethodno dijagnosticiranog primarnog melanoma bio je 150 (85,7%), dok je 25 pacijenata (14,3%) imalo prethodno dijagnosticiran primarni melanom.

5.2 Mutacije u genu BRAF

U analizu je uključeno 175 pacijenata kod kojih su bili poznati svi podatci važni za statističku analizu. Od ukupno 175 pacijenata, bez ikakve BRAF mutacije bilo je njih 87 (49,7%). Od pacijenta s neakvim tipom mutacije (njih 88, tj. 50,3%), s V600E tipom mutacije bilo je njih 68 (38,86%), dok ih je značajno manje bilo s V600K tipom mutacije (njih 20, tj. 11,43%).



Slika 9. Grafički prikaz brojnosti pacijenata koji nemaju BRAF mutaciju ili imaju jedan od dva tipa (V600E ili V600K) mutacija.

5.3 Mutacije u genu BRAF kod displastičnih nevusa i melanoma *in situ*

U statističkoj analizi povezanosti BRAF mutacije i dijagnoze dobili smo sljedeće rezultate. Kod pacijenata s ND-om (ukupno 106 pacijenata), 62 pacijenta imala su neku varijantu BRAF mutacije (58,5%). Među njima, 55 (88,7% mutiranih) ih je imalo V600E mutaciju, a 7 (11,3% mutiranih) V600K mutaciju. Kod pacijenata s melanomom *in situ*, od ukupno 41 pacijenta, kod njih 25 (60,9%) zabilježena je BRAF mutacija. Među njima ih je 12 (48%) imalo V600E mutaciju, a 13 (52%) V600K mutaciju. Među 28 pacijenata s LM samo je jedan imao BRAF mutaciju (3,6%) V600E. Postoji statistički značajna povezanost između prisutnosti BRAF mutacije i dijagnoze melanoma *in situ* (χ^2 test, $\chi^2=29,17$, $p<0,0001$). Međutim, nije nađena statistički značajna povezanost između prisutnosti BRAF mutacije i dijagnoze melanoma *in situ* kada su iz analize isključeni bolesnici s LM (χ^2 test, $\chi^2=0,008$, $p=0,930$).

Tablica 6. Povezanost prisutnosti BRAF mutacije i dijagnoze pacijenta.

Dijagnoza		BRAF mutacije/broj (postotak)/		Ukupno /Broj/
		Ne	Da	
	ND	44 (41,5%)	62 (58,5%)	106
	MIS	16 (39,0%)	25 (60,9%)	41
	LM	27 (96,4%)	1 (3,6%)	28
	Ukupno	87 (49,7%)	88 (50,3%)	175

* ND – displastični nevus, MIS – melanom *in situ*; LM – lentigo maligna

Među bolesnicima s nađenom mutacijom u genu BRAF postoji statistički značajna povezanost između dijagnoze melanoma *in situ* i tipa mutacije (V600E ili V600K) (χ^2 test, $\chi^2=17,110$, $p=0,0002$). V600E mutacija češća je kod ND, a V600K kod MIS.

Tablica 7. Povezanost vrste BRAF mutacije i dijagnoze pacijenta među bolesnicima s BRAF mutacijom.

Dijagnoza		Vrsta BRAF mutacije/broj (postotak)/		Ukupno /Broj/
		V600E	V600K	
	ND	55 (88,7%)	7 (11,3%)	62
	MIS	12 (48,0%)	13 (52,0%)	25
	LM	1 (100%)	0 (0%)	1
	Ukupno	68 (77,3%)	20 (22,7%)	88

* ND – displastični nevus, MIS – melanom *in situ*; LM – lentigo maligna

5.4 Povezanost mutacija u genu BRAF s drugim demografskim i kliničkim varijablama

5.4.1 Mutacije u genu BRAF i spol

U analizi odnosa pojavnosti BRAF mutacija prema spolu bolesnika, statistička analiza pokazala je sljedeće rezultate: od ukupno 103 muška pacijenta, njih 46 (44,7%) imalo je BRAF mutaciju. Kod žena, od ukupno 72 pacijentice, njih 42 (58,3%) imalo je BRAF mutaciju. Nije uočena statistički značajna razlika kod pojavnosti mutacija s obzirom na spol ispitanika (χ^2 test, $\chi^2=2,646$, $p=0,104$).

Tablica 8. Povezanost prisutnosti BRAF mutacije i spola pacijenta.

Spol		BRAF mutacije/broj (postotak)/		Ukupno /Broj/
		Ne	Da	
	Muško	57 (55,3%)	46 (44,7%)	103
	Žensko	30 (41,7%)	42 (58,3%)	72
	Ukupno	87 (49,7%)	88 (50,3%)	175

U odnosu spola i tipa mutacije, od ukupno 46 pacijenata muškog spola s nađenom BRAF mutacijom, njih 33 (71,7%) imalo je V600E mutaciju, a 13 (28,3%) V600K mutaciju. Među 42 pacijenta ženskog spola s nađenom BRAF mutacijom, njih 30 (41,7%) imalo je V600E mutaciju, a 12 (28,6%) V600K mutaciju. Među bolesnicima s nađenom mutacijom u genu BRAF nije nađena statistički značajna povezanost između spola i tipa mutacije (V600E ili V600K) (χ^2 test, $\chi^2=1,085$, $p=0,298$).

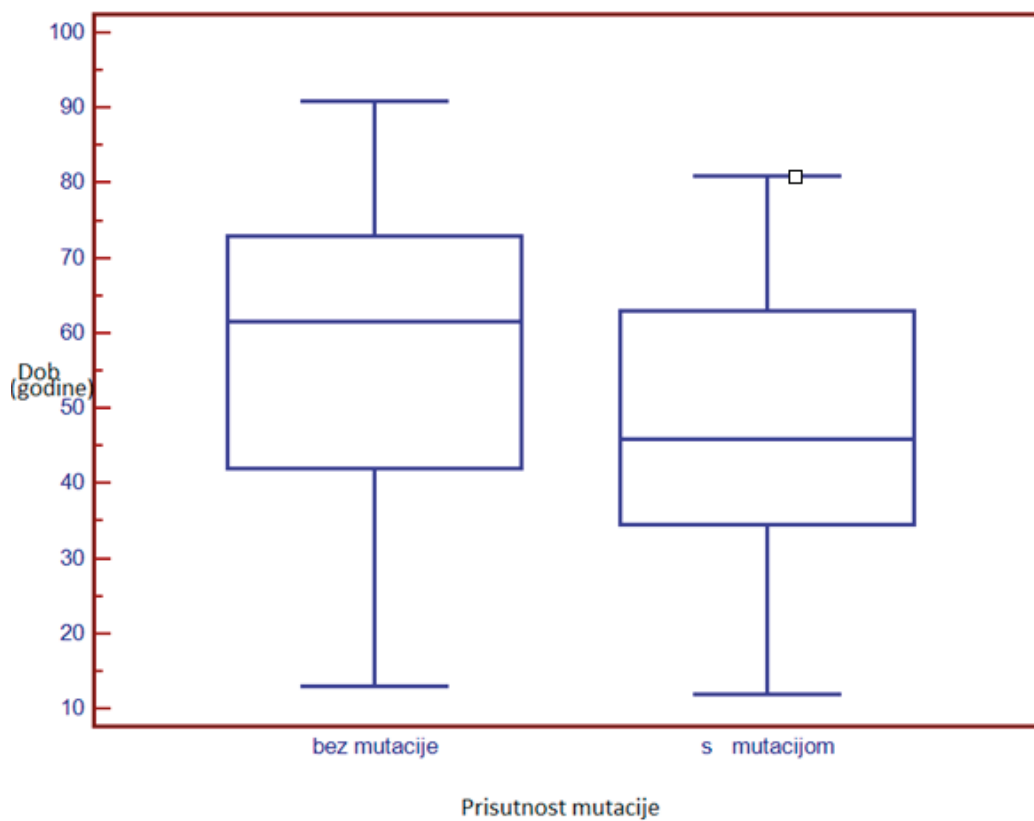
Tablica 9. Povezanost vrste BRAF mutacije i spola pacijenta među bolesnicima s BRAF mutacijom.

Spol		Vrsta BRAF mutacije /broj (postotak)/		Ukupno /broj/
		V600E	V600K	
	Muško	33 (71,7%)	13 (28,3%)	46
	Žensko	35 (83,3%)	7 (16,7%)	42
	Ukupno	68 (77,3%)	20 (22,7%)	88

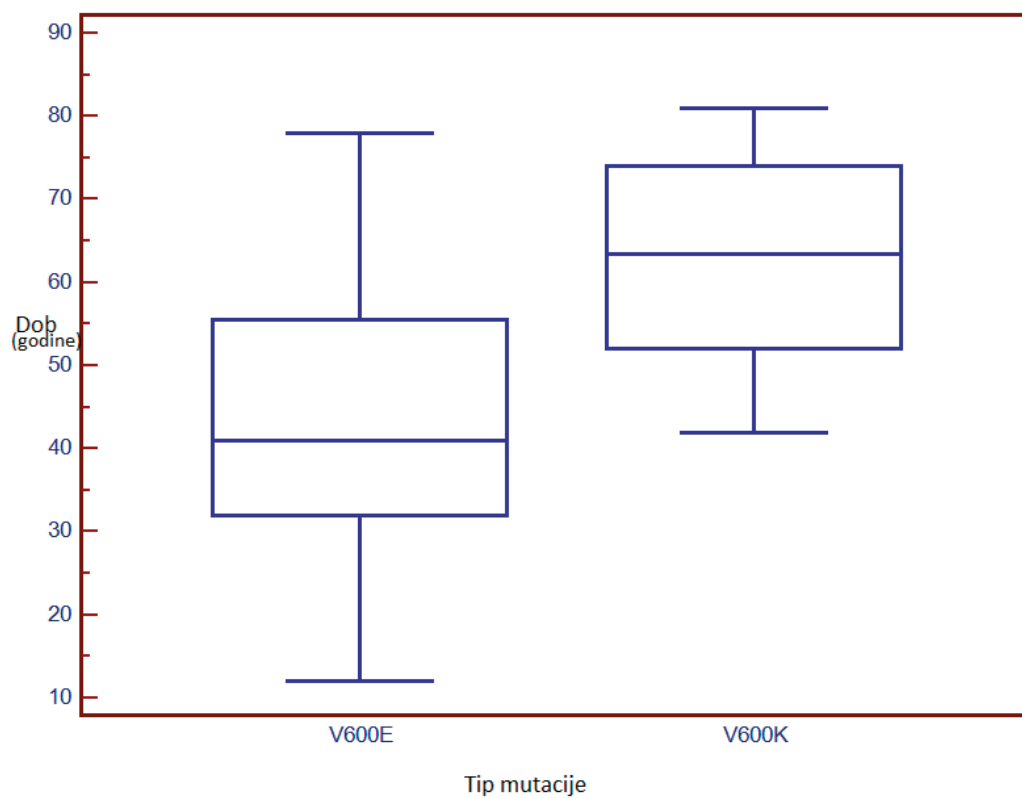
5.4.2 Mutacije u genu BRAF i dob

Dob pacijenta određena je u vrijeme ekscizije lezije. Kod 49,9% pacijenata nije prisutna mutacija, kod 39,6% prisutna je V600E, dok je kod 11,0% prisutna V600K. U pacijenata bez mutacije medijan dobi je bio 61,5 godina, a raspon od 13 do 91 godine. Pogledaju li se podatci za dob ekscizije pacijenata s BRAF mutacijom može se vidjeti daje medijan dobi bio 46 godina, starost najmlađeg pacijenta bila je 12 godina, dok je starost najstarijeg pacijenta bila 81 godinu. Za pacijente s V600E mutacijom, raspon dobi bio je od 12 do 78 godina uz medijan od 41 godinu, dok je kod pacijenata s V600K mutacijom, raspon bio od 42 do 81 godine, uz medijan od 63,5 godina.

Dob ekscizije bolesnika s mutacijom statistički je značajno niža u odnosu na bolesnike bez mutacije (Mann-Whitneyev U test, $z=3,227$, $p=0,001$). Među bolesnicima s BRAF mutacijom dob ekscizije bolesnika s V600E mutacijom bila je statistički značajno niža od dobi bolesnika s V600K mutacijom (Mann-Whitneyev U test, $z=4,401$, $p<0,0001$).



Slika 10. Grafički prikaz distribucije dobi bolesnika s BRAF mutacijom i bolesnika bez BRAF mutacije.



Slika 11. Grafički prikaz distribucije dobi bolesnika s V600E i bolesnika s V600K mutacijom u genu BRAF.

5.4.3 Mutacije u genu BRAF i lokalizacija

Od ukupno 175 pacijenata, njih 87 (49,71%) nije imalo nikakav oblik BRAF mutacije. S mutacijom je bilo njih 88 (50,29%). S obzirom na lokalizaciju tumora, udio bolesnika s nađenom BRAF mutacijom bio je sljedeći: 72 od 117 bolesnika (61,5%) s tumorom na trupu, 4 od 26 bolesnika (15,4%) s tumorom na glavi, 7 od 14 bolesnika (50%) s tumorom na gornjim ekstremitetima i 5 od 18 bolesnika (27,8%) s tumorom na donjim ekstremitetima. Analiza je pokazala da postoji statistički značajna povezanost između lokalizacije tumora i učestalosti BRAF mutacija (χ^2 test, $\chi^2=22,243$, $p=0,0001$).

Tablica 10. Povezanost prisutnosti BRAF mutacije i lokalizacije tumora.

Lokalizacija		BRAF mutacije /broj (postotak)/		Ukupno /Broj/
		Ne	Da	
	Trup	45 (38,5%)	72 (61,5%)	117
	Glava	22 (84,6%)	4 (15,4%)	26
	Gornji ekstremiteti	7 (50%)	7 (50%)	14
	Donji ekstremiteti	13 (72,2%)	5 (27,8%)	18
	Ukupno	87 (49,7%)	88 (50,3%)	175

Raspored bolesnika s obzirom na tip mutacije (V600E ili V600K) među bolesnicima s različitim lokalizacijama tumora prikazan je u Tablici 11. Nije nađena statistički značajna povezanost između lokalizacije tumora i tipa mutacije (V600E ili V600K) (χ^2 test, $\chi^2=3,108$, $p=0,375$).

Tablica 11. Povezanost vrste BRAF mutacije i lokalizacije tumora među bolesnicima s BRAF mutacijom.

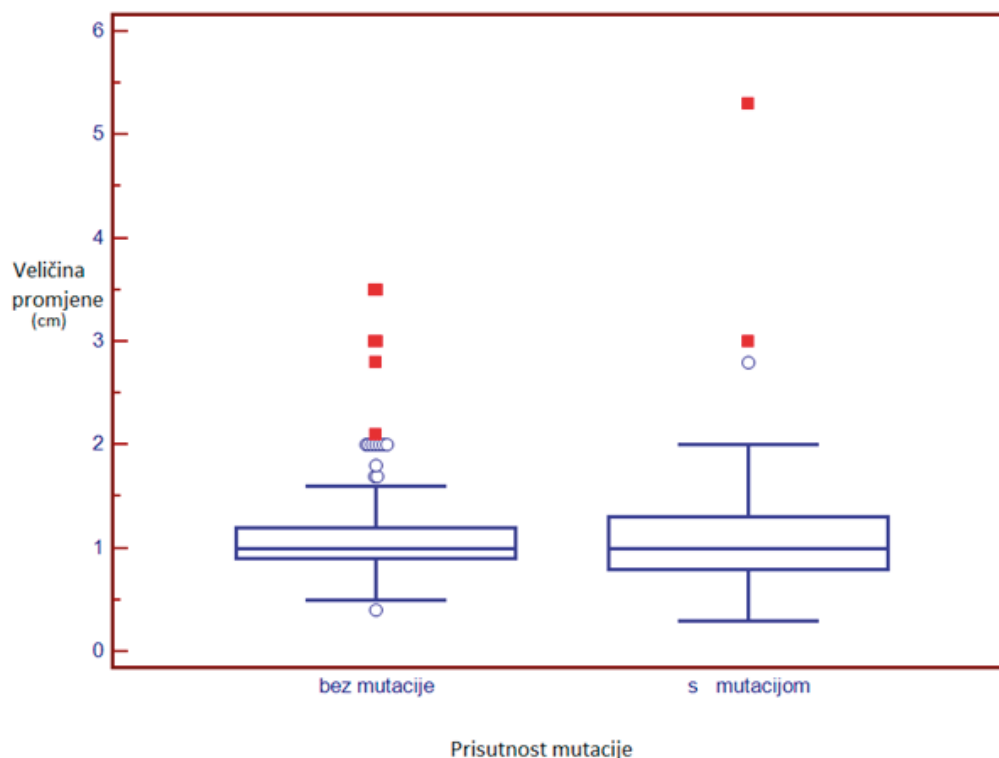
Lokalizacija		Vrsta BRAF mutacije /broj (postotak)/		Ukupno /broj/
		V600E	V600K	
	Trup	56 (77,8%)	16 (22,2%)	72
	Glava	3 (75%)	1 (25%)	4
	Gornji ekstremiteti	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7
	Donji ekstremiteti	5 (100%)	0 (0%)	5
	Ukupno	68 (77,3%)	20 (22,7%)	88

5.4.4 Mutacije u genu BRAF i veličina promjene

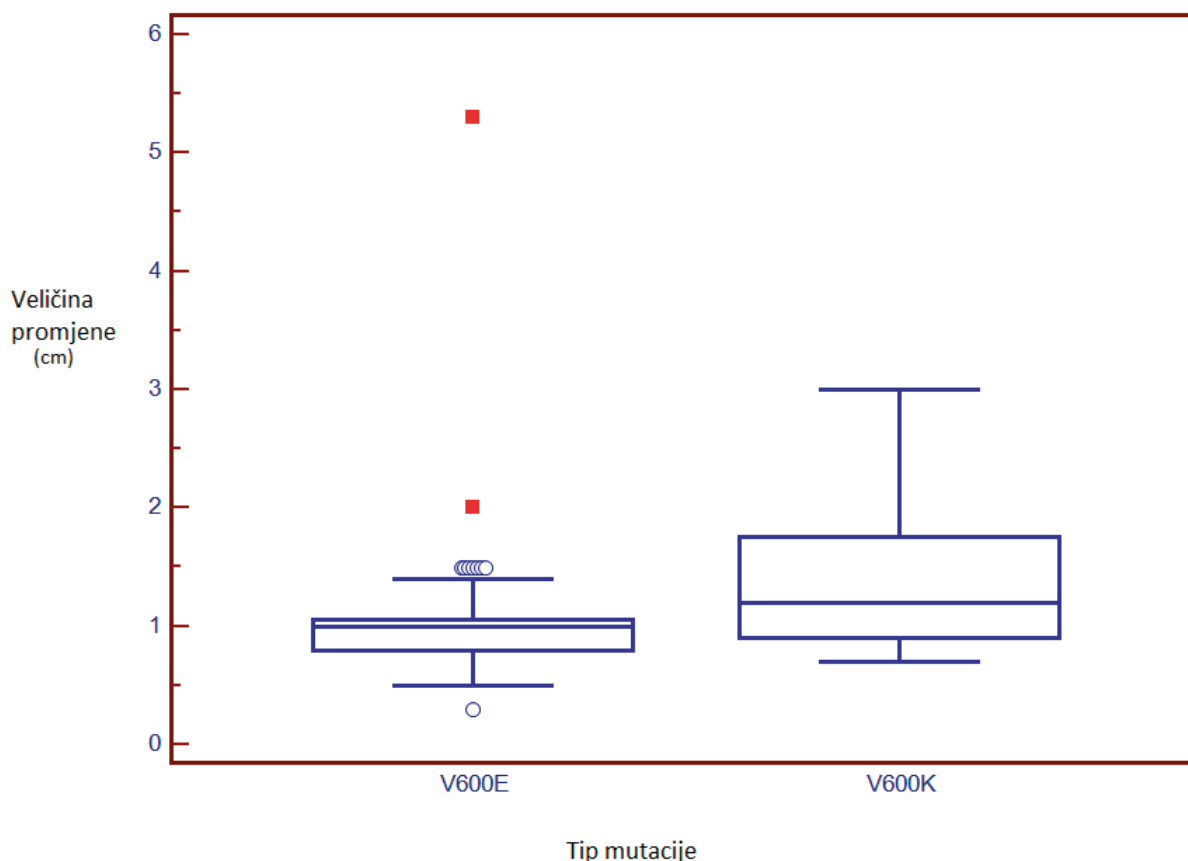
Analizira li se veličina promjena, vidi se da je najveća bila 5,3 cm, a najmanja 0,3 cm. Medijan veličine među svim bolesnicima bio je 1,0 cm.

Pogledaju li se podatci za veličinu promjene kod ispitanika koji nemaju BRAF mutaciju, minimalna veličina promjene iznosi 0,4 cm, a maksimalna 3,5 cm, dok medijan iznosi 1,0 cm. Među svim bolesnicima koji imaju BRAF mutaciju, medijan veličine promjene iznosi 1 cm, najmanja vrijednost 0,3 cm, a najveća 5,3 cm. Kod ispitanika koji imaju V600E mutaciju, najmanja veličina promjene iznosi 0,3 cm, dok je najveća 5,3 cm uz medijan prosječne veličine promjene od 1,0 cm. Kod V600K mutacije, najmanja veličina promjene iznosi 0,7 cm, a najveća 3,0 cm uz medijan od 1,2 cm.

Nije nađena statistički značajna povezanost između veličine promjene i prisutnosti BRAF mutacije (Mann-Whitneyev U test, $z=0,834$, $p=0,404$). Među bolesnicima s BRAF mutacijom veličina promjena bila je statistički značajno manja u bolesnika s V600E mutacijom u odnosu na bolesnike s V600K mutacijom (Mann-Whitneyev U test, $z=2,529$, $p=0,011$).



Slika 12. Grafički prikaz distribucije veličine tumora u bolesnika s BRAF mutacijom i bolesnika bez BRAF mutacije.



Slika 13. Grafički prikaz distribucije veličine tumora bolesnika s V600E i bolesnika s V600K mutacijom u genu BRAF.

5.4.5 Mutacije u genu BRAF i prethodna dijagnoza melanoma

Analizirali smo povezanost prisutnosti BRAF mutacije u odnosu na prethodno dijagnosticiran primarni melanom. Bez prethodne dijagnoze melanoma bilo je ukupno 150 bolesnika, a s prethodnom dijagnozom melanoma njih 25. Među bolesnicima koji nisu imali prethodnu dijagnozu melanoma, njih 78 (52%) imalo je mutaciju u genu BRAF, a 72 (48%) nije imalo mutaciju. Među 78 bolesnika bez prethodne dijagnoze melanoma koji su imali mutaciju u genu BRAF, njih 61 imalo je V600E, dok je njih 17 imalo V600K mutaciju. Među bolesnicima koji nisu imali prethodnu dijagnozu melanoma, njih 10 (40%) imalo je BRAF mutaciju, dok njih 15 (60%) nije imalo BRAF mutaciju. Među 10 bolesnika s prethodnom dijagnozom melanoma koji su imali mutaciju u genu BRAF, njih 7 imalo je V600E, dok je njih 3 imalo V600K mutaciju. Nije nađena statistički značajna povezanost između prethodne dijagnoze melanoma i prisutnosti BRAF mutacija (χ^2 test, $\chi^2=0,267$, $p=0,371$). Također, među bolesnicima s nađenom mutacijom u genu BRAF nije nađena statistički značajna povezanost između prethodne dijagnoze melanoma i tipa mutacije (V600E ili V600K) (χ^2 test, $\chi^2=0,033$, $p=0,856$).

Tablica 12. Povezanost prisutnosti BRAF mutacije i prethodne dijagnoze melanoma.

	BRAF mutacije /broj (postotak)/		Ukupno /Broj/
	Ne	Da	
Prethodna dijagnoza melanoma			
Bez melanoma	72 (48%)	78 (52%)	150
Melanom	15 (60%)	10 (40%)	25
Ukupno	87 (49,7%)	88 (50,3%)	175

Tablica 13. Povezanost vrste BRAF mutacije i prethodne dijagnoze melanoma među bolesnicima s BRAF mutacijom.

	Vrsta BRAF mutacije /broj (postotak)/		Ukupno /Broj/
	V600E	V600K	
Prethodna dijagnoza melanoma			
Bez melanoma	61 (78,2%)	17 (21,8%)	78
Melanom	7 (70%)	3 (30%)	10
Ukupno	68 (77,3%)	20 (22,7%)	88

6 RASPRAVA

Maligni melanom, zloćudni tumor melanocita je jedan od najagresivnijih tumora u ljudi. Iako melanom kože čini samo 4% svih kožnih tumora, on uzrokuje čak 80% smrtnih slučajeva od svih tumora kože (10). Zbog slabe osjetljivosti na danas dostupno liječenje proširenog melanoma, većina bolesnika umire u petogodišnjem razdoblju. Petogodišnje preživljenje pacijenata s metastazama iznosi samo 14% (10). Upravo zbog gore navedenih podataka, sva znanstvena istraživanja koja vode boljem razumijevanju genetske osnove nastanka, progresije ove bolesti, te osmišljavanjem novih terapija od izuzetne su važnosti. Displastični nevus je relativno učestao (oko 10%, raspon od 7-21%) u Europskoj populaciji (55). Moramo ga promatrati kao poseban slučaj, stadij između novonastalog nevusa i melanoma, jer je biološki i morfološki između ta dva slučaja (55). Još od samog otkrića displastičnih nevusa kao zanimljivih u smislu potencijalne uloge u nastanku melanoma, i dalje se raspravlja o njihovoj definiciji, histološkim i kliničkim kriterijima za njihovo određivanje te njihovoj biološkoj važnosti (55). Iako ne postoji univerzalna klinička ili histološka definicija displastičnog nevusa, on je i dalje važna karika u povećanju rizika nastanka melanoma (55). Većina epidemioloških studija je definirala displastični nevus kao rizični faktor u nastanku melanoma (56). Pojava displastičnog nevusa deseterostruko povećava šansu obolijevanja od melanoma (55). Prema istraživanju Tsao i sur. godišnje <1 nevus u 200 000 slučajeva prelazi u melanom, i kod žena i kod muškaraca mlađih od 40 godina. Kod muškaraca starijih od 60 godina, šansa je puno veća, 1 u 33 000 slučajeva (57). Rezultati ovog istraživanja po kojima nema statistički značajne razlike u učestalosti BRAF mutacija između displastičnih nevusa i melanoma in situ (uz izuzetak lentigo maligna melanoma) govore u prilog uloge BRAF mutacije u displastičnom nevusu kao nužnog, ali samog po sebi nedovoljnog onkogenog pokretača (58). Prisutnost same BRAF mutacije (V600E) u displastičnom nevusu nužno ne znači njegovu transformaciju u melanom, pošto je put nastanka tumora komplicirana biokemijska kaskada više gena i faktora od kojih je BRAF gen i njegove mutacije, samo jedan dio. Hoće li i kada displastični nevus prijeći u bilo koji oblik melanoma, sa sigurnošću se ne može reći.

S obzirom da su naša klinička iskustva, potkrijepljena znanstvenim spoznajama, da displastični nevus s većom učestalošću maligno alterira u melanom, zanimalo nas je koliko je u displastičnom nevusu izražena BRAF mutacija i koliko je usporediva s početnim melanomima.

BRAF mutaciju smo odabrali kako bi se dobila što jasnija slika o njezinoj učestalosti te kako bi učinili korelaciju s važnim čimbenicima (spol bolesnika, dob, lokalizacija tumora, veličina lezije), te da bi analizirali statističku značajnost povezanosti pojavnosti BRAF mutacije s istima.

U istraživanju je sudjelovalo 175 bolesnika s displastičnim nevusima i melanomom in situ, od kojih 103 muškarca i 72 žene. Izuzev statistika iz 2013. godine kada je bio veći broj oboljelih žena nego muškaraca (11, 13), od 1968. do 2015. godine kontinuirano je bio veći broj muškaraca s novootkrivenim melanomom pa ne čudi što je i u našem istraživanju bilo više muškaraca nego žena (56).

Kod pojavnosti mutacija s obzirom na spol bolesnika, utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u pojavnosti mutacija niti u distribuciji mutacija s obzirom na tip (V600E ili V600K) između muškaraca i žena. Iako je o ovom istraživanju pokazana nešto veća pojavnost BRAF mutacija kod žena, ta razlika ipak nije bila statistički značajna. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja također nisu našla statistički značajnu razliku u učestalosti i distribuciji BRAF mutacija između muškaraca i žena. Stopa pojavnosti BRAF mutacija kod muškaraca i žena se ne razlikuje jer ne postoji razlika u nastanku mutacija, koje su ili genski predisponirane – uglavnom kod mlađih pacijenata, ili utjecane okolinom (izloženost sunčevom zračenju) – kod starijih pacijenata (59).

Kada je riječ o zastupljenosti BRAF mutacije u cijelom uzorku, 87 (49.7%) pacijenata je imalo pozitivnu mutaciju, od čega 58.5 % s displastičnim nevusom, 60.9% s melanomom in situ i 3.6% s lentio maligna. Prosječna životna dob prilikom dijagnoze bolesti bolesnika u ovom istraživanju je bila 53 godine. Iako je prosječna životna dob u kojoj se dijagnosticira melanom opala u posljednjih nekoliko desetljeća i sve češće se melanom dijagnosticira u mlađih osoba u dobi od 25-40 godina (10), osobe starije od 40 godina su i dalje najzastupljenija dobna skupina kod novooboljelih s preko 75% (60). Melanom se u djece rijetko pojavljuje tako da je samo 2% novooboljelih mlađe od 20 godina (60). Prosječna starost bolesnika je i dalje veća nego prosječna starost stanovnika u Republici Hrvatskoj (41,7 godina (DZZS, 2017.)), ali prosječna dob bolesnika pripada u najučestaliju dobnu skupinu u Republici Hrvatskoj (DZZS, 2011). U skladu s podacima da se sve češće melanom dijagnosticira u mlađih osoba je i dob najmlađe oboljele osobe u ovom istraživanju koja je imala 12 godina u vrijeme ekscizije.

Dob igra važnu ulogu u nastanku i prisutnosti BRAF mutacije kod pacijenata s melanomom. Usporedba pojavnosti BRAF mutacija s obzirom na dob pacijenata se pokazala statistički značajnom u smislu veće učestalosti mutacija u bolesnika mlađe životne dobi. Rezultat je očekivan, s obzirom na prethodne studije koje su se bavile ovim pitanjem. Prema istraživanju Shinozakija i suradnika, razlika u pojavnosti BRAF mutacija kod pacijenata starijih i mlađih od 60 godina, se pokazala velikom (59). Dob pacijenta je jedan od najbitnijih faktora u nastanku BRAF mutacija. Zabilježena je i iznimno velika frekvencija BRAF mutacija kod pacijenata mlađih od 40 godina, što ukazuje na to da je nastanak mutacije genetski predisponiran (59). Postoji mogućnost da BRAF ima ulogu u diferencijaciji i proliferaciji melanocita u organizmu koji raste i razvija se, stoga mutacije češće zahvaćaju osobe mlađe životne dobi (61). Kod starijih pacijenata s melanomom, postoji velika vjerojatnost da je nastanak istog koreliran s duljinom izloženosti sunčevom zračenju (59). Opaženo je progresivno smanjenje učestalosti BRAF mutacija u starijim dobnim skupinama – u bolesnika starijih od 70 godina samo 25% je bilo pozitivno na BRAF mutacije, dok su kod pacijenata mlađih od 30 godina gotovo svi bili pozitivni (62). Također postoji i razlika u tipu mutacije i dobi pacijenta. Rezultati ovog istraživanja pokazuju veću incidenciju V600E mutacije kod mlađih pacijenata dok su pacijenti s V600K mutacijom značajno stariji što je u skladu s drugim istraživanjima. Istraživanje koje su proveli Menzies i suradnici je pokazalo da su „non-V600E“ mutacije (kao npr. V600K) prisutne u 40% bolesnika starijih od 70 godina i manje od 20% pacijenata mlađih od 50 godina (62).

S obzirom na lokalizaciju melanoma obrađene su četiri skupine: trup, glava i vrat, donji ekstremiteti i gornji ekstremiteti. Bolesnici uključeni u ovo istraživanje imali su primarnu lokalizaciju na trupu u čak 66,9% slučajeva. Prethodna istraživanja pokazuju da obzirom na anatomsku lokalizaciju, melanom na trupu ima vrhunac incidencije u 5. i 6. desetljeću života, a melanom glave i vrata u 8. desetljeću života. Ranije kliničke studije prikazuju veću učestalost melanoma na leđima i ramenima u muškaraca, odnosno na donjim udovima u žena (10). S obzirom da je prosječna starost bolesnika u ovom istraživanju iznosila između 47 i 58 godina (između 5. i 6. desetljeća života) te da su veći postotak oboljelih bili muškarci (58,9%), visok postotak bolesnika u ovom istraživanju s lokalizacijom lezije na trupu je očekivan. Nadalje, zastupljenost melanoma na glavi i vratu iznosi 14,9%. Melanom glave i vrata u prosjeku čini oko 15-20% ukupnog broja melanoma, što je vrlo značajan postotak s obzirom da površina glave i vrata čini tek 9% ukupne površine tijela (63). Ovakav rezultat često se tumači kao dokaz o važnosti intermitentnog izlaganja UV zračenju u patogenezi melanoma (10), što se može i primijeniti na oboljele u ovom istraživanju. Glava i vrat kao mjesta nastanka melanoma su vrlo nepovoljna jer je dosadašnjim istraživanjima dokazano da melanomi glave i vrata imaju zamjetno lošiju prognozu u odnosu na melanome koji su lokalizirani drugdje (60).

Nadalje, jedan od najbitnijih faktora u dijagnozi bolesti, u određivanju opasnosti nastanka melanoma te daljnjoj prognozi bolesti su lokalizacija samog tumora i veličina istoga. Ovo istraživanje je pokazalo

statistički značajnu povezanost lokalizacije tumora i učestalosti BRAF mutacija. Bolesnici s lokalizacijom na glavi i vratu su imali najmanju (15,3%), a bolesnici s lokalizacijom na trupu najveću učestalost BRAF mutacija (61,5%). Ovi rezultati su u skladu sa velikom studijom na 544 bolesnika s melanomom koja je također pokazala statistički značajnu povezanost lokalizacije melanoma sa učestalošću BRAF mutacija, sa najvećom učestalošću BRAF mutacija u bolesnika s melanomom na trupu (59,7%), a najmanjom u bolesnika s melanomom na glavi i vratu (25,0%) (69). Melanom trupa javlja se u mlađoj životnoj dobi (vrhunac u 5. i 6. desetljeću života) kada je veća učestalost javljanja melanoma s mutiranim genom BRAF i veći udio onih s V600E mutacijom među mutiranimima (10) za razliku od melanoma na glavi i vratu koji se javljaju u kasnijoj dobi (8. desetljeće života). Među bolesnicima s mutacijom u genu BRAF, oni s melanomom na trupu su imali nešto češće V600E mutaciju (77,8%) nego bolesnici s melanomom na glavi i vratu (75%), ali nije nađena statistički značajna povezanost između lokalizacije tumora i tipa mutacije (V600E ili V600K). Melanomi na glavi i vratu se razlikuju od melanoma na trupu po tome što su povezani s kroničnim izlaganjem suncu, dok su melanomi na trupu etiološki povezani s povremenim (intermitentnim) izlaganjem sunčevom ultraljubičastom svjetlu. Postoje i druge karakteristike po kojima se melanomi na glavi i vratu tipično razlikuju od onih na trupu kao što su rijetka povezanost s melanocitnim madežima, i javljanje u starijoj životnoj dobi. Sve to ukazuje da se melanomi na glavi i vratu genetski i etiološki razlikuju od melanoma na trupu, što je potvrdilo istraživanje koje je pokazalo da se na temelju analize genetskih promjena mogu razlikovati melanomi povezani s kroničnim sunčevim oštećenjem kože (tipično melanomi glave i vrata) od melanoma bez takvih oštećenja (64). U tom istraživanju su melanomi na koži bez kroničnih oštećenja od sunca (većinom melanomi na trupu) imali BRAF mutaciju u 59% slučajeva dok su melanomi na koži s kroničnim oštećenjima od sunca (uglavnom melanomi na glavi) imali BRAF mutaciju u samo 11% slučajeva, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

Klinička veličina melanoma jedna je od varijabli koja se pokazala statistički značajno povezana s tipom BRAF mutacije. Rezultati su pokazali da je promjena veća kod V600K, a manja kod V600E mutacije. Veličina pigmentirane lezije na koži je bitan parametar pri dijagnosticiranju melanoma. Poznato je da je glavno kliničko obilježje melanoma pigmentirana promjena, koja se kroz vrijeme, od nekoliko mjeseci do godine dana, mijenja. Isto tako je poznato da svaka lezija koja se ističe među drugim promjenama na koži može biti potencijalni melanom (10). Povezanost veličine lezije s tipom BRAF mutacije ukazuje na moguće biološke odnosno genetske promjene povezane s rastom pigmentirane lezije na koži što je povezano s nastankom i progresijom melanoma.

Ovo istraživanje je pokazalo da postoji statistički značajna razlika u učestalosti BRAF mutacija između bolesnika s displastičnim nevusima i onih s melanomom in situ. Ranija istraživanja u kojima se uspoređivala učestalost BRAF mutacija u melanocitnim nevusima i melanomima su dala različite rezultate. Jedno novije istraživanje je pokazalo veću učestalost BRAF mutacija u melanomima in situ nego u displastičnim nevusima, što je slično našim rezultatima (65). Međutim, neka druga istraživanja su pokazala da nema značajne razlike u učestalosti BRAF mutacija između displastičnih nevusa i melanoma (66, 67). Kada smo među bolesnicima analiziranim u našem istraživanju iz statističke obrade isključili one s lentigo maligna melanomom, pokazali smo da nema statistički značajne razlike u učestalosti BRAF mutacija između bolesnika s displastičnim nevusima i onih s melanomom in situ. Ovi rezultati su u skladu s modelom prema kojem je BRAF mutacija rani događaj u progresiji melanoma i povezana je s nastankom melanocitnih nevusa. S druge strane lentigo maligna melanom se razlikuje genetički od melanoma koji su povezani s povremenim (intermitentnim) izlaganjem sunčevom svjetlu pa kod njega BRAF mutacija ima manje važnu ulogu. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s trenutnim razumijevanjem uloge BRAF mutacija koje mogu potaknuti nekontroliranu proliferaciju melanocita i nastanak nevusa, ali same nisu dovoljne za nastanak melanoma. Udio displastičnih nevusa sa mutiranim BRAF genom u našem

istraživanju (58,5%) je sličan postotku dobivenom u drugim istraživanjima ($\approx 60\%$), što je niži postotak od postotka BRAF mutiranih običnih nevusa ($\approx 80\%$). (68). Na taj način naši rezultati doprinose rasvjetljavanju nejasne uloge displastičnih nevusa kao prekursorskih lezija u nastanku melanoma govoreći u prilog modelu po kojem su displastični nevusi poseban entitet i ne nastaju nužno iz običnih nevusa.

U ovom istraživanju je kod čak 88,7% pacijenata s displastičnim nevusom i BRAF mutacijom bio prisutan V600E tip mutacije, dok je kod melanoma *in situ* među onima s BRAF mutacijom u 48% slučajeva bio prisutan V600E, a u 52% V600K tip mutacije. Kao što je već prethodno navedeno, V600E mutacije su uglavnom karakteristične za mlađu populaciju (<40 godina u prosjeku). Korelacija ja očita između displastičnih nevusa i V600E tipa mutacije i za pretpostaviti je da su oba faktora usko vezana za životnu dob, tj. karakteristična za pacijente mlađe životne dobi (<40 godina) i s toga je visok postotak pojavnosti V600E mutacije u displastičnom nevusu. S druge strane, melanom *in situ* u preko 70% slučajeva se razvija kao posljedica izloženosti UV zračenju. S obzirom da se razvija kao posljedica izloženosti UV zračenju, za pretpostaviti je da melanom *in situ* ne ovisi samo o genetskoj predispoziciji, nego i o vanjskim i okolišnim faktorima. Stoga se razvija u kasnijoj dobi što se i vidi prisustvom V600K mutacije (u 52% slučajeva) za koju je već gore navedeno da je uglavnom karakteristična za pacijente starije životne dobi (62). Možemo tvrditi da postoji poveznica između životne dobi, dijagnoze i tipa BRAF mutacije jer se pokazalo, kao što je navedeno i u literaturi, da je češća pojava V600E mutacije u mlađoj, a V600K u starijoj životnoj dobi.

Rezultati ovog istraživanja otvaraju vrata nastavku daljnjih znanstvenih istraživanja na području nastanka melanoma i povezanosti nastanka i razvoja melanoma s BRAF mutacijama što je važno za razumijevanje etiopatogeneze melanoma. U etiopatogenezi melanoma, kao i kod drugih zloćudnih tumora, dvije skupine čimbenika su od vrlo velike važnosti: čimbenici domaćina i okolišni čimbenici. Od čimbenika domaćina treba izdvojiti genske mutacije kao vrlo važan čimbenik, dok od okolišnih je to UV zračenje (10). Obiteljska anamneza pozitivna je za 10-15% bolesnika s melanomom. Osobe, kod kojih jedan bliski rođak ima dijagnosticiran melanom, imaju dvostruko veću šansu za razvoj melanoma, a ako je dijagnosticiran kod tri ili više rođaka, šansa se penje na 100% (69, 70). Povećani rizik od razvoja melanoma može se promatrati u odnosu na prisutnost, broj i vrstu nevusa (10). Osobe koje imaju velik broj nevusa (pogotovo više od 100) imaju povećan rizik od melanoma (10). Genetika i genske mutacije su vrlo bitne u nastanku melanoma i usko su vezane uz njegovu etiologiju. Dva gena su od posebne važnosti: *CDKN2A* i *CDK4* (71). Bitne anomalije koje se nalaze u melanomima su zabilježene i u genima *NRAS*, *APAF-1*, *PTEN*, *TP53* te *BRAF* (72). Otkriće BRAF mutacije je značajno unaprijedilo razumijevanje bolesti. Rezultate ovog istraživanja usmjerenog na *BRAF* gen bi trebalo proširiti budućim istraživanjima koje će ove rezultate smjestiti u kompleksniji genetski kontekst nastanka melanoma i uloge displastičnih nevusa kao potencijalnih prekursora melanoma. Ta istraživanja bi trebala uključiti druge gene koji potencijalno sudjeluju u cijeloj biokemijskoj kaskadi nastanka melanoma (*MEK*, *MAPK*, *RAS*, itd.) jer sam *BRAF* gen nije dovoljan onkogeni pokretač, nego u kombinaciji s mutacijama drugim genima dovodi do nastanka melanoma. U tome smislu se daljnja istraživanja trebaju bazirati na odnosu ovih gena i važnosti svakog pojedinog u nastanku melanoma.

Doprinos ovog istraživanja je i u analizi i objašnjenju učestalosti različitih vrsta BRAF mutacija kod displastičnih nevusa i melanoma *in situ*. Gen *BRAF* je mutiran u više od 50% slučajeva melanoma (73), a među mutacijama su najčešće V600E (u 73 do 91% slučajeva) i V600K (7 do 20%) (62, 74, 75). Definiranje podvrsta BRAF mutacije ima važno epidemiološko značenje.

Osim u razumijevanju etiopatogeneze melanoma, rezultati ovih istraživanja imaju i moguću primjenu u liječenju melanoma. Selektivni BRAF inhibitori (vemurafenib, dabrafenib) i MEK inhibitori (trametinib, kobimetinib) su danas standard u liječenju metastatskog melanoma. U kontekstu ove terapije, određivanje BRAF mutacija je nužan korak kojeg treba napraviti prije donošenja odluka o liječenju bolesnika (10). Međutim, još postoje nepoznanice vezane uz terapijski odgovor i rezistenciju na ove lijekove. Re-

zultati ovog istraživanja, posebno u smislu određivanju povezanosti između V600 mutacija BRAF gena i različitih anamnestičkih, kliničkih i patohistoloških varijabli mogu imati primjenu u osmišljavanju novih istraživanja s ciljem boljeg odabira bolesnika za liječenje BRAF i MEK inhibitorima.

7 ZAKLJUČCI

- 1) Nije nađena značajna razlika u učestalosti BRAF mutacija između bolesnika s displastičnim nevusima i bolesnika s melanomom *in situ* ($p=0,371$).
- 2) Bolesnici s lentigo maligna su imali značajno manju učestalost BRAF mutacija od bolesnika s displastičnim nevusima i onih s melanomom *in situ* (3,6%).
- 3) Nađena je značajna razlika u distribuciji BRAF mutacija s obzirom na tip (V600E ili V600K) između bolesnika s displastičnim nevusima i bolesnika s melanomom *in situ* ($p=0,0002$). U bolesnika s displastičnim nevusima češća je bila V600E mutacija dok je kod bolesnika s melanomom *in situ* češća bila V600K mutacija.
- 4) Nađena je značajna povezanost učestalosti BRAF mutacije i lokalizacije tumora ($p=0,0001$). Bolesnici s melanomom na trupu su imali najveću učestalost BRAF mutacija, dok su bolesnici s melanomom na glavi imali najmanju. Nije nađena razlika u distribuciji BRAF mutacija s obzirom na tip (V600E ili V600K) između bolesnika s različitom lokalizacijom tumora.
- 5) Nađena je značajna povezanost dobi bolesnika i prisutnosti BRAF mutacije te dobi bolesnika i tipa BRAF mutacije (V600E ili V600K) ($p=0,0001$). Bolesnici s BRAF mutacijom su bili značajno mlađi od bolesnika bez BRAF mutacije. V600E mutacija je bila više zastupljena u mlađih bolesnika, a V600K u starijih.
- 6) Nije nađena značajna razlika u učestalosti BRAF mutacija ($p=0,104$), niti u distribuciji BRAF mutacija s obzirom na tip (V600E ili V600K) između bolesnika ženskog i muškog spola ($p=0,298$).
- 7) Nije nađena značajna povezanost prisutnosti BRAF mutacije sa veličinom tumora i prethodnom dijagnozom melanoma ($p=0,856$).

8 SAŽETAK

Mutacije u genu BRAF su česte u melanomima i predstavljaju rani onkogeni događaj u njihovom nastanku. Ideja ovog istraživanja je da analiza BRAF mutacija u uzorcima displastičnih nevusa i melanoma *in situ* može pomoći u rasvjetljavanju zasad nejasne uloge displastičnih nevusa kao mogućih prekursor-skih lezija melanoma. Ciljevi istraživanja bili su odrediti i međusobno usporediti učestalost mutacija gena BRAF u displastičnim nevusima i melanomima *in situ* te odrediti postoji li povezanost između prisutnosti mutacija gena BRAF i različitih anamnestičkih, kliničkih i patohistoloških varijabli. U istraživanje je bilo uključeno ukupno 175 bolesnika, 106 bolesnika s displastičnim nevusima, 41 bolesnik s melanomom *in situ* i 28 bolesnika s lentigo maligna melanomom. Svim bolesnicima je izdvojena DNA iz uzoraka tkiva uklopljenog u parafin i analizirana metodom kompetitivne alel-specifične TaqMan lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu kako bi se odredila prisutnost BRAF V600E i V600K mutacija. Dobiveni podaci o mutacijama uspoređeni su s anamnestičkim, kliničkim i patohistološkim podacima primjenom odgovarajućih statističkih metoda. Od ukupno 175 bolesnika, u njih 87 (49,7%) je nađena BRAF mutacija: u 68 (38,9%) bolesnika V600E, a u 20 (11,4%) bolesnika V600K. Nije nađena statistički značajna razlika u prisutnosti BRAF mutacije između bolesnika s displastičnim nevusima (58,5% mutiranih) i onih s melanomom *in situ* (60,9% mutiranih) ($p=0,371$). U bolesnika s displastičnim nevusima značajno češća je bila V600E mutacija (89% bolesnika s mutacijom) dok je kod bolesnika s melanomom *in situ* češća bila V600K mutacija (52% bolesnika s mutacijom). Nađena je statistički značajna povezanost prisutnosti BRAF mutacija sa lokalizacijom tumora i dobi bolesnika ($p=0,0001$). Bolesnici s mutacijom su bili mlađi od bolesnika bez mutacije. Nije nađena statistički značajna povezanost prisutnosti BRAF mutacija sa spolom ($p=0,104$), veličinom tumora ($p=0,404$), ni prethodnom dijagnozom melanoma ($p=0,856$). Rezultati ovog istraživanja govore u prilog uloge BRAF mutacije u displastičnom nevusu kao važnog, ali samog po sebi nedovoljnog onkogenog pokretača u nastanku melanoma. U tom smislu ovo istraživanje predstavlja doprinos boljem razumijevanju etiopatogeneze melanoma i uloge displastičnih nevusa kao mogućih prekursorskih lezija.

9 SUMMARY

Mutations in the BRAF gene are common in melanomas and represent an early oncogenic event at their occurrence. The idea of this study is that the BRAF mutation analysis in samples of dysplastic nevi and melanoma *in situ* may help enlighten the unclear role of dysplastic nevi as precursor melanoma lesions. The objectives of the study were to determine and compare the frequency of BRAF gene mutations in dysplastic nevi and melanomas *in situ* and determine whether there is a correlation between the presence of BRAF gene mutations and various anamnestic, clinical and pathohistological variables. A total of 175 patients, i.e. 106 patients with dysplastic nevi, 41 patients with melanoma *in situ* and 28 patients with lentigo maligna melanoma, were included in the study. DNA has been extracted from tissue samples of all patients embedded in paraffin and analyzed using the competitive allele-specific TaqMan polymerase chain reaction in real time, all in order to determine the presence of BRAF V600E and V600K mutations. The obtained mutation data were compared with anamnestic, clinical and pathohistological data using appropriate statistical methods. Out of a total of 175 patients, BRAF mutation was found in 87 patients (49.7%): 68 (38.9%) patients with V600E and 20 (11.4%) patients with V600K. There was no statistically significant difference in the presence of BRAF mutation in patients with dysplastic nevi (58.5% of mutated) and those with melanoma *in situ* (60.9% of mutated) ($p=0,371$). In patients with dysplastic nevi, V600E mutation was significantly more common (89% of patients with mutation), while the V600K mutation was more common in patients with melanoma *in situ* (52% of patients with mutation). There was a statistically significant connection between the presence of BRAF mutations, tumor localization and the age of the patient ($p=0,0001$). Patients with mutation were younger than patients without mutations. No statistically significant connection between the presence of BRAF mutation and sex ($p=0,104$), tumor size ($p=0,404$), or previous melanoma diagnosis ($p=0,856$) has been found. The results of this study imply that BRAF mutations in dysplastic nevi have an important, but in itself insufficient, role in triggering malignant transformation and onset of melanoma. In this respect, this research is a contribution to a better understanding of the etiopathogenesis of melanoma and the role of dysplastic nevi as precursor lesions.

10 LITERATURA

- (1) McLeod GR, Davis NC, Sober AJ. A history of melanoma. From Hunter to Clark. U: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, ur. *Cutaneous Melanoma*. 4. izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing Inc. 2003; 1-12.
- (2) Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions: The B-K mole syndrome. *Arch dermatol*. 1978; 114: 732-8.
- (3) McGovern VJ. Epidemiological aspects of melanoma: a review. *Pathology* 1977;9: 233-41.
- (4) McGovern VJ. *Melanoma: Histological Diagnosis and Prognosis*. 1. izd. New York: Raven Press; 1983.
- (5) Breslow A, Cascinelli N, van der Esch EP, Morabito A. Stage I melanoma of the limbs: assessment of prognosis by levels of invasion and maximum thickness. *Tumori*. 1978;64:273-84.
- (6) Breslow A, Macht SD. Optimal size of resection margin for thin cutaneous melanoma. *Surg Gynecol Obstet*. 1977;145:691-2.
- (7) Cahn LR. Some notes on Sir Jonathan Hutchinson (1828-1913). *Am J Surg Pathol*. 1979;3:563-6.
- (8) Clark Jr WH, Elder DE, Guerry IV D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, i sur. Model predicting survival outcome in stage I melanoma based on tumor progression and multi-variable logistic regression. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:1893-904.
- (9) Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, i sur. *Melanoma Nat Rev Dis Prim* 2015;1:1-20.
- (10) Šitum M. *Melanom, udžbenik i atlas*. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Medicinska naklada, Zagreb; 2016.
- (11) Barbarić J, Znaor A. Incidence and mortality trends of melanoma in Croatia. *Croat Med J*. 2012;53:135-40.
- (12) Erdman F, Lortet-Tieurent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, i sur. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer*. 2013;132:385-400.
- (13) Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Registar za rak Republike Hrvatske, Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Bilten broj 40. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2018. 35 pp.
- (14) Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997;73:198-203.
- (15) Ting W, Schultz K, Cac NN, Peterson M, Walling HW. Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. *Int J Dermatol*. 2007;46:1253-7.
- (16) Geller AC, Clapp RW, Sober AJ, Gonsalves L, Mueller L, Christiansen CL, i sur. Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor registry. *J Clin Oncol*. 2013;31:4172-4178.
- (17) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*, 5th edition. Garland Science, England. 2008. 1392 pp.
- (18) Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007;445:851-857.

- (19) Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2014;28:437-453.
- (20) Bennett DC. Mechanisms of differentiation in melanoma cells and melanocytes. *Environ Health Perspect*. 1989;80:49-59.
- (21) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Osnove histologije*. Školska knjiga, Zagreb 1999, 7. izdanje.
- (22) Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355:51-65.
- (23) Anderson CM, Tabacof J, Legha SS. Malignant melanoma: biology, diagnosis and management. *Med Oncol*. 1995;493-509.
- (24) Tsao H, Chin H, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev*. 2012;26:1131-1155.
- (25) Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol*. 2009;27:46-52.
- (26) Vučić M, Tomas D, Krušlin B. Patohistološka slika melanoma kože. U: Šitum M, ur. *Melanom*. Zagreb: Medicinska naklada, 2016. str. 167-179.
- (27) Abildgaard C, Guldberg P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol Med*. 2015;xx:1-8.
- (28) Azoury SC, Lange JR. Epidemiology, risk factors, prevention and early detection of melanoma. *Surg Clin N Am*. 2014;94:945-962.
- (29) Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016;37:1-14.
- (30) Smoller BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2006;19:34-40. (33)
- (31) Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag K i sur. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. *Eur J Cancer*. 2012;48:2375-2390.
- (32) Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9:239-271. (49)
- (33) Roskoski Jr. R. RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399:313-317.
- (34) Michaloglou C, Vredeveld LCW, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF^{V600E} in benign and malignant human tumors. *Oncogene*. 2008;27:877-895.
- (35) Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Conde E, i sur. Comparison of testing methods for detection of BRAF V600E mutations in malignant melanoma: Pre-approval validation study of the companion diagnostic test for Vemurafenib. *PloS One*. 2013;8(1):e53733.
- (36) Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, i sur. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:873-886.
- (37) Sullivan RJ, Flatherty KT. BRAF in melanoma: Pathogenesis, diagnosis, inhibition and resistance. *J Skin Cancer*. 2011;2011:423239.
- (38) Sauter ER, Herlyn M. Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol Carcinog*. 1998;23:132-143.
- (39) Gibney GT, Messina JL, Fedorenko IV, Sondak VK, Smalley KS. Paradoxical oncogenesis-the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(7):390-9.
- (40) Gonzales D, Fearfield L, Nathan P, Taniere P, Wallace A, Brown E, i sur. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma recommendations from an expert panel. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):700-7.

- (41) Ihle MA, Fassunke J, König K, Grunewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, i sur. Comparison of high resolutionmelting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to convetional Sanger seguencing for detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. BMC Cancer. 2014;14:13.
- (42) Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Conde E, i sur. Comparison of testing methods for the detection of BRAF V600E mutations in malignant melanoma: pre-approval validation study of the companion diagnostic test for vemurafenib. PLoSOne. 2013;8(1):e53733.
- (43) Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, i sur. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. J Mol Diagn.2013;15(1):94-100.
- (44) Halait H, Demartin K, Shah S, Soviero S, Langland R, Cheng S, i sur. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. Diagn Mol Pathol. 2012;21(1):1-8.
- (45) McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, i sur. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. Lancet Oncol. 2014;15(3):323-32.
- (46) Chiappetta C, Proietti I, Soccodato V, Puggioni C, Zaralli R, Pacini L, i sur. BRAF and NRAS mutations are heterogeneous and not mutually exclusive in nodular melanoma. Appl imunohistochem Mol Morphol. 2015;23(3):172-7.
- (47) Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, i sur. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. J Clin Oncol.2012;30(20):2522-9.
- (48) Heinzerling L, Baiter M, Kühnapfel S, Schuler G, Keikavoussi P, Agaimy A, i sur. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. Br J Cancer. 2013;109(11):2833-41.
- (49) Menzies AM, Lum T, Wilmott JS, Hyman J, Kefford RF, Thompson JF, i sur. Inpatient homogeneity of BRAFV600E expression in melanoma. Am J Surg Pathol. 2014;38(3):377-82.
- (50) Boursault L, Haddad V, Vergier B, Cappellen D, Verdon S, Bellocq JP, i sur. Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing. PLoSOne. 2013;8(8):e70826.
- (51) Jurowska M, Gos A, Ptaszynski K, Michej W, Tysarowski A, Zub R, i sur. Comparisom between two widely used laboratory methods in BRAF V600 mutation detection in a large cohort of clinical samples of cutaneous melanoma metastazes to the lymph nodes. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(7):8487-8493.
- (52) Mullane MP. The molecular biology and treatment of malignant melanoma with BRAFV600 mutations. J Patient-Centered Res Rev. 2014;1(1):21-26.
- (53) Holdrefield M, Deuker M, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. Nat Rev Cancer. 2014;14:455-467.
- (54) TIBCO Software Inc. Statistica (data analysis software system), version 13. 2018. Dostupno na: <http://tibco.com>.
- (55) Goldstein AM, Margaret AT. Dysplastic Nevi and Melanoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013; 22(4):528-532.

- (56) Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Paquini P, Picconi O, Boyle P, i sur. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005; 41:45-60.
- (57) Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Archives of dermatology*. 2003; 139:282-8.
- (58) Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, i sur. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33:19-20.
- (59) Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DSB. Incidence of BRAF Oncogene Mutation and Clinical Relevance for Primary Cutaneous Melanomas. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:1753-1757.
- (60) Ivkić M, Bedeković V. Melanom glave i vrata. U: Šitum M, ur. *Melanom*. Zagreb: Medicinska naklada, 2016. str. 84-121.
- (61) Bauer J, Büttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT, i sur. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011; 24(2): 345-351.
- (62) Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, i sur. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18:3242-9.
- (63) Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ. *Cutaneous melanoma*. 4. izdanje. St. Louis: Quality Medical Publishing, Inc.; 2003. str.538.
- (64) Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, i sur. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-47.
- (65) Mackiewicz-Wysocka M, Czerwińska P, Filas V, Bogajewska E, Kubicka A, Przybyła A, i sur. Oncogenic BRAF Mutations and P16 Expression in Melanocytic Nevi and Melanoma in the Polish Population. *Postepy Dermatol Alergol*, 2017;34(5):490-498.
- (66) Tschandl P, Berghoff AS, Preusser M, Burgstaller-Muehlbacher S, Pehamberger H, Okamoto I, i sur. NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi. *PLoS One*. 2013;8(7):e69639.
- (67) Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, i sur. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33(1):19-20.
- (68) Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*. 2017;36(42):5771-5792.
- (69) Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014 Jan; 170(1):11-9.
- (70) Roesch A, Volkenandt M. *Melanoma*. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, Braun-Falco O, ur. *Braun-Falco's Dermatology*. 3rd, completely rev.edt. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009. str.1416-32.
- (71) Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malvehy J, i sur. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med*. 2015,3(15): 210.
- (75) MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009;6:1-7.
- (73) Solit D, Sawyers CL. How melanomas bypass new therapy. *Nature*. 2010;468:902.
- (74) Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, i sur. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:2522-9.

(75) Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, et al. Prognostic and clinicopathologic association of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011;29:1239-46.

11 ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Splitu 24. lipnja 1984. Godine gdje sam završila osnovnu školu i 1. jezičnu gimnaziju. 2003. godine sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 2009. godine na istom fakultetu, te sam 2010. godine odradila obavezni pripravnički staž doktora medicine pri DZ Splitsko-Dalmatinske županije te sam iste godine položila stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske. U veljači 2011. započela sam specijalizantski staž iz dermatologije i venerologije na Klinici za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice tijekom kojeg sam 2012.-2013. godine odslušala Stručni poslijediplomski studij iz dermatovenerologije. Iste akademske godine sam upisala poslijediplomski doktorski studij «Biomedicina i zdravstvo» Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit sam položila 12.03.2015. godine i od tada sam zaposlena kao specijalist dermatologije i venerologije u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice. Do sada sam kao autor i koautor objavila 20 članaka u znanstvenim časopisima i oko tridesetak kongresnih priopćenja u knjigama sažetaka. U Školi za medicinske sestre Mlinarska održavala sam nastavni plan iz dermatovenerologije i sudjelovala u organizaciji kongresa i simpozija Klinike za kožne i spolne bolesti KBC Sestre milosrdnice. Pohađala sam brojne tečajeve edukacije dermatovenerologije u organizaciji Europske Akademije dermatovenerologa (EADV) te sam dobitnica stipendije za specijalizante dermatovenerologije EADV-a. Aktivno se služim engleskim i talijanskim jezikom. Udana sam i majka sam dvoje djece. Članica sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog katoličkog liječničkog društva, te Europske Akademije dermatologije i venerologije (EADV).