Kliničko-patološki čimbenici i značajke staničnog ciklusa u predviđanju ishoda melanoma kože

Nola, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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:105:674186

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Središnja medicinska knjižnica

Nola, Ivana (2005) *Kliničko-patološki čimbenici i značajke staničnog ciklusa u predviđanju ishoda melanoma kože.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

http://medlib.mef.hr/165

University of Zagreb Medical School Repository

http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

IVANA NOLA

KLINIČKO-PATOLOŠKI ČIMBENICI I ZNAČAJKE STANIČNOG CIKLUSA U PREDVIĐANJU ISHODA MELANOMA KOŽE

DOKTORSKA DISERTACIJA

ZAGREB, 2005.

Istraživanje je provedeno u Klinici za tumore u Zagrebu i u Laboratoriju za protočnu citometriju Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Viktor Šeparović

ZAHVALE

Prof. dr. sc. Viktoru Šeparoviću, mojem mentoru, hvala na pomoći i strpljenju u svakom trenutku.

Gdjici Jasni Hađasija hvala na pomoći u prikupljanju podataka.

Gđi Ani Kocijan, tehničarki odjela za patologiju i citologiju Klinike za tumore, hvala na perfekcionizmu u izradi imunohistokemijskih preparata.

Dipl ing. Ivani Tomičić hvala na analizi podataka protočnim citometrom.

Iskreno zahvaljujem doc. dr. sci. Anji Jazbec, na pomoći pri statističkoj obradi podataka i neprocjenjivim savjetima u interpretaciji istih.

Mojim roditeljima hvala na beskrajnom strpljenju i pomoći koju mi i dalje nesebično pružaju.

Mojem suprugu neizmjerno hvala na razumijevanju i podržci u svakom trenutku.

Mojim sinovima koji su proživljavali izradu ovog rada, veliko hvala.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD

1.1 Definicija malignog melanoma	1
1.2 Biologija melanocita	1
1.3 Epidemilologija malignog melanoma	2
1.4 Etiologija malignog melanoma	3
1.5 Klinička slika i prekursori malignog melanoma	4
1.6 Patohistologija malignog melanoma	6
1.7 Imunohostokemija malignog melanoma	13
1.8 Stadiji malignog melanoma	14
1.9 Prognostički čimbenici kod malignog melanoma	16
1.10 Protočnocitometrijski prognostički parametri	19
1.11 Modaliteti liječenja malignog melanoma	25

2. CILJEVI RADA	29
3. MATERIJALI I METODE	30
3.1 Priprema uzorka za protočnu citometriju	32
3.2 Analiza rezultata protočne citometrije	32
3.3 Statističke metode	33
4. REZULTATI	35
5. RASPRAVA	58
6. ZAKLJUČCI	64
7. SAŽETAK	66
8. SUMMARY	68
9. LITERATURA	70
10. ŽIVOTOPIS	80

POPIS OZNAKA I KRATICA

MM	maligni melanom
DNA	deoksirubonukleinska kiselina (engl. deoxyrobonucleic acid)
DN	displastični nevus
LM	lentigo maligna
SSM	površinsko šireći melanom (engl. superfitial spreading melanoma)
MN	nodularni melanom (engl. melanoma nodulare)
ALM	akrolentiginozni melanom
LMM	lentigo maligni melanom
S-100 protein	antigen (bjelančevina) izražena u novotvorevinama porijekla iz neuroektoderma
HMB-45 antigen	HMB-45, engl.; bjelančevina izražena u melanomu, vezana uz melanosome
NKI/beteb	glikoprotein 100-107
NKI-C3	glikoprotein 25-110
Bcl-2	onkogen prvi puta opisan u limfomu B limfocita (engl. B-cell lymphoma-2)
PCNA	proliferirajući antigen jezgre (engl. proliferating cell nuclear antigen)
AJCC	američko udruženje za stupnjevanje karcinoma (engl. American Joint Comitee on Cancer staiging)
SLN	limfni čvor stražar (engl. sentinel lymph node)
SLNB	biopsija limfnog čvora stražara (engl. sentinel lymph node biopsio)

1. UVOD

1.1 Definicija malignog melanoma

Maligni melanom (MM) je zloćudni tumor kože, podrijetla iz melanocita. Naziv potječe od pigmenta melanina, koji je prisutan u velikom broju slučajeva. Klinički se očituje na različite načine i razlikuje se u boji, od hiperpigmentiranih do amelanotičnih promjena (1-4). Karakterizira ga lokalna agresivnost i sklonost ranom limfogenom i/ili hematogenom metastaziranju (5,6).

Većina bolesnika s primarnim MM uspješno se liječi kirurškim odstranjenjem primarnog tumora. Bolje preživljenje, koje se bilježi posljednjih godina, rezultat je ranije dijagnoze, boljeg razumijevanja biologije ovog tumora i određivanja prognostičkih čimbenika za bolesnike s primarnim MM (7).

Terapija MM prvenstveno se provodi kirurški. Ostali oblici terapije koji uključuju kemoterapiju, radioterapiju i imunoterapiju primijenjuju se rjeđe, ovisno o stadiju bolesti (8), dok je bioterapija još u fazi istraživanja (9).

1.2 Biologija melanocita

Prekursori melanocita su melanoblasti, koji migriraju u prvom trimestru embrionalnog razvoja iz neuralnog grebena i nastanjuju kožu, meninge, oko, limfne žlijezde, ektodermalnu sluznicu respiratornog i probavnog sustava (10). Diferencijacija melanoblasta u koži za vrijeme embrionalnog i neonatalnog razvoja dovodi do stvaranja dedritičnih, tamno pigmentiranih, zrelih melanocita. Potpuno diferencirani melanociti zadržavaju se u predjelu bazalne membrane epidermisa i sintetiziraju pigment melanin u melanosomima pod utjecajem enzima

tirozinaze (10,11). Melanin služi kao zaštita od štetnog utjecaja ultravioletnog zračenja (engl. ultraviolet radiation, UVR). Jačina pigmentacije kože ne ovisi o broju melanocita, nego o njihovoj mogućnosti produkcije melanina (10).

1.3 Epidemiologija malignog melanoma

MM čini približno 2 do 3% svih zloćudnih tumora i uzrokuje 1 do 2% ukupnog mortaliteta od malignih bolesti (12).

Epidemiološke studije o učestalosti MM pokazuju da se broj oboljelih uvelike razlikuje prema geografskom položaju. Tako je u području Australije i Novog Zelanda 10 puta više bolesnika nego u Europi, što je u izravnoj vezi s oštećenjem ozonskog zaštitnog omotača koji filtrira UV zračenje. Incidencija i mortalitet stalno su u porastu (13-16).

U Europi najveća učestalost zabilježena je u Norveškoj, Danskoj i Švedskoj (porast incidencije MM s 2,5 na 100 000 stanovnika 1958. na 11,6 na 100 000 stanovnika 1980. godine, dok je niža incidencija zabilježena u Poljskoj, Rumunjskoj, Bugarskoj, Sloveniji i Hrvatskoj (17-19). U Hrvatskoj je incidencija za muškarce 5,9, a za žene 4,7 na 100 000 stanovnika. Od svih zloćudnih tumora, udio MM u incidenciji je 1,6 % za muškarce i 1,5 % za žene (20).

MM se uglavnom javlja između 20. i 60. godine života, s vrhom incidencije u 5. desetljeću (2,4). Izuzetno rijetko se javlja u dječjoj dobi (21). Displastični nevusi osobito u obitelji s obiteljskim MM povećavaju rizik melanoma u djece (22,23).

S obzirom na spol, na temelju proučavanja u Europi, MM dva je puta češći kod žena nego kod muškaraca, dok je u većini američkih studija taj odnos 1:1 (12).

Opsežni epidemiološki podaci podupiru negativnu korelaciju između stupnja pigmentacije i rizika razvoja MM. Stoga se MM češće javlja u osoba svjetle kože, plavih očiju i plave ili crvene kose (24,25). U

osoba s albinizmom, zbog nedostatka pigmenta rizik pojave nemelanomskog karcinoma kože je viši, osobito planocelularnog, u usporedbi s rizikom pojave melanoma (26,27).

Incidencija MM je približno deset puta veća u bjelaca nego u crnaca koji žive na istom području (13).

Uočeno je da se 75% MM pojavljuje na otkrivenim dijelovima kože, te da pojedina anatomska mjesta pokazuju veću sklonost razvoja ovog tumora među različitim etničkim skupinama. Najčešća lokalizacija MM kod muškaraca bijele rase su trup, gornji ekstremiteti, glava i vrat, a kod žena leđa, potkoljenice, gornji ekstremiteti, glava i vrat (3,4,28). Kod pripadnika crne i žute rase, MM se češće javlja na tabanima, mukoznim membranama, stopalima i noktima. Točan razlog češćeg razvoja MM na akralnim mjestima u pripadnika crne rase nije još utvrđen (4,29,30).

1.4 Etiologija malignog melanoma

MM nastaje kao rezultat maligne transformacije melanocita ili alteracije nevus stanica u prekursorskim lezijama. Takve promjene najčešće se zbivaju u kongenitalnom i displastičkom nevusu, u lentigo maligna ili melanocitnom plavom nevusu. Vrlo rijetko MM nastaje alteracijom visceralno smještenih melanocita (31-34).

Kako do danas nije poznat pravi uzrok MM, postoje brojne hipoteze koje pokušavaju dovesti u uzročnu vezu taj tumor i određene endogene ili egzogene čimbenike (15,17,18,31-34). Među egzogenim čimbenicima možemo navesti UVR, oštećenje ozonskog sloja, onkogene viruse, kemikalije, lijekove te još nerazjašnjenu ulogu traume (6,13,15,31). Izloženost UVR smatra se glavnim rizičnim čimbenikom u razvoju MM (33), bazocelularnog i planocelularnog karcinoma kože (26,27). Uloga UVB u patogenezi karcinoma kože je dokazana u brojnim epidemiološkim studijama, kao i u eksperimentalnoj fotokarcinogenezi (34,35). Naime, melanin apsorbira UVR u melanocitima, a oslobođena energija otpušta slobodne radikale koji dovode do mutacija na uzvojnici

deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic adic, DNA) (14,28,31,36). Čini se da je izlaganje suncu jakog intenziteta unutar prvih deset godina života od izuzetnog značaja. Ukupan broj nevusa je također jedan od najjačih rizičnih faktora za razvoj MM (31). Prvi korak nakon stečene mutacije u DNA uslijed djelovanja UV svjetla je stvaranje benignih promjena, tj. nevusa. Valja spomenuti i utjecaj umjetnog UV svjetla, koje se koristi u terapijske i u kozmetske svrhe, a kao mogućeg etiološkog čimbenika u nastanku MM (37,38).

U etiologiji MM navedeni su retrovirusi i papiloma virusi, no bez dovoljno potkrepljujućih dokaza. Profesionalna izloženost kemikalijama kao što su poliklorinati i polivinilklorid također predstavlja povećani rizik za razvoja MM (31).

Unatoč ranijem mišljenju, prema današnjim saznanjima, nije se uočio utjecaj oralnih kontraceptiva ili nadomjesnih estrogena u nastanku MM kao niti utjecaj na petogodišnje preživljenje (39).

Uočeno je da nasljeđe ima također određenu ulogu u razvoju MM. Udio bolesnika s anamnestičkim podatkom o MM u obitelji u ukupnom broju bolesnika s melanomom iznosi 8-12% (40).

Prema tome čimbenici povećanog rizika za razvoj MM su prvenstveno prisutnost brojnih nevusa osobito displastičnih nevusa (41), sklonost pojavi sunčevih pjega (42), podatak o jakom “izgaranju” na suncu ili intermitentnom izlaganju jakom suncu (43), intenzivno izlaganje suncu prije desete godine života (14,36), podatak o postojanju MM u obitelji (40,41) i svijetla put (24).

1.5 Klinička slika i prekursori malignog melanoma kože

Rane lezije MM obično karakterizira izgled nepravilnog, tamno pigmentiranog plaka ili makule. S vremenom dolazi do pojave papule ili čvora, što označava prodiranje stanica melanoma u dublje dijelove dermisa. Sekundarne promjene unutar MM koje se odnose na pojavu

erozije, ulceracije, kruste, krvarenja pridonose raznolikosti kliničke slike. Stoga nema klinički tipičnog MM (44).

MM kože može se razviti na prethodno nepromijenjenoj koži ili iz prekursorskih lezija koje uključuju kongenitalne i stečene melanocitne nevuse, displastične nevuse (DN) i lentigo maligna (LM), a vrlo rijetko može nastati i iz melanocitnog plavog nevusa i kod xeroderma pigmentosum (2-4,41,45).

Kongenitalni melanocitni nevusi su prisutni kod rođenja, dok stečeni melanocitni nevusi nastaju u tijeku života (3,4).

DN su pigmentirane lezije kože građene od nevus stanica. Kliničke osobine DN su nejednolika pigmentacija, nepravilan oblik, neoštri rubovi prema zdravoj koži, promjera su većeg od 5 mm. Karakterizira ih ne samo klinička, već i histološka atipija. Histološki nevus stanice su poligonalnog izgleda, također izlučuju melanin, ali nisu prisutne u koži svih ljudi. Najčešće su nasljedno uvjetovane, makar se javljaju i sporadično (3). Incidencija pojavnosti sporadičnih DN u populaciji je 5-10%. U osoba sa više od šest DN postoji statistički potvrđen porast incidencije MM. DN zapaženi su u obiteljima s visokom incidencijom MM, iako se mogu javiti i nevezano za pozitivnu obiteljski anamnezu (41).

Danas se govori i o biljezima MM koji se odnose prvenstveno na fenotip bolesnika. Uočilo se da je rizik pojave MM u osoba svijetle kose čak do sedam puta veći u usporedbi s osobama crne kose, skoro četiri puta veći u osoba svjetlo smeđe kose i dva puta češći u osoba smeđe kose (46).

Svjetska zdravstvena organizacija postavila je osnovne kriterije, na temelju pet glavnih simptoma pri promjeni nevusa u melanom, poznatih kao ABCDE simptomi, koji označavaju asimetriju, nepravilnost rubova, nejednolikost boje, promjer i uzdignutost pigmentirane lezije, a dobiveni su na temelju akronima engleskih riječi (A - asymmetry, B - border irregularitiy, C - color variegation, D - diameter, E - elevation) (3).

Pri pregledu bolesnika s pigmentirantnim lezijama kože svakako treba odgovoriti na dva osnovna pitanja. Prvo, da li bolesnik ima

suspektnu pigmentiranu leziju, te drugo, koji je rizik od razvoja MM kod tog bolesnika u budućnosti (47). Stoga svaku suspektnu pigmentiranu kožnu leziju valja kirurški odstraniti u cjelosti i histološki verificirati (48).

1.6 Patohistologija malignog melanoma kože

Histopatološka analiza pruža niz podataka koji osim u postavljanju dijagnoze mogu pomoći u određivanju prognoze i terapije bolesnika. Mikroskopskom pretragom dobiju se podaci o:

- načinu rasta tumora, odnosno stupnju njegove invazije
- histološkom tipu tumora
- vrsti stanica
- količini pigmenta melanina
- upalnoj infiltraciji na bazi i rubovima (44).

1.6.1 Načini rasta malignog melanoma

MM može pokazivati dva načina rasta, radijalni i vertikalni.

Radijalna faza rasta karakterizirana je histološki proliferacijom melanocita u epidermisu uzduž bazalne membrane (MM in situ) i/ili u površinskom dijelu papilarnog dermisa. Tumori u ovoj fazi rasta smatraju se netumorigeničnim i imaju izrazito povoljnu prognozu.

Vertikalnu fazu rasta karakterizira sposobnost proliferacije tumora i stvaranje tumorske mase u dermisu (44).

1.6.2 Određivanje stupnja invazivnosti malignog melanoma

Stupanj invazivnosti MM moguće je odrediti na dva načina.

a) ovisno o histološkoj razini kože koji tumor infiltrira, prema Clarku (Tablica 1) i

b) ovisno o debljini tumora u milimetrima, prema Breslowu (Tablica 2)

Tablica 1 Stupnjevanje malignog melanoma prema Clarku

Stupanj I	tumor samo u epidermisu (melanoma in situ)
Stupanj II	tumor infiltrira u papilarni dermis
Stupanj III	tumor ispunjava i proširuje papilarni dermis, te tumori koji se nalaze na papilarno retikularnoj granici, ali ne zahvaćaju retikularni sloj kože
Stupanj IV	tumor infiltrira retikularni dermis
Stupanj V	tumor infiltrira supkutano masno tkivo (49).

Debljina MM prema Breslowu vrši se uz pomoć baždarenog okularnog mikroskopa, od gornjega ruba granularnog sloja epidermisa, okomito, do najdubljeg dijela tumora. Ako je tumor ulceriran, mjeri se od dna vrijeda (krusta na površini vrijeda se ne mjeri), okomito, do najdubljeg dijela tumora.

Tablica 2. Stupnjevanje malignog melanoma prema Breslowu

Stupanj I	tanji od	0,76 mm
Stupanj II		0,76 – 1,50 mm
Stupanj III		1,51 – 2,25 mm
Stupanj IV		2,26 – 3,00 mm
Stupanj V	deblji od	3,00 mm (50).

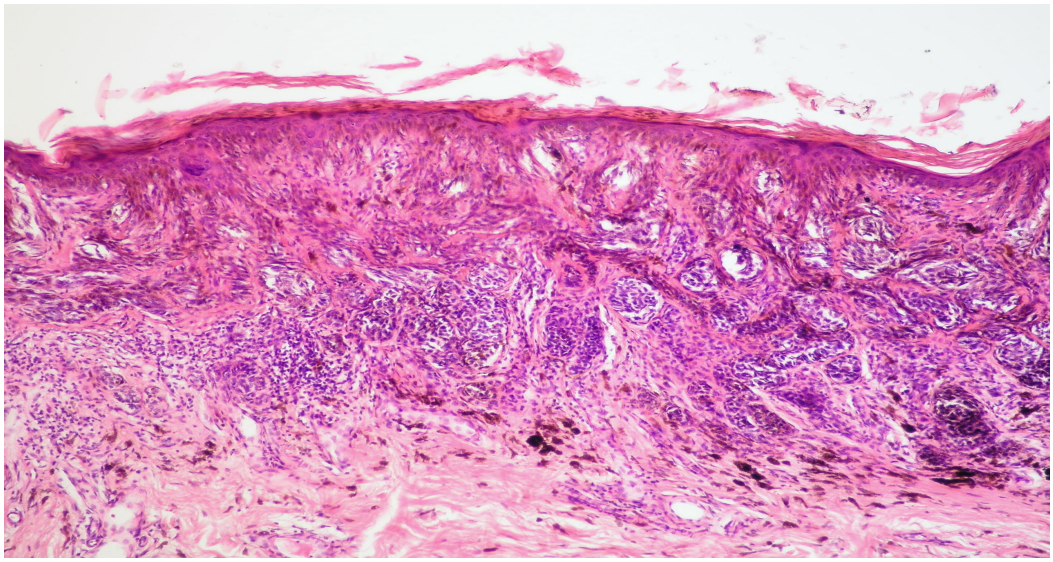
1.6.3 Histološki tipovi melanoma

Danas morfološki razlikujemo četiri najčešća histološka tipa MM, koja se međusobno razlikuju po sijelu, tipu stanica, načinu rasta i kliničkom ponašanju (51).

Površinsko šireći melanom (engl. superfitial spreading melanoma, **SSM**) predstavlja najčešći tip MM kože i pojavljuje se u oko 70% slučajeva (slika 1). Uglavnom nije udružen s promjenama kože karakterističnim za jača aktinička oštećenja. Nastaje iz običnog ili DN najčešće u osoba srednje životne dobi. U histološkoj slici nazočna je pagetoidna proliferacija atipičnih melanocita s posljedičnim zadebljanjem epidermisa (slika 2). Atipične stanice su nepravilno raspoređene unutar epidermisa, pojedinačno ili u nakupinama, te zahvaćaju većinom gornje dijelove epidermisa na način sličan Pagetovoj bolesti. Stanice su velike, bogate citoplazmom, pleomorfne vezikulozne jezgre s naglašenom eozinofilnom ozinofilnom jezgricom. U dermisu prisutan je upalni infiltrat. Horizontalni način rasta traje obično dugo, nakon čega prelazi u vertikalni, invazivni oblik tumora (45).

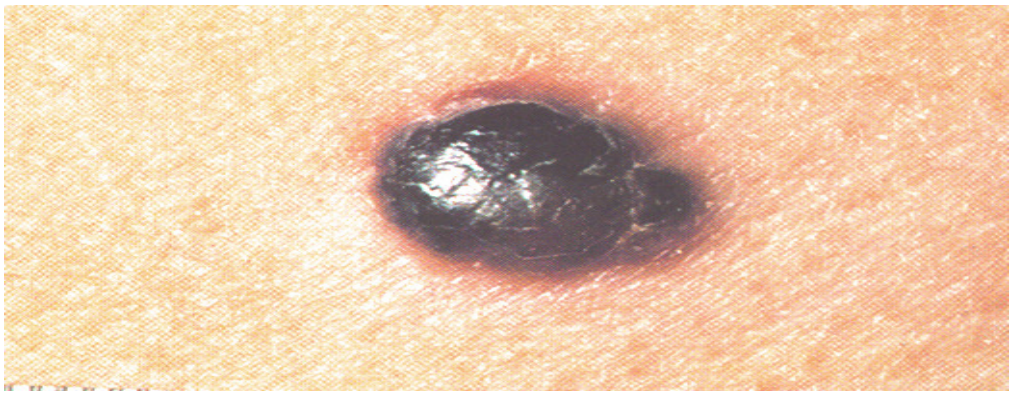


Slika 1. Klinička slika površinsko širećeg melanoma (SSM).

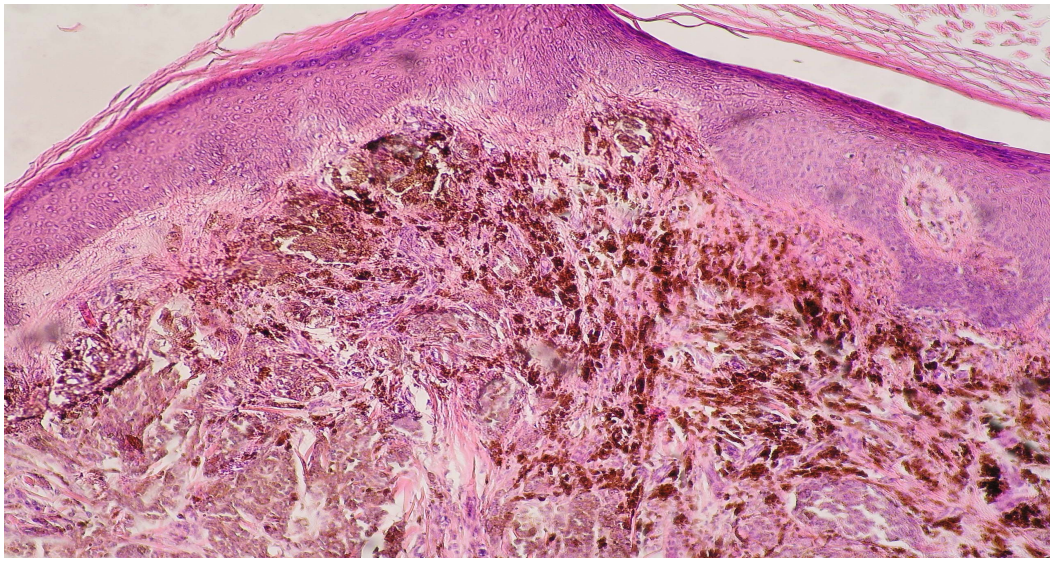


Slika 2. Histopatološka slika površinsko širećeg melanoma (SSM), (100xHE).

Nodularni melanom (engl. melanoma nodulare, **MN**) je slijedeći tip MM prema učestalosti. Javlja se u 15% slučajeva, također najčešće u srednjoj životnoj dobi. Nastaje na nepromijenjenoj koži u obliku smeđe-crnog čvorića na trupu, glavi i vratu (slika 3). U histološkoj slici nazočne su intradermalni sferoidalni čvorići sastavljeni od velikih epiteloidnih melanocita s izraženim jezgrama dok atipični melanociti pokazuju svijetle jezgre i izražene jezgrice (slika 4). Karakteriziran je isključivo vertikalnom fazom rasta atipičnih melanocita čime se objašnjava izrazita agresivnost ovog tumora (44,45).



Slika 3. Klinička slika nodularnog melanoma (MN).



Slika 4. Histopatološka slika nodularnog melanoma (MN), (100xHE).

Akrolentiginozni melanom (ALM) se javlja do 10% slučajeva svih MM. Nastaje na akralnim predjelima u osoba starije životne dobi, najčešće na dlanovima, stopalima i sluznicama. Ne prethode mu nevusi, kao ni markeri povećanog rizika, niti nastaje na fotoeksponiranim mjestima. U histološkoj slici atipični vretenasti melanociti smješteni su u donjim dijelovima epidermisa, te zamijenjuju većinu bazalnih keratinocita, iako mogu biti zahvaćeni i gornji dijelovi epidermisa. Pojedinačne stanice su pleomorfne s hiperkromatskom jezgrom i izraženom jezgricom. Česte su mitotske figure. Karakterizira ga horizontalni i vertikalni način rasta. (45).

Lentigo melanoma malignum (LMM) se javlja u 5 % slučajeva u obliku pigmentirane makule na fotoeksponiranim mjestima osoba starije životne dobi. Razvija se iz **lentigo maligna** (**LM**), lezije koju karakterizira višegodišnja radijalna faza rasta. S prijelazom u vertikalnu fazu rasta nastaje LMM. Histološki LMM karakteriziraju atipični vretenasti melanociti, atrofičan epidermis i aktinička elastoza tj. povećana količina vezivnog

tkiva u gornjem dermisu. Atipični melanociti nazočni su uzdruž bazalne membrane epidermisa, a zahvaćaju i dlačne folikule. Imaju nepravilnu hiperkromatsku jezgru i vakuoliziranu citoplazmu. S progresijom lezije, nakupine atipičnih stanica zahvaćaju epidermodermalnu granicu i prelaze u dermis (45).

Izuzetno rijetki su slijedeći oblici MM:

Amelanotični MM klinički se pojavljuje kao crveni ili ružičasti plak ili čvorić, stoga se dijagnoza postavlja tek histološkom analizom. Biološki je znatno agresivniji nego pigmentirana varijanta MM. No, zašto ovaj oblik MM ne proizvodi melanin nije još utvrđeno (44,45).

MM balonastih stanica sastoji se od velikih svijetlih stanica s centralno smještenom jezgrom i velikom količinom retikulirane i vakuolirane citoplazme (44).

MM svijetlih stanica je MM mekih česti koji se razvija u blizini tetiva ili aponeuroze ekstremiteta mladih osoba između 20. i 40. godine. Tumor se satoji od gnijezda ili tračaka poligonalnih ili vretenastih stanica s vezikularnom jezgrom i velikom bazofilnom jezgricom, svijetlom ili blijedom citoplazmom, od stanica s eozinofilnom citoplazmom i od multinuklearnih gigantskih stanica. Ultrastrukturalno svijetli izgled citoplazme nastaje zbog prisutnosti velikih nakupina čestica glikogena i/ili brojnih mjehurića ili organela (44).

Dezmoplastični – neurotropni MM je agresivna varijanta MM građen od vretenastih stanica. Karakteriziran je dubokom invazijom vretenastih melanocita i nježnih fibroblasta koji su posloženi u tračke uronjenih u kolagensku stromu. Vrlo teško ga je histološki razlikovati od ožiljka. Većina dezmoplastičnih melanoma nastaje iz invazivne vertikalne

faze prethodnog LMM. Kada dezmoplastični melanom formira strukture koje nalikuju živcima ili invadiraju živce u dermisu, dobiva naziv neurotropni melanom. Ultrastrukturalne karateristike odnose se na pleomorfizam jezgre s prominentnom jezgricom, velikom količinom citoplazmatskih filamenata vimentina i brojnim pinocitotičnim mjehurićima, rijetko prisutnih melanosoma, širokim citoplazmatskim izdancima uz bazalnu membranu i rudimentarne stanične veze (52).

Miksoidni MM predstavlja metastatki MM u kojeg stroma pokazuje miksoidnu promjenu. Histološki je karakteriziran epiteloidnim tumorskim stanica koje formiraju gnijezda ili tračke u miksoidnom matriksu nastalom iz reaktivnih stromalnih stanica. Može se pogrešno dijagnosticirati kao primarni miksoidni maligni fibrozni histiocitom, miksoidni hondrosarkom ili rabdomiosarkom, maligni tumor apendiksa kože ili maligni miksoidni tumor (53).

1.6.4 Vrsta stanica

Veličina i izgled tumorskih stanica u dermisu pokazuju velike varijacije. Ipak se mogu razlikovit dva tipa stanica, kubični i vretenasti. Većina tumora pokazuje oba tipa stanica, ali obično jedan prevladava. Kubične stanice su češće nego vretenaste i imaju tendenciju smeštaja unutar alveolarnih formacija. Alveolarno raspoređene kubične stanice su okružene tankim vlaknima kolagena koja sadržavaju malo fibroblasta. Vretenaste stanice oblikuju nepravilne tračke. Tumor u kojima prevladavaju vretenaste stanice nalikuju fibrosarkomima, ali se od njih razlikuju prema tome, što imaju junkcionalnu aktivnost (54).

1.6.5 Količina pigmenta

Količina pigmenta melanina vrlo se razlikuje u MM. U nekim tumorima se veća količina melanina nalazi ne samo unutar tumorskih stanica nego i u melanofagima koji se nalaze u stromi. U drugima nema znakova melanina u hematoksilin-eozinom obojenim preparatima. Međutim, bojenjem preparata sa srebrnim nitratom otkriva u većine malignih melanoma koji izgledaju amelanotični nekoliko stanica sa melaninom. Još je bolje upotrijebiti metodu Masson Fontanove amonijakalne otopine srebrnog nitrata, jer će se time prikazati i nepigmentirane argentafilne premelaninske granule. Dopa reakcija i određivanje tirozinazne aktivnosti obično daju pozitivne rezultate, barem na nekim mjestima, iako katkada MM može biti bez tirozinazne aktivnosti (4).

1.6.6 Količina upalnog infiltrata

U ranim invazivnim MM na bazi tumora nalazi se mononuklearni upalni infiltrat. Kada jednom dođe do dublje invazije dermisa upalni infiltrat se smanuje, a u uznapredovalim stadijima može biti odsutan (4).

1.7 Imunohistokemija malignog melanoma

Imunohistokemijsko prepoznavanje novotvorina nevomelanocitnog podrijetla vrši se dokazivanjem biljega, kao što je vimentin, S-100 protein i HMB-45 antigen, a u svrhu potvrde histološke dijagnoze ili u slučaju postojanja sumnje na nedefinirani tumor (54).

S-100 protein pozitivan je kod različitih tipova madeža, kao i kod različih histoloških oblika MM. U dobroćudnim promjenama, S-100 protein može pomoći u : (i) dijagnozi Sutton nevusa određivanjem nazočnosti

nevus stanica “prekrivenih” upalnim limfocitima; (ii) razlikovanju pseudovaskularnih od vaskularnih tumora (glomangioma). Kod MM postotak S-100 pozitivnih stanica varira od 50-95%. Određivanje S-100 proteina može se koristiti za točnije mjerenje debljine tumora u slučaju kada su duboko smještene melanomske stanice skrivene upalnim stanicama, kao i za procjenu ekscizijskih rubova. S-100 protein iako je senzitivan marker, nije specifičan za melanocitne tumore; izražavaju ga i drugi tumor, na pr. tumori žlijezda znojnica, švanomi, neurofibromi, hondrocitni tumori, histiocitoza Langerhansovih stanica i lipomi (55).

Monoklonsko protutijelo HMB-45 prepoznaje antigen nezrelih melanosoma i često se koristi u dijagnozi melanocitnih tumora. HMB-45 ne pokazuje križnu reakciju s nemelanocitnim tumorima (osim u slučajevima gdje tumorske stanice fagocitiraju melanosome, kao na pr. kod metastatskog karcinoma dojke). Protutijelo HMB-45 je više specifičan za melanocite, iako nije uvijek pozitivan kao ni kod primarnih kožnih MM tako ni kod metastatskog MM. Postotak MM koji su imunoreaktivni na HMB-45 protutijelo iznosi 88-93% (54).

Druga antitijela koja se mogu koristiti u dijagnozi MM uključuju NKI/beteb, NKI-C3 i protutijela na tirozinazu. Nedavno je dokazano da nevomelanocitni tumori izražavaju i periferin, intermedijarni filament u razvoju neurona. Bcl-2 onkoprotein je kao sastavni dio izražen kod benignih nevusa, primarnih MM i nešto slabije kod metastatskog melanoma (50). Iako senzitivan, taj protein nije specifičan za melanocitne tumore, jer ga izražavaju i drugi epitelijalni tumori (bazocelularni karcinom i neki tumori znojnica), vaskularni tumori (Kaposi sarkom) i tumori mišića. Unatoč kvantitativnoj razlici u ekspresiji pojedinih antigena na pr. nuklearni antigen proliferacije stanica (engl. proliferating cell nuclear antigen, PCNA) i površinskih glikokonjugata, danas još nema jedinstvenog markera pomoću kojeg bi se prepoznale slabo diferencirane varijante amelanotičnog MM, a također postavila sigurna i stroga razlika između MM i benignih nevusa. To vrijedi i za HMB-45 antigen koji se veže (iako znatno manje) za različite benigne nevuse (junkcijski, Spitz, displastični i plavi nevus) (54).

1.8 Stadiji malignog melanoma

Godine 1992. American Joint Committee on Cancer staging (AJCC) usvojio je “staging” sistem za melanom, temeljen na patohistološkom nalazu te na TNM klasifikaciji. (Tablica 3) (56).

Tablica 3. Podjela MM prema stadiju bolesti.

I stadij	pT1	N0	M0
	pT2	N0	M0
II stadij	pT3	N0	M0
	pT4	N0	M0
III stadij	bilo koji pT	N1	M0
	bilo koji pT	N2	M0
IV stadij	bilo koji pT	bilo koji N	M1

(56).

Primarni tumor (pT)

pTx nepoznati primarni tumor
pT0 bez primarnog tumora
pTis Melanoma in situ
pT1 tumor do 0,75 mm, invadira papilarni dermis (Clark II)
pT2 0,76 – 1,5 mm i invadira papilarni retikularni dermis (Clark III)
pT3 1,5 – 4 mm i invadira retikularni dermis (Clark IV)
pT3a Tumor od 1,5 do 3 mm
pT3b Tumor od 3 do 4 mm

pT4 Tumor deblji od 4 mm, i/ili invadira subkutano tkivo (Clark V) i/ili sateliti unutar 2 cm od primarnog tumora

pT4a Tumor deblji od 4 mm i/ili invadira subkutano masno tkivo

pT4b Sateliti unutar 2 cm od primarnog tumora (56).

Limfni čvor (N)

Nx nepoznati

N0 Bez regionalnih metastaza

N1 Metastaze do 3 cm u najvećem promjeru bilo kojeg limfnog čvora

N2 Metastaze > 3 cm u najvećem promjeru bilo kojeg limfnog čvora i/ili in trasit metastaze

N2a Metastaze > 3 cm u najvećem promjeru bilo kojeg limfnog čvora

N2b In transit metastaze

N2c N2a i N2b (56).

Distalne metastaze (M)

Mx nepoznate

M0 Bez distalnih metastaza

M1 Distalne metastaze

M1a Metastaze u koži, potkožnom masnom tkivu ili limfnom čvoru udaljenom od regionalnog limfnog čvora

M1b Visceralne metastaze (56).

1.9 Prognostički čimbenici kod malignog melanoma

U literaturi se navode brojni prognostički čimbenici koji pomažu u ocjeni biološkog ponašanja tumora i određivanju terapije. Klinički stupanj pokazao se najvažnijim parametrom u određivanju prognoze. Stoga se novi prognostički čimbenici određuju s obzirom na proširenost bolesti (57-58).

MM I i II stadija predstavlja primarni tumor bez metastaza u regionalne limfne čvorove i bez udaljenih metastaza. Jedan od parametara koji se pokazao značajnim u ovoj skupini bolesnika je anatomska lokalizacija ovih tumora. Naime bolesnici s MM na ekstremitetima imaju statistički značajnije duže preživljenje nego bolesnici s MM u predjelu glave, vrata, trupa, šake i stopala (58,59).

Iz grupe patohistoloških čimbenika koji utječu na ishod ovog stadija MM statističku značajnost ima debljina tumora koja korelira s rizikom lokalne rekurencije, pojavom in transit (metastaze unutar limfnih žila dermisa i subkutisa između primarnog tumora i regionalnih limfnih čvorova), satelitskih (kožne promjene unutar 2 cm od primarne lezije) i metastaza u regionalne limfne čvorove (85,91). Prisutnost ulceracije označava biološki agresivniji tumor. Razina invazije prema Clarku obrnuto je proporcionalna s preživljenjem (58).

Način rasta MM je također značajan prognostički pokazatelj. Tako vertikalni način rasta od samog postanka nodulanog melanoma predstavlja lošiju prognozu (44).

Količina limfocitnog upalnog infiltrata obrnuto je proporcionalna s debljinom tumora, a u uznapredovalim slučajevima je prisutna samo na rubovima (44).

Ulogu prognostičkog čimbenika ima i aneuploidija koja korelira sa slabim ukupnim prežeivljenjem, kratkom remisijom bolesti i visokom stopom rekurencije (57-60). Isto se odnosi i na tumore s mitotskim indeksom (broj mitoza na jedan mm^2 u vertikalnoj fazi rasta tumora) većim od 5 (61).

Od ostalih nepovoljnih čimbenika spominje se veći volumen jezgara (koji označava stanice u S-fazi) i mikroskopske satelitoze (nakupine

melanomskih stanica većih od 0,05 mm u promjeru, odvojene od tumora, smještene u dermisu ili subkutisu) (58).

Prema AJCC klasifikaciji stadij III MM karakterizira prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (56).

Prognostički čimbenici III stadija obuhvaćaju broj i lokalizaciju zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, dob bolesnika kao i nazočnost ulceracije u primarnom tumoru (58,62).

U dobi do 50 godina preživljenje je bolje, nego u dobi iznad 50 godina (63).

Broj pozitivnih limfnih čvorova je značajniji od veličine limfnih čvorova (56). Bolesnici s metastazama u aksilarne limfne čvorove imaju veću sklonost udaljenoj diseminaciji nego sa zahvaćenim limfnim čvorovima u ingvinalnoj regiji (58).

Točno određivanje statusa limfnih čvorova je od presudnog značaja u postavljanju plana liječenja. Naime, metastaza melanoma može se javiti kao jedna tumorska stanica u limfnom čvoru. Za bolju detekciju takvih mikrometastaza, uz bojanje hematoksilin-eozinom uvode se još senztivnije metode analize **limfnog čvora stražara** (engl. sentinel lymph node, **SLN**) (64). To uključuje imunohistokemijska bojanja (**HMB-45** i **S-100 protein**) (54), te analizu **reverznom transkriptaza polimeraza lančanom reakcijom** (engl. reverse transcriptase polymerase chain reaction, **RT-PCR**) (64). Pozitivan nalaz upućuje na prisutnost metastatskih stanica melanoma, čime se otkrivaju bolesnici s mikrometastazama i provodi ekstenzivniji operativni tretman i adjuvantna terapija (65).

U bolesnika s udaljenim metastazama karakteristike primarnog tumora postaju relativno nevažne u predviđanju ishoda bolesti. Općenito prognoza za bolesnike ovog stupnja bolesti je loša. Najznačajniji prognostički čimbenici u ovoj fazi bolesti su broj metastatskih mjesta, trajanje remisije i anatomsko mjesto metastaza (66).

Broj metastatskih mjesta znatno utječe na prognozu. Bolesnici s jednim metastatskim mjestom imaju bolju stopu preživljenja od grupe bolesnica s brojnijim metastazama (67).

U 59% bolesnika razviju se metastaze u udaljena mjesta kože, mekana tkiva ili udaljene limfne čvorove. Plućne metastaze javljaju se od 31-36% bolesnika (68,62,63). Bolesnici s kožnim metastazama imaju bolje preživljenje nego bolesnici s visceralim metastazama (66-67).

Općenito, danas se smatra da je debljina tumora prema Breslowu najjači prognostički čimbenik kod bolesnika s MM-om. Prema tim podacima postotak petogodišnjeg preživljenja prema debljini tumora za tumore tanje od 0,76 mm iznosi 96-99%, za Breslow II 87-95%, za Breslow III 75-84%, za Breslow IV manje od 66-70%, te za Breslow V 44-47% (28).

Anatomska razina invazije prema Clarku predstavlja također parametar koji je čvrsto povezan s preživljenjem. Razina invazije II prema Clarku općenito predstavlja melanome s vrlo niskim metastatskim potencijalom, a razina III i IV lezije s većim rizikom metastaziranja. Tako dva tumora mogu imati istu debljinu no različitu dubinu, pa prema tome i različitu prognozu (66,67). Prema podacima iz literature, petogodišnje preživljenje prema dubini MM-a za Clark I iznosi 100%, za Cark II 95%, Clark III 82%, Clark IV 71% i Clark V 49% (28).

1.10 Protočnocitometrijski prognostički parametri

Sadržaj DNA u stanici može se odrediti pomoću: a) tehnika molekularne biologije, b) citogenetike, c) citofotometrije i d) protočne citometrije. Kvantitativna promjena kariotipa i promjena sadržaja stanične DNA čest su i osobit nalaz za pojedine oblike tumora. Premda su citogenetičke studije u ljudskim solidnim tumorima dokazale visok stupanj kariotipskih abnormalnosti, rutinsko analiziranje je iznad kapaciteta mnogih laboratorija. Mjerenjem DNA sadržaja protočnim citometrom

mogu se dobiti neke značajne informacije o kromosomskom sadržaju, premda normalni sadržaj DNA uzoraka ne podrazumijeva neophodno i normalni kariotip (68-69).

Mutacije kromosoma mogu se očitovati u odstupanju u broju ili nepravilnostima oblika kromosoma. U zdravim tkivima postoji normalan sadržaj DNA, koji odgovora diploidnom broju kromosoma u stanicama (haploidni broj kromosoma vezan je jedino za zrele gamete), dok zloćudno promijenjene stanice često pokazuju aneuploidiju. Aneuploidija označava poremećaj broja kromosoma, u smislu povećanja broja (hiperploidija) ili smanjenja (hipoploidija). Pod pojmom poliploidije podrazumijeva se povećanje haploidnog broja kromosoma, tri, četiri ili više puta (triploidija, tetraploidija). Aneuploidija je poznata pojava kod ljudskih tumora, no istraživanje njenog biološkog i kliničkog značaja u prošlosti bilo je onemogućeno tehničkim nedostacima (70). Nedostaci su djelomično svladani razvojem protočne citometrije, ali se uzorci s kvalitativnim i manjim kvantitativnim poremećajima još uvijek ne mogu otkriti (71-73).

Protočna citometrija je metoda koja pruža mogućnost brze i točne analize pojedinačnih stanica. Koristi se u imunologiji, hematologiji i onkologij. Prednost joj je velika brzina mjerenja stanica (analizira ih se na tisuće u sekundi), velika osjetljivost i objektivnost, kao i mogućnost praćenja više parametara na jednoj stanici (veličina, zrnatost stanice i sadržaj emisije fluorescencije pri nekoliko valnih duljina). Osnovni uvjet za protočnu citometriju je dobivanje pojedinačne suspenzije stanica (74).

Ova metoda vrši se pomoću protočnog citometra koji analizira i razvrstava stanice od 1 do 60 mikrometara prema njihovim morfološkim, molekularnim, biofizikalnim i funkcionalnim svojstvima. Osnovna dva dijela protočnog citometra čine višeparametrijski osjetnički sustav i računalni sustav s osciloskopom i pisačem. Višeparametrijski osjetnički sustav čine: laser (izvor koherentne monokromatske svjetlosti za obasjavanje uzoraka), mehanički sustav za stvaranje protoka stanica i njihovo razvrstavanje, detektorski sustav zrcala i leća, sustav za odvod otpadnog materijala te sustav za pneumatsku kontrolu. Računalni sustav

služi za automatsku obradu signala sa stanica i prikazuje ih u željenom obliku i kombinacijama. Protočnim citometrom mjerenja se izvode dok suspenzija stanica protječe ispred laserske zrake. Ta zraka osvjetljava stanice i na svakoj se raspršri pod različitim kutovima. Stupanj raspršenja svjetlosti u smjeru laserske zrake, tj. pod malim kutom, razmjeran je veličini stanica (engl. forward angle light scatter, parametar FALS). Stupanj raspršenja svjetlosti pod pravim kutom od smjera laserske zrake razmjeran je zrnatosti stnice (engl. 90 light scatter parameter, parametar 90 LS). Za protočnu citometriju koriste se fluorescentne boje s karakterističnim ekscitacijskim i emisijskim spektrom (69).

Rezultati mjerenja na protočnom citometru dobivaju se u obliku histograma, koji na osi apscisa prikazuje intenzitet fluorescencije, a na osi ordinata broj stanica (slika 5). Prema intenzitetu fluorescencije obojenih jezgara, što je razmjerno sadržaju DNA, dobije se prepoznatljiva raspodjela postotaka stanica u različitim fazama staničnog ciklusa. Tako je:

G0/G1-faza - faza mirovanja stanica gdje normalne diploidne stanice imaju isti broj kromosoma, s time i isti sadržaj DNA;

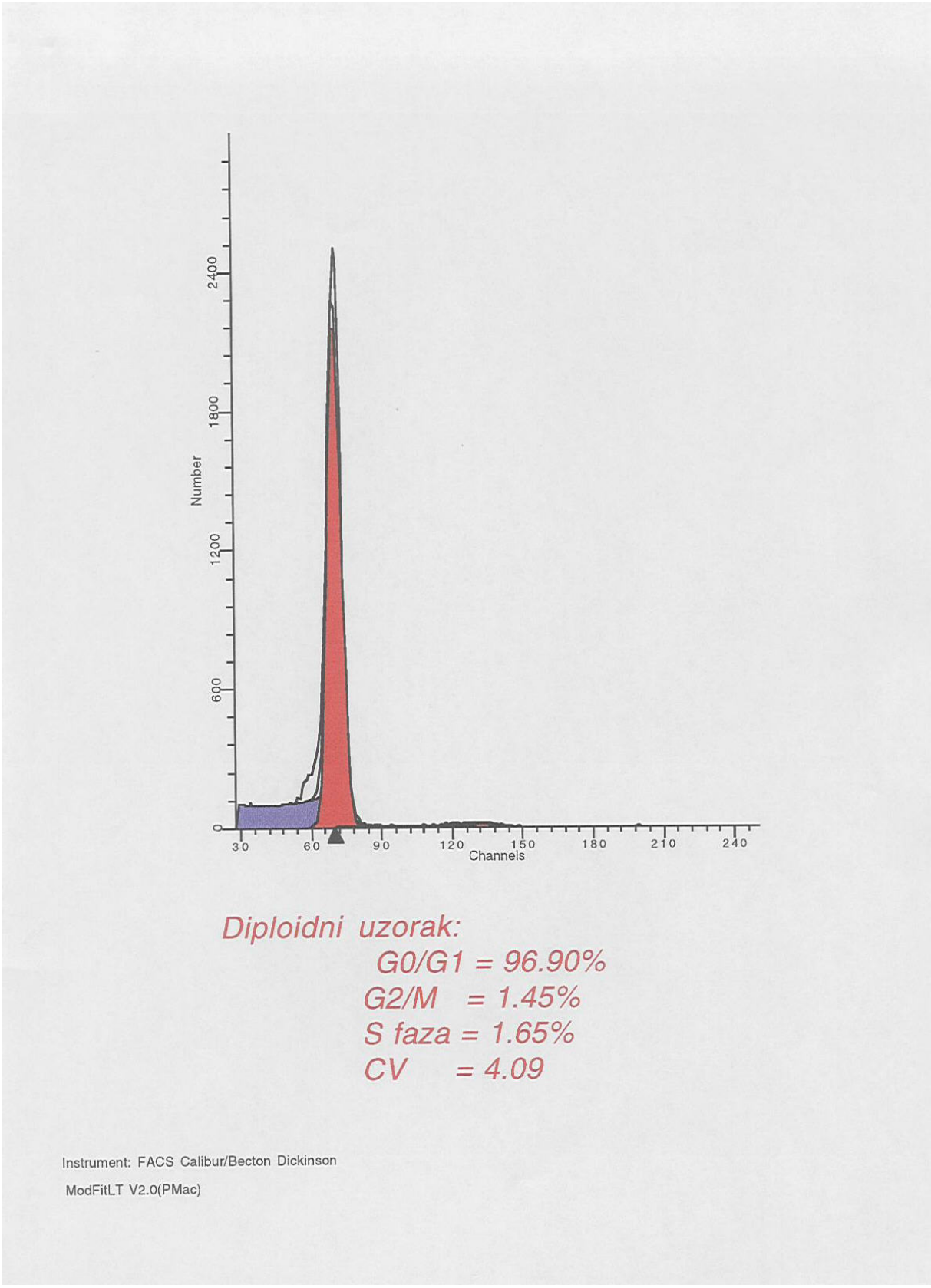
S-faza - faza sinteze stanične DNA i udvostučenja broja kromosoma

G2+M-faza - faza udvostručenja sadržaja DNA i nastanak dvije nove stanice.

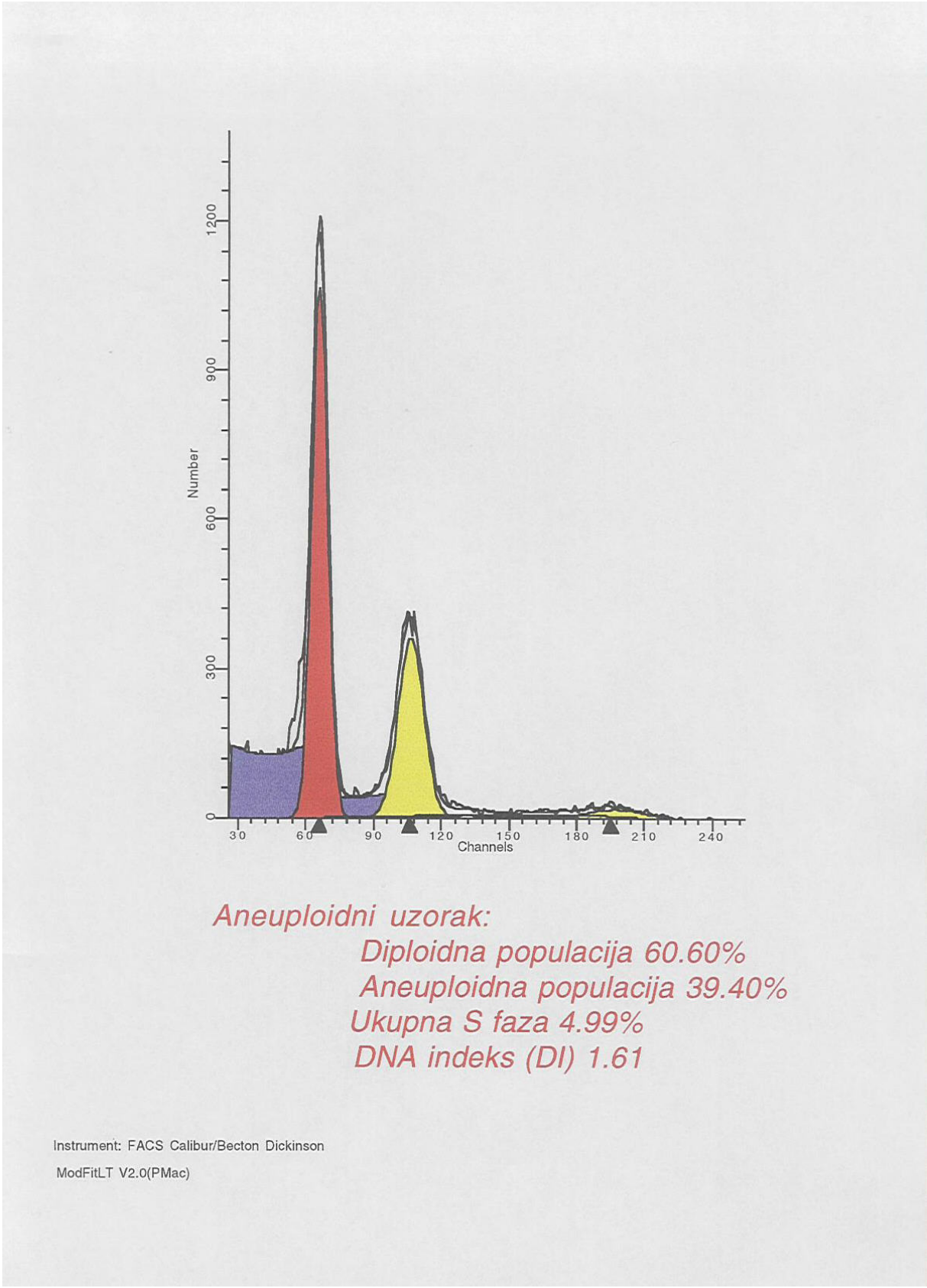
Prema tome, stanice G2+M-faze staničnog ciklusa imaju dva puta veći sadržaj DNK od stanica u G0/G1-fazi, pa će one emitirati približno dva puta veću fluorescenciju od stanica u G0/G1-fazi staničnog ciklusa.

Analiza DNA sadržaja ovom metodom omogućuje analizu pojedinih dijelova staničnog ciklusa i temelji se na slijedećim činjenicama:

a) normalne stanice u različitim fazama životnog ciklusa imaju različit, ali poznati sadržaj DNA;
b) intenzitet obojenosti je izravno razmjeran sadržaju DNA;
c) normalne stanice su diploidne, dok zloćudne stanice dosta često pokazuju sklonost aneuploidiji (71,74).



Slika 5a. DNA diploidni uzorak dobiven protočnom citometrijom.



Slika 5b. DNA aneuploidni uzorak dobiven protočnom citometrijom.

Za ispitivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom koriste se svježi materijali ili parafinski rezovi.

Analizom DNA histograma i obradom podataka mogu se dobiti slijedeći parametri:

- udio stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa izražen u postocima (G0/G1, S, G2/M) (69,75);
- DNA-indeks – omjer između srednje vrijednosti relativnog DNA sadržaja G0/G1 stanica uzoraka i srednje vrijednosti relativnog DNA sadržaja diploidnih G0/G1 referentnih stanica. Diploidne stanice od istog tkiva i od iste osobe su idealni standard u analizi tumorske ploidnosti (71,76-78).
- DNA-ploidnost – iskazuje se na temelju broja G0/G1-vrškova na DNA histogramu. Jedan G0/G1-vršak ukazuje na DNA-ploidiju, dodatni vršak na DNA-aneuploidiju, a pojava više vrškova na DNA-multiploidiju. Mnogi autori pri definiciji DNA-aneuploidije uzimaju u obzir postotak stanica u G2+M-fazi staničnog ciklusa. Ukoliko je udio stanica u G2+M-fazi veći od 10% govori se o DNA-tetraploidiji (76-77);
- koeficijent varijacije (CV) – parametar koji ukazuje na kvalitetu pripremanja uzoraka. Naime, točnost određivanja sadržaja DNA ovisi o: a) kvaliteti uzoraka (stupanj nekroze, fibroze, upale, hemoragije, autolize, te udio tumorskih u odnosu na netumorske stanice), b) kvaliteti pripreme uzoraka (enzimatska ili mehanička priprema uzoraka, upotrijebljeni fluorokromi), c) tumačenju histograma DNA (kriterij za definiciju diploidnosti i aneuploidnosti, upotrijebljeni standardi) i d) kvaliteta strojnog mjerenja (stupanj rezolucije i linearnosti). Uočeno je da CV nije rezultat samo kvalitete pripreme uzoraka, već djelomično ovisi o karakteristikama tumorskog tkiva koje se ispituje. Ukoliko se radi o materijalu iz parafinskih blokova, uobičajeno je postupak ponavljati za svaki CV koji je veći od 10% (75,78-82).

DNA indeks služi kao mjera za DNA-aneuploidiju, a S-faza kao indikator proliferativne aktivnosti (81). DNA-aneuploidni tumori su agresivniji, češće metastaziraju i imaju nepovoljniju prognozu u usporadbi s DNA diploidnim tumorima. Kod nekih tumora isti prognostički značaj

ima i visoki postotak G2/M stanica, ili visoki postotak stanica u S-fazi (83-86). Danas se zna da limfomi, leukemije, mijelomi te ljudski solidni tumori mogu imati abnormalan sadržaj DNA. DNA-aneuploidija i povišena proliferativna aktivnost predskazuju nepovoljan ishod bolesti kod većine zloćudnih tumora. To se odnosi na MM, rak dojke, jajnika, endometrija, pluća, debelog crijeva, bubrega, mokraćnog mjehura i prostate (75,76). Osim prognostičkog značaja, određivanje sadržaja DNA ima važnu ulogu i u određivanju terapije. Tako je dokazano da su DNA-aneuploidni karcinomi vrata maternice i karcinom mokraćnog mjehura senzitivniji na radioterapiju i kemoterapiju od ostalih (77-80).

Iako su vrijednosti dobivene mjerenjem DNA sadržaja pokazale izuzetnu vrijednost u pogledu dijagnostike, terapije i prognoze, ipak se smatra da je kombinacija protočne citometrije i morfoloških parametara pouzdanija u prognozi, nego u slučaju njihove zasebne primjene (81,87).

1.11 Modaliteti liječenja malignog melanoma

Terapija MM prvenstveno se provodi kirurški, a u nekIm slučajevima, ovisno o stadiju bolesti primjenjuje se kemoterapija, imunoterapija i u rijeđim slučajevima radioterapija (8).

Primarna terapijska metoda u liječenju MM je **kirurši zahvat** i to nekoliko milimetara od ruba lezije. Široka ekscizija (3-5 cm od ruba tumora) se više ne vrši u prvom aktu zbog mogućnosti preklapanja dermatoma i drenažnih limfnih puteva, što može remetiti određivanje lokalizacije **limfnog čvora stražara** (engl. sentinel lymph node, **SLN**) kod MM debljeg od 1 mm. Nakon limfoscintigrafskog određivanja SLN pristupa se **biopsiji limfnog čvora stražara (engl. sentinel lymph node biopsio, SLNB)**, u cilju pronalaženja mikrometastaza u navedenom limfnom čvoru (88). Ukoliko mikrometastaze nisu dokazane, vrši se samo **reekscizija** u predjelu ožiljka, a ukoliko su

mikrometastaze dokazane pristupa se u istom aktu **operativnom odstranjenju limfnih čvorova** dotične drenažne regije (89).

Iako in situ MM nije invazivna lezija, predstavlja rizik lokalnog recidiva i metastatske bolesti. Stoga preporučena širina ekscizije je 0,5 do 1 cm. Za MM debljine do 1 mm potrebna je reekscizija širine 1 cm. Tumor debljine 1 do 2 mm treba odstraniti od 1 do 2 cm u širinu, odnosno 2 cm za tumore debljine 2–4 mm. Široka ekscizija preko 2 cm od ruba tumora vrši se u MM debljine veće od 4 mm (90-94). Ovisno o anatomskoj lokalizaciji (npr. MM u predjelu šake ili lica) preporučena širina operacijskih rubova se prilagođava zbog postizanja što boljeg kozmetskog učinka kao i zbog manjeg narušavanja funkcionalnosti (65).

Prema AJCC klasifikaciji stadij III MM karakterizira prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Terapija se sastoji u **operativnom odstranjenju regionalnih limfnih čvorova** (65,95).

Terapija in transit metastaza (označene kao N2b) koje predstavljaju emboluse tumora u dermalnim i subdermalnim limfnim žilama između primarnog tumora i regionalnih limfnih čvorova, provodi se lokalno, regionalno ili sistemski (65,96,97).

Lokalna terapija provodi se kirurškim ili laserskim odstranjivanjem tumorskih masa. Opisivane su i mogućnosti lokalnim injiciranjem dinitroklorobenzena (DNCB), Bacillusa Calmette-Guérin (BCG) i interferona u lezijama kojie nisu dostupne kompletnoj kirurškoj eksciziji (98).

Regionalna terapija podrazumijeva **perfuziju ekstremiteta melfalanom**, a sistemska terapija primjenu dakarbazina (DTIC) (99).

Terapija diseminiranog melanoma stastoji se u palijaciji, a provodi se kirurški i radioterapijski. Svrha je smanjiti tumorsku masu i spriječiti komplikacije prouzrokovane metastazama (97,100).

Amputacije udova nisu indicirane zbog diseminacije bolesti i brze pojave metastaza na amputacionom rezu (8).

Radioterapija MM primjenjuje se u ovom stadiju preoperativno s ciljem smanjenja vitaliteta tumorskih stanica, odnosno postoperativno ili kao jedina metoda u inoperabilnim slučajevima (101). Danas postoje dovoljno kliničkih dokaza koji odbacuju dugo postojeću dogmu da radioterapija nema ulogu u terapiji MM. Iako kirurški tretman ostaje metodom izbora kod bolesnika s lokaliziranim MM, navode se podaci koji potvrđuju da je radioterapija alternativa za bolesnike s opsežnim LMM, osobito kod starijih osoba (102). Potom je dokazano da elektivna/adjunktivna radioterapija poboljšava lokoregionalni nalaz, u bolesnika s "debelim" primarnim MM glave i vrata sa zahvaćenim limfnim čvorovima (103), kao i kod "debelih" dezmoplastičnih melanoma, dakle onih kod kojih postoji veliki rizik rekurencije. Glavne indikacije za radioterapiju su dermalne, subkutane i metastaze u limfne čvorove, mozak i u kosti. Ostale indikacije su kompresija leđne moždine i simptomatske izolirane visceralne metastaze koje nisu pristupačne kirurgu. Izbor optimalnog frakcioniranja ovisi o mjestu tumora i o očekivanom preživljenju, a daljnja istraživanja na tom području pružit će mogućnost veće uporabe radioterapije kod MM (101-3).

U bolesnika III i IV stadija, samo u određenim slučajevima primjenjuje se uz kiruršku terapiju i **adjuvantna terapija** koja obuhvaća primjenu kemoterapije, imunoterapije ili bioterapije (8,104).

Kemoterapija obuhvaća primjenu dakarbazina (DITC), derivata nitrozouree (karmustin, lomustin, semustin i fotemustin), melfalana, thiotepe, cisplatin, vindesin, taksan i temozolomid kao monokemoterapeutika. U polikemoterapiji primjenjuje se protokol bleomicin, vinkristin, lomustin i dakarbazin (BOLD) (8). Od hormonalne terapije uporaba Tamoxifena uputila je da antiestrogeni imaj nevažan antitumorski učinak u uznapredovalim melanomima (97).

Imunoterapija, čija je svrha pojačati imunološki odgovor organizma na tumor, primjenuje se u obliku:

- aktivne specifične imunoterapije (terapije tumorskim stanicama)

- pasivne specifične imunoterapije – adoptivne terapije (terapija in vitro obrađenim limfocitima)
- aktivne nespecifične imunoterapije (terapija mikrobiološkim imunosimulantima npr. BCG, Corynebacterium parvum ili kemijskim sredstvima npr. Levamisole) i
- pasivne specifične imunoterapije (terapija specifičnim monoklonskim protutijelima) (8).

Bioterapija predstavlja uporabu rekombinantnih citokina (interferona i interleukina–2), te monoklonskih protutijela. Jedno od djelovanja interferona je direktno protututumorski, a interleukin-2 pojačava imunološku reakciju organizma na tumor (9).

Genska terapija *predstavlja somatsku terapiju budućnosti. Obuhvaća uporabu genski izmijenjenih limfocita, tumorskih stanica i fibroblasta u cilju poboljšanja imunološkog odgovora (8).*

2. CILJEVI RADA

1. Utvrditi učestalost kliničkih (spol, dob, lokalizacija) i histopatoloških (histološka razina invazije, debljina tumora, mitotski indeks) parametara, kao i vrijednosti DNA sadržaja (DNA ploidnost, proliferativna aktivnost) u skupini bolesnika sa MM, te ustanoviti da li postoje razlike s obzirom na histološki podtip (SSM i NM).

2. Utvrditi prognostički značaj kliničkih i patohistoloških parametara, te vrijednosti DNA sadržaja. Ujedno iistražiti da li ispitivani parametri imaju isti prognostički značaj u bolesnika sa SSM i NM.

3. Izračunati relativne rizike smrti s obzirom na promatrane kliničke i histopatološke parametre, te vrijednosti DNA sadržaja u skupini bolesnika s MM, i utvrditi da li postoje razlike između bolesnika sa SSM i NM.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanjem je obuhvaćeno 100 bolesnika u kojih je dijagnoza MM-a postavljena u Klinici za tumore u razdoblju od 1992–2002. godine. U studiju je uvršteno 50 bolesnika s SSM i 50 s MN. Analizirani parafinski blokovi tumorskog tkiva sakupljani su prema redosljedu upisivanja histopatoloških nalaza u protokol Zavoda za patologiju, sve do ukupnog broja od 50 uzoraka za oba histološka tipa tumora.

Analiza preživljenja bolesnika temeljila se na praćenju bolesnika od datuma postavljanja dijagnoze do smrti od osnovne bolesti. Od ukupnog broja bolesnika, 28 je umrlo tijekom praćenja, a 72 je ušlo u grupu «cenzuriranih» (označeni kao živi bolesnici ili umrli od neke druge bolesti). Podaci o preživljenju uzeti su iz Hrvatskog registra za rak, kao i iz povijesti bolesti.

Podaci o **spolu** i **dobi bolesnika** te **lokalizaciji** tumora dobiveni su retrospektivno iz povijesti bolesti. Istraživanje je obuhvatilo 48 muškaraca i 52 žene. Srednja dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze bila je 57,1 godina. Raspon dobi bio je od 19 do 92 godine. S obzirom na dob razvrstali smo bolesnike u dvije skupine, a kao graničnu vrijednost postavili smo dob od 65 godina (58). U skupini bolesnika do 65 godina života bilo je njih 66, dok je starijih bilo ukupno 34. S obzirom na lokalizaciju bolesnike s MM-om svrstali smo u 4 skupine: ekstremitet, trup, okrajine te glava i vrat. Najviše melanoma bilo je lokalizirano na ekstremitetima (N=42) i trupu (N=48), dok je na okrajinama bilo dijagnosticirano 6 tumora, a na glavi i vratu svega 4.

Za patohistološku analizu korišteno je tkivo tumora uklopljeno u parafinski blok pohranjeno u Klinici za tumore. Dijagnoza MM postavljena je na temelju bojenja hemalaun-eosinom, mikroskopskog povećanja 400 puta, a od imunohistokemijskih bojenja korišteni su S-100 protein i HMB-45 antitjelo. Provjeru postavljenih patohistoloških parametara (debljina tumora, histološka razina invazije, mitotski indeks) vršila su dva patologa, a u slučaju neslaganja bio je konzultiran i treći.

Stupnjevanje MM-a prema **Clarku** vršilo se ovisno o histološkoj razini koju tumor zahvaća Tako je tumor koji zahvaća samo epidermis označen kao Clark I (ili MM in situ), a infiltracija tumora u papilarni dermis kao Clark II. Kada je tumor ispunio papilarni dermis, a da pri tome nije zahvatio retikularni sloj kože, obilježen je kao Clark III. Ako je tumor infiltrirao retikularni dermis označen je kao Clark IV, a infiltracija u supkutano masno tkivo kao Clark V (49).

Grupirajući tumore prema histološkoj razini invazije u ovoj studiji najviše tumora je bilo u skupini Clark III (N=39) i Clark IV (N=43), a svega 18 u skupini Clark V. Tumori označeni kao Clark I i II nisu bili uvršteni u studiju jer je interes studije bio analizirati navedene parametre u tumorima s lošijom prognozom.

Debljina tumora po **Breslowu** određivana je baždarenim okularnim mikroskopom od gornjega ruba granularnog sloja epidermisa okomito do najdubljeg dijela tumora. Ako je tumor bio ulceriran, mjerenje se vršilo od dna vrijeda.

Stupnjevanje MM-a prema Breslowu vršeno je u 5 stupnjeva. Tako je Breslow I znači MM debljine manje od 0,76 mm, Breslow II od 0,76 do 1,50 mm, Breslow III od 1,51 do 2,25 mm, Breslow IV od 2,26 do 3,00 mm i Breslow V tumori deblji od 3,00 mm (50).

U ovoj analizi s obzirom na debljinu tumora najmanje tumora je bilo u skupini Breslow III (N=27) i Breslow IV (N=14), a najviše njih (N=59) u skupini Breslow V.

Svi MM korišteni u ovoj studiji su oni koji su klasificirani prema Clarku i Breslowu u stupanj III, IV i V, dok su stupanj I i II isključeni iz studije.

Mitotski indeks (MI) se izračunavao brojanjem mitoza na deset vidnih polja velikog povećanja mikroskopa. S obzirom na MI bolesnici su podijeljeni u dvije skupine, a graničnu vrijednost je uzeta vrijednost ≤ 5. Od ukupnog broja bolesnika 54 je imalo vrijednost MI ≤ 5, a njih 46 vrijednost >5.

3.1 Priprema uzorka za protočnu citometriju

Za potrebe protočne citometrije koristio se Hadleyev postupak (105) za izoliranje jezgara iz tumorskih parafinskih rezova i Vindelov postupak (106) za bojenje izoliranih jezgara s propidijevim jodidom. Tri reza debljine 40 µm se izrežu iz parafinskih blokova. Osim ta tri reza potrebna za protočnu citometriju, narežu se još dva reza debljine 4 µm i to jedan od početka uzorka (prvi rez) i jedan od kraja uzorka (peti rez). Tanki uzorci se oboje standardnom bojom hemalaun-eosinom radi patohistološke analize. S debelih rezova se skine vosak umakanjem u kiselinu i izvede rehidracija uzastopnim umakanjem u 100%, 95% i 70% alkoholu. Nakon što se uzorak dva puta opere u destiliranoj vodi, slijedi enzimska reakcija s 0,5% pepsinom u 0.9% NaCl (pH 1.5) 30 minuta na 37^{o} C u vodenoj kupelji uz stalno miješanje. Uzorak se centrifugira, vakuum-crpkom odstrani nadtalog, doda se 2 ml medija (RPMI) i filtrira kroz najlonsku mrežicu. Nakon toga uzorak se ponovo centrifugira na 800 G 5 minuta i doda 1 ml tripsina u citratnom puferu (10 minuta u vodenoj kupelji na 37^{o}C uz miješanje. Nakon centrifugiranja talog dobivenih jezgara tumorskih stanica obradi se s ribonukleazom S, a zatim se boja propidijevim jodidom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

3.2 Analiza rezultata protočne citometrije

Sadržaj DNA izmjerenje na FACScan protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD) pri valnoj dulini od 488 nm uz crveni filter i snagu lasera od 500 mW. Analizirano je 10.000 jezgara po uzorku.. Histogrami intenziteta fluorescencije analizirani su gotovim programom (CONSORT 30 program) koji nudi proizvođač stroja. Histogram se tumači kao diploidni ako postoji jedan G0/G1 vršak, kojem je CV<10.0. Nazočnost više od jednog vrška na histogramu fluorescencije pokazuje

da se radi o DNA aneuploidiji ili većem broju stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa (više od 10% stanica, DNA tetraploidija).

Analiza DNA sadržaja protočnim citometrom pokazala je da je 53% bolesnika imalo **DNA diploidni tumor** dok je **DNA aneuploidija** dijagnosticirana u preostalih 47% bolesnika.

Kako se u nekim slučajevima nije moglo odrediti koliko stanica spada u S, a koliko u S+G2M fazu staničnog ciklusa, za određivanje vrijednosti **proliferativne aktivnosti (S+G2M)** bolesnici su također svrstani u dvije grupe. Jedna grupa s vrijednosti S+G2M $\leq$10%, te druga grupa s vrijednostima >10%. Pokazalo se da je čak 79% bolesnika imalo udio stanica u S+G2M fazi $\leq$10% dok su više vrijednosti od toga zabilježene u 21% bolesnika.

S obzirom na ploidni status i proliferativnu aktivnost osmislen je i novi parametar koji objedinjuje ove dvije varijable, a nazvali smo ga **kombinirani nalaz protočne citometrije (KNPC)**. Ukoliko se radilo o diploidnom tumoru s proliferativnom aktivnošću $\leq$10% svrstali smo ga u povoljnu skupinu, za razliku od DNA aneuploidnih i DNA diploidnih tumora s povišenom proliferativnom aktivnošću koje smo smatrali prognostički nepovoljnim. Kada smo podijelili bolesnike u povoljnu i nepovoljnu skupinu s obzirom na KNPC pokazalo se da je većina bolesnika (61%) bila u nepovoljnoj skupini s obzirom na vrijednost DNA sadržaja.

3.3 Statističke metode

Razlike između frekvencija za analizirane varijable (spol, dob, lokalizacija, Clark, Breslow, mitotski indeks, DNA ploidnost, proliferacijska aktivnost (S+G2M) prema histološkom tipu (SSM i MN) testirane su χ^2 testom. Ukoliko su očekivane frekvencije za određene kategorije bile manje od 5 razlika je testirana Fisherovim egzaktnim testom (107).

Ukoliko je postojala statistički značajna razlika za multikategorijske varijable (Clark i Breslow), statistička značajnost između kategorija utvrdila se Hockbergovim post hoc testom (108).

Za procjenu duljine života nakon postavljene dijagnoze koristili smo Kaplan-Meirovu metodu. Vjerojatnost preživljenja izračunavala se metodom životnih tablica i prikazala grafički Kaplan-Meierovim krivuljama.

Istodobni utjecaj svih pokazatelja (spol i dob bolesnika, lokalizacija tumora, histološka razina invazije, debljina tumora**,** mitotski indeks, DNA ploidnost, proliferativna aktivnost i kombinirani nalaz protočne citometrije) na prognozu preživljenja, odnosno za procjenu relativnog rizika smrti i 95% intervala pouzdanosti analiziran je metodom multivarijantne regresije na nepotpunim podacima, tj. Coxovom regresijskom analizom (univarijatno i multivarijatno) (109).

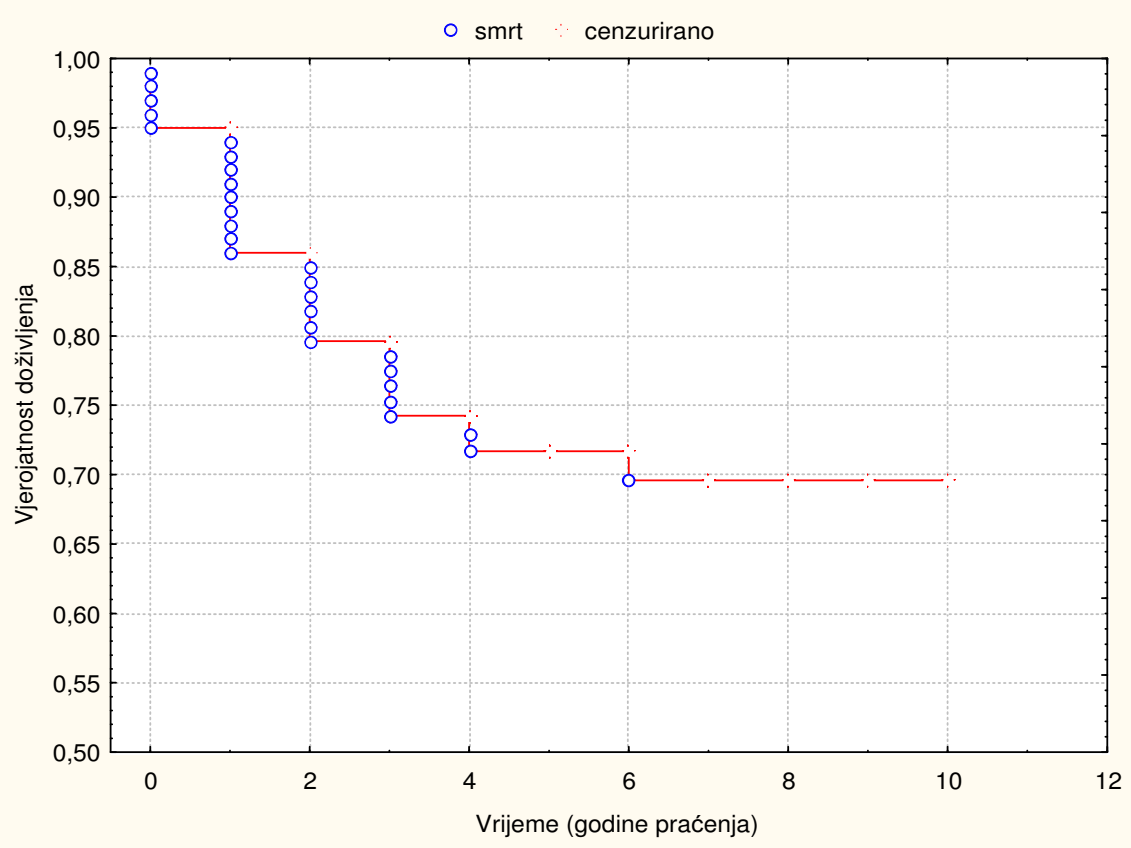
Razlike između funkcija doživljenja testirane su Log rank testom.

Varijable koje su jako korelirale izdvojene su iz multivarijatne analize (DNA ploidnost, S+G2M).

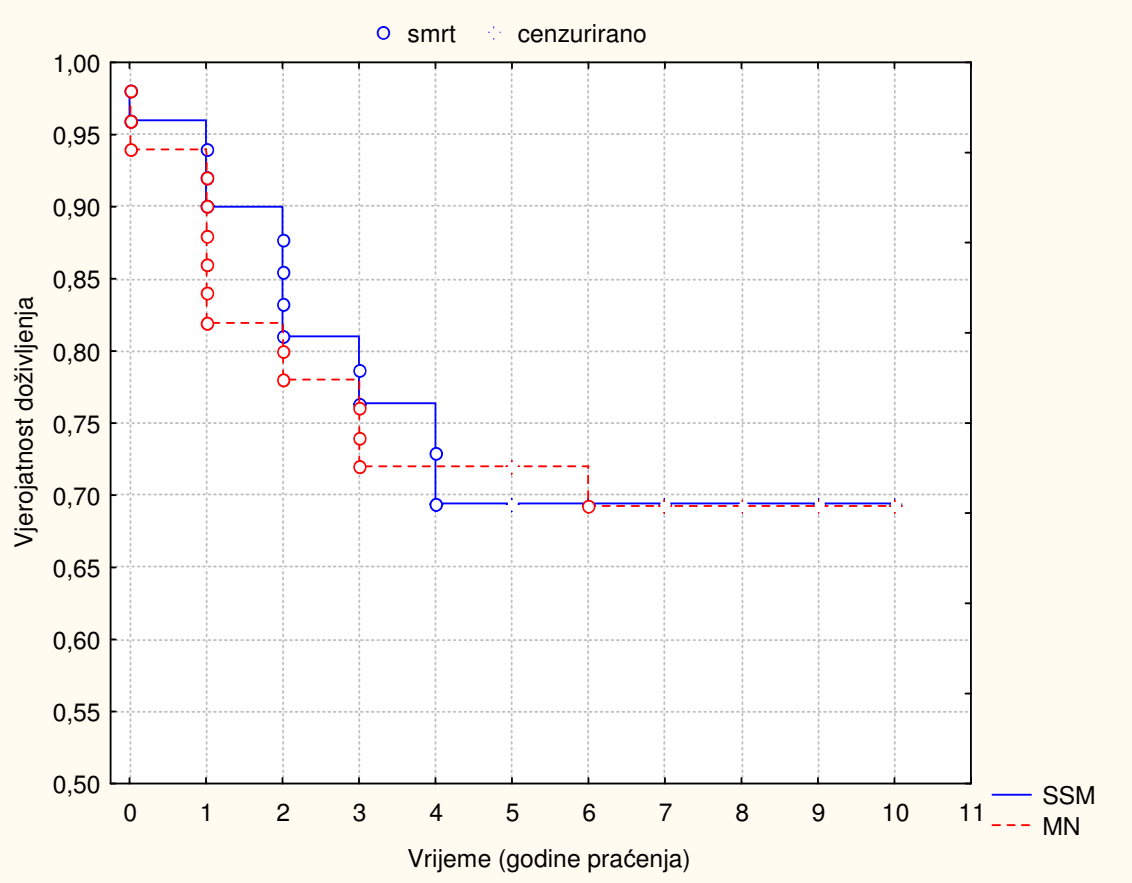
Nivo značajnosti od 5% u svim testovima smatran je statistički značajnim. Za sve analize korišten je statistički programski paket SAS 6.12 i Statistica 6.0.

4. REZULTATI

Slika 6 i 7 prikazuju ukupno petogodišnje preživljenje za sve bolesnike koji su bili uključeni u studiju. Na **slici 6** vidljivo je da petogodišnje preživljenje ispitivane skupine bolesnika s MM bilo 72%. S obzirom na histološki tip tumora između skupine bolesnika s SSM i MN nije bila zabilježena značajna razlika u petogodišnjem preživljenju **(slika 7)**.



Slika 6. Krivulja doživljenja bolesnika (N=100) s malignim melanomom kože.



Slika 7. Krivulja doživljenja bolesnika sa površinskoširećim melanomom (SSM) (N=50) i nodularnim melanomom (MN) (N=50).

4.1 Klinički, histopatološki i protočnocitometrijski parametri u odnosu na histološki tip malignog melanoma

Tablica 4 prikazuje kliničke, histopatološke i protočnocitometrijske zanačajke tumora u bolesnika sa MM kože.

Spol. U skupini muškaraca (N=48), SSM bio dijagnosticiran u 19, a NM 29 bolesnika. Taj odnos bio je obrnut u skupini žena (N=52) gdje je kod 31 bolesnice dijagnosticiran SSM¸ a kod preostalih 21 MN. Razlika u zastupljenosti histoloških tipova prema spolu statistički je značajna (p=0,045).

Dob. U skupini bolesnika mlađoj od 65 godina (N=66) bilo njih 32 s dijagnozom SSM, i 34 s NM. Iako je broj bolesnika bio manji u skupini starijoj od 65 godina (N=34), od toga njih 18 s dijagnozom SSM i samo 16 s MN, nema statistički značajne razlike u zastupljenosti ovih histoloških tipova prema dobi bolesnika (p=0,673).

Lokalizacija. Od ukupnog broja bolesnika s SSM njih 44 imalo je ovaj histološki tip tumora lokaliziran na ekstremitetima i trupu, a kod MN 46 bolesnika. Vrlo mali broj bolesnika imao je ovaj tip tumora lokaliziran u predjelu glave i vrata, i to 6 bolesnika s SSM i 4 s dijagnozom MN. Statistički nema značajne razlike u lokalizaciji s obzirom na histološki tipa tumora.

Clark. Analizirajući histološku razinu invazije, u skupini Clark III i IV bilo je 49 bolesnika s dijagnozom SSM, i njih 33 s MN. U skupini Clark V bio je svega jedan bolesnik s SSM, te čak 17 bolesnika s MN. Statistički postoji značajna razlika u frekvenciji bolesnika između kategorija Clarka III i IV te kategorije Clark V u odnosu na histološki tip tumora (p=0,001).

Tablica 4. Usporedba istraživanih parametara u odnosu na histološki podtip malignog melanoma (N=100).

Varijabla	ukupno	SSM	MN	test
SPOL				χ^2=4,01
muški	48	19	29	**p=0,045**
žene	52	31	21	
DOB				χ^2=0,18
< 65 god.	66	32	34	p=0,673
≥65 god	34	18	16	
lokalizacija				Fisherov
ekstremitet	42	21	21	test
trup	48	23	25	p=0,853
okrajine	6	3	3	
glava, vrat	4	3	1	
CLARK				χ^2=17,36
3	39	23	16	**p=0,001**
4	43	26	17	*Hockberg*
5	18	1	17	**(3,4) (5)**
BRESLOW				χ^2=5,59
3	27	20	7	**p=0,014**
4	14	6	8	**Hockberg**
5	59	24	35	**(3) (4,5)**
Mitotski indeks				χ^2=1,61
≤ 5	54	22	24	p=0,688
> 5	46	28	26	
DNA ploidija				χ^2=1,00
diploidija	53	29	24	

aneuploidija	47	21	26	p=0,316
S+G2M[#1]				χ^2=0,54 p=0,316
≤10%	79	38	41	
>10%	21	12	9	
KNPC[#2]				χ^2=0,378 p=0,539
povoljan KNPC[#3]	39	21	18	
nepovoljan KNPC[#4]	61	29	32	

Legenda:

#1 S+G2M = proliferativna aktivnost;
#2 KNPC = kombinirani nalaz protočne citometrije (ploidnost i S+G2M);
#3 povoljan KNPC = DNA diploidija i S+G2M ≤10%
#4 nepovoljan KNPC = DNA aneuploidija ili DNA diploidija i S+G2M>10%

Breslow. S obzirom na debljinu tumora u skupini Breslow III bilo je 20 bolesnika s dijagnozom SSM, i njih 7 s MN. Suprotno tome u skupini Breslow IV i V bilo je 30 bolesnika sa SSM i 42 s MN. Razlika u frekvenciji bolesnika između skupine Breslow III u odnosu na Breslow IV i V prema histološkom tipu tumora statistički je značajna (p=0,014).

Mitotski indeks (MI). Analizirajući prema histološkom tipu u grupi MI≤ 5 bilo je 22 bolesnika s SSM, te njih 24 s MN. U grupi ispitanika s MI>5 bilo je njih 28 sa SSM i 26 s NM. Nije postojala statistički značajna razlika u frekvenciji vrijednosti MI i s obzirom na histološki tip tumora (p=0,688).

DNA ploidnost. Od ukupnog broja bolesnika s diploidnim tumorima, njih 29 je bilo u skupini SSM, a 24 u skupini MN. Gotovo

podjednaka raspodjela je bila i u skupini aneuploidnih tumora, od kojih je 21 je bilo u skupini SSM, a 26 u skupini NM. Statistički nema razlike u frekvenciji bolesnika u DNA ploidnosti s obzirom na histološki tip tumora (p=0,316).

Proliferacijska aktivnost (S+G2M). U skupini tumora s proliferativnom aktivnosti $\leq$10% bilo je 38 bolesnika sa SSM, i 41 s MN. U grupi bolesnika s proliferativnom aktivnosti >10% bilo je njih 12 s dijagnozom SSM i 9 s MN. Nema statistički značajne razlike u proliferativnoj aktivnosti s obzirom na histološki tip tumora (p=0,316).

Kombinirani nalaz protočne citometrije (KNPC). Analizirajući KNPC u grupi bolesnika s povoljnijim nalazom (DNA diploidija i S+G2M$\leq$10%) bilo je njih 21 s dijagnozom SSM, te 18 s MN. U nepovoljnoj skupini (DNA aneuploidnost ili DNA diploidnost i S+G2M>10%) bilo je 29 bolesnika sa SSM i njih 32 s MN. Statistički nema značajne razlike u vrijednosti KNPC s obzirom na histološki tip tumora (p=0,539).

4.2 Ovisnost učestalosti mrtvih i «cenzuriranih» bolesnika o kliničkim, histopatološkim i protočnocitometrijskim parametrima u odnosu na histološki tip melanoma

U **tablici 5** prikazana je frekvencija mrtvih i "cenzuriranih" bolesnika u odnosu na histološki tip tumora i rezultati log-Rank testa. U skupini bolesnika sa SSM bilo je 13 mrtvih i 37 cenzuriranih, te u skupini s MN 15 mrtvih i 35 cenzuriranih.

Tablica 5. Učestalost mrtvih i "cenzuriranih" bolesnika u odnosu na histološki podtip melanoma

Histološki tip	**SSM**			**MN**			**SSM+MN**
Varijabla	Mrtvi	Cenzurirani	log-Rank test	Mrtvi	Cenzurirani	log-Rank test	log-Rank test
SPOL (ukup.)	13	37	χ^2=0,095 p=0,757	15	35	**χ^2=3,754 p=0,053**	χ^2=2,260 p=0,133
muški	5 (26,3%)	14 (73,7%)		12 (41,4%)	17 (58,6%)		
žene	8 (25,8%)	23 (74,2%)		3 (14,3%)	18 (85,7%)		
DOB	13	37		15	35		

< 65 god.	8 (25,0%)	24 (75,0%)	χ^2=0,009 p=0,922	9 (26,5%)	25 (73,5%)	χ^2=0,645 p=0,422	χ^2=0,451 p=0,502
≥65 god	5 (27,8%)	13 (72,2%)		6 (37,5%)	10 (62,5%)		
Lokalizacija	13	37	χ^2=2,95 p=0,3985	15	35	χ^2=7,430 p=0,059	χ^2=7,047 p=0,070
ekstremitet	4 (19,0%)	17 (81,0%)		2 (9,5%)	19 (90,5%)		
trup	8 (34,8%)	15 (65,2%)		11 (46,0%)	14 (56,0%)		
okrajine	1 (33,3%)	2 (66,7%)		1 (33,3%)	2 (66,7%)		
glava, vrat	0 (0,0%)	3 (100,0%)		1 (100,0%)	0 (0,0%)		
CLARK	13	37	χ^2=0,108 p=0,742	15	35	**χ^2=4,179 p=0,041**	**χ^2=6,412 p=0,040**
3	5 (21,7%)	18 (78,3%)		1 (6,3%)	15 (93,7%)		
4	8 (30,8%)	18 (69,2%)		6 (35,3%)	11 (64,7%)		
5	0 (0,0%)	1 (100,0%)		8 (47,1%)	9 (52,9%)		
BRESLOW	13	37	**χ^2=13,557 p=0,000**	15	35	χ^2=2,910 p=0,088	**χ^2=15,589 p=0,0004**
3	0 (0,0%)	20 (100,0%)		0 (0,0%)	7 (100,0%)		

4	1 (16,7%)	5 (83,3%)	**2**	2 (25,0%)	6 (75,0%)		
5	12 (50,0%)	12 (50,0%)		13 (37,1%)	22 (62,9%)		

Tablica 5. (nastavak)

Histološki tip	**SSM**			**MN**			**SSM+MN**
Varijabla	Mrtvi	Cenzurirani	log-Rank test	Mrtvi	Cenzurirani	log-Rank test	log-Rank test
Mitotski indeks	13	37	**χ^2=3,8749 p=0,049**	15	35	χ^2=1,826 p=0,176	**χ^2=5,655 p=0,017**
≤ 5	2 (9,1%)	20 (90,9%)		5 (20,8%)	19 (79,2%)		
> 5	11 (39,3%)	17 (60,7%)		10 (38,5%)	16 (61,5%)		
DNA ploidija	13	37	χ^2=0,0019 p=0,965	15	35	χ^2=3,536 p=0,059	χ^2=2,197 p=0,138
aneuploidija	6 (28,6%)	15 (71,4%)		11 (42,3%)	15 (57,7%)		
diploidija	7 (24,1%)	22 (75,9%)		4 (16,7%)	20 (83,3%)		
S+G2M[#1]	13	37	χ^2=0,062 p=0,803	15	35	χ^2=1,218 p=0,269	χ^2=0,366 p=0,545
≤10%	10 (26,3%)	28 (73,7%)		11 (26,8%)	30 (73,2%)		
>10%	3 (25,0%)	9 (75,0%)		4 (44,4%)	5 (55,6%)		
KNPC[#2]	13	37		15	35		

povoljan KNPC[#3]	5 (23,8%)	16 (76,2%)	χ^2=0,003 p=0,959	2 (11,1%)	16 (88,9%)	**χ^2=4,302 p=0,038**	χ^2=2,489 p=0,115
nepovoljan KNPC[#4]	8 (27,6%)	21 (72,4%)		13 (40,6%)	19 (59,4%)		

Legenda:

#1 S+G2M = proliferativna aktivnost;

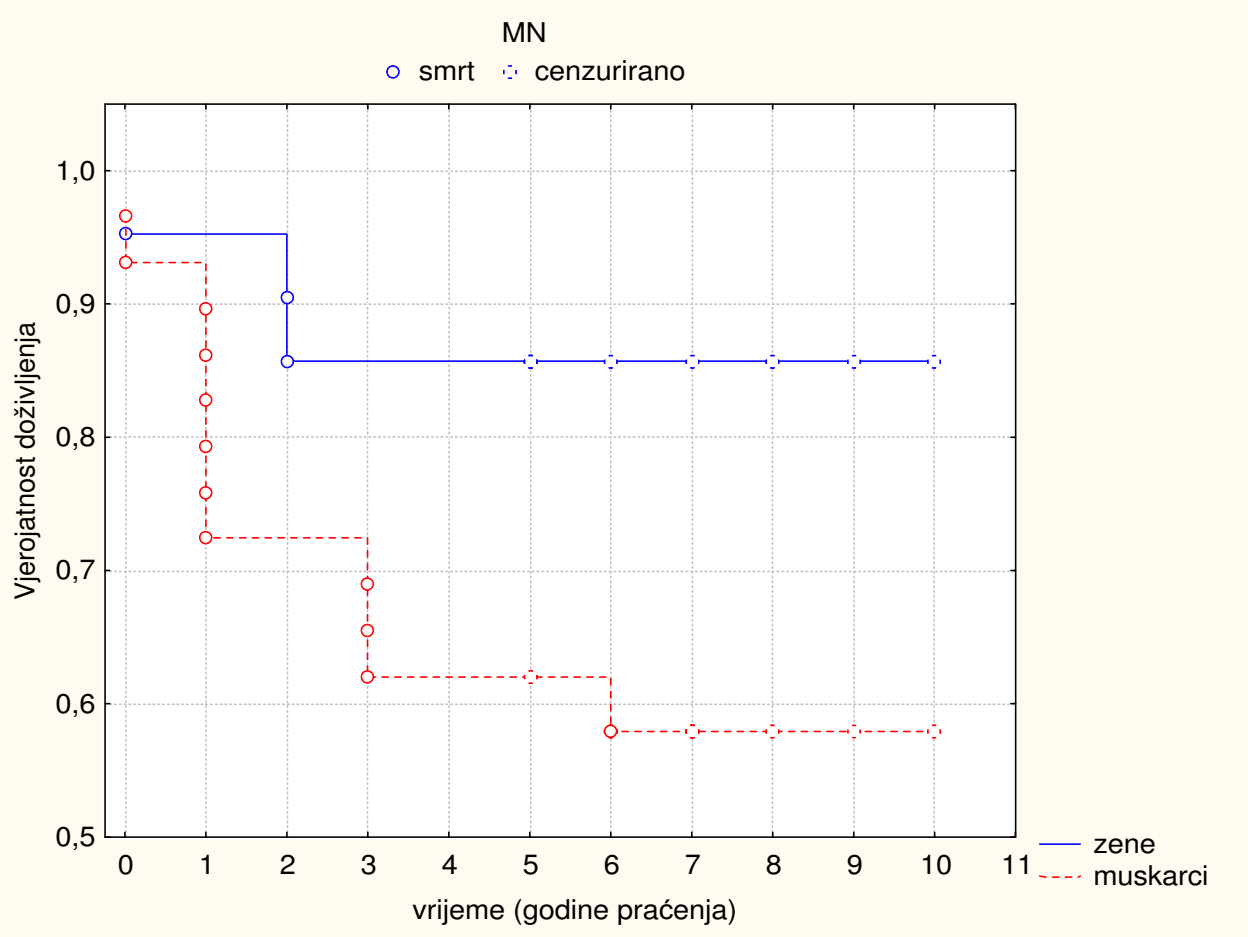
#2 KNPC = kombinirani nalaz protočne citometrije (ploidnost i S+G2M);

#3 povoljan KNPC = DNA diploidija i S+G2M ≤10%;

#4 nepovoljan KNPC = DNA aneuploidija ili DNA diploidija i S+G2M>10%.

Spol. Kod SSM u skupini muškaraca bilo je 5 (26,3%) mrtvih i 14 (73,7%) cenzuriranih. Slična raspodjela je bila i kod žena, od kojih je 8 (25,8%) mrtvih i 23 (74,7%) «cenzurirane». Statistički nema značajne razlike u frekvenciji mrtvih i cenzuriranih bolesnika sa SSM (p=0,757).

U skupini bolesnika s MN umrlo je 12 (41,4%) muških, a 17 (58,6%) je bilo «cenzuriranih». U skupini žena umrlo je 3 (14,3%), a 18 (85,7%) bilo je «cenzuriranih». Ovdje je postojala statistički značajna razlika u preživljenju u skupini MN s obzirom na spol (p=0,53), slika 8.



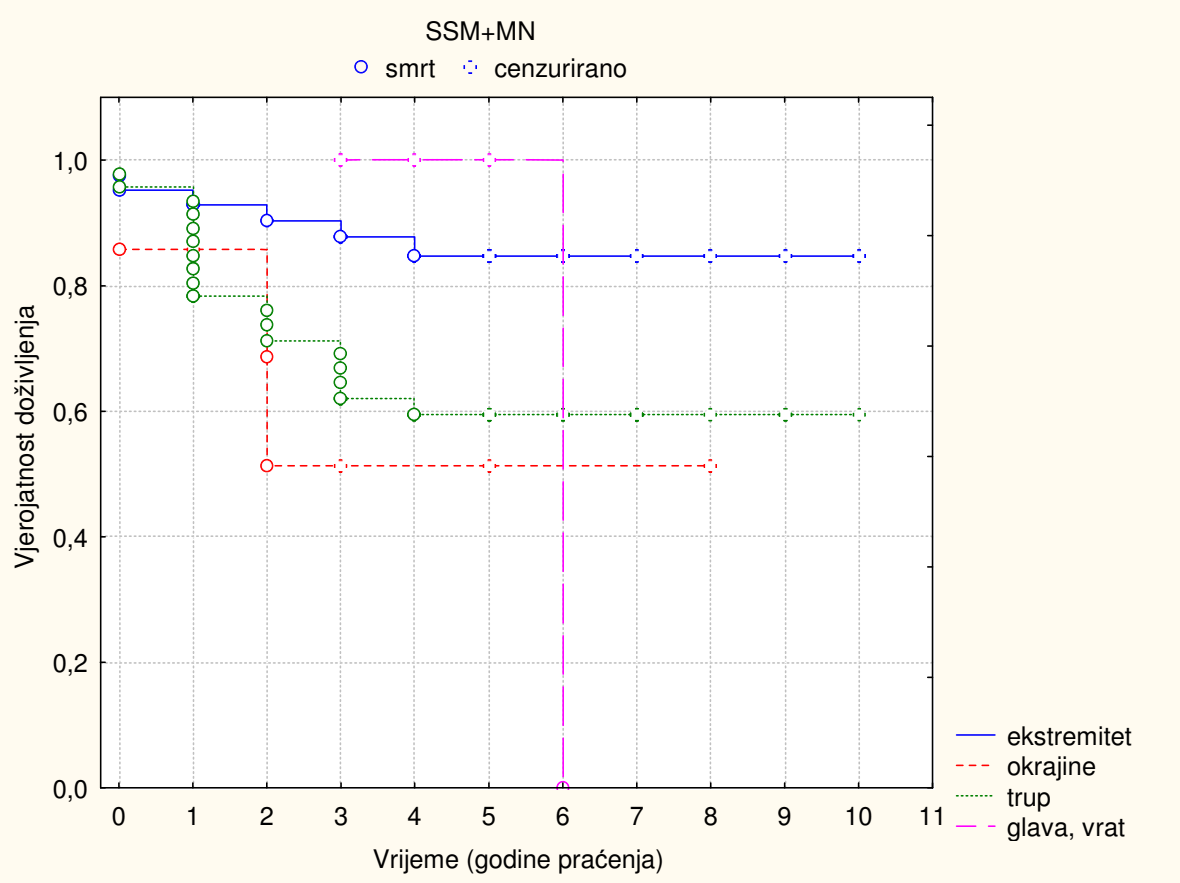
Slika 8. Krivulja doživljenja bolesnika s MN s obzirom na spol.

Prema rezultatima ispitivanja ukupnog uzorka studije (SSM+MN) nije bilo statistički značajne razlike u funkciji doživljenja prema spolu bolesnika (p=0,133).

Dob. Niti u jednoj od analiziranih skupina nije postojala statistički značajna razlika u funkciji doživljenja s obzirom na dob. U skupini SSM p=0,922, kod MN p=0,422, a u skupini ukupnog uzorka studije (SSM+MN) p=0,502.

Lokalizacija. Podaci o funkciji doživljenja s obzirom na lokalizaciju i histološki tip tumora nisu statistički značajni za skupinu SSM (p=0,3985),

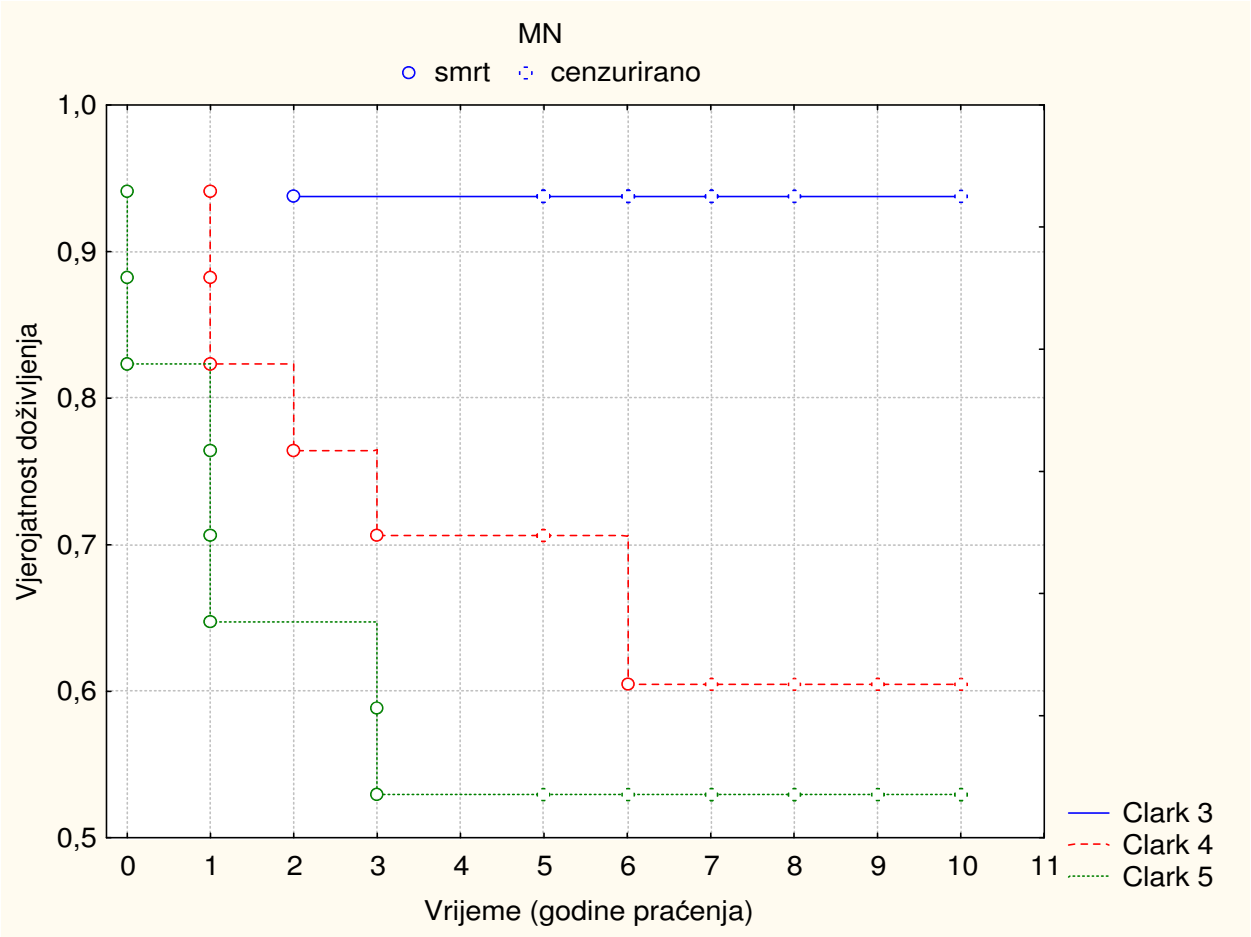
MN (p=0,059) kao i za ukupan uzorak studije (SSM+MN) (p=0,070), slika 9.



Slika 9. Krivulja doživljenja kod ukupnog uzorka bolesnika (SSM+MN) s obzirom na lokalizaciju tumora.

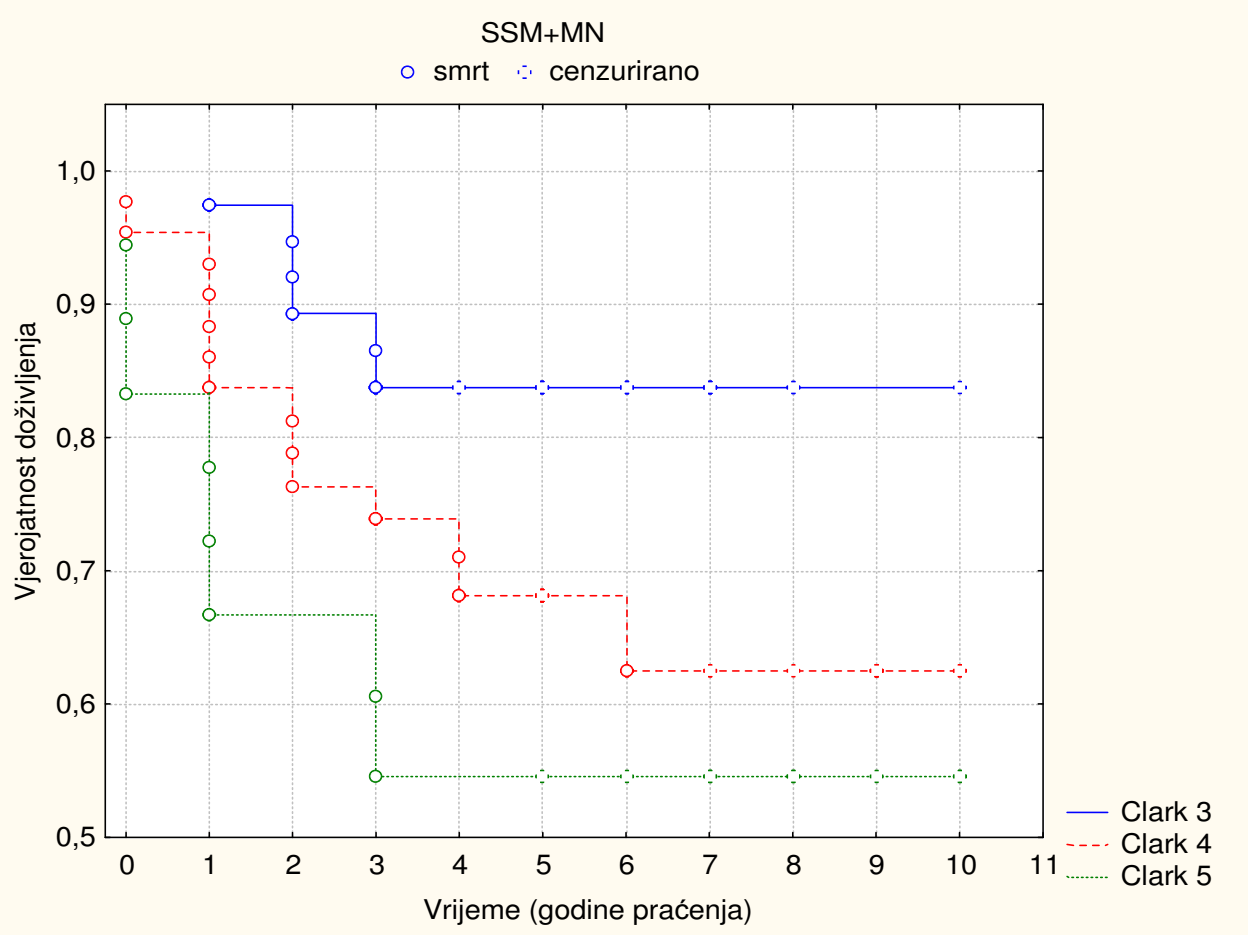
Clark. U skupini bolesnika sa SSM nema statistički značajne razlike u preživljenju s obzirom na različite stupnjeve Clarka (p=0,742).

U skupini bolesnika s MN Clark III bio je jedan mrtav (6,3%), a 15 (93,7%) cenzuriranih. Kod Clark IV bilo je 6 (35,3%) mrtvih i 11 (64,7%) cenzuriranih, a u kategoriji Clark V je 8 (47,1%) mrtvih i 9 (52,9%) cenzuriranih. Preživljenje bolesnika sa MN statistički značajno ovisi o stupnju invazije po Clarku (p=0,041), slika 10.



Slika 10. Krivulja doživljenja bolesnika s MN s obzirom na histološku razinu invazije kože prema Clarku.

Statistički značajna razlika s obzirom na različite stupnjeve Clarka zabilježena je i kod bolesnika s MM neovisno o histološkom tipu (SSM i MN) (p=0,040), slika 11.

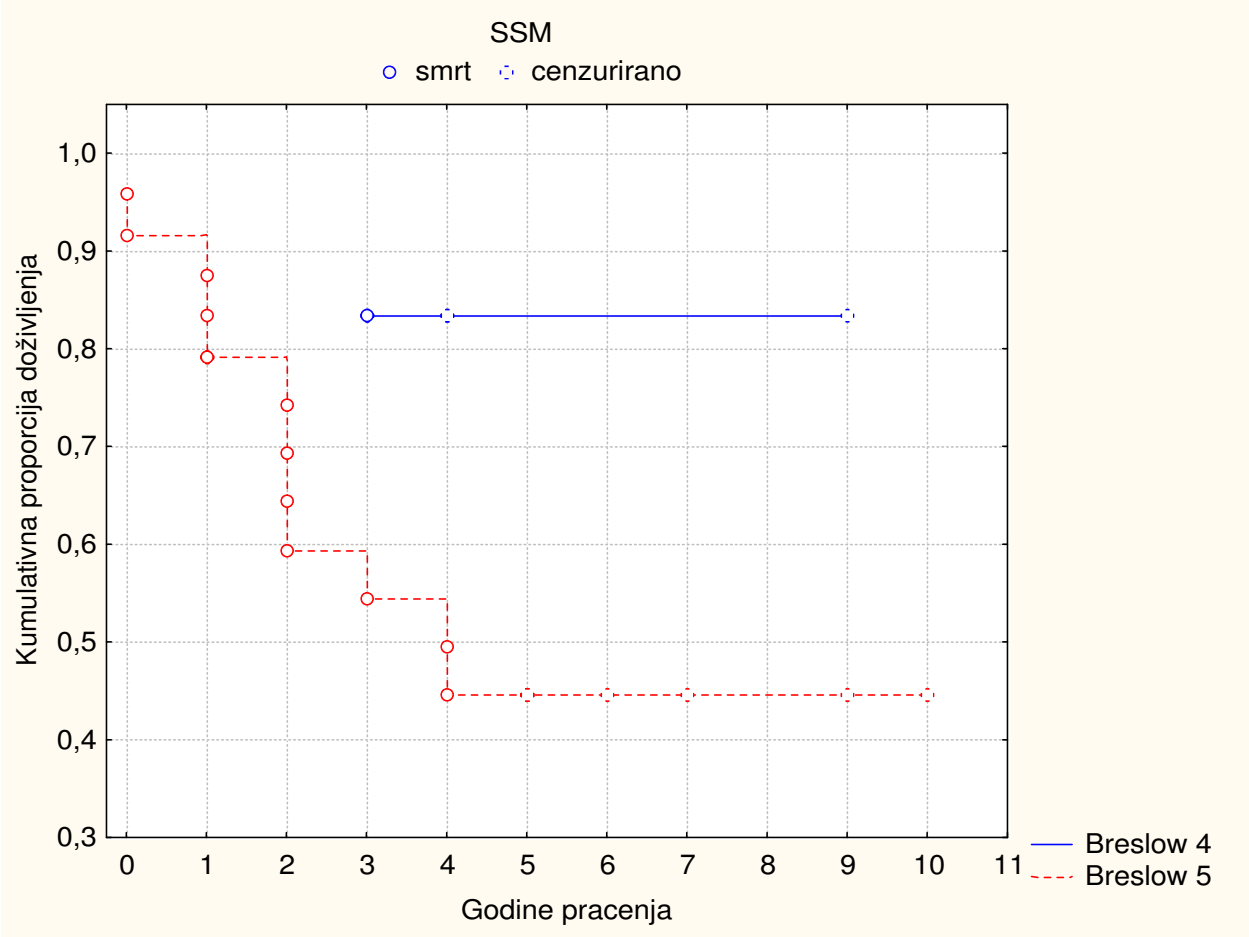


Slika 11. Krivulja doživljenja bolesnika u ukupnom uzorku (SSM+MN) s obzirom na histološku razinu invazije prema Clarku.

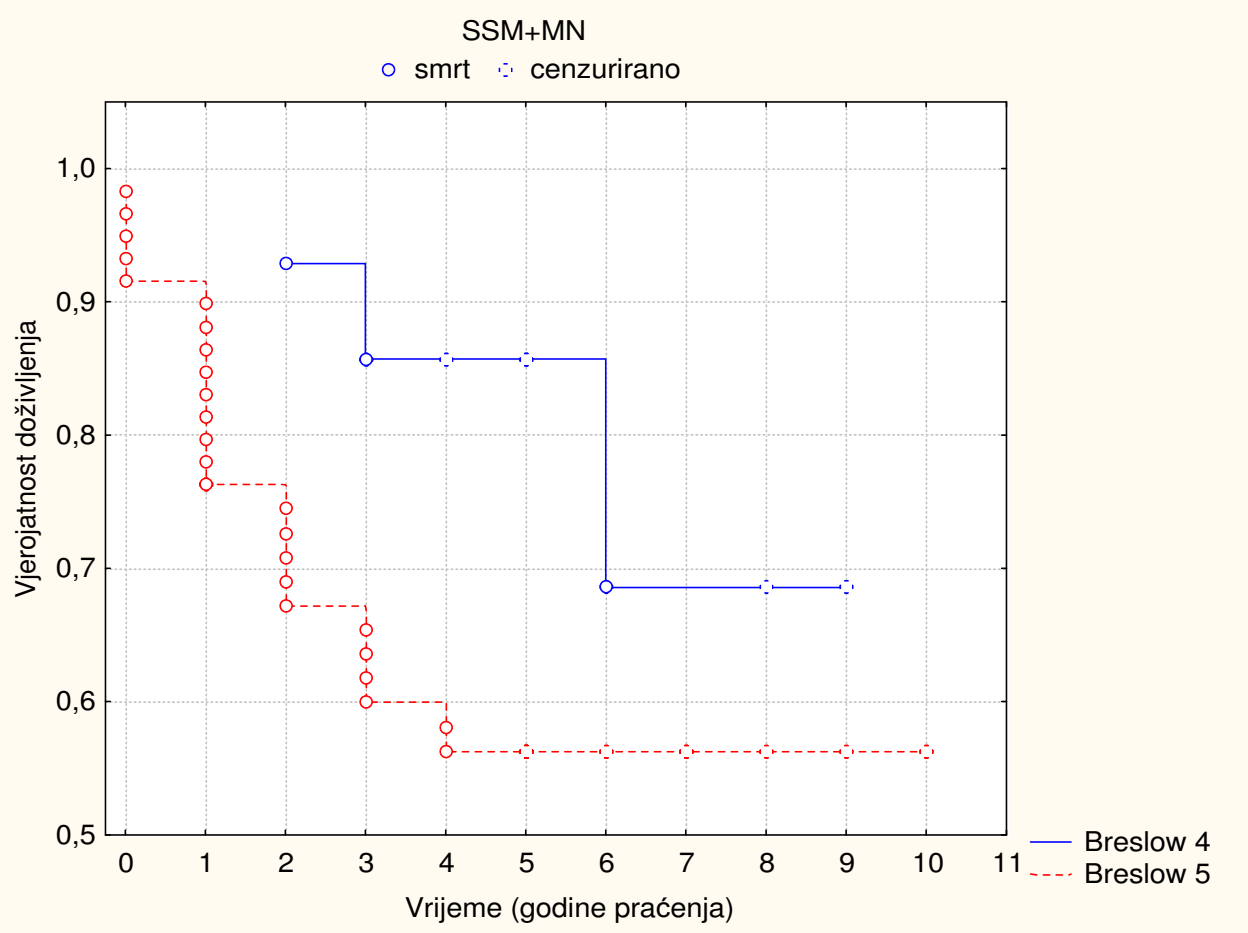
Breslow. U skupini bolesnika s dijagnozom SSM Breslow III nije zabilježen ni jedan mrtav bolesnik, a 20 (100,0%) je cenzuriranih. U kategoriji Breslow IV jedan (16,7%) bolesnik je mrtav, a 5 (83,3%) cenzuriranih. Za Breslow V zbilježeno je 12 (50,0%) mrtvih i 12 (50,0%) cenzuriranih bolesnika.

Ove razlike u preživljenju bolesnika sa SSM su statistički značajne (p=0,0002) (slika 12). Nasuprot tome, nema statistički značajne razlike u preživljenju bolesnika sa MN u odnosu na debljinu tumora po Breslowu (p=0,088).

Slika 12. Krivulja doživljenja bolesnika sa SSM s obzirom na debljinu tumora prema Breslowu.



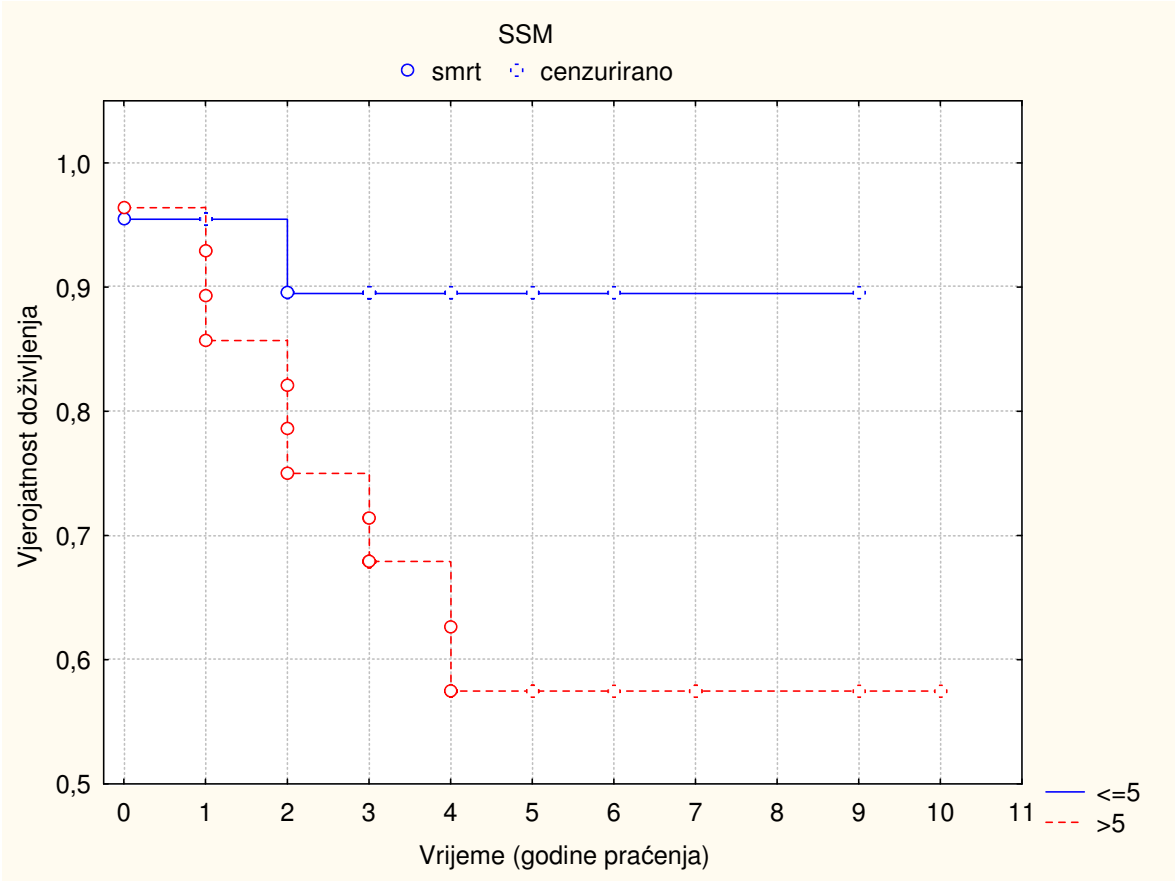
Preživljenje bolesnika sa MN bez obzira na histološki podtip izrazito ovisi o stupnju debljine tumora po Breslowu (p=0, 0004), slika 13.



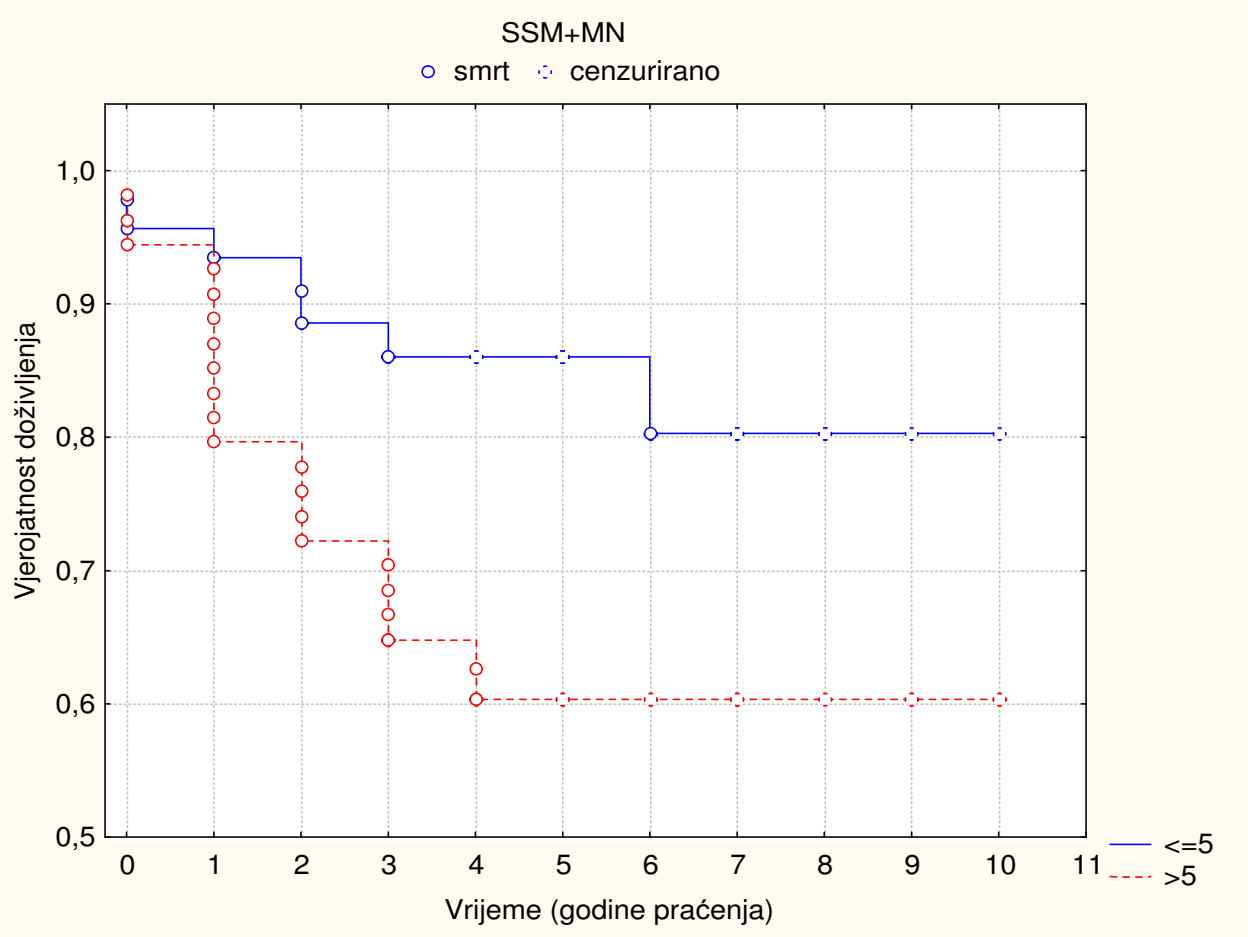
Slika 13. Krivulja doživljenja bolesnika u ukupnom uzorku (SSM+MN) s obzirom na debljinu tumora prema Breslowu.

Mitotski indeks (MI). U grupi SSM bilo je zabilježeno 2 (9,1%) mrtva i 20 (90,9%) cenzuriranih bolesnika u skupini s MI≤5. U skupini MI>5 bilo je 11 (39,3%) mrtvih i 17(60,7%) cenzuriranih bolesnika. Te razlike u doživljenju s obzirom na vrijednost MI kod bolesnika sa SSM su statistički značajne (p=0,049), slika 14.

Slika 14. Krivulja doživljenja bolesnika sa SSM s obzirom na vrijednost mitotskog indeksa (MI).



U bolesnika s MN nije bilo statistički značajne razlike za ove dvije kategorije MI (p=0,176), Ipak je preživljenje bolesnika s MN i MI>5 statistički značajno kraće od bolesnika sa MI<5 (p=0,017), slika 15.



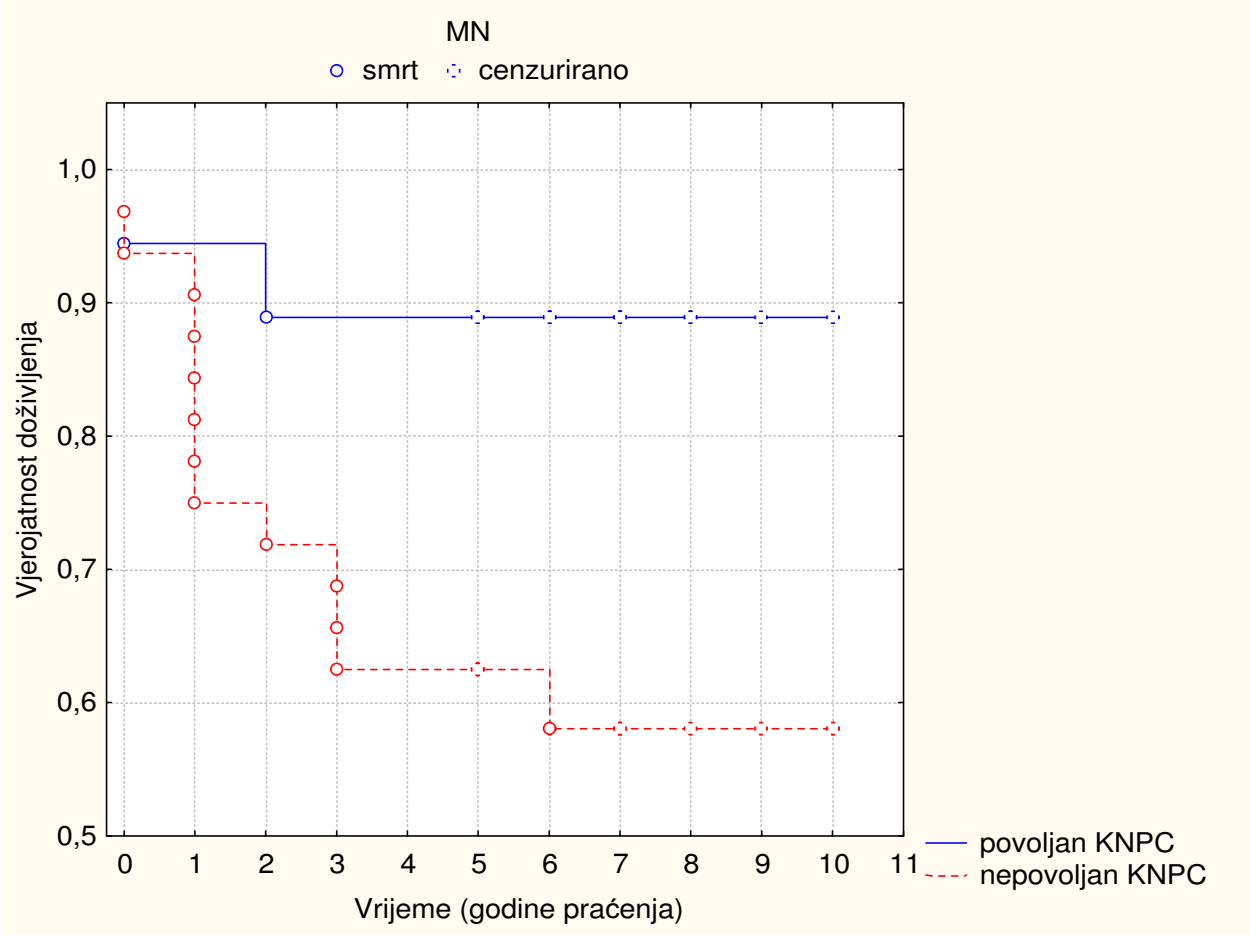
Slika 15. Krivulja doživljena bolesnika u ukupnom uzorku (SSM+MN) s obzirom na vrijednost mitotskog indeksa (MI).

DNA ploidnost. U skupini SSM (p=0,965), MN (p=0,059), i u skupini ukupnog uzorka (SSM+MN) (p=0,138) nema statistički značajne razlike u preživljenju u odnosu na DNA aneuploidne i DNA diploidne tumore.

Profliferativna aktivnost (S+G2M). Analizirajući proliferativnu aktivnost nije zabilježena statistički značajna razlika u funkciji doživljenja za skupinu SSM (p=0,803), za MN (p=0,269) i u ukupnom uzorku (SSM+MN) (p=0,545).

Kombinirani nalaz protočne citometrije (KNPC). U skupini SSM nema statistički značajne razlike u preživljenju s obzirom na KNPC (p=0,959), dok se u skupini MN pokazalo da bolesnici s aneuploidnim tumorima ili povišenom S+G2M fazom imaju kraće preživljenje (p=0,038),

slika 16.



Legenda: povoljan KNPC = diploidija i S+G2M≤10%

nepovoljan KNPC = aneuploidija ili diploidija i S+G2M>10%

Slika 16. Krivulja doživljenja bolesnika u skupini ukupnog uzorka (SSM+MN) s obzirom na povoljan i nepovoljan KNPC.

No, gledajući ukupan uzorak (SSM+MN) nema statistički značajne razlike između funkcije doživljenja i KNPC (p=0,115).

4.3 Prognostički značaj kliničkih, histopatoloških i protočnocitometrijskih parametara u odnosu na histološki tip melanoma

Rezultati univarijatne i multivarijatne Coxove regresije s obzirom na histološki podtip i ukupni uzorak (SSM+MN) kod bolesnika s MM prikazani su u **tablici 6**.

Spol i dob. Prema rezultatima univarijatne i multivarijatne Coxove regresijske analize prema histološkom tipu tumora nema značajne statističke razlike u relativnom riziku (RR) smrti u odnosu na spol i dob.

Lokalizacija. U grupi SSM nema statistički značajne razlike u RR smrti u odnosu na lokalizaciju, za razliku od skupine bolesnika s MN.

Kod MN u univarijatnoj analizi RR smrti je 5,4 puta veći od onog lokaliziranog na ekstremitetima i statistički je značajan, dok je RR smrti u toj grupi za glavu i vrati 9,6 puta veći, no nije statistički značajan.

U ukupnom uzorku (SSM+MN) u univarijatnom modelu RR smrti za trup je 3,1 puta veći od tumora lokaliziranih na ekstremitetima. U multivarijatnom modelu RR smrti od MM lokaliziranog na okrajinama je za oko 3,6 puta veći od onog lokaliziranog na ekstremitetima, ali ti rezultati nisu statistički značajni.

U ukupnom uzorku (SSM+MN) tumori lokalizirani na glavi i vratu imaju u univarijatnom modelu RR smrti veći od onih lokaliziranih na ekstremitetima za 67%, ali taj rezultat nije statistički značajan, dok u multivarijatnom modelu taj rizik je 14 puta veći i statistički je značajan.

Tablica 6. Prognostički značaj kliničkih, histopatoloških i protočnocitometrijskih parametara u odnosu na histološki tip melanoma - rezultati Coxove regresije. (Relativni rizici smrti i 95% intervali pouzdanosti za univarijatnu i multivarijatnu Coxovu regresiju).

Coxova regresija	SSM		MN		SSM+MN	
	Uni varijatno	Multi varijatno	Uni varijatno	Multi varijatno	Uni varijatno	Multi varijatno
	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)
SPOL						
muški	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
žene	0,947 (0,308-2,904)	0,926 (0,278-3,079)	0,318 (0,09-1,127)	0,558 (0,120-2,592)	0,573 (0,268-1,223)	0,712 (0,296-1,714)
DOB						
< 65 god.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
≥65 god	1,056 (0,344-3,238)	0,944 (0,265-3,355)	1,502 (0,534-4,220)	1,374 (0,480-3,938)	1,286 (0,602-2,746)	1,050 (0,487-2,267)
LOKALIZACIJA						
ekstremitet	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
trup	1,838 (0,553-6,108)	2,047 (0,564-7,439)	**5,404 (1,195-24,439)**	2,928 (0,503-17,026)	**3,080 (1,229-7,718)**	2,331 (0,869-6,256)
okrajine	3,543 (0,386-32,499)	9,826 (0,772-125,040)	3,787 (0,343-41,866)	3,253 (0,222-47,696)	3,057 (0,616-15,181)	3,592 (0,680-18,980)
glava, vrat	-	-	9,615 (0,871-106,131)	15,929 (0,531-477,631)	1,675 (0,202-13,925)	**14,625 (1,044-204,833)**
CLARK						
3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4	1,325	0,792	**2,385**	1,447	**1,856**	1,090

5	(0,455-3,862)	(0,226-2,775)	**(1,163-4,889)**	(0,615-3,406)	**(1,122-3,069)**	(0,624-1,902)
BRESLOW						
3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4	**7,419 (1,389-39,630)**	**7,442 (1,355-40,856)**	2,873 (0,836-9,871)	2,006 (0,531-7,576)	**4,507 (1,696-11,977)**	**3,994 (1,446-11,028)**
5						
MITOTSKI INDEKS						
≤ 5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
> 5	3,927 (0,870-17,725)	2,510 (0,479-13,161)	2,018 (0,689-5,912)	1,443 (0,478-4,359)	**2,635 (1,120-6,199)**	1,945 (0,811-4,664)
KNPC[#1]						
povoljan KNPC[#2]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
nepovoljan KNPC[#3]	0,972 (0,317-2,980)	0,702 (0,209-2,363)	4,084 (0,920-18,126)	2,696 (0,525-13,842)	1,928 (0,819-4,536)	1,469 (0,576-3,750)

Legenda:

#1KNPC = kombinirani nalaz protočne citometrije

#2povoljan KNPC = DNA diploidija i S+G2M ≤10%;

#3 nepovoljan KNPC = DNA aneuploidija ili DNA diploidija i S+G2M>10%.

Clark. U univarijatnoj ni u multivarijatnoj analizi nema statistički značajne razlike u RR smrti u odnosu na povećanje stupnja Clarka za jedan više u skupini bolesnika sa SSM.

Za skupinu bolesnika s MN u univarijatnoj analizi RR smrti povećava se 2,38 puta za povećanje stupnja Clarka za jedan više i taj rezultat je statistički značajan.

U ukupnom uzorku (SSM+MN) pokazalo se da povećanje Clarka za 1 stupanj na više povećava rizik smrti za 85,6%. U multivarijatnoj

analizi neovisno o histološkom tipu tumora nema statistički značajne razlike u RR smrti.

Breslow. Rezultati u skupni SSM, univarijatnom i multivarijatnom analizom pokazuju povećanje RR smrti za 7,4 puta kod povećanje stupnja Breslowa za jedan više.

Kod MN nema statistički značjne razlike u univarijatnoj i multivarijatnoj analizi u procjeni RR smrti, dok neovisno o histološkom tipu tumora povećanje Breslowa za jedan stupanj na više povećava rizik 4,5 puta u univarijatnoj, te 3,9 puta u multivarijatnoj analizi i takvi rezultati su statistički značajni.

Mitotski indeks (MI). U skupini SSM i MN nije zabilježena statistički značajna razlika u RR smrti s obzirom na MI. Statistički značajna razlika je zabilježena u skupini univarijatne analize ukupnog uzorka (SSM+MN) gdje je RR smrti bio 2,6 puta veći za grupu bolesnika s MI>5 i taj rezultat je statistički značajan.

Rezultati univarijatne Coxove regresije s obzirom na histološki podtip i ukupni uzorak (SSM+MN) u odnosu na DNA diploidnost i proliferativnu aktivnost kod bolesnika s MM prikazani su u **tablici 6a**.

DNA ploidnost. Analizirajući aneuploidnost tumora u odnosu na diploidnost nije zabilježena statistički značajna razlika univarijatnom Coxovom regresijom u relativnom riziku smrti prema histološkom tipu tumora, kao niti u ukupnom uzorku (SSM+MN).

Proliferativna aktivnost (S+G2M). Rezultati univarijatne Coxove regresije prema histološkom tipu i ukupno ne prikazuju statistički značajne razlike u RR smrti između grupe bolesnika s višom i nižom proliferativnom aktivnosti.

Tablica 6a. Rezultati univarijatne Coxove regresije prema histološkom tipu i ukupno. Relativni rizici smrti i 95% intervali pouzdanosti.

	SSM	**MN**	**SSM+MN**
	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)	RR smrti (95%IP)
DNA ploidija			
diploidija	1,0	1,0	1,0
aneuploidija	1,024 (0,344-3,052)	2,768 (0,880-8,702)	1,733 (0,811-3,700)
S+G2M[#1]			
≤10%	1,0	1,0	1,0
>10%	0,852 (0,234-3,100)	1,847 (0,588-5,804)	1,291 (0,549-3,038)

Legenda:

#1 S+G2M = proliferativna aktivnost.

5. RASPRAVA

Incidencija MM-a u cijelom svijetu je u porastu (2-4) Povećanje broja oboljelih od MM-a zadnjih deset godina pripisuje se većim dijelom sve češćim operativnim zahvatima suspektnih pigmentnih lezija, te se na taj način postavlja dijagnoza MM-a u najranijoj fazi. Osim ranijeg prepoznavanja suspektnih lezija, povećanju incidencije MM-a kože doprinose i različiti utjecaji okoliša, prvenstveno izlaganje UV zrakama čiji se mutagenički učinak može dokazati molekularnom analizom kromosomskih abnormalnosti (13-16,26,33-35,37). Takvo oštećenje DNA dovodi do mutacija koje su sposobne aktivirati protoonkogene ili inaktivirati tumor supresorske gene, koji tako dovode do nastanka tumora i njegove progresije (4-6,32).

Incidencija MM-a nije se smanjila usprkos uporabi lokalnih preparata s visokim zaštitnim faktorom. Naime, uporabom tih preparata produžuje se vrijeme provedeno pod štetnim utjecajem UV zraka. Svakako štetnom učinku UV zraka doprinosi u novije vrijeme i oštećenje ozonskog sloja (13-16,33-35,36,37).

Istovremeno s povećanjem incidencije MM-a razvijaju se nove tehnologije koje omogućuju otkrivanje novih prognostičkih čimbenika važnih za prognozu i terapiju ove bolesti. Stoga se posljednjih nekoliko desetljeća pristup dijagnostici MM-a uvelike izmijenio, te tako promjene koje su se u povijesti dijagnosticirale prostim okom, počele su se s razvojem svjetlosne mikroskopije uočavati u ranijoj fazi bolesti, da bi se u današnje vrijeme analizom DNA pokušalo ne samo odrediti dijagnozu i prognozu bolesti već i primijeniti gensku terapiju (8,9).

Tako je danas u eri DNA otvorena mogućnost istraživanja MM i na molekularnoj razini u cilju pronalaženja prognostičkog parametra koji bi najbolje mogao razvrstati bolesnike u povoljne i nepovoljne prognostičke skupine, a u cilju određivanja prognoze i terapije MM-a. Stoga se

neprekidno istražuju nove dijagnostičke metode koje bi što preciznije razdvojile te dvije grupe bolesnika (10,32,54,61,66,71,82).

Iako je poznato da je MM, kao i sve druge zloćudne novotvorine, posljedice poremećene regulacije staničnog rasta i razmnožavanja, genetski mehanizni odgovorni za inicijaciju i progresiju ovog tumora nisu u potpunosti još razjašnjeni. Naime, smatra se da su mehanizmi karcinogeneze različiti, tako da je veliki broj novijih radova posvećen analizi tumor supresorskih gena i ulozi apoptoze u razvoju melanoma. Navodi se da u nastanku MM ulogu imaju mutacije na kromosomima 1, 6, 7, 9, 10, 11 i 22. Prema novijim literaturnim podacima u ranoj fazi MM dokazane su mutacije gena na kromosomima 9 i to lokusu 9p21, te na kromosomu 10. Mutacije na kromosomu 7 i na lokusu p16 kromosoma 9 češće su mutacije u invazivnoj fazi MM-a. U kasnijoj fazi MM prisutne su mutacije na kromosomima 1, 6, 9 (lokus 19q13) i 11. Na na kromosomu 22 mutacije su zabilježene u radijalnoj i vertikalnoj fazi rasta ovog tumora. Obiteljsko nasljeđivanje potencijalnih tumor supresorskih gena, npr. p16, kao i razlika u kapacitetu DNA popravka imaju ulogu u individualnom riziku od MM-a. Naime, gubitak tumor supresorskog gena kao p16 dokazan je kod MM-a i korelira s tumorskom progesijom. Kod MM-a je dokazana mutacija u tumor supresorskom genu p53, i smatra se da je uključen u patogenezu MM-a (40).

S obzirom da je poznavanje staničnog ciklusa pokazatelj dragocjen za razumijevanje biološkog ponašanja tumora, mjerenje sadržaja DNA (DNA-indeks, proliferacijska aktivnost i DNA-ploidnost) uz pomoć protočnog citometra pruža velike mogućnosti u istraživanju i određivanju agresivnosti tumorske bolesti. U velikog broja tumora s DNA-aneupoloidijom, povišenim vrijednostima proliferacijske aktivnosti i visokim vrijednostima DNA-indeksa uspjela se pokazati povezanost sa kraćim preživljenjem u usporedbi s DNA-diploidnim tumorima koji imaju niže vrijednosti proliferacijske aktivnosti i niže vrijednosti DNA-indeksa (68-85).

Danas se zna da limfomi, leukemije, mijelomi te solidni tumori mogu imati abnormalan sadržaj DNA koji je uvjerljiv biljeg maligniteta. DNA

anuploidija i povišena proliferativna aktivnost predskazuju nepovoljani ishod bolesti kod većine malignih tumora (karcinom dojke, karcinom pluća, karcinom debelog crijeva, karcinom jajnika, karcinom bubrega, mokraćnog mjehura prostate i endometrija). Određivanje sadržaja DNA je važno i zbog liječenja, jer je na karcinomu vrata maternice i karcinomu mokraćnog mjehura pokazano da su DNA-aneuploidni tumori senzitivniji na radioterapiju i kemoterapiju od ostalih tumora (81,85-87).

No, s vremenom se pokazalo da niti jedna metoda nije dovoljna sama za sebe, već da je u pogledu određivanja dijagnostike, terapije i prognoze zloćudnih bolesti važna kombinacija kliničkih i patohistoloških parametara kao i rezultata protočne citometrije (60,73).

Sve ove tri metode obrađene su i u ovom radu. U grupi kliničkih parametara obrađeni su spol bolesnika, dob i lokalizacija tumora. Od patoloških parametara obrađeni su histološki tip, razina invazije i debljina tumora, te mitotski indeks. Protočnom citometrijom određena je DNA ploidnost i proliferativna aktivnost (S+G2M).

Poznato je da učestalost MM u oba spola gotovo podjednaka, tek s nešto većim brojem slučajeva kod žena. Prema nekim literaturnim podacima taj omjer nije različit u području gdje su ljudi izloženi većem utjecaju UV zraka, kao što je to primjer u Australiji, (18), od one koja je primjerice zabilježena u Švedskoj, gdje je ta izloženost znatno niža (19).

Zastupljenost prema spolu, u ovom radu, za kategoriju MM-a III, IV i V prema Clarku i Breslowu bila je u suglasnosti s ostalim objavljenim radovima, tako da je u ovom radu bilo neznatno više žena nego muškaraca. Međutim, kada smo bolesnike razvrstali prema histološkom tipu pokazalo se da su SSM značajno češći u žena, a da se kod muškaraca češće javlja MN.

Prosječna dob pojavnosti SSM-a i MN-a u ovom radu iznosila je 57,1 godinu, što je sukladno ostalim autorima koji kao prosječnu dob najčešće navode 50 godina (21,28). MM se rijetko javlja u dječjoj dobi, a u ovoj studiji najmlađi bolesnik imao je 19 godina (23).

Brojne studije nastojale su procjeniti povezanost lokalizacije primarnog MM i preživljenja. Iako postoje određe razlike u tim studijama (7,21,28), noviji radovi pokazuju da je lokalizacija primarnog tumora statistički značajna u određivanju relativnog rizika smrti. Tako bolesnici s MM na ekstremitetima imaju najbolje preživljenje, slijede bolesnici s MM na trupu, a najlošiju prognozu imaju bolesnici s MM u predjelu glave i vrata (59). Vrlo lošu prognozu imaju i bolesnici s MM u predjelu akralnih regija (28). S obzirom na gore navedene podatke predmet interesa ovog rada bio je i ispitivanje utjecaja lokalizacije na rizik smrti kod bolesnika s MM. Pokazalo se naime da bolesnici s MM na ekstremitetima imaju najbolju prognozu, za razliku od onih na trupu, te glavi i vratu kod kojih je prognoza puno lošija, što je sukladno literaturnim podacima.

Za donošenje odluke o daljnjoj obradi i liječenju bolesnika s MM-om neophodno je utvrditi i histološki tip tumora. U ovu studiju uključena su dva najčešća tipa MM-a, to su SSM i MN. Zbog načina rasta MN prema literaturnim podacima ima najjači metastatski potencijal, stoga i najlošiju prognozu, dok je SSM svrstan u grupu tomora s boljom prognozom (2,12,57,61). Na temelju podataka dobivenih u ovom radu navedena opažanja nisu se mogla potvrditi. Međutim, uvidom u novije literaturne podatke navedene razlike nisu potvrđene u radu Weedon i sur. koji su ustanovili da se kod MM iste debljine a različitih histoloških tipova ne uočava razlika u preživljenju (45).

S obzirom da su u ovom radu analizirani samo oni MM koji su bili deblji od 1,5 mm i koji su prema Clarku svrstani u III, IV i V stupanj, postoji mogućnost da se kod višeg stupnja MM razlike u biološkom ponašanju između SSM i MN gube.

Na multicentričnim studijama se pokazalo da MM I i II stadija prema Clarku i Breslowu, obično ne metastaziraju u regionalne limfne čvorove ne stvaraju udaljene metastaze, te kao takvi imaju i povoljniju prognozu (28,59,47,57,59,61). Stoga ispitanici III, IV i V stupnja prema Clarku, odnosno Breslowu su interesantnije skupine, jer u tim skupinama katkad ne možemo odlučiti kome je od tih bolesnika potreban agresivan tip terapije. To je bitno stoga što su današnje

terapijske metode nekih drugih malignih bolesti toliko agresivne da mogu same ugroziti život bolesnika više nego primarna bolest. Stoga se pokušalo ustanoviti da li postoje razlike u skupini bolesnika s Clark III u odnosu na Clark IV i V, odnosno razlike u skupini bolesnika s Breslow III i IV u odnosu na V. U ovoj studiji pokazalo se da postoji statistički značajna razlika u relativnom riziku smrti kod MN i ukupnom uzorku (SSM+MN) za povećanje Clarka za jedan stupanj na više. U procjeni debljine tumora, također je ustanovljeno da postoji statistički značajna razlika u relativnom riziku smrti za povećanje Breslowa za jedan i to u skupini SSM, i ukupnog uzorka studije (SSM+MN).

Mitotski indeks je procjenjivan od samih početaka patologije. Do sada objavljeni radovi pokazuju različite poglede na brojanje mitoza. Tako su Salman i sur. evaluirali aneuploidnost i MI kod tankih melanoma (tanji od 0,76 mm) i došli do rezultata da tumori s aneuploidijom i MI većim od 5 imaju lošu prognozu (61). Do sličnih podataka su došli Leon i sur. koji su uočili da MI veći od 6 korelira s lošijim preživljenjem (105).

U ovoj studiji granična vrijednost MI iznosila je 5 mitoza na 10 vidnih polja, a rezultati su sukladni navodima iz literature. Naime u skupini bolesnika neovisno o histološkom tipu tumora postojao je statistički značajano veći rizik smrti kod MI većeg od 5.

Kod MM-a nađeno je da aneuplodija korelira s lošom prognozom, što se odnosi na kratki period bez manifestne bolesti, češće recidive i slabim preživljenjem. Neki autori su dokazali da aneuploidija u I stadiju MM-a korelira s ostalim lošim prognostičkim čimbenicima kao što je ulceracija, debljina tumora, razina invazije i prisutnost vertikalne faze rasta (44,45,57,60,61).

U ovom radu ispitivano je značenje DNA ploidnosti i proliferativne aktivnosti u određivanju prognoze bolesnika s MM. S obzirom da statistička značajnost DNA ploidnosti tumora u određivanju prognoze nije bila dokazana, učinjen je i dodatni korak te je formiran i novi parametar koji je objedinio ove dvije varijable (KNPC). Tako su tumori koji su bili DNA diploidni s niskom proliferativnom aktivnosti svrtani u prognostički povoljnu skupinu, a DNA aneuploidni ili DNA diploidni s visokom

proliferativnom aktivnosti u prognostički nepovoljnu skupinu. Svrha ovakvog udruživanja bila je odgovoriti na pitanje da li je ovakv nalaz protočne citometrije za bolesnika povoljan ili ne. Ovakvim postupkom nismo mogli dokazati prognostičku vrijednost protočne citometrije u skupini svih melanoma, već samo u skupini bolesnika s NM. Naime, pokazalo se da bolesnici s NM koji su DNA aneuploidni ili DNA diploidni s visokom proliferativnom aktivnosti imaju statistički značajno kraće preživljenje.

6. ZAKLJUČCI

Analizom kliničkih (spol, dob, lokalizacija) i histopatoloških (histološka razina invazije, debljina tumora, mitotski indeks) parametara, te vrijednost DNA sadržaja (DNA ploidnost, proliferativna aktivnost) u skupini bolesnika s SSM i MN dobiveni rezultati upućuju na slijedeće zaključke:

1. Određivanjem učestalosti navedenih parametara u odnosu na histološki tip kao i u ukupnom uzorku u ovom radu nije zabilježena značajna statistička razlika u preživljenju bolesnika s SSM i MN.
   SSM se češće javlja u žena, nižeg je stupnja prema Clarku i Breslowu za razliku od MN koji se češće javljaju u muškaraca i višeg su stupnja prema Clarku i Breslowu.
   S obzirom na vrijednosti sadržaja DNA nije nađena statistički značajna razlika s obzirom na histološki tip tumora.

2 U određivanju prognoze bolesnika uočeno je da nepovoljni prognostički čimbenici u skupini SSM su debljina tumora prema Breslowu i visina mitotskog indeksa.
   Nepovoljni prognostički čimbenici u skupini MN su muški spol, razina histološke invazije prema Clarku i nepovoljan KNPC (DNA aneuploidija ili DNA diploidija sa S+G2M>10%).
   Razina histološke invazije prema Clarku, debljina tumora prema Breslowu i mitotski indeks su nepovoljni prognostički čimbenici u ukupnom uzorku.

3. U određivanju relativnog rizika smrti ustanovilo se da u skupini SSM viši rizik smrti imaju melanomi veće debljine prema Breslowu.
   U skupini MN do povećanja relativnog rizika smrti dolazi ukoliko je tumor veće histološke razine invazije prema Clarku i ako je lokaliziran u predjelu trupa.
   U ukupnom uzorku do povećanja relativnog rizika smrti dolazi kod tumora veće razine histološke invazije, kod debljih tumora prema

Breslowu, ukoliko su lokalizirani u predjelu trupa, te glave i vrata. S obzirom na vrijednost DNA sadržaja nije bilo značajnog povećanja rizika smrti ovisno o histološkom tipu i u ukupnom uzorku.

7. SAŽETAK

UVOD. Maligni melanom kože nastaje malignom transformacijom melanocita. Karakterizira ga lokalna agresivnost, i sklonost ranom limfogenom i/ili hematogenom metastaziranju. Terapija malignog melanoma provodi se prvenstveno kirurški, dok se drugi oblici terapija koji uključuju kemoterapiju, radioterapiju i imunoterapiju primijenjuju ovisno o stadiju bolesti. Iako se nekoliko posljednjih godina bilježi bolje preživljenje, što je rezultat dijagnoze u ranoj fazi bolesti, i dalje se nastoje naći prognostički pokazatelji koji bi omogućili pouzdanije predviđanje tijeka bolesti uz modifikaciju terapije.

Stoga je svrha ovog rada bila utvrditi koji klinički i patohistološki parametri imaju ulogu u prognozi bolesnika s SSM i MN koji po Clarku i Breslowu spadaju u III, IV i V stupanj. Ujedno se željelo ustanoviti značenje određivanja DNA sadržaja protočnom citometrijom i da li nam i taj pokazatelj može pomoći u određivanju prognoze kod bolesnika s malignim melanomom.

MATERIJALI I METODE. Studija je uključila 100 bolesnika s malignim melanomom kože u razdoblju od 1992. do 2002. godine. Interes istraživanja obuhvatio je kliničke i patohistološke pokazatelje, te analizu DNA sadržaja dobivenu protočnom citometrijom iz tumorskog tkiva uklopljenog u parafinske blokove. Ispitivanjem se željelo pokazati koji od tih pokazatelja ima najvažniju ulogu u preživljenju bolesnika. Od kliničko-patoloških pokazatelja ispitivani su dob i spol bolesnika, lokalizacija tumora, histološka razina invazije, debljina tumora i mitotski indeks. Analiza DNA sadržaja protočnom citometrijom obuhvatila je određivanje ploidnosti tumora i proliferativnu aktivnost.

REZULTATI. Ukupno petogodišnje preživljenje bolesnika iznostilo je 72%. Statistički značajnim pokazateljima utvrđeni su spol bolesnika za

MN (p=0,053), histološka razina invazije po Clarku za MN (p=0,041) i ukupan uzorak (0,040), debljina tumora kod SSM (p=0,0002) i ukupnog uzorka (p=0,0004), mitotski indeks kod SSM (p=0,049) i ukupnog uzorka (p=0,017), te kombinirani nalaz protočne citometrije kod MN (p=0,038).

ZAKLJUČAK. Ovisno o histološkom tipu tumora spol, histološka razina invazije, debljina tumora i mitotski indeks važni su za prognozu bolesnika s malignim melanomom kože, dok neovisno o histološkom tipu tumora u prognozi bolesnika ulogu ima histološka razina invazije kože, debljina tumora i mitotski indeks.

8. SUMMARY

INTRODUCTION. Malignant melanoma of the skin arises due to neoplastic transformation of melanocytes. Its behavior is characterized not so much by the local agressiveness of the primary tumor but rather by the pronounced and often vary early tendency to produce lymphogenous and /or hematogenous metastases. Management of malignant melanoma is primarly surgical excision, and the other therapeutical possibilites include chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy in dependance of stage of disease. The last few years there is better rate survival as the result of early diagnosis. Hovever, the recent studies have been focused od determining reliable prognostic parameters that would allow more reliable predictible course of diseases with modification of therapy.

The aim of this study was to determine the most important clinical and pathohistological parameters that influence the prognosis and outcome of patients with SSM and MN stage III, IV and V according to Clark and Breslow, in order offer them the most suitable form of therapy.

Moreover, it was designed to assess the clinical significance of DNA content analysis by flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS. Hundred cases of malignant melanoma, diagnosed between 1992 and 2002 were selected. In order to assess the influence of the various prognostic factors on survival, the study included clinical and pathohistological parameters as well as the results of flow cytometric DNA analysis of paraffin-embedded tumor samples from all cases. Clinicopathological parameters focused on the age and sex of patients, tumor localisation, histological level of tumor progression, tumor thickness according to Breslow and mitotic rate, while flow cytometric DNA analysis comprised DNA ploidy and proliferative activity.

RESULTS. Five year survival of our selected population of patients was 72%. The results of statistical analysis confirmed that statistically significant prognostic parameters for group of SSM included tumor thickness according to Breslow (p=0,0002) and mitotic rate (p=0,049).
The group of MN included sex of the patient (p=0,053), histological level of tumor invasion (p=0,041), and combined analysis of flow citometry (p=0,038).
In group of all specimens statistically significant prognostic parameters were histological level of tumor progression according to Clark (p=0,040), tumor thickness according to Breslow (p=0,0004) and mitotic rate (p=0,017).

CONCLUSION. Depending of histological tumor type, sex of the patient, histological level of tumor progression according to Clark, tumor thickness according to Breslow, mitotic rate and combined analysis of flow citometry are considered to be the parameters of crucial relevance for the prognosis of patients with malignant melanoma of the skin. The histological level of tumor progression according to Clark, tumor thickness according to Breslow and mitotic rate were proven to be independent statistically significant parameters relevant for the outcome of patients with this disease.

9. LITERATURA

1. Damjanov I, Linder J. Anderson's pathology. 10. izd. St. Louis:Mosby-Year Book, Inc;1996, str. 2438-41.
2. MacKie RM. Clinical dermatology. 4. izd. Oxford: Oxford University Press; 1997, str.294-8.
3. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC. Dermatology. 2. izd. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag;2000, str. 1036-45.
4. Barnhill RL, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms. Malignant Melanoma. U: Fitzpatrick TB i sur. Dermatology in General Medicine. New York: Mc Graw-Hill;1993, str. 1078-115.
5. Herlyn M. Human melanoma: Development and progression. Cancer Metastasis Rev 9:101, 1990.
6. Perkins AS, Stern DF. Molecular biology of cancer: Oncogenesis. U: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ur. Cancer – principles and practice of oncology. Philadelpnia – New York : Lippincott – Raven Publishers; 1997, str. 79-102.
7. Schuchter LM. Melanoma and other skin neoplasms. Curr Opin Oncol 1998,10:151-2.
8. Newton Bishop JA. The treatment of melanoma. U: Chu AC, Edelson RL, ur. Malignant tumors of the skin. London: Arnold;1999, str. 78-94.
9. Chapman PB, Parkinson DR, Kirkwood JM. Biologic therapy. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 419-435.
10. Nesbit M, Setaluri V, Herlyn M. Biology of melanocytes and melanoma. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 463-470.
11. Orlow SJ. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. J Invest Dermatol 104:99, 1995.
12. Riegel DS. Epidemiology and prognostic factors in malignant melanoma. Ann Plast Surg 1992; 28:7-8.

13. Moan J, Dahlback A, Setlow RB. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. Photochem Photobiol 1999;70(2):243-7.
14. Doré JF. Influence of sun exposures durin childhood and durin adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Inter J Can 1998;77(4):533-7.
15. Walter SD, King WD, Marrett LD. Association of cutaneous malignant melanoma with intermitent exposure to ultraviolet radiation: results of a case-control study in Ontarion, Canada. Int J Epidemiol 1999;2(3):418-27.
16. De Gruijl FR. Skin cancer and solar UV radiation. Europ J Cancer 1999;35(14):2003-9.
17. International Agency for Research on Cancer World Health Organization, Internation association of cancer registries. Cancer incidence in five continents. Volume VII. Report No.:143. Issued by performing agency: Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editors. Lyon: IARC Scientific publications;1997.
18. MacLennan R, Green AC, McLeod GRC, Martin NG. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. J Natl Cancer Inst 1992;84:1427-32.
19. Måsbäck A, Westerdahl J, Ingvar C. Cutaneous malignant melanoma in South Sweden 1965, 1975, and 1985. A histopathologic review. Cancer 1994;73:1625-30.
20. Strnad M. Kretanje i rasprostranjenost karcinoma u Hrvatskoj i nekim drugim zemljama u svijetu. U: Ebling Z, Budak A, ur. Problematika raka u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1993:23-35.
21. Garbe C, Orfanos CE. Epidemiology of malignant melanoma in Central Europe: Risk factors and prognostic predictors. Results of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. Pigmennt Cell Res 1992;2Suppl:285.
22. Pappo AS, Kaste SC, Rao BN, Pratt CB. Childhood melanoma. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3

izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str.175-186.

23. Mc Whriter WR, Dobson C. Childhood melanoma in Australia. World J Surg 1995;19:334.
24. Cevenini G, Borzelli G, Rubegni P, Massai MR, Andreassi L, Barbini P. Modified Karhunenloeve expansion for evaluating skin-colour-associated melanoma risk factors. Comput Biol Med 2000;30(4):171-89.
25. Egan CL, Oliveria SA, Elenitsas R, Hanson J, Halpern AC. Cutaneous melanoma risk and phenotypic changes in large congenital nevi: follow-up study of 46 patients. J Am Acad Derm 1998;39(6):923-32.
26. Runger TM. Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1999;15(6):212-6.
27. Rosso S, Zanetti R, Pippione M, Sancho-Garnier H. Parallel risk assesment of melanoma and basal cell carcinoma: skin characteristic and sun exposure. Melanoma Res 1998;8(6):573-83.
28. Sober AJ, Koh HK. Melanoma and other pigmented skin lesions. U: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Faud AS, Root RK, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 12.izd. New York:McGraw-Hill,Inc;1991,str. 1634-8.
29. Ross MI, Stern SJ. Mucosal melanomas. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 195-206
30. Ishihara K, Saida T, Yamamoto A. The statistics of malignant melanoma in Japan. Melanoma Res 2001;1Suppl 11:138.
31. Longstreth JD. Melanoma genesis. Putative Causes and possible mechanisms. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc;
32. Halliday. Immunosuppression and melanoma. Melanoma Res 2001;1Suppl 11:34.

33. Fitzpatrick TB. Ozone depletion with increases UVB and melanoma induction: UVA (320-400 nm) as a cocarcinogen. Melanoma Res 2001;1Suppl 11:34.
34. Whiteman D, Green A. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N Engl J Med 1999;29:340(17):1341-8.
35. Panello G, Devesa S, Gail M. Association of surface ultraviolet B radiation levels with melanoma and nonmelanoma skin cancer in United States blacks. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9(3):291-7.
36. Naldi L, Gallus S, Imberti GL, Cainelli T, Negri E, La Vecchia C. Sunscreens and cutaneous malignant melanoma: an Italian case-control study. Int J Cancer 2000;86(6):879-82.
37. Wolf P, Schollnast R, Hofer A, Smolle J, Kerl H. Malignant melanoma after psorales and ultraviolet A (PUVA) therapy. Br J Dermatol 1998;138(6):1100-1.
38. Miller SA, Hamilton SL, Wester UG, Cyr WH. An analysis of UVA emissions from sunlamps and the potential importance for melanoma. Photochem Photobiol 1998;68(1)63-70.
39. MacKie R. Pregnancy and exogenous female sex hormones in melanoma patients. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 187-193.
40. Fountain JW. Genetic factors. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 475-92.
41. Halpern AC, Guerry DIV, Elder DE, Clark WH, Jr, Synnestvedt M, Norman S, Ayerle R. Dysplastic nevi as risk markers of sporadic (non-familial(melanoma: A case-control study. Arch Dermatol 1991;127:995.
42. Loch Andersen J, Drzewiecki KT, Wulf HC. Eyeand hair colour, skin type and constitutive skin pigmentation as risk factors for basal cell carcinoma and cutaneous malignant melanoma. A Danish casse-control study. Acta Derm Venereol 1999;79(1):74-80.

43. Doré JF, Pedeux R, Lefort K, Boniol M. Molecular biology of cellular response to UV: Specific induction of genesis. Melanoma Res 2001;1Suppl 11:33.
44. Elder DE, Murphy GF. Melanocytic tumors of the skin. [Atlas of tumor pathology, Fascile 2]. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1990.
45. Weedon D. Skin pathology. 2. izd. London: Churchil Livingston; 2002, str. 821-58.
46. Setlow RB. Spectral regions contributing to melanoma: a personal view. Symp Proceedings 1999;4(1):46-9.
47. Blum A, Brand CU, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Stroebel W, Rassner G, Garbe C. Awareness and early detection of cutaneous melanoma: an analysis of factors related to delay in treatment. Br J Dermatol 1999;141:783-7.
48. Hauschild A, Kiene P, Christophers E. Melanoma – clinical. U: Chu AC, Edelson RL, ur. Malignant tumors of the skin. London: Arnold;1999, str. 66-77.
49. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res 1969;29:705-27.
50. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970;172:902-8.
51. Erlandson RA. Diagnostic transmission electron microscopy of tumors. NewYork: Raven Press; 1994, str. 515-523.
52. Bruijn JA, Mihm MC, Barnhill RL. Desmoplastic melanoma. Histopathology 1992;20:197-205.
53. Bhuta S, Mirra JM, Cochran AJ. Myxoid malignant melanoma. A previously undescribed histologic pattern noted in metastatic lesions and a report of four cases. Am J Surg Pathol 1986;10:203-11.
54. Kanitakis J. Solid cutaneous tumors. U: Kanitakis J, Vassileva S, Woodley D, ur. Diagnostic Immunohistochemistry of the skin. London: Chapman & Hall Medical;1998, str. 279-287.
55. Wallace M, Smoller B. Immunohistochemistry in diagnostic dermopathology. J Am Acad Dermatol 1996,34:163-183.

56. American Joint Committee on Cancer. Manual for Staging of Cancer, 4. izd. Philadelphia: JB Lippincott, 1992, p 143.
57. Fargnoli MC, Bolognia JL. The biology of melanoma. U: Chu AC, Edelson RL, ur. Malignant tumors of the skin. London: Arnold, 1999, str. 49-65.
58. Stadelmann WK, Rapaport DP, Soon SJ, Reintgen DS, Buzaid AC, Balch CM. Prognostic clinical and pathologic features. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 11-35
59. Tuthill RJ,Unger JM, Liu PY, Flaherty LE, Sondak VK. Risk assesment in localized primary cutaneous melanoma. Anat Pathol 2002;118:504-11.
60. Kheir SM, Bienes SD, Vonroenn JH, et al. Prognostic significance of DNA aneuploidy in stage I cutaneous melanoma. Ann Surg 1998;207-455.
61. Salmann SM, Rogers GS. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. J Surg Oncol 16:413,1990.
62. Buzaid AC, Bedikian A, Hougnton AN. Systemic chemotherapy and biochemotherapy. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str.405-18.
63. Austin PF, Cruse CW, Lyman G. Age as a prognostic factor in the malignatn melanoma population. Ann Surg Oncol 1994;1:487.
64. Dale P, Wang Y, Conrad A, et al. Multiple marker polymerase chain reaction assay for evaluating circulatin melanoma cells. Proc Am Soc Clin Oncol 1995;14:413.
65. NCCN, National Comprehensive Cancer Network. Houghton AN, Bloomer WD, Chu D, Coit DG, Eisenber BL, Guitard JG. Practice Guidlines in Oncology. Melanoma. Version 1;2002.
66. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1512 melanoma patients with distant metastases. J Am Coll Surg 181:193, 1995.
67. Balch CM, Soong S, Shaw HM. An analysis of prognostic factor in 8500 patients with cutanous melanoma. U: Balch CM, Houghton AN,

Milton GW, ur. Cutaneous melanoma. 2. izd. Philadelphia: JB Lippincott; 1992, str. 165.

68. Barlogie B, Gohde W, Drewinko B. Flow cytometric analysis of DNA content for ploidy determination in human solid tumors. J Histochem 1979;27:505-7.
69. Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, i sur. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. Am J Med 1980;69:195-203.
70. Zergollern-Čupak Lj. Medicinska genetika. U: Zergollern-Čupak Lj, ur. Humana genetika. Zagreb: Jumena, 1986;345-442.
71. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol 1984;37:961-74.
72. Ryan DH, Fallon MA, Horan PK. Flow cytometry in the clinical laboratory. Clin Chem Acta 1988;171:125-74.
73. Schackney SE, Burholt DR, Pollice AA, Smith CA, Pugh RP, Hartsock RJ. Discrepancies between flow cytometric and cytogenetics studies in the detection of aneuploidy in human solid tumors. Cytometry 1990;11:94-104.
74. Užarević B. Imunološka definicija leukocitnih odjeljaka periferne krvi protočnom citometrijom. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1990. 3-18 str. Magisterij.
75. Egerter DA, Said JW, Epling S, Lee S. DNA content of T-cell lymphomas. A flow-cytometric analysis. Am J Pathol 1988,130:326-34.
76. Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, i sur. Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry 1984;5:445-6.
77. Sledge GW, Jr, Eble JN, Roth BJ, Wuhrman BP, Einhorn LH. Flow cytometry derived DNA content of the primary lesions of advanced germ cell tumors. Int J Androl 1987;10:115-20.
78. Petersen SE, Accuracy and reliability of flow cytometric DNA analysis using a simple, one-step ethidium bromide staining protocol. Cytometry 1986;7:301-6.

79. Baildam AD, Zaloudik J, Howell A, Barnes DM, Moore M, Sellwood RA. Effect of tamoxifen upon cell DNA analysis by flow cytometry in primary carcinoma of the breast. Br J Cancer 1987;55:561-6.
80. Quirke P. Flow cytometry: methodology and applications in pathology. J Pathol 1986;149:79-87.
81. Nola M. Korelacija staničnog ciklusa i kliničkih značajki raka endometrija. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1992. 16-22 str. Magisterij.
82. Lovett EJ, Schnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson Jl, McClatchea KD. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Lab Invest 1984;50:115-40.
83. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS, Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Lab Invest 1987;57:451-79.
84. Sickle-Santanello BJ, Farrar WB, DeCenzo JF, i sur. Technical and statistical improvements for flow cytometric DNA analysis of paraffin-embedded tissue. Cytometry 1988;9:594-9.
85. Iversen OE, Utaaker E, Skaarland E. DNA ploidy and steroid receptors as predictors of disease course in patients with endometrial carcinoma. Acta Obstet Gynecol Scand 1988;67:531-7.
86. Volm M, Bak M, Haahn EW, Mattern J, Weber E. DNA and S-phase distributin and incidence of metastatic in human parimary lung carcinoma. Cytometry 1988;9:183-8.
87. Newburry R, Schuerch C, goodspeed N, Fanning J, Glidewell O, Evans M. DNA content as a prognostic factor in endometrial carcinoma. Obstet Gynecol 1990;76:251-7.
88. Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for melanoma: past, present and future. Ann Surg Oncol 2001;8:22S-28S.
89. Morton DL, Thompson JF, Essner R, et al. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage malnoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group. Ann Surg 1999;230:453-63.
90. Mersden JR. Malignant melanoma excision margins. Lancet 1993;341:184.

91. Ross MI, Balch CM. Surgical treatment of primary melanoma. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 141-153..
92. Popović Š, Nola P. Mogućnosti liječenja malignog melanoma II kliničkog stadija. Libri oncol 1993;22:31-36.
93. Zitelli JA, Moy RL, Abell E. The reliability of frozen sections in the evaluation of surgical margins for melanoma. J Am Acad Dermatol 1991;24:102.
94. Veronesi U, Cascinelli N. Narrow excision (1cm): A safe procedure for thin cutaneous melanoma. Arch Surg 1991;126:438.
95. Rapaport DP, Stadelman WK, Reintgen DS. Inguinal lymphadenectomy. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 269-80.
96. Coit DG. Patient surveillance and flollow-up. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 313-23.
97. Meyers ML, Balch CM. Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 325-72.
98. Kirkwood JM, Agarwala SS. Adjuvant systemic therapy. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str.451-59.
99. Fraker DL. Hyperthermic regional perfusion for melanoma of the limbs. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 281-300.
100. Buzaid AC, Tinoco LA, Jendiroba D. Prognostic value of size lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol 1995;13:2361.
101. Kian Ang K, Geara FB, Byers RM, Peters LJ. Radiotherapy for melanoma. U: Balch CM, Hough AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous

melanoma. 3 izd. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 1998, str. 389-403.

102. Suter L, Fuhrmann D. Radiotherapy of malignant melanoma of the skin. Schweiz Rundsch Med Prax. 2001;90:397-402.

103. Schmid-Wendtner MH, Brunner B, Konz B, Kaudewitz P, Wendtner CM, Peter RU, Plewig G, Volkenandt M. Fractionated radiotherapy of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in 64 patients. J Am Ac Derm 2000;43:477-82.

104. Fuhrmann D, Lippold A, Borrosch F, Ellwanger U, Garbe C, Suter L. Should adjuvant tadiotherapy be recommended following resection of regional lymph node metastases of malignant melanomas? Br J Derm 2001;144:66-70.

105. Hadley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embadded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 1983;31:1333-5.

106. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 1983;3:323-7.

107. Conover WJ, ur. Practical nonparametric Statistics. New York: John Wiley & Sons; 1980.

108. Troendle JF, ur. A Stepwise Resampling Method of Multiple hypothesis Testing. J Am Statist Assoc 1995; 90:370-8.

109. Collett. D, ur. Modeling Survival Data in Medical research. London: Chapman & Hall; 1994.

110. Leon P, Daly JM, Synnestvedt M i sur. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. Arch Surg 1991;26:1461.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3. travnja 1966. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1984. godine, a diplomirala 1989. godine. Tijekom studija, dvije godine bila sam demonstrator na Zavodu za anatomiju, ispite položila s prosječnom ocjenom 4,1 i diplomirala s ocjenom odličan u prosincu 1989. godine.

Stručni staž odradila sam u Domu zdravlja studenata u Zagrebu.

Poslijediplomski studij iz Onkologije upisala sam školske godine 1990/91, položila sve propisane ispite, te magistrirala iz područja ginekološke onkologije 19. 3. 1997. godine braneći magistarski rad pod naslovom "Prognostička vrijednost hormonskih receptora u zloćudnim epitelnim tumorima jajnika".

Stručni ispit položila sam u ožujku 1991. godine u Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske, te tako stekla uvjerenje o stručnoj osposobljenosti za samostalni rad.

Godine 1992. stupam kao znanstveni novak u radni odnos na određeno vrijeme na projektu pod nazivom "Tumorski biljezi u dijagnostici i praćenju tijeka melanoma kože" u Klinici za tumore u Zagrebu, pod vod vodstvom prof. dr. sci. Ante Roguljića.

Zbog edukacije prvenstveno iz područja dermatološke onkologije, upućena sam na Kliniku za dermatovenerologiju KBC-a u Zagrebu, gdje sam započela s volonterskim radom na način uobičajen za "vanjske specijalizante" 01. 09. 1992. godine.

Od 14. prosinca 1995. godine specijaliziram dermatovenerologiju za potrebe privatne dermatovenerološke ordinacije mr. sci. dr. Nade Videnić iz Karlovca. Tijekom školske godine 1995/96 upisala sam još jedan poslijediplomski studij i to iz dermatovenerologije, kao obvezatni dio specijalizacije.

Od 17. 6. 1998. raspoređena sam na temelju natječaja na poslove liječnika na specijalizaciji u Klinici za kožne i spolne bolesti u KB “Sestre milosrdnice”.

Specijalistički ispit iz dermatovenerologije sam položila 17. 12. 1999. godine, od kada sam preraspoređena na mjesto liječnika specijaliste u Klinici za dermatovenerologiju KB “Sestre milosrdnice”.
Dana 17. svibnja 2004. godine započinjem s radom u vlastitoj privatnoj dermatovenerološkoj ordinaciji u Zagrebu.

Aktivno sam sudjelovala na više kongresa u Hrvatskoj i inozemstvu, te kao autor i koautor objavila više stručnih i znanstvenih radova.

Sretno udana, majka trojice prekrasnih sinova.