



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Asen V Veličkov

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ NUKLEARNE
MORFOMETRIJE I IMUNOHISTOHEMIJSKIH
PARAMETARA KOD MELANOMA KOŽE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Asen V Veličkov

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF NUCLEAR
MORPHOMETRY AND IMMUNOHISTOCHEMICAL
PARAMETERS IN SKIN MELANOMA**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. Dr Predrag Kovačević Katedra za Hirurgiju Medicinski Fakultet, Univerziteta u Nišu
Naslov:	Prognostički značaj nuklearne morfometrije i imunohistohemijskih parametara kod melanoma kože
Rezime:	<p>Cilj je bio dokazati prognostički značaj kariometrijskih i imunohistohemijskih parametara kod pacijenata sa melanomom kože.</p> <p>Metodologija: analizirani su epidemiološki parametri bolesnika lečenih od melanoma kože (polna i starosna struktura i lokalizacija melanoma) koji su praćeni u periodu od 2002. do 2016. godine i analizirano je biološko ponašanje tumora (recidivi, metastaze). Analizirane su kariometrijske i imunohistohemijske varijable primarnih melanoma. Statističkom obradom podataka komparirana je veza ispitivanih parametara i njihov prognostički značaj.</p> <p>Značaj istraživanja: Utvrđeno je postojanje veze između biološkog toka melanoma kože i kariometrijskih i imunohistohemijskih parametara. Porast ukupnih intratumorskih koncentracija CD4 i CD8 pozitivnih ćelija, kao i povećani udeo ovih ćelija u odnosu na nebojene ćelije istih morfoloških karakteristika vodio je dobroj prognozi. Intenzitet CD4 prebojenja je takođe pozitivno korelirao sa dobrom prognozom. Porast CD15 pozitivnih ćelija sa porastom Area, Circularity, IntDen, Roundness predviđa dobru prognozu. Porast Circularity i Roundness, kao i povećana koncentracija peritumorskih CD15 ćelija vodio je lošijoj prognozi. Ispodprosečni nivo CD117 sa porastom cirkularnosti i zaobljenosti može ukazivati na lošu prognozu bolesti. Parametri CD8 korelirali su sa parametrima CD4 i CD15. Roundness je pokazao negativni odnos sa parametrima CD117. Ovo predstavlja originalni naučni doprinos ove disertacije</p>
Naučna oblast:	Medicinske nauke
Naučna disciplina:	Hirurgija, patologija
Ključne reči:	Melanom kože, nuklearna morfometrija, imunohistohemijski parametri, CD4, CD8, CD15, CD117
UDK:	615.5-006.81-036-076
CERIF klasifikacija	B 200; B 520; B 600; B 630
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Professor Predrag Kovačević, MD.,Ph.D. Department of Surgery Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	Prognostic significance of nuclear morphometry and immunohistochemical parameters in skin melanoma
Abstract:	<p>The goal was to prove the prognostic significance of nuclear-morphometric and immunohistochemical parameters in skin melanoma.</p> <p>Methodology: Epidemiological parameters (sex, age and localization) and biological properties (recidives, metastases) were analyzed (timespan from 2002 to 2016). Nuclear-morphometric and immunohistochemical parameters were also analyzed. Statistical data processing provided the connection between the evaluated parameters and their prognostic value.</p> <p>Significance of the research: The existence of a link between the biological course of skin melanoma and nuclear-morphometric and immunohistochemical parameters has been established. The increase in total intratumoral concentrations of CD4 and CD8 positive cells, as well as the increased proportion of these cells compared to the unstained cells of the same morphological characteristics, led to a good prognosis. The intensity of CD4 staining was also positively correlated with good prognosis. The increased count of CD15 positive cells along with the increase of Area, Circularity, IntDen, and Roundness predicts a good prognosis. The increase in Circularity and Roundness, as well as the increased concentration of peritumor CD15 cells, led to a worse prognosis. The lower CD117 level with increasing circularity and roundness may also indicate a poor prognosis of the disease. The CD8 parameters correlated with CD4 and CD15 parameters. Roundness showed a negative relation with the CD117 parameters. This represents the original scientific contribution of this dissertation.</p>
Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	Surgery, pathology
Key Words:	Skin melanoma, nuclear morphometry, immunohistochemical parameters, CD4, CD8, CD15, CD117
UDC:	615.5-006.81-036-076
CERIF Classification:	B 200; B 520; B 600; B 630
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Ostaviti nešto iza sebe dolazi sa ogromnom radošću i srećom, ali i sa ogromnom odgovornošću. Redovi koje pišemo ostaju za nama za naše čitaoce i predstavljaju našu decu. Završetak pisanja na neki način definiše i odrastanje u svetu nauke i odvajanja od “dečjeg”. Na taj način utabaćemo put nekim budućim istraživačima i pomoći im na putu iz “dečjeg” u “odraslo”, jer, svakako, put od hiljadu milja mora početi prvim korakom, a taj put bez vas ne bih nikada prešao.

Mojoj porodici

Zahvalnica:

Prof. dr Predragu Kovačeviću, mentoru, učitelju i prijatelju na nesebičnoj pomoći u kreiranju i sprovođenju istraživanja i iskrenom prijateljstvu,

Prof. dr Draganu Mihailoviću, na neprocenjivim savetima i vođstvu prilikom izrade doktorske disertacije,

članovima komisije, Prof. dr Ivici Pejčiću, Prof. dr Jefti Kozarskom i Doc.dr Danici Todorović na dragocenim savetima i pomoći u izradi završne verzije disertacije,

Prof. dr Goranu Radenkoviću i osoblju Instituta za histologiju i embriologiju, osoblju Klinike za Patološku anatomiju KC Niš i zaposlenima Klinike za Onkologiju KC Niš na velikoj pomoći u prikupljanju i obradi materijala za istraživanje,

Doc.dr Aleksandru Petroviću i Doc.dr Vladimiru Petroviću na dragocenim savetima i neiscrpnim stručnim i prijateljskim diskusijama,

mom šefu PD Dr Štefanu Pilcu na razumevanju i podršci u neophodnim trenucima (danke Ihnen mehrmals für Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung in den schwierigen Momenten),

i naravno, mojoj porodici, supruzi Aleksandri, ćerki Kalini i sinu Miši, majci Birgidi i ocu Veselinu, bratu Iliji i sestri Velentini na veri u mene i beskrajnoj podršci.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	7
SPISAK KORIŠĆENIH SKRAĆENICA	10
1.UVOD	11
HISTOLOŠKA GRAĐA KOŽE SA ASPEKTA ONKOLOŠKE HIRURGIJE	11
MELANOCIT	15
ĆELIJSKE KARAKTERISTIKE MELANOCITA	16
ANATOMSKA DISTRIBUCIJA MELANOCITA	18
MELANOGENEZA.....	18
MELANOCITNI TUMORI KOŽE	20
NEVUSI	20
PREKURSORI MELANOMA KOŽE.....	23
DISPLASTIČNI (ATIPIČNI) NEVUSI	23
POSEBNE VRSTE NEVUSA	24
HIRURŠKA TERAPIJA	26
MELANOM	28
KRATKI ISTORIЈAT.....	28
EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE.....	30
GEOGRAFSKA DISTRIBUCIJA.....	30
POLNA DISTRIBUCIJA	30
MORTALITET.....	31
STAROSNE KARAKTERISTIKE.....	32
RASNA DISTRIBUCIJA	32
PORAST INCIDENCE	33
ETIOPATOGENEZA	35
TEORIJE NASTANKA MELANOMA	35
MOLEKULARNA BIOLOGIЈA MELANOMA	36
CIKLIN ZAVISNA KINAZA N2 (CDKN2/p16INK4A)	36
BCL-2 ONKOPROTEIN	38
P53 TUMOR SUPRESOR GEN	39
PROLIFERATIVNI KI-67 ANTIGEN	40
FAKTORI RIZIKA I PROGNOZE	42
EGZOGENI FAKTORI RIZIKA	42
ENDOGENI FAKTORI RIZIKA.....	45
KOMBINACIЈA EGZOGENIH I ENDOGENIH FAKTORA	46
ENDOGENI FAKTORI RIZIKA I GENOTIPSKO-FENOTIPСКE KARAKTERISTIKE.....	47
ANATOMSKA LOKALIZACIЈA	49
OGRANIČENЈA DIЈAGNOSTIKE	50
TIPOVI MELANOMA KOŽE	51
POVRŠINSKI ŠIREĆI MELANOM (SUPERFICIAL SPREADING MELANOMA – SSM).....	51
NODULARNI MELANOM (NM)	52
LENTIGO MALIGNA MELANOM (LMM)	53
AKRALNI LENTIGINOZNI MELANOM (ALM)	53
POSEBNA KLINIČKA VRSTA MELANOMA - DEZMOPLASTIČNI MELANOM (DM)	54
TERAPIЈA	56
PROTOKOL OBRADЕ PACIJENTA.....	56
LEČENЈE PRIMARNOG TUMORA	57

REGIONALNI LIMFNI ČVOROV I BIOPSIJA SENTINEL LIMFNOG ČVORA	58
ADJUVANTNA TERAPIJA	61
PRAĆENJE	62
RECIDIVI	62
HIRURŠKO LEČENJE PACIJENTA SA MELANOMOM.....	64
LEČENJE PRIMARNE PROMENE.....	64
TERAPIJSKE DISEKCIJE REGIONALNIH LIMFNIH ČVOROVA	65
NEHIRURŠKO LEČENJE	67
PREVENCIJA	67
STADIJUMI MELANOMA	68
ZNAČAJNE IZMENE U 7. IZDANJU AJCC VAŽNE ZA PATOLOGE PRAKTIČARE UKLJUČUJU:.....	69
NOVINE U PM KATEGORIJI:	69
IMUNOHISTOHEMIJSKA BOJENJA ZNAČAJNA ZA ISTRAŽIVANJE.....	71
BOJENJE CD4.....	71
BOJENJE CD8.....	72
BOJENJE CD15.....	73
BOJENJE CD117.....	74
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	76
CILJEVI ISTRAŽIVANJA	76
RADNA HIPOTEZA	76
3. PACIJENTI I METODE	77
MORFOMETRIJA I IMIDŽ ANALIZA	78
METODOLOGIJA MORFOMETRIJSKIH ANALIZA.....	79
MERENJE DEBLJINE TUMORA	79
BROJ MITOZA	79
IMIDŽ (IMAGE) ANALIZA	79
IMUNOHISTOHEMIJSKE METODE ISPITIVANJA	81
KONTROLA KVALITETA I SPECIFIČNOSTI IMUNOHISTOHEMIJSKE REAKCIJE	82
SEMIKVANTITATIVNA I KVALITATIVNA PROCENA IMUNOHISTOHEMIJSKE REAKCIJE	83
OSNOVNE METODE STATISTIČKE OBRADNE PODATAKA	85
4. REZULTATI	86
POLNA STRUKTURA ISPITIVANIH PACIJENATA	87
STAROSNA STRUKTURA ISPITIVANIH PACIJENATA	87
LOKALIZACIJA PRIMARNE BOLESTI	89
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ PRISUSTVA ULCERACIJE NA PRIMARNOM TUMORU U ODNOSU NA POJAVU RECIDIVA, METASTAZA ILI SMRTOG ISHODA	89
TNM KLASIFIKACIJA I KLINIČKOPATOLOŠKI STADIJUM BOLESTI.....	91
KORELACIJA STADIJUMA T SA POJAVOM RECIDIVA, ULCERACIJOM I LOKALIZACIJOM.....	92
KORELACIJA STADIJUMA BOLESTI SA POJAVOM RECIDIVA, ULCERACIJOM I LOKALIZACIJOM	93
KORELACIJA T STADIJUMA SA POLOM.....	93
KORELACIJA KLINIČKOPATOLOŠKOG STADIJUMA BOLESTI SA POLOM.....	94
NUKLEARNA MORFOMETRIJA – POLNA I STAROSNA DISTRIBUCIJA I LOKALIZACIJA TUMORA	94
NUKLEARNA MORFOMETRIJA - PREDIKTORI NEPOVOLJNOG RAZVOJA BOLESTI	97
DISTRIBUCIJA CD4	99
DISTRIBUCIJA CD8	101
DISTRIBUCIJA CD15	103
DISTRIBUCIJA CD117	105

KORELACIJE ISPITIVANIH IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA	107
KORELACIJA MORFOMETRIJSKIH PARAMETARA SA IMUNOHISTOHEMIJSKIM PARAMETRIMA	108
KORELACIJA MORFOMETRIJSKIH PARAMETARA SA MARKERIMA PO GRUPAMA	109
5. DISKUSIJA	112
EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE ISTRAŽIVANJA	112
KLINIČKOPATOLOŠKE KARAKTERISTIKE	113
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ KARIOMETRIJSKIH PARAMETARA	115
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA	121
ZNAČAJ CD4 I CD8	121
ZNAČAJ CD15	127
ZNAČAJ CD117	129
KORELACIJA IZMEĐU IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA	135
KORELACIJA MORFOMETRIJSKIH PARAMETARA SA IMUNOHISTOHEMIJSKIM PARAMETRIMA	136
6. ZAKLJUČCI:	137
7. LITERATURA:	139
PRILOG:	179

Spisak korišćenih skraćenica

AJCC - Američko udruženje za stepenovanje karcinoma (engl. American Joint Comitee on Cancer staiging)

ALM - akralnolentiginozni melanom

Bcl-2 onkogen - prvi put opisan u limfomu B limfocita (engl. B-cell lymphoma-2)

CSD – hronično suncem oštećeno (eng. chronically sun-damaged)

DM - dezmozoplastični melanom

DN - displastični nevus

EMJ - epidermalno-melaninska jedinica

HE - hematoksilin-eozin (HE)

HMB-45 antigen - belančevina izražena kod melanoma, vezana za melanozome

Ki-67 antigen - proliferativni Ki-67 jedarni antigen

LMM - lentigo maligna melanom

LVI - limfovaskularna invazija Melan A - antigen incijalno prepoznat kod T ćelija osoba sa melanomom

MAPK - mitogen aktivirane protein kinaze

MDM - melanom sa minimalnim odstupanjem (eng. minimal deviation melanoma)

MDSCs – eng. Myeloid-derived suppressor cells

MI - mitotski indeks

MK - melanom kože

NM - nodularni melanom (engl. nodular melanoma)

NSE, Mart-1/MelanA (A103), transkripcioni faktor mikroftalmije,

P16 - tumor supresorni p16 protein/inhibitor ciklin zavisne kinaze 4/CDK4

P53 - tumor supresorni p53 protein

PAX3 (faktor transkripcije sa važnom ulogom u razvoju melanocita tokom embriogeneze)

RGP - radijalna faza rasta (eng. radial growth phase)

S-100 protein - antigen (belančevina) izražena u novotvorevinama poreklom iz neuroektoderma

SEER - Surveillance, Epidemiology, and End Results

SLNB - biopsija sentinel limfnog čvora

Sox10 (transkripcijski faktor neuralnog grebena ključan za specifikaciju, sazrevanje i održavanje Švanovih ćelija i melanocita),

SSM - površinski šireći melanom (engl. superfitial spreading melanoma)

TILs - tumor infiltrišući limfociti

VGP - vertikalna faza rasta (eng. vertical growth phase)

UVI - Indeks ultraljubičastog zračenja (eng. Ultra Violet Index)

UVR - ultraljubičasto zračenje

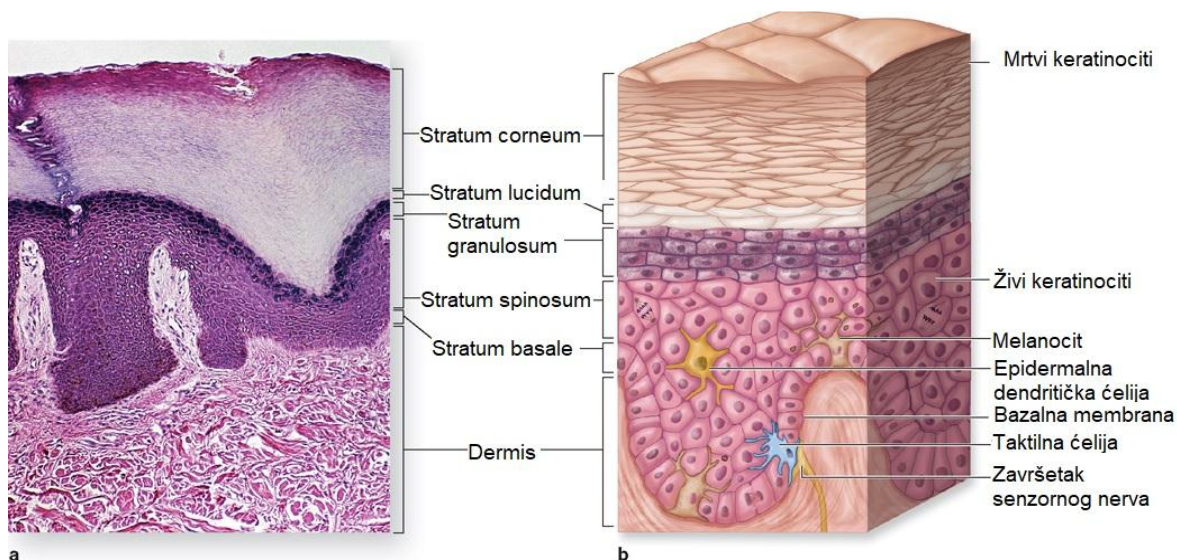
1.Uvod

Histološka građa kože sa aspekta onkološke hirurgije

Koža predstavlja zaštitnu barijeru za mikroorganizme, a gubitak telesne vode je ograničen zahvaljujući keratinskom sloju kože. Koža je značajna u regulaciji telesne temperature i u zaštiti od ultraljubičastog zračenja. Bogata je senzornim receptorima i sprovodi nadražaje iz neposredne okoline. Ona takođe ima značajnu ulogu u imunskoj regulaciji preko limfocita i antigen prezentujućih ćelija koje se kreću između kože i regionalnih limfnih čvorova kroz limfatike i krvotok (što je posebno značajno za razumevanje onkoloških principa postojanja i širenja melanomske bolesti). Keratinociti, Langerhansove ćelije, mastociti, limfociti i makrofagi predstavljaju ćelije koje svojim funkcijama učestvuju svaka na svoj način u imunološkim procesima (1).

Kožu čine tri embriološki i histološki različita sloja: epiderm (čvrsto spojen za vezivno tkivo koje mu daje potporu) i adneksa, melanocitni sistem i derm (drugi sloj kože) i potkožu (hipoderm, subkutis – treći sloj koga čini rastresito vezivo, koje obično sadrži obilnu količinu masnog tkiva) (2-7).

Epiderm je višeslojni stratifikovani skvamozni epitel koji se diferentuje kako bi formirao spoljašnji zaštitni keratinski sloj. On je priljubljen uz derm, naniže fiksiran svojim silaznim nastavcima, epidermalnim prečkama, koje su isprepletene sa dermalnim papilama. Epiderm ne sadrži krvne sudove. Njegova debljina varira, najtanji je na očnim kapcima, a najdeblji na dlanovima i tabanima. Sastoji se iz keratinocita uobličjenih u četiri sloja (Slika 1): bazalni (*stratum basale*), skvamozni ili spinozni (*stratum spinosum*), granularni (*stratum granulosum*) i rožnati (*stratum corneum*) (6, 7). Bazalne ćelije su cilindrične, u odnosu na bazalnu membranu normalno orijentisane, mitotski aktivne i iz kojih se razvijaju svi ostali keratinociti; one sadrže keratin niske molekulske težine i odvojene su od dermisa neprekidnim bazalnim slojem, sa kojim su povezane hemidezmozomima. Normalno, blizu 30% bazalnih ćelija kože uvek je spremno za deobu (tzv.frakcija rasta) (6, 7).

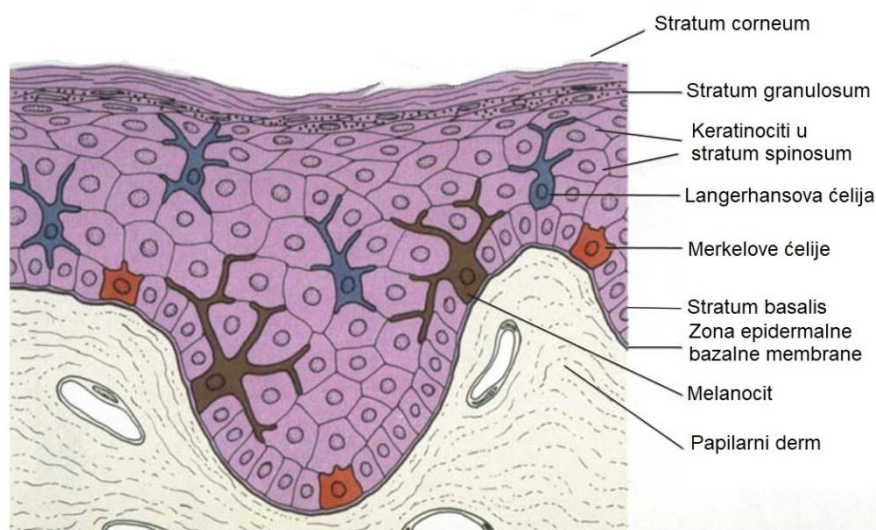


Slika 1. Histološki slojevi kože⁽⁸⁾.

Napomena: a = mikroskopski prikaz strukture kože, b = šematski prikaz strukture kože

Skvamozni sloj sastavljen je iz nekoliko slojeva (5-10) bazofilnih višegaonih ćelija keratinocita (6, 7), koje postaju veće, zaravnjenije i eozinofilnije kako se približavaju površini. Porast eozinofilnosti proporcionalan je intracitoplazmatskoj akumulaciji filamenata, koji su prekursori keratina, i umanjenju ribozoma.

Granulisani sloj je sastavljen od jednog do tri sloja spljoštenih ćelija koje sadrže keratohijaline granule (Slika 2). Te hrapave, intenzivno bazofilne granule su bogate histidinom i predstavljaju prekursora proteina filagrina, koji je odgovoran za agregaciju keratinskih filamentata (9).



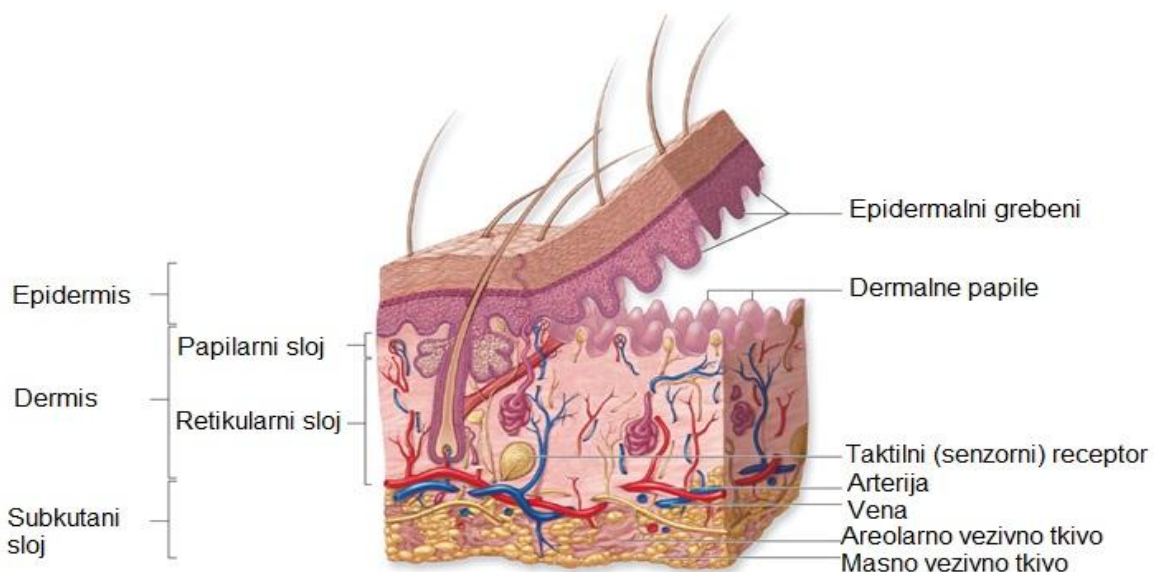
Slika 2. Celularna građa kože⁽⁸⁾.

Rožnati sloj sadrži mutliiple slojeve poliedarskih ćelija koje su izgubile jedra i koje su aranžirane u vidu košarastih šara (osim u akralnim regionima, u kojima je ovaj sloj debeo i kompaktan) (9).

Koža na dlanovima i tabanima sadrži još jedan dodatni sloj – *stratum lucidum* – lokalizovan između granulisanog i rožnatog sloja koji se prezentuje kao homogena eozinofilna zona. (9). Uz keratinocyte, normalni epiderm sadrži i melanocyte, Langerhansove ćelije i Merkelove ćelije (9).

Langerhansove ćelije su dendritične ćelije koje potiču iz kosne srži i čija je funkcija prezentovanje antigena imunološki kompetentnim T ćelijama. One su razbacane kroz gornji deo skvamoznog sloja i teško se identifikuju u rutinski bojenim preparatima (3).

Merkelove ćelije su takođe veoma teške za identifikaciju na hematoksilin-eozin (HE) isečcima, a takođe i na specijalnim bojenjima (6, 7).



Slika 3. Šematski prikaz slojeva kože i kožnih adneksa⁽⁸⁾.

Adneксе kože predstavljaju folikuli dlaka, sebacealne žlezde, znojne (ekrine) žlezde i apokrine žlezde (Slika 3). Folikul dlake, sebacealna žlezda i erector pilli mišić, i (u pojedinim delovima tela) apokrina žlezda sačinjavaju funkcionalni kompleks poznat i kao pilarna jedinica.

Poznavanje histoloških karakteristika kože je važno za razumevanje histogeneze malignih tumora kože. Najvažniji nemelanocitni maligni tumori kože su: bazocelularni karcinom, planocelularni karcinom i karcinom Merkelovih ćelija (1).

Dermis (derm) je struktura vezivnog tkiva sastavljena od kolagena i elastičnih vlakana “okupanih” u osnovnoj supstanci, koja sadrži adneksalne strukture, sudove i nerve. Podeljen je na dva sloja: adventicijalni i retikularni. Adventicijalni derm se sastoji iz površinskog sloja koji se nalazi odmah ispod epidermisa - papilarni derm - i koji se nalazi oko adneksalnih struktura - periadneksalni derm. Adventicijalni derm je uglavnom sastavljen od delikatne mreže kolagenskih vlakana, dok se retikularni derm sastoji od debljih snopova kolagena tipa I pomešanih sa gustim elastičnim vlaknima. Debljina derma znatno varira od područja do područja; izrazita debljina dermisa je posebno izražena na leđima, osobina koja se ponekad pogrešno tumači kao abnormalna u biopsijama (9). Dermalni krvni sudovi se dele na sudove dubokog pleksusa (koji se nalazi u retikularnom dermisu) i površinskog pleksusa (nalazi se u papilarnom dermisu), sa komunikantnim sudovima između njih. Od površnog vaskularnog pleksusa, kapilarne petlje se protežu u kožne papile.

Potkožno tkivo (hipoderm, subkutis) se sastoji od lobula zrelog masnog tkiva izdvojenih tankim trakama tkiva sličnog vezivnom tkivu, u vidu interlobularnih septi. Limfatici kože takođe su podeljeni na dubok i površinski pleksus.

Specijalizovani organi nervnih završetaka koji su prisutni u koži su *Wagner–Meissner* korpuskuli (sa taktilnom funkcijom; uglavnom smešteni u papilarnom dermu dlanova i tabana) i Pacini korpuskula (osetljive na pritisak; uglavnom smeštene u dubokom dermisu i potkoži težinom opterećenih delova tela).

Melanocit

Melanociti su dendrijske ćelije neuralnog grebena koje proizvode pigment melanin i odgovorne su uveliko za boju kože. Nalaze se u bazalnom sloju epiderma i odvojene su od derma epidermalnom bazalnom membranskom zonom(1). Normalni melanociti sa oskudnim pigmentom pojavljuju se kao blede ćelije na rutinski obojenim preparatima (stoga su ranije nazivane "Massonove jasne ćelije") (10).

Histogeneza melanocita još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Najpoznatije teorije o njihovom poretku obuhvataju: mezenhimalnu, epidermalnu i neuralnu. Većina autora prihvata neuralnu teoriju. Po njoj, melanociti su ćelije izvedene iz neuralnog grebena i nalaze se u bazalnom sloju kože, folikulima dlaka, većini skvamozno pokrivenih mukoznih membrana, i leptomeningama. Njihova funkcija je stvaranje nerastvornog pigmenta melanina i njegovo prenošenje kroz proces citokrinije do susednih epitelnih ćelija. Neuroektodermalno poreklo melanocita, predstavljeno pre mnogo godina od strane Masson i sar. (11), dokazivo je raznim tehnikama, među kojima je, chick-quail himera autora Le Douarina najelegantnija i najubedljivija, bar za ovaj određeni ćelijski tip (12).

Melanociti bazalnog sloja ektoderma humanog embriona uočavaju se vrlo rano, već u 8. nedelji gestacije. Tokom razvoja kože melanociti se prvo pojavljuju u blizini nerava i krvnih sudova derma od 4. do 10. nedelje fetalnog života, a u epidermu maksimalni razvoj dostižu krajem drugog meseca gestacijske starosti (6, 7, 13).

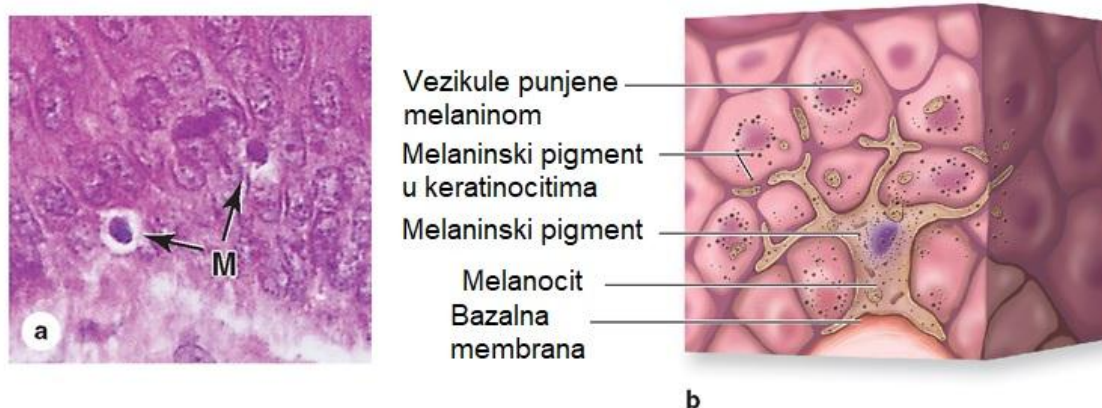
In vivo studije amputacije i presađivanja neuralnog grebena pokazale su da je embrionalno poreklo melanocita iz neuralnog grebena (14, 15). Podršku ovoj teoriji pružaju *in vitro* studije koje pokazuju da ćelije neuralnog grebena različitih vrsta mogu postati izvor melanocita (16). U centru ovih debata je melanoblast koji je definisan kao melanocitna stem ćelija (17-19).

Tokom migracije melanocita kroz fetalni dermis oni su funkcionalno nezreli i ne mogu se identifikovati histohemijskim metodama bojenja. U predelu glave sinteza melanina unutar melanozoma počinje u drugoj polovini trećeg meseca, a u drugim delovima tela se to dešava tek u 4. mesecu. Melanociti sa prepoznatljivim melanozomima dokazuju se imunohistohemijskim bojenjem na HMB-45 protein. Morfološki, fetalni melanociti su uniformniji (po veličini, strukturi i brojnosti dendritičnih nastavaka) nego adultni melanociti (15, 20).

Proliferacija i migracija melanocita može nastati nakon tkivnog oštećenja, tokom regeneracije i depigmentacije epiderma. Glavni rezervoar za obnovu melanocita su melanocitni prekursori unutar folikula dlake, kao i pluripotentne perineuralne stem ćelije (17, 19). Stadijumi u razvoju melanocita su: melanoblast, rani melanocit, funkcionalni melanocit, aktivirani melanocit i terminalno diferentovan melanocit.

Ćelijske karakteristike melanocita

Melanociti poseduju vitke citoplazmatske nastavke (dendrite) koji se pružaju iz tela ćelije i protežu između keratinocita; ovi postaju veoma upadljivi kada sadrže povećanu količinu melaninskog pigmenta bilo zbog povećane proizvodnje ili zbog bloka u mehanizmu prenosa (9). Pojedinačni melanocit može posedovati dendrite prema više od 30 keratinocita (Slika 4) (1). Melanociti izgledaju na HE preparatima kao nasumice razbacane ćelije u bazalnom sloju epiderma. Imaju malo, tamno prebojeno jдро, kao rezultat njegovog skvrčavanja.



Slika 4. Odnos melanocita sa susjednim ćelijama⁽⁸⁾. *Napomena:* a = mikroskopski prikaz strukture kože, b = šematski prikaz melanocita sa okolnim ćelijama.

Jedarni hromatin je uniformnog izgleda bez vidljivog nukleolusa. Za vizuelizaciju dendritskih nastavaka neophodna je primena specijanih histochemijskih bojenja, impregnacija srebrom. Melanociti čine do 10% svih ćelija bazalnog epiderma, ali se teško raspoznaju (6, 15). Odnos melanocita i keratinocita u epidermalnom bazalnom sloju varira od 1:4 do 1:10 u zavisnosti od dela tela. Međutim, rasne razlike u pigmentaciji kože su posledica razlika u količini melanina sadržanom u keratinocitima, a ne u broju melanocita. Funkcionalna jedinica sastavljena od melanocita i susjednih keratinocita koji primaju melanin iz njih naziva se epidermalno-melaninska jedinica (EMJ) (9). Za razliku od keratinocita, melanociti nemaju

tonofilamente ili dezmozome. Na bazi, gde leže u bliskom odnosu sa laminom denzom, melanociti pokazuju strukture koje nalikuju hemidezmozomima, koji se vide kod bazalnih keratinocita (7). Ultrastrukturno, obeležje melanocita je melanin-sintetišuća organela poznata kao melanozom. Razvoju ove, iz Goldžija izvedene, strukture, koja u svojoj potpuno razvijenoj formi ima specifičan izgled (zbog strijatnog izgleda svog elektron-gustog sadržaja duž duže ose organele), prethodi ultrastrukturno nespecifični premelanozom, a potom biva praćen zrelom granulom melanina (9). Te granule se transportuju u keratinocite, gde formiraju supranuklearnu kapu, štiteći jedro od ultraljubičastog zračenja. Boja kože uveliko se zasniva na broju, veličini i pakovanju melanozoma u keratinocitima (1).

Melanociti su uglavnom pozitivni na melaninska bojenja (kao što je srebrasto bojenje Fontana-Masson), tirozinazu, DOPA reakciju, S-100 protein, NSE, Mart-1/MelanA (A103), transkripcioni faktor mikroftalmije, Sox10 (transkripcijski faktor neuralnog grebena ključan za specifikaciju, sazrevanje i održavanje Švanovih ćelija i melanocita), PAX3 (faktor transkripcije sa važnom ulogom u razvoju melanocita tokom embriogeneze) i vimentin; intenzitet ovih reakcija pokazuje značajnu varijabilnost, verovatno zavisno od funkcionalnog statusa ćelije (21-26). Protein S-100 se često koristi za imunohistohemijsku detekciju melanoma. Međutim, ovaj protein prisutan je i u citoplazmi drugih ćelija uključujući i one iz neuralne melanocitne linije. Specijalizovani makrofagi, pojedine epitelne ćelije, Langerhansove ćelije i drugi nemelanocitni ćelijski tipovi takođe sadrže S-100 protein i pokazuju pozitivnu imunoreaktivnost. Melan-A je marker melanozoma koji pokazuje veći stepen specifičnosti za melanocite (6, 15). Bojenja na neurofilamente i gljalni fibrilarni kiselinski protein su negativni (27). Bojenje na HMB-45 je uglavnom negativno kod normalnih melanocita, ali je pozitivno kod aktiviranih melanocita, uključujući i one kod malignog melanoma (28). Keratin je još jedan marker, koji je postojano odsutan u normalnim melanocitima, ali je ponekad izražen u njihovim neoplastičnim formama. Zabeležena je činjenica da su normalni melanociti pokazali snažnu imunoreaktivnost za proizvod Bcl-2 proto-onkogen (29). Ovo se takođe pojavljuje i kod benignih nevusa i ređe kod melanoma (30, 31).

Izraz melanocit bi trebalo da bude rezervisan za zrelu melanin-formirajuću ćeliju. Njena nezrela forma je melanoblast. Rani melanociti su slični melanoblastima po veličini i strukturi, sposobni su da stvaraju pigment melanin, mada u citoplazmi ne sadrže granule melanina. Funkcionalni melanocit je mala ćelija koja ima jedan do dva tanka dendrita, i

može, ali ne mora da sadrži melanin, međutim, poseduje tirozinazu, koja pretvara tirozin u melanin.

Aktivirani melanocit je funkcionalni melanocit koji je pod uticajem hormona, hemijskih ili fizičkih stimulusa, te pojačava sintezu melanina i aktivno prenosi pigment na susedne keratinocite.

Terminalno diferentovan melanocit je potpuno zreo melanocit koji je prošao najveći deo životnog ciklusa. U njemu ima pigmenta, ali sinteza je oslabila, te se ove ćelije, s obzirom da ne sintetišu DNK, smatraju istrošenim ćelijama (15). Dermalni makrofagi sa fagocitizovanim melaninom su melanofagi (9).

Anatomska distribucija melanocita

Epidermalni melanociti prisutni su u svim regijama tela. Njihova gustina u koži varira zavisno od regije tela. Gustina melanocita najveća je na licu i genitalijama ($>2000/\text{mm}^2$), a najmanja u koži trupa i nadlaktice ($800-1000/\text{mm}^2$). Starenjem se smanjuje broj melanocita i opada aktivnost sinteze melanina (15). Ponovljena izlaganja ultravioletnom zračenju uzrokuju povećanje broja melanocita (6).

Melanogeneza

Melanociti su ćelije čije jedinstveno svojstvo proizvodnje pigmenta melanina omogućava široki raspon boja, što se vidi na primeru dlaka kod sisara. Melanin-stimulišući hormon (MSH) i drugi hormoni, uključujući i adrenokortikotropni hormon (ACTH) stimuliše sintezu melanina. Određeni uticaj pokazuju i polni hormoni, kao i brojni inflamatorni medijatori. Citoplazma melanocita sadrži diskretne organele, melanozome; sa različitom količinom melaninskog pigmenta. Ako melanin i proizvode drugi melanociti tokom embrionalnog života, jedino epidermalni i melanociti bulbusa dlaka stvaraju merljivu količinu ovog pigmenta kod odraslih (6, 7, 15, 32). Epidermalni melanociti su u kontaktu sa susednim keratinocitima (EMJ) kojima prenose partikule pigmenta melanina. Transfer melanozoma iz melanocita u epidermalne keratinocite rezultat je aktivne fagocitoze. Zbog aktivnog prenosa melanina u susedne keratinocite, melanociti epiderma i bulbusa dlaka

nazivaju se sekretornim melanocitima. Nasuprot njima, drugi melanociti, kao što su dermalni, sa melaninom koji su stvorili, nazvani su sadržajnim („content“) melanocitima. Tradicionalno se opisuju dve vrste melanina: eumelanin, koji je crno-braon boje i nerastvorljiv i feomelanin, crvenkasto-žut i rastvorljiv u alkalnim rastvorima. Melanin pokazuje argentafilnu reakciju. Redukcijom amonijum-srebro-nitrata pod dejstvom fenolskih grupa iz melanina gradi se crni srebrni precipitat, koji se dokazuje odgovarajućom histochemijskom metodom bojenja (Fontana-Masson) (6, 7, 15, 32). Ovaj specifični metod verifikuje prisustvo melaninskog pigmenta u tkivu (crno prebojavanje). Melanin treba razlikovati od drugih sličnih pigmenata braon ili mrko braon boje, kao što su pigment homogentizinske kiseline (delom se deponuje u koži kod ohronoze), hemosiderin, lipofuscin, bilirubin, i pigment kod pseudomelanoze koji je više povezan sa lipofuscinom. Glavna funkcija melanina kod ljudi je zaštita od potencijalno štetnog i karcinogenog efekta UV zračenja (6, 7, 15, 32).

Melanocitni tumori kože

Melanocitne lezije mogu biti benigne ili maligne. One obuhvataju širok spektar tumora počev od sitnih, makularnih i lentiginoznih hiperplazija, kongenitalnih ili stečenih melanocitnih nevusa do malignog melanoma (33).

Melanocitnu proliferaciju čine jedan ili više (tri) tipa ćelija: melanociti, nevusne ćelije, i melanomske ćelije. One mogu biti lokalizovane u epidermu ili dermu.

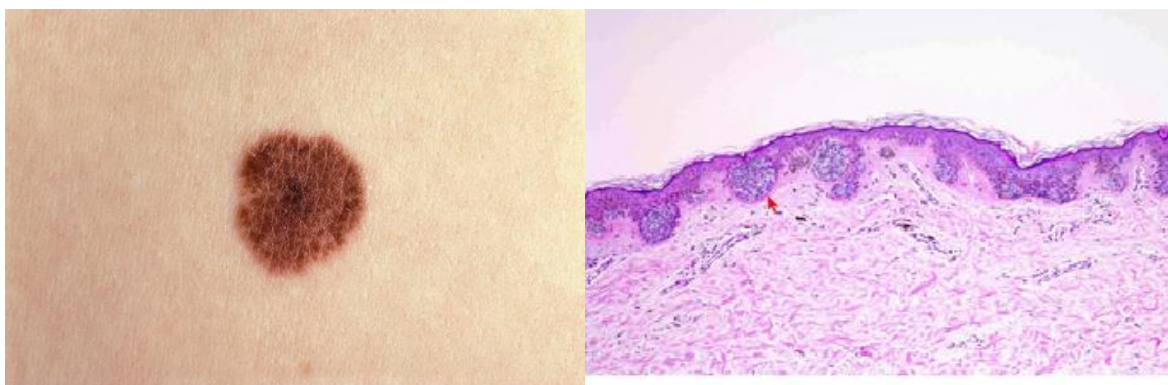
Nevusne ćelije i ćelije melanoma se razlikuju od melanocita po tome što su pretrpele proliferaciju u blizini susednih melanocita. Dalje, melanomske ćelije poseduju nuklearne abnormalnosti „uniformnu citološku atipiju“ (uniform cytological atypia) (6).

Određeni podaci ukazuju na potrebu za proširenjem klasifikacione šeme za melanocitne tumore uključivanjem treće dijagnostičke kategorije melanocitnih lezija intermedijarnog malignog potencijala, koje mogu imati sposobnost metastaziranja u regionalne limfne noduse, ali sa ograničenim potencijalom za udaljeno širenje. Termin melanocitom (melanocytoma) je predložen za ovu grupu lezija (34, 35).

Nevusi

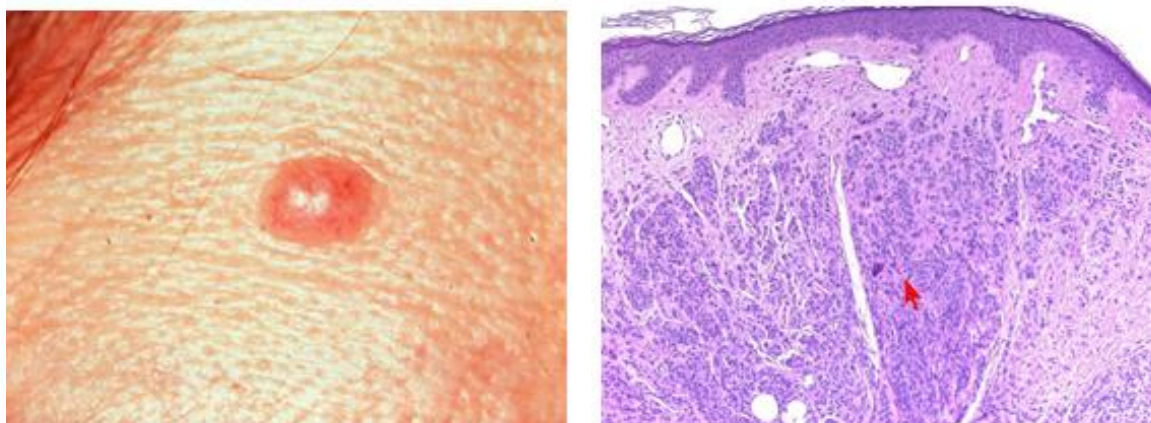
Reč nevus (L. naevus, beleg rođenjem) može se odgovarajuće primeniti za bilo koju ograničenu promenu kože kongenitalne prirode. Međutim, u uobičajenoj praksi se obično koristi kao sinonim za m(l)adež (L. moles, bezoblična masa) kako bi se obeležila lokalizovana benigna abnormalnost melanocitnog sistema (9).

Melanocitni nevusi su benigni tumori melanocita nastali proliferacijom ćelijskog klona, koji eksprimira melanocitni fenotip. Oni nastaju zbog mutacija u prekursorskim ćelijama koje aktiviraju proliferativne puteve ili suprimiraju puteve apoptoze, dovodeći do akumulacije melanocita u koži. Zavisno od tipa mutacije i lokalnih faktora okoline, melanocitna lezija se može širiti i migrirati u dermalne i epidermalne delove kože uslovljavajući nastanak odgovarajućeg tumora (19).



Slika 5. Juncioni nevus, makroskopski i mikroskopski prikaz. *Napomena:* crvena strelica pokazuje lokalizaciju juncionog nevusa.

Celularni plavi nevusi i Spitz nevusi imaju morfološke i biološke karakteristike skladne sa istinskim neoplastičnim procesom (stoga je predloženo da se ovi drugi nazivaju Špicovim tumorima), dok uobičajeni složeni nevus ima takvu karakterističnu organoidnu konfiguraciju (sa učešćem adneksi) što snažno sugerije *razvojne abnormalnosti* (36). U melanocitičnim nevusima, učestalost aktivirajućih mutacija BRAF-a su česte, najčešće T1799A (V600E) mutacija (37-39). NRAS mutacija je neuobičajena, a CDKN2A mutacija nije pronađena (38).



Slika 6. Dermalni nevus, makroskopski i mikroskopski prikaz. *Napomena:* crvena strelica pokazuje lokalizaciju dermalnog nevusa.

Ogromna većina nevusa se nalazi u koži, ali se takođe mogu naći i u bilo kojoj sluzokožnoj membrani prekrivenoj skvamoznim epitelom.

Klasteri benignih ćelija nevusa takođe se mogu videti u dermisu, potkožnom tkivu i u kapsuli limfnih čvorova, od kojih se poslednji najčešće nalaze u aksilarnom regionu (40, 41). Ovo je od izuzetnog značaja za onkološku hirurgiju, jer ova gnezda, koja ne prodiru u sam

čvor ne treba mešati sa metastatskim malignim melanomom, a to se pogotovo može desiti kada se pronađu u uzorcima nakon aksilarne limfadenektomije ili biopsije sentinel čvora izvedene zbog kožnog melanoma.

Ćelije nevocelularnog nevusa ili nevusne ćelije su obielno grupisane u vidu manjih i većih gnezda. Ovo grupisanje se može dešavati duž epidermo-dermalnog spoja (junkcionalni nevus) (Slika 5), unutar derma (dermalni nevus) (Slika 6) ili su nevusne ćelije istovremeno prisutne i duž epidermo-dermalnog spoja i unutar derma (složeni nevus) (9). Klinički, nevusi mogu biti kongenitalni ili stečeni i ispoljavaju se kao biološki stabilne mrlje, plakovi, papule ili polipi. Kod osoba svetle kože dominiraju u skoro 100% slučajeva i skoro uvek su histološki simetrični, sa povećanim brojem melanocita u epidermu, dermu ili u obe lokalizacije.

Za histopatološku dijagnostiku melanocitnih nevusa koriste se sledeci kriterijumi:

1) Mikroskopska simetrija lezije koja obuhvata: simetriju cele lezije/silуетe, simetriju lateralnih ivica, simetriju horizontalnog nivoa, simetriju distribucije pigmenta, simetriju distribucije, velicine i oblika junkcionalnih gnezda i simetriju epidermalnog rasporeda;

2) Uniformnost ćelijske gustine;

3) Sazrevanje (maturacija) ćelija;

4) Celularni monomorfizam, gubitak ćelijske atipije i nekroze i nizak mitotski indeks (42).

Mikroskopski izgled nevusa pokazuje neke zanimljive varijacije u zavisnosti od lokacije na kojoj se pojavljuju. Nevusi dlanova i tabana imaju tendenciju da ostanu junkcionalni tokom života. Nevusi poglavine često imaju istaknutu neuralnu komponentu. Nevusi koji se nalaze na koži vulve (vulvarni ili genitalni nevusi) imaju tendenciju da imaju veća, nepravilnije oblikovana i nepravilnija gnezda od onih koja se nalaze na drugim mestima, i imaju tendenciju da budu praćeni lentiginoznom melanocitnom hiperplazijom; zbog ovih osobina, oni se mogu pogrešno dijagnostikovati kao melanom (43).

Prekursori melanoma kože

Pojam prekursora odnosi se na one lezije kože kod kojih postoji vremenska i prostorna povezanost sa malignim tumorom, u ovom slučaju melanomom kože (MK) (44). Prepoznavanje ovih promena pruža mogućnost ranog otkrivanja osoba visokog rizika za nastanak i rano lečenje malignog melanoma. Najznačajniji prekursori MK su:

Displastični (atipični) nevusi

Najčešći prekursor melanoma kože je displastični nevus (15, 19, 45). On ima najveći rizik za nastanak MK. To su nevusi dijametra većeg od 6mm, sa nepravilnom pigmentacijom, nejasnih rubova i mnogobrojni (multipli displastični nevusi) (46).

Displastični nevusi (DN) većinom su značajni imitatori melanoma, markeri povećanog rizika za pojavu melanoma i potencijalni prekursori melanoma (47, 48). Ubrzo je postalo jasno da se multipli mladeži, pored njihovog porodičnog ispoljavanja, mogu javiti i kao sporadični fenomen u pacijenata sa melanomom; taj fenomen opisan je kao sindrom displastičnih nevusa (eng. "dysplastic nevus syndrome") (49).



Slika 7. Displastični nevus. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Klasični sindrom displastičnih nevusa označava postojanje više od 100 nevusa, od kojih je jedan ili više njih dijametra ≥ 8 mm, odnosno jedan ili više njih je displastično (45). DN mogu biti lokalizovani bilo gde na telu, ali najčešće se nalaze na trupu. Stroga klinička definicija DN uključuje:

- (a) postojanje mrljaste komponente u leziji ili okružujući centralnu papulu;
- (b) veličina lezije > 5 mm;
- (c) nepravilna ili nejasna granica lezije; i
- (d) nepravilnu pigmentacija unutar lezije (50, 51).

Ovako definisani, klinički prepoznati, DN su glavni faktor rizika za nastanak malignog melanoma kože.

Kongenitalni melanocitni nevusi

Urođeni melanocitni nevus vidljiv je na rođenju, može zahvatati srazmerno veliku površinu kože i skoro uvek ima dlake. Uzrok nastanka ovog nevusa nije poznat. Smatra se da je posledica defekta koji nastaje tokom migracije melanocita iz neuralnog grebena. Kongenitalni melanocitni nevus je takode poznat kao prekursor melanoma, rizik za malignu transformaciju je uslovljen veličinom ovog nevusa. Nevus prečnika većeg od 20 mm, a naročito "large bathing trunk naevus" nosi visok rizik za malignu transformaciju. Kao i većina melanocitnih nevusa, i za razliku od Spitz nevusa i plavih nevusa, urođeni nevusi obično pokazuju BRAF mutaciju (52). Nema hromozomskih aberacija.

Posebne vrste nevusa

Plavi nevus običnog tipa je obično mali i nalazi se na glavi, vratu ili gornjim ekstremitetima (53). Mikroskopski ga karakteriše nedefinisana duboka dermalna proliferacija izduženih i/ili dendritičnih dermalnih melanocita, koji se ponekad protežu u subkutis. Melaninski pigment je obično bogat (Slika 7). Postoji opseg zanemarenog dermisa između epiderma i lezije, a junkcionalna aktivnost je postojano odsutna. Oni su pozitivni na melaninska, S-100 protein i sve



Slika 8. Plavi "blue" nevus.

druga melanocitna bojenja, uključujući i HMB-45 (54). Plavi nevusi ne pokazuju BRAF i NRAS mutacije koje se mogu naći u konvencionalnim melanocitnim nevusima, ali umesto toga pokazuju česte somatske mutacije (do 83%) u heterotrimernoj alfa subjedinici G proteina (GNAQ gen). Ova mutacija je često prisutna u uvealnom melanomu. Mutacije se javljaju u kodonu 209 u domenu sličnom RAS-u, što rezultira konstitutivnom aktivacijom (55).

Celularni plavi nevus predstavlja karakterističnu podvrstu plavih nevusa, za koje se često klinički sumnja da su maligni zbog velikih dimenzija i intenzivne pigmentacije (56, 57). Najčešće se nalaze na glutealnoj i sakrokokcigealnoj regiji; ređe lokacije uključuju skalp, lice i dorzume šaka i stopala (57). Mikroskopski, ove lezije su ekstremno celularne, pa otuda i njihovo ime. Proširenje u subkutis je pravilo, a pigment se lako može naći. Kao i drugi melanocitni nevusi, celularni plavi nevusi ne pokazuju hromozomske aberacije na analizi pomoću komparativne genomske hibridizacije (58). Ponašanje celularnog plavog nevusa je skoro uvek benigno, ali je zabeleženo nekoliko slučajeva lokalnog ponavljanja ili zahvatanja regionalnih limfnih čvorova (57). Međutim, čak i ovi pacijenti su izlečeni ekscizijom primarne lezije i zahvaćenih čvorova, u smislu da bolest ne napreduje dalje.

Spitz nevus (spindle i/ili epitelioidni ćelijski nevus) karakteristično se javlja pre puberteta, ali se takođe može pojaviti i u odraslom dobu (59-61). Najtipičnija prezentacija je u obliku izdignutog, roze ili crvenog čvorića na koži lica slično hemangiomu (Slika 8). Može biti višestruk, bilo u vidu grozda (agminatnom) ili diseminovanom obliku (62); to ne bi smelo da se zameni sa satelitskim lezijama malignog melanoma. Mikroskopski, većina Spitz nevusa su složenog tipa, sa istaknutom intraepidermnom komponentom. Oko 5-10% su junkcionalni, a 20% ili više su intradermalni (63, 64). Oni se sastoje od vretenskih ćelija, epitelioidnih ćelija ili mešavine.



Slika 9. Spitz nevus.

Komparativna genomska hibridizacija pokazuje da većina slučajeva Spitz nevusa ne pokazuje hromozomske aberacije, a samo 25% pokazuje povećanje hromozoma 11p (65). Za razliku od malignog melanoma, mutacije u BRAF i NRAS genima nisu pronađene u Spitz nevusu (66).

Halo nevus (*leukoderma acquisitum centrifugum*) je klinički izraz (Slika 9), koji se koristi za opis melanocitnog nevusa okruženog zonama depigmentirane kože (67). Najčešće se nalazi na trupu mladih pacijenata i može biti višestruk (68). Mikroskopski se karakteriše teškom infiltracijom nevusa limfocitima i histiocitima i smatra se da predstavlja ekspresiju imunskog odgovora pacijenta (9). Treba napomenuti da maligni melanom takođe može biti okružen haloom depigmentisane kože (67). Međutim, u tom slučaju halo ima tendenciju da bude nepravilan, a pigmentisana tačka je obično izvan centra (9).

Rizik za nastanak melanoma od zrelog dermalnog, junkcionog i plavog nevusa je dosta mali, približno 1/200.000 (15, 19, 45).



Slika 10. Halo nevus.

Hirurška terapija

Definitivne indikacije za eksciziju uključuju pojavu pigmentne lezije kod odrasle osobe, hroničnu mehaničku iritaciju nevusa, ili pojavljivanje bilo koje od sledećih promena u već postojećem nevusu: produblјivanje pigmentacije ili širenje pigmenta izvan spoljnih granica lezije, pojava ravnih područja depigmentacije unutar nevusa, pojava crvene inflamirane zone oko nevusa, brzi rast, ulceracija, svrab, eksudacija seruma ili krvarenje nakon beznačajne traume (69).

Uklanjanje nevusa treba pre izvoditi hladnim nožem nego kauterom, kako bi se sprečilo izobličenje tkiva i posledične neuobičajene reakcije bojenja koje su sa tim povezane (9).

Rekurentna lezija često pokazuje junkcionu aktivnost, čak i ako ova osobina nije bila prisutna u originalnoj eksciziji (70). Ovo, zajedno sa povećanjem veličine nukleusa i nukleolarnom istaknutošću, koje često prate ove recidive, ponekad je rezultovalo pogrešnom dijagnozom malignog melanoma sa regresijom, pa odatle i termin pseudomelanoma koji je predložen za ovu pojavu (71). Ta previše nejasna oznaka se bolje zamenjuje nazivom rekurentni nevus (72).

Rano hirurško uklanjanje gigantskih oblika urođenih nevusa takođe se preporučuje zbog njihove veće tendencije da odu u malignu transformaciju; izuzetno velike lezije moraju biti ekscidirane tokom nekoliko sesija (9).



Slika 11. Gigantski nevus na levoj sakroglutealnoj regiji. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Melanom

Kratki istorijat

Naziv melanom datira iz prve polovine devetnaestog veka. U literaturi se spominje Laennec koji je po Pembertonu (73) navodno još 1809. diskutovao o melanomu, nazvavši ga “la melanose”. Naziv melanom u opisu ovog tumora prvi upotrebljava Robert Carswell 1838., u svom delu *Patological Anatomy* (74). Eiselt u svom delu iz 1861-1862. navodi da su Highmore (1651.), Bartholin (1677.), Bonet (1679.) i Henrici i Nothnagel (1757.) opisivali “fatalne crne tumore sa metastazama i crnom tečnošću u telu” (75). Zanimljivo je da je Pemberton još 1858. obavio široku i duboku disekciju zbog melanoma, izvodeći eksciziju ispod nivoa fasije i uklanjanjem zahvaćenih limfnih čvorova tokom ingvinalne disekcije (73).

Pringle je još 1908. prepoznao Handleyev koncept limfatičnog širenja melanoma (76) i prvi usvojio princip “en bloc” odstranjivanja (77), koje obuhvata mesto primarnog melanoma, regionalne limfne čvorove i širi pojas kože, potkožnog masnog tkiva i fascije između originalne lezije i zahvaćenih čvorova.

Ovi radovi su između ostalih diskutovani u radu Urteaga iz 1966. On navodi da je još Hipokrat opisao melanom 500 godina p.n.e. (navodeći navode iz istorijskih anala). On demantuje ranija pisanja o tome da se melanom spominje još u doba Drevnog Egipta jer se u prevedenim papirusima zapravo ne nalaze navodi koji se odnose na ovaj tumor. Ovaj rad se takođe bavi i estetskim aspektima mladeža, kao i diskusijom o prekolumbovskim mumijama Perua kod kojih su potvrđene koštane metastaze melanoma (78).

Jones 1924. daje prikaze melanoma nokatnog ležišta sa modalitetima lečenja. On navodi tadašnji stav da je nemoguće prognozirati ishod ukoliko se sprovede hirurško lečenje u slučaju dijagnoze tokom rane faze bolesti. Još tada je bilo jasno da mnogi slučajevi ne pokazuju pigmentaciju do trenutka kada je bolest već napredovala (79).

Javljali su se i neprepoznati melanomi u vidu ulkusa kod kojih nije došlo do potpune destrukcije epitela (80, 81). Prema opisima Hutchinsona i Hertzlera pigment se pojavljuje u ovim slučajevima u vidu razbacanih “crnih pega”, ili u vidu crne granice koja okružuje leziju (82, 83). Jones je dalje zaključio da lezija može nastupiti bez očigledne pigmentacije, da se obično kasni sa dijagnozom, sa beznadežnim rezultatima lečenja i da se sva hronična stanja vezana za ležište nokta trebaju razmatrati kroz prizmu mogućeg melanoma.

Zanimljivo je spomenuti predavanje profesora Grey Turnera o iskustvima sa melanomom iz 1939. (84), čiji je sažetak objavljen u The British Medical Journal. Profesor Turner diskutuje o kliničkim oblicima melanoma, opisujući pojavu kod pacijenata starosti 29, 45 i 66 godina. On dalje diskutuje o problematici iz domena kliničke dijagnoze, što je često vodilo kasnoj dijagnozi bolesti, delimično zahvaljujući previdima u procesu kliničkog pregleda. Prognoza, kako se tada smatralo, je najviše zavisila od oblika operativnog lečenja, ali je u najvećem broju slučajeva, i pored svetlih primera uspešnog lečenja, imala tragični karakter. Njegov zaključak je ipak govorio u pravcu boljitka bilo kakvim lečenjem u odnosu na pacijente kod kojih niti jedan od modaliteta lečenja nije primenjen. Zastupljenost u različitim životnim dobima je očigledno bila poznata i na početku 20. veka.

I čuveni Ewing je 1930. objavio rad na temu melanoma gde diskutuje o poreklu melanoma, koristeći u svom radu naziv nevusna ćelija. U tom periodu se iz radova o kojima on diskutuje odbacuje dotadašnja teorija o epitelnom poreklu nevusnih ćelija (85).

Hiles 1973. diskutuje o tome da li limfadenektomiju kao operativni modalitet treba napustiti (86).

Epidemiološke karakteristike

Na početku 21. veka, melanom ostaje potencijalno smrtonosni malignitet. U vreme kada se incidencija mnogih tipova tumora smanjuje, incidencija melanoma nastavlja da raste (87). Melanom je maligni tumor melanocita koji ima petogodišnju stopu preživljavanja od samo 15-20% kada je tumor metastazirao do udaljenih tkiva (88). Tokom poslednjih nekoliko decenija učestalost melanoma u muškarca ubrzano raste u poređenju sa ženama svih uzrasta, sa izuzetkom mladih žena (≤ 39 godina), koje su izgleda u većem riziku od mladih muškaraca (89-91). Iako većina pacijenata ima lokalizovanu bolest u vreme dijagnoze, koja bude lečena hirurškom ekscizijom primarnog tumora, mnogi pacijenti razvijaju metastaze (92). Podaci o melanomu u većini zemalja pokazuju brzo povećanje incidence ovog tumora (87).

Geografska distribucija

Prema podacima prikupljenim tokom perioda 1998-2002, MacKie i sar. pokazali su da je najveća zabeležena incidencija melanoma širom sveta u Queensland-u (Australija), gde postoji godišnja incidenca 55,8/100000 za muškarce i 41,1/100000 za žene. Incidenca ovog tumora je takođe povišena na Novom Zelandu (34,8/100000 i 31,4/100000 za muškarce i žene konsektivno). Stope incidence variraju u Evropi i najviše su u Švajcarskoj i skandinavskim zemljama (Norveška, Švedska i Danska). Incidencija melanoma u Italiji iznosi 5-7 slučajeva na 100.000 stanovnika godišnje, iako se smatra da mediteranske populacije imaju mali rizik za razvoj ovog tumora. Dakle, u Evropi postoji gradijent u stopama incidencije sa najvišim stopama u severnim zemljama, a najnižim u južnim zemljama. Ovo se javlja verovatno zbog povećane zaštite od UV zračenja, tipične za jako pigmentisanu kožu, ali i zbog različitog oblika izlaganja suncu (hronični tip izlaganja u Južnoj Evropi) (87). Stopa incidence u Evropi je veća u naprednijim zemljama, u poređenju sa podacima iz pribaltičkih država, iako skoriji podaci pokazuju povećanu učestalost u mnogim istočnoevropskim zemljama (87).

Polna distribucija

Epidemiološke studije potvrdile su pol kao nezavisni prognostički faktor nakon (93-97). Objasnjenja za ove disparitete su se fokusirala na ponašanje nasuprot biološkim razlikama između muškaraca i žena. Postojanje pola kao prognostičkog faktora može se objasniti time da žene savesnije koriste preporučenu UV zaštitu (primarna prevencija) i češće

posećuju lekare (sekundarna prevencija) (98). Iako se melanom klasično ne smatra tumorom koji reaguje hormonski, androgenski receptori su otkriveni na melanomskim ćelijama, što donekle može objasniti zašto je ovaj tumor agresivniji kod muškaraca (99). Takođe, estrogen može igrati ulogu, jer postoje radovi koji ukazuju na to da se preživljavanje kod muškaraca i žena približava istim vrednostima za žene u postmenopauzi, kako nivoi estrogena opadaju (100, 101). Dok su neki istraživači pretpostavljali da pol utiče samo na lokalnu invaziju tumora (102), drugi smatraju da pol kao faktor utiče i na nastanak limfnih i hematogenih metastaza (103, 104). Međutim, studije kod pacijenata sa metastatskom bolesti su ograničene i do sada su dale konfliktne rezultate (105-107). Postoji istraživanje o odnosu između pola i preživljavanja u SAD korišćenjem baze podataka o Nadzoru, epidemiologiji i krajnjim rezultatima (Surveillance, Epidemiology, and End Results - SEER). Cilj je bio da se utvrdi da li je prednost u preživljavanju kod žena ograničena na ranu fazu melanoma, kao što je ranije smatrano, ili postoji i u napredovaloju ili metastatskoj bolesti. Upoređivan je rizik od smrti usled melanoma u svim fazama bolesti, istražujući i mogući efekat pola korišćenjem starosnih grupa kao zamenu za status menopauze kod žena. Veliki broj pacijenata je omogućio jasniji opis epidemioloških obrazaca preživljavanja specifičnog za melanom u Sjedinjenim Državama kod muškaraca i žena u tri različite starosne grupe. Podaci iz studije pokazali su da su žene, u poređenju sa muškarcima, imale više stope preživljavanja za lokalizovanu i regionalnu bolest, ali da ova razlika u polu ne postoji među pacijentima sa udaljenom bolešću. Neophodno je dalje istraživanje bioloških i razlika faktora sredine između muških i ženskih pacijenata. Razumevanje osnova za ove razlike ima potencijal za poboljšanje ishoda kod kožnih melanoma (108).

Mortalitet

Paralelno sa povećanjem stope incidence postoji i povećanje mortaliteta povezanog sa melanomom, mada u nižem stepenu. U Sjedinjenim Državama stopa smrtnosti povećavala se za 1,4% svake godine između 1977. i 1990. godine. Od 1990. godine pokazuje mali trend opadanja i smanjivala se za 0,3% godišnje od 1990. do 2002. (109). Prema Rigel i sar., od 2003. do 2007. godine, prosečna starost vezana za smrt od malignog melanoma je bila 68 godina (110). Postoji veća stopa mortaliteta kod muškaraca (+2,3% od 1975. do 1989. i +0,2% od 1989. do 2007. godine) u poređenju sa ženama istog uzrasta u SAD (+0,8% između 1975-1989 i tokom perioda 1989-2007. pošto se smanjivala za 0,6%) (110).

Starosne karakteristike

Za razliku od drugih čvrstih tumora, melanom se uglavnom javlja kod mladih i sredovečnih osoba. Prosečna starost u vreme dijagnoze melanoma je 57 godina, a primećeno je da se incidenca ovog karcinoma povećava linearno nakon 25 godina starosti do 50 godina, a zatim usporava, posebno kod žena. Što se tiče incidence melanoma u odnosu na pol, različite studije pokazuju rezultate koji nisu uvek slučajni. Prema Marković i sar., muškarci su približno u 1,5 puta većem riziku za razvoj melanoma u poređenju sa ženama, dok se, prema drugim studijama različita prevalencija kod oba pola mora analizirati u odnosu na uzrast: stopa incidence melanoma je veća kod žena do 40 godina starosti, međutim, nakon te dobi, do 75 godina starosti, učestalost je skoro 3 puta veća kod muškaraca u odnosu na žene (145,6 naspram 47,3 na 100,000) (87, 110). Rizik za melanom, u ranijem dobu od očekivanog, povećan je među rođacima osoba sa istorijom melanoma, naročito ako je slučaj melanoma dijagnostikovao u mladom dobu. Dalja istraživanja o odnosu između uzrasta pri postavljanju dijagnoze i rizika za melanom kod rođaka mogla bi preneti preporuke za skrining melanoma kod pojedinaca sa porodičnom istorijom bolesti (111).

Rasna distribucija

Stopa incidence ove bolesti varira široko i u odnosu na rasu. Bela populacija ima približno 10 puta veći rizik od razvoja kožnog melanoma od crne, azijske ili latinoameričke populacije. Međutim, i belačka i crnačka populacija imaju sličan rizik od razvoja melanoma na tabanu, dok su nekutani melanomi (npr. sluzokože) češći kod nebeločkih populacija (112).

Prema podacima koje je SEER sakupljao tokom 2007. godine, stopa incidence melanoma u populaciji belaca iznosila je 27,5 na 100.000, dok je kod crnaca 1,1 na 100,000 (u Sjedinjenim Državama) (110). Incidenca melanoma raste kod svetloputih osoba širom sveta, ali razlozi za to ostaju kontroverzni. Prethodna procena u Kaliforniji među populacijom nelatinskih belaca pokazala je značajni porast u incidenci invazivnog melanoma za tumore svih debljina u svim socioekonomskim kategorijama statusu između 1988–1992 i 1998–2002. Da bi se razumelo da li se ovaj trend nastavlja, sama procena je ponovljena sa uključivanjem i perioda 2008-2012 i tačnijih patoloških stadijuma tokom dijagnoze. Pritom je korišćen California Cancer Registry da bi se obračunala uzrastu prilagođena incidenca za preko 58000 novodijagnostikovanih. Incidenca nije samo nastavila sa rastom tokom desetogodišnjeg perioda od 1998-2002 i 2008-2012, već je takođe pokazala značajni porast u svim grupama zajednički definisanim debljinom tumora ili stadijumom tokom dijagnoze i socioekonomskim

statusom (SES). Najveći relativni porast je nađen za regionalnu, udaljenu i ulcerisanu bolest, posebno među muškarcima koji žive u područjima sa najnižim SES. Razmatrajući debljinu tumora i stadijum kao reprezent vremena za skrining i detekciju i SES kao reprezent dostupnosti zdravstvene nege, ovaj obrazac je interpretiran kao nastavak i pravi porast pojavljivanja melanoma, nasuprot fenomenu tankog tumora koji se javlja zbog poboljšanog dostupa zdravstvenoj nezi (113). Incidenca melanoma i nemelanomskih tumora kože je u porastu, sa godišnjim porastom od 0,6% za melanom kod starijih od 50 godina (114). Pretpostavlja se da će broj novih slučajeva u 2018 u USA iznositi oko 91270 (115).

Porast incidence

Odstupanja u stopi incidence postoje i pripisuju se varirajućim faktorima rizika u različitim populacija, kao i diskrepancama u sistemima nacionalnih registara. Štaviše, incidenca melanoma je možda i viša nego što se misli, National Cancer Registries je istakao da je incidenca u pojedinim zemljama potcenjena (116). Porast incidence melanoma nije praćen adekvatnim porastom nivoa mortaliteta (115). To vodi pitanju da li se zaista radi o epidemiji melanoma ili porast incidence predstavlja samo epifenomen koji se može pripisati “preteranim” dijagnozama, koje nastaju kao rezultat pojačanog skrininga i većim brojem biopsija. Ipak, povećana incidencija melanoma u SAD obuhvata sve grupe debljina (kategorije tumora po American Joint Committee on Cancer - AJCC) i nezavisna je od socioekonomskog statusa (surogatni marker za pristup negi i skriningu), što ukazuje na to da povećani skrining i biopsije ne uzrokuju ovu dramatičnu promenu incidence (117, 118). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima koje je izveo Shaikh i sar., koji su pokazali da se prosečna debljina tumora povećala kod tumora T3/T4 i kod nodularnog melanoma (119). Ova zapažanja zajedno sugerišu da je epidemija melanoma stvarna, a ne samo artefakt povećanog detekcijskog pritiska ranijih stadijuma (T1/T2 lezija) (119). Nasuprot tome, ipak postoje dokazi o postojanju “preteranih” dijagnoza. Nedavne epidemiološke studije pokazuju da melanom *in situ*, sa godišnjom incidencom od 9,5% (115), predstavlja neproporcionalno visok procenat ukupnog povećanja incidencije melanoma (120). Sa dermatopatološke tačke gledišta, postoje studije koje ukazuju na trenutni trend prema reklasifikaciji prethodnih nemalignih dijagnoza kao melanom (121). Pored toga, u populacionoj studiji Welch i sar., koja je povezivala broj biopsija kože i incidencu melanoma, istražitelji su primetili da je došlo do paralelnog povećanja tokom perioda od 15 godina, što ukazuje na to da epidemija melanoma može biti povezana i sa povećanim nadzorom i brojem biopsija (122). Incidenca

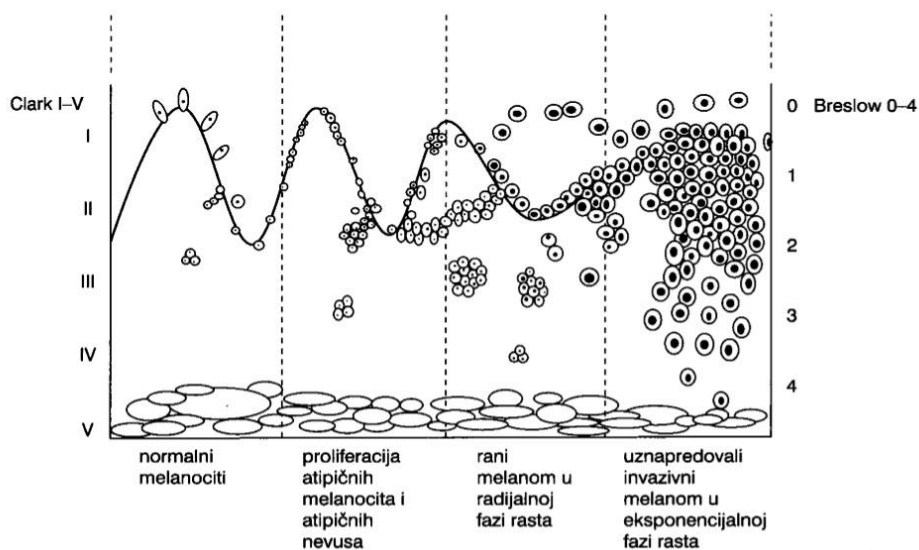
malignog melanoma se u proteklih 50 godina u populacijama sa svetlom bojom kože povećavala stalno (117). Trendovi incidencije verovatno odražavaju promenljivu prevalencu faktora rizika, kao što je povećana količina slobodnog vremena na sunčanim destinacijama, promena u modi i upotreba solarijuma, zajedno sa povećanim nadzorom, ranim otkrivanjem i promenama u dijagnostičkim kriterijumima (123, 124).

Etiopatogeneza

Danas se melanom smatra multifaktorskom bolesti koja proističe iz interakcije između genetske osetljivosti i izloženosti životnoj sredini.

Teorije nastanka melanoma

Jedan od mogućih puteva do melanoma je put ka nevusu, gde intrinzička predispozicija melanocitnoj proliferaciji dovodi do prisustva velikog broja melanocitnih benignih i atipičnih Nevusa (Slika 12) (125, 126).



Slika 12. Mogući put nastanka melanoma iz melanocita⁽⁴⁵⁾

Iako je nevusni put usmeren na bolesnike sa više nevusa, nije u potpunosti jasno da li se primarni melanom u ovom kontekstu javlja na mestima gde je broj nevusa najveći (127-129). S druge strane, drugi put povezuje melanom sa akumulacijom kožnog aktiničnog oštećenja tokom života, tj. prekomernim izlaganjem hroničnom ili intermitentnom ultravioletnom zračenju (UVR) (130). Pacijenti koji razvijaju melanom kroz ovaj drugi put imaju tipično bledu kožu i znake hroničnog oštećenja suncem, druge nemelanomske tumore kože zavisne od UVR i ekspresiju p53 proteina u primarnom tumoru (126). Jaka veza između gustine nevusa, primarne lokacije melanoma i prethodne istorije sunčanih opekotina ili intermitentne UVR izloženosti na istom mestu podržava ulogu izlaganja suncu kao okidača za razvoj melanoma u već predisponiranom području (131, 132). Takođe, potvrđeno je da se CSD (chronically sun-damaged) melanomi javljaju češće na područjima izloženim sunčevim zracima – kao kod bolesnika sa nemelanomskim kancerima kože i niskim brojem nevusa (130, 133).

Molekularna biologija melanoma

Melanom nije izuzetak u biologiji tumora i njegovo poreklo predominantno je rezultat akumulacije mutacija gena čija je ključna uloga regulacija ćelijske proliferacije, diferencijacije, apoptoze ili drugih puteva ćelijske smrti (134-136). Na stranu od porodičnih sindroma, napredak u tehnologiji analize gena je omogućio proučavanje ređih alela sa visokim rizikom koji izgleda da doprinose riziku za rak kod pojedinaca. Molekularna genetika može pružiti značajan doprinos u proceni prognoze obolelih od kutanog melanoma, odnosno omogućiti selekciju pacijenata kojima je potrebna odgovarajuća terapija. Kao značajni geni regulatori ćelijskog ciklusa ističu se sledeći onkogeni i tumor supresorski geni: Ciklin D1 (CCND1), ciklin zavisna kinaza 4 (CDK4), CDKN2a (p16INK4a), ARF, RB1, TP53, ATM i HPV E6 i E7. Međutim, tumor supresorni geni i onkogeni (CDKN2A/p16, PTEN, TP53, RAS, MYC) odgovorni za nastanak malignog melanoma, ne dovode se još uvek u vezu sa određenim podtipovima malignog melanoma, a po nekim studijama čak i nemaju validan prognostički značaj (137-140). Međutim, brojna sprovedena istraživanja potvrđuju česta oštećenja regulatora ćelijskog ciklusa kod MK (141-147). Mehanizam patogeneze melanoma nije dovoljno razjašnjen. Deregulacija mehanizma programirane ćelijske smrti (apoptoze) verovatno predstavlja jedan od ključnih faktora u nastanku i prognozi melanoma. Kao normalni fiziološki proces apoptoza igra važnu ulogu u embrionalnom razvoju, u remodeliranju adultnog tkiva i u regulaciji imunog odgovora. Insuficijentni mehanizmi regulacije apoptoze mogu doprineti nastanku malignog fenotipa.

Ciklin zavisna kinaza N2 (CDKN2/p16INK4a)

Studije povezivanja fokusirane na porodice sa visokom incidencom melanoma (148-150) otkrile su lokus za predispoziciju na hromozomu 9p21, posledično pronađeno da predstavlja genski lokus za CDKN2A (151, 152). Ovaj genski lokus se kompleksno transkribuje (iz različitih čitajućih okvira) tako da kodira dva proteina, p16 i p14ARF; većina mutacija utiče na p16 (153, 154). P16 normalno interaguje sa i inhibira ciklin-zavisnu kinazu 4 (cyclin-dependent kinase 4 - CDK4). Tokom normalnog ćelijskog ciklusa CDK4 stvara kompleks sa ciklinom D, rezultujući fosforilacijom proteina retinoblastoma (retinoblastoma protein Rb1), što zauzvrat oslobađa E2F-1 i time dozvoljava indukovanje sinteze gena S-faze; p16 se dakle ponaša kao negativni regulator ćelijskog ciklusa (151, 154). Mutacije koje

utiču na ovaj važni protein ometaju njegovu inhibitornu funkciju i time poremećuju ćelijski ciklus. Stoga se smatra da one pripremaju melanocite na malignitet. Dokazi (155-157) takođe postoje za promelanomgenički efekt „germline“ mutacija koje utiču na CDK4 i Rb1 direktno. P14ARF ima takođe važnu ulogu u nishodnoj regulaciji p53 aktivnosti (kroz povećanu aktivaciju MDM2) čime se takođe ponaša kao tumor supresor; ometanje ove aktivnosti mutacijama može takođe biti tumorigeno (158). Istinsku prevalencu CDKN2A mutacije je teško kvantifikovati. U studijama porodičnih melanoma iznosi su varirali od 20% do 57% (154), ali se smatra da je ona u opštoj populaciji značajno niža, oko 1,2-2,9% (159). Takođe može postojati interakcija između genetskih mutacija i dalji uticaj na rizik za melanom; npr. neke varijante MC1R gena mogu povećati penetraciju (penetrance) CDKN2A mutacija, time dalje povećavajući rizik (160, 161).

Veza između CDKN2A melanoma i drugih maligniteta (npr. kancer pankreasa) je takođe pokazana (162-164). BRCA2 je dobro povezan sa rizikom za malignitete dojke, ali njegova uloga u melanomu nije u potpunosti uspostavljena. S obzirom da neke studije (165) sugerišu povećani rizik za melanom u prisustvu mutacije ovog gena, dok druge (166) nisu bile u mogućnosti da to pokažu, ne može se povući potpuni zaključak u vezi sa ovim genom. Drugi geni su takođe ispitivani; genom-wide association studije (167-169) su identifikovale nekoliko lokusa koji mogu korelirati sa povećanim rizikom za melanom, ali biološki mehanizam mnogih od njih još uvek nije uspostavljen. Genske mutacije koje utiču na protagoniste puta mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK) su pronađene u mnogim tipovima tumora. Ovaj ključni ćelijski signalni put se aktivira ligandom koji se vezuje za površnoćelijski receptor tirozin-kinaze (RTK), koji zauzvrat aktivira RAS.

RAS familija G proteina se sastoji iz tri izoforme, od kojih je najvažnija NRAS. Aktivacija NRAS rezultuje daljom transdukcijom putnog signala kroz fosforilaciju (i posledičnu aktivaciju) RAF proteina BRAF i CRAF (170). Formacija homo ili heterodimera RAF molekula konačno vodi ka aktivaciji ekstracelularne signalom-regulisane kinaze (ERK) koja zauzvrat utiče na brojne mete u cilju promocije ćelijskog rasta i preživljavanja, kao i kontrole dalje signalizacije MAPK putem indukcijom ekspresije negativnih regulatora (171), i direktno inhibirajući proteine poput CRAF (172). Mutacije koje utiču na ovaj put su pristune u velikoj većini kožnih melanoma, predominantno utičući na NRAS (oko 20%) (173) ili BRAF (oko 40-50%) proteine (174). U slučaju BRAF, velika većina mutacija sastoji se iz pojedinačne zamene aminokiseline iz valina u glutaminsku kiselinu na kodonu 600 (V600E) rezultujući konstitutivno aktivnim BRAF proteinom koji je posledično u stanju da sprovodi signal neprekidno i bez suprotstavljanja niz MAPK put, tako promovišući

melanomagenezu i prevenirajući apoptozu (175, 176). Slični procenat nevusa takođe sadrži BRAF mutaciju, implicirajući da ona sama nije dovoljna za malignu transformaciju (177). Postoji hipoteza da dok sama pojava BRAF mutacije nije polazni događaj za onkogenezu, ona nastaje rano u razvoju invazivnog melanoma i dalje pojačava efekte onkogenih stimulusa; time ona pre olakšava malignu transformaciju, nego što je započinje. BRAF mutacije su češće viđene kod melanoma koji nastaju na suncu povremeno izloženim delovima, implicirajući da UV zračenje (opisano ranije) može biti jedan takav stimulus.

Dodatno, pošto postoji značajna interakcija između intracelularnih signalnih puteva, dalje genetske aberacije koje utiču na put PI3 kinaze, na primer, mogu takođe biti dovoljne da indukuju razvoj melanoma. Jednom kada se razvije, naime, postoji jasna zavisnost tumora od perzistentne aktivacije puta MAPK (176).

Postojanje naslednih oblika malignih melanoma je poznato dugo vremena (178). Članovi porodica sklonih melanomu često imaju brojne atipične melanocitske lezije ('displastični nevusi') koje služe kao kožni marker onih sa većim rizikom (179). Određeni broj slučajeva naslednog melanoma je uzrokovan isključujućom germinativnom mutacijom u CDKN2A na hromozomu 9p21 (kodira dva proizvoda tumor supresornih gena, p16INK4a i p14ARF) ili ređe, aktivirajuća mutacija u CDK4 (180-185). Melanom može biti udružen sa generalizovanim melanozom (186, 187) i sa lezijama koje liče na vitiligo (188).

Bcl-2 onkoprotein

Članove bcl-2 familije čine brojni geni koji imaju značajnu ulogu u kontroli apoptoze, bilo kao njeni promotori ili inhibitori. Bcl-2 je onkogen koji reguliše sintezu istoimenog proteina koji inhibira apoptozu, odnosno funkcioniše kao onkoprotein. Ovaj protein zajedno sa Bax familijom proteina reguliše oslobađanje citohroma C iz mitohondrija, tako što bcl-2 inhibiše, a Bax proteini potpomažu oslobađanje citohroma C. Ovaj protein istraživan je i kod benignih i malignih melanocitnih tumora. Pokazana je konstantna ekspresija bcl-2 proteina u melanocitima bazalnog sloja epiderma, kako kod benignih nevusa, tako i kod melanoma. Međutim, neurotizovana područja nevusa pokazuju slabu ili odsutnu ekspresiju ovog proteina (189). Prekomerna ekspresija bcl-2 proteina blokira apoptozu, čime se remeti ravnoteža ćelijskog preživljavanja i uslovljava abnormalni rast tumora.

P53 tumor supresor gen

Tumor supresor p53 gen ima centralnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze. Kod čoveka TP 53 gen je lociran na kratkom kraku hromozoma 17 (17p13.1) (190). Svojom aktivnošću omogućava transkripciju DNA u RNA tokom G1-S faze ćelijskog ciklusa. On kodira protein koji inhibiše nastajanje tumora tako što utiče na stabilnost genoma, rast i diferencijaciju ćelije i stimulaciju apoptoze. Kao transkripcioni faktor i regulator kontrolnog punkta ćelijskog ciklusa on doprinosi regulaciji procesa apoptoze i smatra se centralnom tačkom nekoliko puteva koji uslovno determinišu da li će ćelija pretrpeti apoptozu ili zaustaviti rast bez ćelijske smrti. Mutacije p53 gena najfrekventnije su genetske alteracije u humanom karcinomu koje pogađaju specifični gen. Mutacija uslovljava defekte na kontrolnom punktu ćelijskog ciklusa i genetsku nestabilnost kancerskih ćelija. Mutirani tip p53 gena menja strukturu i funkciju enkodiranog proteina i inicira proces onkogeneze. Za mehanizme inaktivacije tumor supresorskih gena odgovorne su tačkaste mutacije, delecije i epigenetska inaktivacija gena (189, 191-194).

Ukoliko nastale promene u genomu nije moguće "popraviti" gen p53 takođe reguliše dalje usmeravanje ove ćelije ka programiranoj ćelijskoj smrti - apoptozu. Pošto ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i očuvanju stabilnosti genoma sprečavanjem mutacija, p53 gen se često naziva "čuvarom genoma". Inaktivacija pRb i p53 puteva na nivou G1/S prelaza ćelijskog ciklusa je osnovni uslov za genezu većine humanih karcinoma, uključujući i melanom. Smatra se da je većina stečenih abnormalnosti regulatora ćelijskog ciklusa na kontrolnom punktu G1/S ključni korak u nastanku i progresiji melanoma (191, 193, 194). Oštećenja na pRb putu relativno su česta kod melanoma, dok se na p53 putu ipak ređe događaju. P16, ciklin D1, pRb i p27 su ključni regulatorni proteini ćelijskog ciklusa uključeni u pRb put, dok su za p53 put ključna dva proteina, p53 i p21. P53 i pRb putevi i njihovi regulatorni proteini koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa i procesa apoptoze prikazani su na dijagramu 1 (195).

Ubrzan porast nivoa p53 direktno povećava transkripciju WAF1 gena, čiji je produkt p21 protein moćni inhibitor širokog spektra ciklin zavisnih kinaza (CDK) u G1 fazi ćelijskog ciklusa. Inhibicija ciklin/CDK enzimske aktivnosti putem povećanja nivoa p21 indukuje privremeni zastoj G1 faze, što omogućava oporavak DNK pre nastanka ćelijske deobe. Funkcionalni gubitak kontrole u zavisnosti od defekata p53, ili za bilo koji kritični protein (p21, p21 udruženi CDK i ciklini, ili CDK/ciklin substrati kao što je Rb), može rezultovati inicijacijom ili progresijom tumorogeneze sprečavajući zastoj ćelijskog ciklusa i apoptoze

posle DNA oštećenja i dozvoljavajući genetskim defektima da se akumuliraju u sledećim ćelijskim deobama (196, 197).

Generalno je prihvaćeno stanovište da se tumor supresorna funkcija TP53 ostvaruje putem niza mehanizama u kojima p53:

- 1) aktivira proteine DNK reparacije u uslovima nastalog oštećenja DNK;
- 2) indukuje zastoj ćelijskog ciklusa u regulatornoj tački G1/S;
- 3) inicira apoptozu, programiranu ćelijsku smrt.

Zbog vrlo kratkog poluvremena raspada neizmenjenog p53 proteina njega nije moguće imunohistohemijski dokazati. Međutim, izmenjen p53 protein, bilo usled mutacije p53 gena ili adhezije s drugim ćelijskim ili virusnim proteinima, dugo opstaje stabilan i prisutan u dovoljnoj količini koja omogućava njegovu imunohistohemijsku detekciju (198). Pozitivna ekspresija p53 proteina pokazuje nuklearno ćelijsko prebojavanje.

U znatnom broju studija autori su nastojali da uoče povezanosti između mutacije p53 gena i prognoze melanoma. Pojedini autori opisuju lošiju prognozu pacijenata sa MK koji poseduju mutirani-nefunkcionalni p53 gen, dok studije drugih autora ovakvu vezu ne nalaze (199, 200).

Proliferativni Ki-67 antigen

Ki-67 je nehistski protein, velike molekulske mase. Identifikovane su dve izoforme molekulske mase 345 kD i 395 kD. MIB-1 je najčešće korišćeno monoklonsko antitelo koje otkriva Ki-67 antigen. Jedan od glavnih razloga česte primene originalnog antitela u kliničkoj praksi je mogućnost njegove upotrebe u formalinom fiksiranim parafinskim preparatima. Isključivo je vezan za ćelijsku proliferaciju (201-203). Ki-67 identifikuje nuklearni antigen koji se nalazi u ćelijama samo u proliferativnoj fazi ćelijskog ciklusa, odnosno u jedrima ćelija tokom kasne G1, S, G2 i M faze. Antigen se ne može detektovati u G0 fazi ćelijskog ciklusa (135, 189, 204). Ki-67 se može koristiti za procenu proliferativne aktivnosti lezije, ali i za diferenciranje benignih od malignih melanocitnih lezija. Naime, mitotska aktivnost kod benignih melanocitnih lezija (nevusa) obično izostaje ili je vrlo niska, dok je kod malignih lezija ona vrlo visoka i u korelaciji je sa stepenom progresije tumora (135). Sama distribucija nuklearne ekspresije Ki-67 sugeriše prirodu lezije. Dermalna ekspresija Ki67 sa velikom verovatnoćom ukazuje na malignitet, te je od velike pomoći za interpretaciju melanocitne proliferacije kod graničnih lezija (204, 205).

Autori drugih studija potvrđuju diferencijalni značaj Ki-67 za razlikovanje benignih od malignih melanocitnih lezija, ali zastupaju stav da je njegova prognostička vrednost za melanom nesigurna (206). Danas se uvode novi proliferativni markeri tipa antifosfohiston H3 (PHH3), mitozin i MCM4 marker, ali za razliku od Ki-67 oni nemaju prognostički značaj za MK. Može se reći da Ki-67 ostaje široko prihvaćen proliferativni marker, kako za melanom, tako i za druge tumore (207). Pozitivna ekspresija Ki-67 antigena pokazuje nuklearno ćelijsko prebojavanje.

Činjenica da se maligni melanomi mogu razviti iz nevusa više se ne mogu poreći, ali njihov tačan procenat nije poznat. Očigledno je da samo vrlo mali deo stečenih nevusa postaje malignan. Procenat je veći kod kongenitalnih nevusa i - navodno - kod displastičnih nevusa, ali tačni brojevi su takođe nepoznati. Zaostatak displastičnog nevusa je naveden kao prisutan u od manje od 5% do skoro polovine svih melanoma, a ovaj široki opseg nesumnjivo odražava teškoće u razlikovanju lateralnog širenja melanoma od prethodne prekursoraske lezije (208).

Faktori rizika i prognoze

Brojne hipoteze ističu dve glavne etiološke grupe faktora za nastanak melanoma. To su endogeni (genetski) i egzogeni faktori (faktori okoline). Najvažniji i potencijalno izmenljivi faktor rizika za razvoj melanoma je izloženost UV zračenju (UVR) zbog njegovog genotoksičnog efekta.

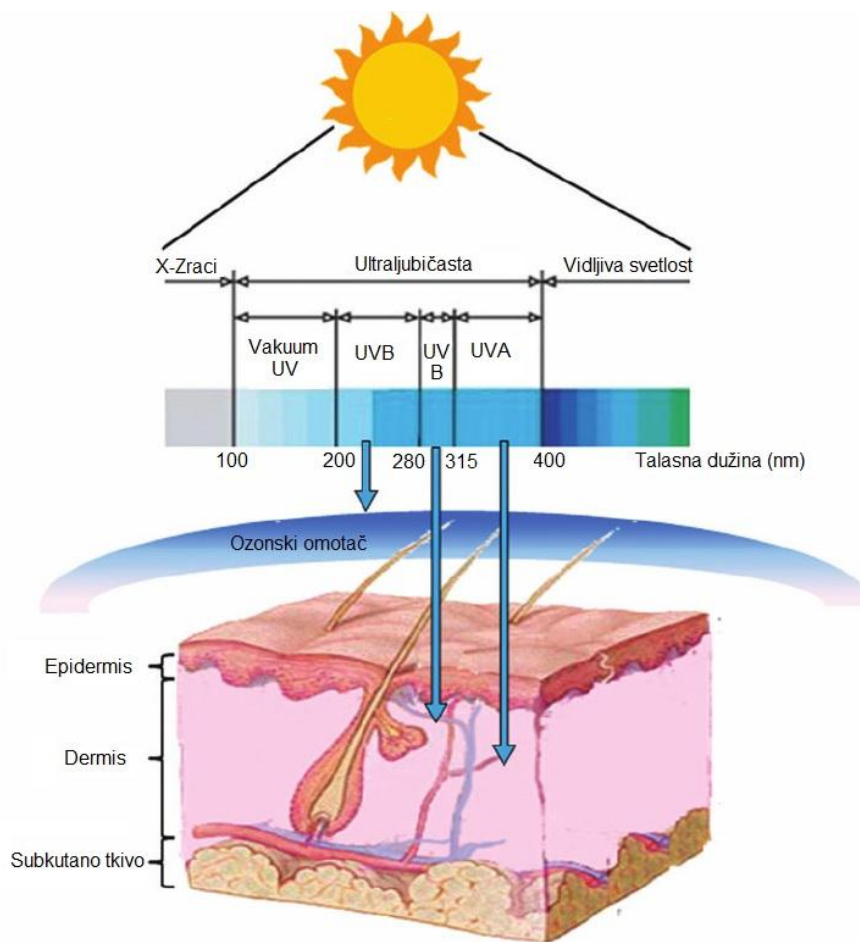
Egzogeni faktori rizika

Među faktorima okoline najvažniji uticaj ima ultraljubičasto zračenje iz sunčeve svetlosti. Naime, dokazano je da dugotrajno izlaganje sunčevoj svetlosti predstavlja glavni uzrok za nastanak karcinoma kože, uključujući i MK, bazocelularni i spinocelularni karcinom. Sunčeva svetlost je kontinuirani spektar elektromagnetnog zračenja koje se prema talasnoj dužini deli na tri glavne regije: vidljivo, infracrveno i ultravioletno (UV) zračenje. UV zračenje koje je najvažnije za nastanak malignih tumora kože nalazi se između 200 i 400 nm (Slika 13) i deli na UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) i UVC (200-280 nm) (45, 209-211). Ozonski omotač zemlje zaustavlja zrake talasnih dužina kraćih od 300 nm.

Za razliku od UVC zraka, UVA i UVB zraci stižu do površine zemlje i imaju, uz pozitivno delovanje na održavanje toplote i metabolizma, i neka negativna dejstva na kožu. Prema dosadašnjim saznanjima najizraženije karcinogeno dejstvo ima UVB zračenje. Nukleinske kiseline i proteini apsorbuju UVB zrake sa najvišom tačkom na 260 i 280 nm. Apsorpcijom ovih zraka nastaju oštećenja ćelijske DNK koja, ako nisu otklonjena posebnim mehanizmima popravke, uzrokuju mutacije zbog kojih nastaju maligni tumori kože. UVB zračenje uzrokuje dva tipa oštećenja DNK:

- 1) fotoprodukte koji nastaju između dva piramidina u lancu DNK i
- 2) ciklobutanske dimere koji nastaju između timina (T) i citozina (C).

Ciklobutanski dimeri karcinogeniji su od 6-4 fotoprodukta i njihova popravka manje je delotvorna. Oba navedena oštećenja DNK uzrokuju genske mutacije kao što su tranzicije C→T ili CC→TT. CC→TT tranzicije su znak mutageneze uzrokovane UV zračenjem. Pored



Slika 13. Šematski prikaz tipova sunčevog zračenja i stepena penetracije zračenja.

toga, UV zraci uzrokuju i kidanje lanaca DNK. Najupečatljiviji učinak UV zračenja na melanocyte jeste podsticaj proizvodnje melanina (45, 209-211).

Pronađeno je da je melanom na koži hronično izloženoj UVR (lice, dorsum šaka, prilagođeni HR 0.6; CI 0.4–0.7) i umereno intermitentno izloženoj UVR (bočni delovi ruku, donji deo nogu, dorzum stopala HR 0.7; CI 0.6–0.8) udruženi sa boljom prognozom, u poređenju sa visoko intermitentno eksponiranim delovima tela (grudi, leđa, vrat, ramena i butine). Dalje, melanom na delovima tela slabo vidljivim tokom samopregleda (skalp, retroaurikularna regija, leđa, zadnji gornji delovi ruku i nogu, zadnjica, pubična regija; HR 1.3; CI 1.1–1.5) imao je lošiju prognozu nego onaj na vidljivim delovima (lice, grudi, stomak, prednji-gornji delovi ruku i nogu, donji delovi ruku i nogu, dorzum šaka i stopala, dlanovi). Mesta visokog intermitentnog UVR izlaganja i slabe preglednosti kože verovatno koreliraju sa smanjenim preživljavanjem kod melanoma, nezavisno od ustaljenih tumorskih karakteristika. Ograničenje ove studije predstavlja nedostatak informacije o konkretnom pojedinačnom UVR izlaganju (212). Elwood i sar. proučavali su korelaciju između

melanoma i izloženosti suncu, zaključujući da je intermitentno izlaganje suncu glavna determinanta rizika za melanom (213).

Uzrast u kojoj nastupa izlaganje suncu i/ili nastaju opekotine izgleda da je takođe važna. Sistematski pregledi literature (213-215) su snažno sugerisali vezu intermitentne ekspozicije u detinjstvu i adolescenciji sa povišenim rizikom od melanoma, šta više, istorija aktiničnih opekotina u detinjstvu povezana je sa najvećim rizikom (216). Osobe koje su doživele više od pet epizoda gorenja imale su duplo povišeni rizik od melanoma (217, 218). Iako su melanomagenski efekti UV-B izlaganju dobro evidentirani, UV-A izlaganje takođe nije bez rizika (219).

Nasuprot tome, hronični kontinuirani obrazac ekspozicije više je povezan sa aktiničnom keratozom i nemelanomskim karcinomima kože (220). Veštačka UV izloženost može takođe imati ulogu u razvoju melanoma; zapravo količina UVA koja se javlja u tipičnom solarijumskom tretmanu je značajno veća u odnosu na izloženost tokom običnih aktivnosti na otvorenom ili čak tokom sunčanja (221). Takođe, psoralen-UV-A fototerapija koja se koristi za lečenje psorijaze takođe je povezana sa povećanim rizikom za melanom (222). Dugotrajno praćenje pacijenata sa psorijazom pokazalo je da oni koji su dobijali UV-A terapiju imaju povećani rizik za razvoj melanoma (223).

Solarijumi emituju UV-A zračenje; metaanaliza studija (221) ispitujući incidencu melanoma nakon upotrebe solarijuma pokazala je porast od 75% kod osoba ispod 35 sa istorijom upotrebe solarijuma. Dalje studije podržavaju ovaj nalaz, crtajući jasnu liniju između melanoma i količine upotrebe solarijuma, pogotovo u mlađem dobu (224-226). Povezanost sa UV zračenjem iz solarijuma je bila dovoljno konkluzivna da se formalno klasifikuje kao humani karcinogen (221, 227); nažalost, uprkos dokazima i posledičnim javnozdravstvenim upozorenjima, solarijumi i dalje ostaju popularni (228). Incidencija melanoma je najveća u ekvatorijalnim regionima, i smanjuje se sa udaljenošću od ekvatora (229, 230). To odgovara direktno UV izlaganju, posebno nivoima UV-B (231-233), i javlja se nezavisno od tipa kože. Iako direktna posledična veza nije uspostavljena, epidemiološke studije (213, 232) su ponovljeno pokazale vezu između obrasca i tajminga izlaganja suncu i melanoma. Većina melanoma pojavljuje se na sporadično (češće nego hronično) suncu izloženoj koži, na mestima i kod individua sklonih izgaranju. Najviši nivoi viđeni su kod ponavljanih intenzivnih izlaganja suncu. Ova teorija je dalje ojačana opservacijom da je kod pacijenata sa melanomom koji aktivno smanje svoju ekspoziciju suncu nakon prve dijagnoze posledično smanjen rizik od nastanka drugog primarnog melanoma (234). Nasuprot tome,

ljudi tamnije kože, ili kože koja lako potamni na suncu ali ne gori, imaju demonstrabilno niže rate melanoma (232).

Drugi konkluzivni faktori sredine, uključujući i (neuobičajeno) pušenje nisu registrovani. Pušenje, uobičajeni karcinogen, nije nezavisno povezano sa melanomom (235). U etiologiji malignog melanoma navedeni su i retrovirusi i papiloma virusi, ali bez dovoljno potkrepljujućih dokaza. Profesionalna izloženost hemijskim noksama, kao što su polihlorinati i polivinilhlorid takođe predstavljaju povećani rizik za razvoj melanoma (236).

Endogeni faktori rizika

Pigmentacija ima neporecivi i značajni uticaj na podložnost kože ka malignoj promeni. Melanokortin 1 receptor (MC1R) je receptor površine melanocita koji indukuje proizvodnju pigmenta (kroz signalling cascade recruitment of MITF) nakon aktivacije njegovim ligandom, alfa-melanocit stimulirajućim hormonom (MSH) (237). Postoji puno polimorfizama MC1R gena, što rezultuje brojnim fenotipovima boje kože u ljudi; varijante fenotipa sa crvenom kosom, svetle kože ekspiriraju nisku pigmentaciju, sa posledičnom povećanom sensitivnošću ka ultraljubičastom (UV) svetlu i sa povećanim rizikom za melanom (238). Melanin može apsorbovati UV fotone i slobodne radikale koji nastaju delovanjem UV zraka pre njihove interakcije sa ostalim ćelijskim organelama. Visoko organizovani sistem melanozoma u epidermisu tamno pigmentirane kože deluje zaštitno, jer apsorbuje i rasipa UV zrake.

Eumelanin se nalazi u tamnoj koži i kosi, dok se feomelanin nalazi u svetloj, crvenoj kosi i koži osoba svetlog tena sa pegama. Eumelaninsku sintezu u melanocitima reguliše α -melanocitni hormon (α melanocyte stimulating hormone/ α MSH) koji deluje preko receptora melanokortina-1 (MCR-1). Poremećaj tih receptora povezan je sa povećanom osetljivošću kože na citotoksično delovanje UV zračenja a time i na povećanu incidencu melanoma. Popravka (reparacija) oštećene DNK uzrokovana UV zračenjem kritični je događaj u prevenciji nastanka melanoma. Normalna ćelija ima sposobnost reparacije i uklanjanja oštećene DNK. Odgovor ćelije na UV oštećenja regulisan je tumor supresornim genom p53. Kao posledica UV oštećenja dolazi do ćelijskog zastoja, a reparacija DNK i apoptoza dešavaju se pod nadzorom gena p53. Ćelije sa defektnim tumor supresor genom p53 osetljive su na sunčevu svetlost i nemaju sposobnost reparacije DNK. Indukcija p53 zapaža se u epidermu i dermu i zavisi od talasne dužine i doze UV zračenja (211).

Pacijenti sa *xeroderma pigmentosum* (XP) često razvijaju kožni (i konjuktivalni) melanom (239); ove osobe nemaju sposobnost reparacije UV indukovanih DNK oštećenja, što dodatno govori u prilog značaja UV zračenja u melanomogenezi.

Važno je razmotriti i individualnu genetiku kod određivanja personalnog rizika. Jasni genetski faktori poput rase i kožnog fenotipa utiču na rizik, kao što je prethodno diskutovano, ali je takođe utvrđeno da je otprilike 10% melanoma porodično (240). Neki od njih pojavljuju se u specifičnim sindromima – poput porodičnog sindroma atipičnih multiplih mladeža i melanoma (FAMMM - familial atypical multiple mole and melanoma syndrome) ili sindroma displastičnih nevusa (DNS) – gde osobe imaju mutlipe i fenotipski različite mladeže sa visokim rizikom za malignu transformaciju, što, dakle, predstavlja skoro garantovani celoživotni rizik za melanom. Mnoge osobe neće ispuniti dijagnostičke kriterijume za ove sindrome, ali imaju brojne nevuse, često kao odraz kumulativnog izlaganja suncu. Opservacione studije sugerišu jaku udruženost između velikog broja nevusa i melanoma (130, 241). Pozitivna lična anamneza kožnog melanoma je takođe poznati rizik za dalje primarne melanome (242-244).

Kombinacija egzogenih i endogenih faktora

Istražujući rizična ponašanja i epidemiološke karakteristike pacijenata sa melanomom, (210) predložen je dvostruki put do melanoma (130, 245). Jedan od mogućih puteva do melanoma je put sklon nevusu, gde intrinzička predispozicija melanocitnoj proliferaciji dovodi do prisustva velikog broja melanocitnih benignih i atipičnih nevusa (125, 126). S druge strane, drugi put povezuje akumulaciju kožnog aktiničnog oštećenja tokom života, ili prekomerno izlaganje hroničnom ili intermitentnom ultravioletnom zračenju (UVR) sa melanomom (130). Pacijenti kod kojih se razvije melanom kroz ovaj drugi put imaju tipično svetlu/nežnu kožu i znake hroničnog aktiničkog oštećenja, druge sa UVR udružene kožne nemelanomske tumore i ekspresiju p53 proteina u primarnom tumoru (126). Iako se put usmeren na nevuse odnosi na bolesnike sa višestrukim nevusima nejasno je da li će se primarni melanom u ovom kontekstu pojaviti na mestima gde je broj nevusa najveći (127-129, 246, 247). Drugi autori navode da je ukupna gustina nevusa povezana sa izloženosti suncu (248), svetlijim fototipovima, istorijom aktiničnih opekotina kod dece (249, 250), melanomom sa susednim nevusnim ostacima (251), porodičnim slučajevima sindroma displastičnog nevusa i melanoma (252), genetskim faktorima kontrole ćelijskog ciklusa (253, 254), kao što je gen CDKN2A (255, 256) i drugi (257), kao i odsutnom p53 ekspresijom u

uzorcima tumora melanoma, što podržava model divergentnog puta (245, 258). Pokazano je, da veća gustina nevusa na datom području povećava rizik od razvoja melanoma na toj lokaciji, naročito kod muških pacijenata koji imaju veliku ukupnu gustinu nevusa i ličnu istoriju sunčanja na mestu melanoma. Ovo je progresivno i obratno korelirano sa histološkim dokazima o hroničnom oštećenju od sunca. Identifikovanje ovih osoba sa visokim rizikom će pomoći u prilagođavanju kampanja za nadzor i praćenje u okviru primarne zdravstvene zaštite (259).

Nije postojala veza između prilagođenih stopa ženskih kožnih melanoma i nivoa UVI, ali je postojala značajna povezanost između muških stopa i UVI i značajna povezanost između ukupnih stopa i UVI. Petogodišnji starosnospecifični nivoi udruženosti UVI-stopa (predstavljeni Pearsonovim koeficijentima ρ) se povećao sa starošću kod muškaraca, ali je ostao nizak i nepromenjen kod žena. Značajna udruženost stopa-UVI kod muškaraca i nekorelacija kod žena potvrđena je kod populacije belaca u Sjedinjenim Državama (260).

Interesantno je da postoji veza između melanoma i komorbiditeta: npr. osobe koje su imunosuprimirane (zbog transplantacije organa) imaju demonstrabilno veći rizik za melanom, uključujući i rekurencu kod pacijenata sa operisanim primarnim melanomom pre transplantacije (261, 262). Takođe, pacijenti sa drugim malignitetima kože (bazo i skvamocelularni karcinom) imaju veći rizik za razvoj melanoma (263) i posledičnom bolešću uslovljenom smrću (264).

Nekoliko rizikofaktora za koje se mislilo da su značajni za razvoj melanoma je identifikovano epidemiološkim studijama. Oni mogu biti grupisani u faktore sredine i genetske faktore, ali postoji jasno i međuigra ovih faktora što se manifestuje širokom varijantom demografije bolesti.

Endogeni faktori rizika i genotipsko-fenotipske karakteristike

Melanocitni nevusi su benigne akumulacije melanocita ili nevusnih ćelija i mogu biti kongenitalne ili stečene. Približno 25% slučajeva melanoma se javlja u kombinaciji sa već postojećim nevusom (265). Štaviše, ukupni broj nevusa pozitivno korelira sa rizikom za melanom i varira na osnovu broja, veličine i tipa nevusa (266-268). Ishod jedne meta-analize iz 2005. je prikazao da pacijenti sa više od 100 nevusa imaju 7 puta veći rizik za melanom (269). Pokazano je takođe da veća gustina nevusa na datoj površini povećava rizik od razvoja melanoma na toj lokaciji, naročito kod muških pacijenata koji imaju veliku ukupnu gustinu nevusa, kao i u prošlosti ličnu istoriju aktiničkih opekotina na mestu melanoma. Ovo je

progresivno i obrnuto srazmerno sa histološkim dokazima o hroničnom aktiničkom oštećenju. Prepoznavanje ovih osoba sa visokim rizikom može pomoći u izradi kampanja za otkrivanje i praćenje u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (259).

Što se tiče veličine, veći (> 5 mm) i džinovski (> 20 cm) nevusi su povezani sa znatno većim rizikom od melanoma (270). Atipični nevus je obično veliki, najmanje 5 mm, sa ravnom komponentom i ima atipične karakteristike kao što su varijabilna pigmentacija, nepravilan asimetrični oblik i nejasne granice. Dvadeset devet do 49% nefamilijarnih slučajeva melanoma se javlja na terenu već postojećeg displastičnog nevusa (271). Nisu samo atipični nevusi povezani su sa povećanim rizikom od melanoma; prisustvo čak i jednog nevusa sa atipičnim osobinama povećava rizik. Prisustvo pet atipičnih nevusa daje šest puta povećanje šanse za razvoj melanoma (51, 269). Melanomi, koji se razvijaju na terenu nekadašnjih nevusa, obično se nalaze na trupu u mlađih pacijenata i pripadaju površinskoj varijanti (251). Gustina nevusa i ukupan broj nevusa poznati su decenijama kao važan faktor rizika za melanom (272-274).

Iako je primećena asocijacija između primarnog tumorskog mesta i nevusne distribucije, ovo još nije detaljno istraženo (241, 275-278) i, stoga, trenutno nema jasnih preporuka u vezi sa varijacijama u regionalnoj anatomskoj ili specifičnoj lokaciji nevusne gustine.

Porodična istorija (*Anamnesis familiae*) melanoma predstavlja jak faktor rizika za bolest. S obzirom na to da je familijarno grupisanje bolesti indikator mogućih naslednih uzroka, došlo je do eksplozije u istraživanjima usmerenim ka razjašnjavanju genetske osnove za melanom u poslednje dve decenije. Tsao i sar. proučavali su porodice sa naslednim melanomom pokazujući prisustvo jasnog obrazca autozomno-dominantnog nasleđivanja kod više članova porodice pogođenih ne samo u prvoj generaciji. Mutacije ciklin-zavisnog kinaznog inhibitora 2A (CDKN2A ili p16) bile su najčešće genetske abnormalnosti pronađene kod ovih porodica, dok je mutacija u ciklin-zavisnoj kinazi 4 (CDK4) bila ređi slučaj (279). Pacijenti sa postojećom genetskom predispozicijom za nastanak melanoma obično pokazuju pojavu u mlađem dobu (<40 godina), višestruke primarne melanome ili istoriju prekursorskih lezija poput displastičnih nevusa i verovatnije imaju tumore koji su površno invazivni i imaju bolji prognozu (280, 281). Pored toga, pacijenti sa porodičnim sindromima raka, npr. familijarni retinoblastom, Li-Fraumeni kancer sindrom i Lynch sindrom tipa II, pokazuju veći rizik za razvoj melanoma (109).

Određene fenotipske karakteristike, kao što su crvena kosa, bleđa koža, brojne pege, svetle oči, osjetljivost na sunce i nemogućnost pigmentacije povećavaju rizik od razvoja melanoma za oko 50% (282).

Pacijenti koji pripadaju nižim foto-tipovima često razvijaju nekarakteristične ili amelanotične melanome koje je teško otkriti. Iz tog razloga izgleda da je razumno da ih treba pratiti dermatolog, nezavisno od prisustva drugih faktora rizika (109).

Ova studija takođe sadrži nekoliko upozorenja. Naše stanovništvo je bilo ograničeno samo na nehispanске bele odrasle osobe sa prvim invazivnim melanomom, izuzev očnih i mukoznih melanoma, i bio je geografski ograničen na područja sa pretežno srednjom pojavom melanoma. Stoga, iako su karakteristike te studijske populacije uporedive sa onima kod većine pacijenata sa dijagnostifikovanim melanomom u Sjedinjenim Državama, ovi rezultati ne mogu biti generalizirani za druge rasne ili etničke grupe, pedijatrijske populacije ili one koji žive van Sjedinjenih Država. Ipak, dva moguća izvora pristrasnosti izbora i dalje ostaju:

1. tanki melanomi potencijalno nisu prijavljeni, a
2. slučajevi isključena iz ovog multivarijantnog modela zbog nedostatka podataka imaju lošiji opstanak.

Međutim, pošto su melanomi poglavine/vrata bili deblji i verovatnije nepotpunih podataka u odnosu na melanome drugih lokacija, očekivano je da količina ovih pristrasnosti teži nuli. Konačno, iako su kontrolisani različiti faktori radi sprečavanja konfuzije, moguće je da se tretman može razlikovati po anatomskim mestima i uticati na prognozu. Prepoznavanje da se lokacija poglavine/vrata povezuje sa lošijim preživljavanjem kod melanoma ima implikacije za skrining i preporuke za javno zdravlje. Pregledi kod sumnje na melanom uključuju i pažljiv pregled poglavine/vrata (283).

Anatomska lokalizacija

Raspodela favorizovanih mesta pojave melanoma zavisi od pola: najčešće oblasti su leđa za muškarce i ruke i noge za žene (109). Anatomska lokalizacija je na osnovu Međunarodne klasifikacije bolesti (ICD) (284) je poznati prognostički faktor za lokalizovani melanom kože (93, 285, 286). Loša prognoza je se obično navodi kod pacijenata sa melanomom na trupu (93, 285), poglavini i vratu (283, 287, 288) u poređenju sa ekstremitetima i licem, što se ne objašnjava varijacijama drugih tumorskih karakteristika. Međutim, ICD klasifikacija je striktno anatomska i ne odnosi se na izlaganje ili faktore

vezane za otkrivanje tumora, poput obrasca UVR ili vidljivosti tokom samopregleda kože. Melanomi na glavi i vratu imaju lošije preživljavanje nego melanomi lica, uha i drugih anatomskih mesta (289). U dvadesetogodišnjoj kohorti iz 2017. navodi se takođe gore preživljavanje melanoma poglavine, koje autori objašnjavaju u velikoj meri većom debljinom Breslow i većim brojem muških pacijenata (290).

Ograničenja dijagnostike

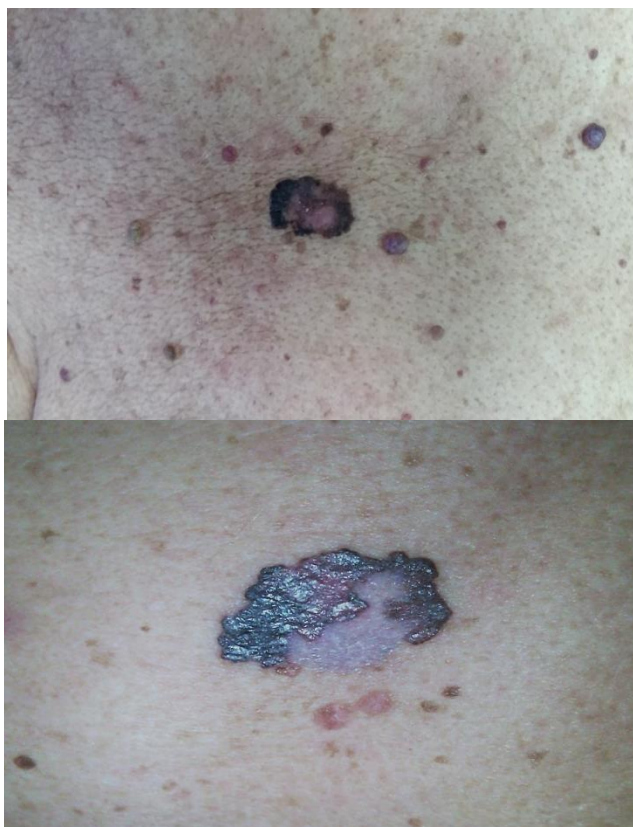
Studija Ge L i sar. pokazala je nepreciznost u merenju debljine po Breslow-u i njen značajni uticaj na stadiranje. Dva potencijalna izvora nepreciznosti su propust u pridržavanju standardizovanih smernica za merenje debljine i fenomen pristranosti graničnih cifara, koji ranije nisu identifikovani kao problem u ovoj oblasti. Edukacija patologa o ovom fenomenu i važnosti korišćenja očnih mikrometara mogu poboljšati preciznost merenja debljine melanoma oko kritičnih prelomnih tačaka. Kliničari moraju takođe biti edukovani, da bi shvatili da postoji neizbežna margina greške u merenju debljine Breslow koji treba uzeti u obzir prilikom donošenja odluka o tretmanu (291).

Tipovi melanoma kože

U odnosu na kliničke i histološke osobine, melanom se može podeliti na glavne podtipove: površinski šireći melanom (Superficial Spreading Melanoma - SSM), nodularni melanom i lentigo maligna melanom.

Površinski šireći melanom (Superficial Spreading Melanoma – SSM)

SSM je najčešći tip melanoma koji obuhvata oko 70% svih slučajeva. Vezuje se za intermitentnu izloženost suncu i najčešće je lokalizovan na zadnjoj strani nogu kod žena i na leđima kod muškaraca. SSM može nastati de novo ili iz nevusa (109). Sa kliničkog aspekta, ovaj tumor može biti različito prebojen, uključujući bronzanu, smeđu, sivu, crnu, ljubičastu, roze i plavičastu ili belu boju (Slika 14). Oblik lezije obično je oštro ograničen sa jednim ili više nepravilnih ispupčenja u obliku poluostrva. Površina može imati opipljivu papulu ili čvorove koji se pružaju nekoliko milimetara iznad površine kože.



Slika 14. Površinski šireći melanom. Dva tumora sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Nodularni melanom (NM)

On čini 5% svih melanoma i najčešće se javlja na trupu i udovima pacijenata u petoj ili šestoj deceniji života; češći je kod muškaraca nego žena. Nodularni melanomi su često ulcerisani (Slika 15). On nema radijalnu fazu rasta, već samo vertikalnu, koja je u korelaciji sa bržim rastom i većom stopom metastaziranja (109). Klinički, NM ima relativno ujednačenu smeđu, crnu ili plavo-crnu boju; može se javiti kao nodul glatke površine, kao ulcerisani polip ili izdignuti plak sa nepravilnim okvirom. U skoro 50% slučajeva NM može biti ahromatičan. Vezan za intermitentnu izloženost suncu. Histološki, NM se karakteriše dominacijom tumora koji invadira dermis. Intradermalna komponenta može biti prisutna, ali direktno prekriva invazivni melanom. Tumor je sastavljen od malih gnezda i agregata ćelija karcinoma koji zajedno čine celokupni tumorski čvor (92).



Slika 15. Nodularni melanom. Dva tumora sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Lentigo maligna melanom (LMM)

LMM čini 4% do 15% kožnih melanoma i, za razliku od NM i SSM, korelira sa dugotrajnom izloženošću sunčevim zracima i povećanjem starosne dobi. Ovaj tumor može se razvijati decenijama pre nego što invadira papilarni dermis (109). Klinički, javlja se u različitim bojama, crnon, braon ili braon na bronzanoj pozadini. Ima nepravilne konture i iako je tumor često relativno velik i zaravnjen, fokus invazije može se otkriti kao papula (Slika 16).



Slika 16. Lentigo maligna melanom. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Nalazi se uglavnom na vratu i glavi (92). Histološki se karakteriše proliferacijom ćelija koje su lokalizovane u bazalnim slojevima epidermisa.

Akralni lentiginozni melanom (ALM)

Ovaj kožni kancer je neuobičajen, čineći 5% melanoma kod belaca, ali je i najčešći tip melanoma među pacijentima poreklom iz Azije, Latinske Amerike i Afrike. Tipično, javlja se kod starijih pacijenata, sa dominacijom među ženskim polom. ALM je uglavnom lokalizovan na glatkoj (bez dlaka) koži i susednoj koži prstiju, dlanova i tabana (Slika 17); to obično uključuje i nokatni krevet ručnog ili nožnog palca (109).



Slika 17. Prikaz 2 slučaja akralnog lentiginoznog melanoma. Pacijenti sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Posebna klinička vrsta melanoma - dezmoplastični melanom (DM)

Desmoplastični melanom se često javlja kod osoba starosti od 60 do 70 godina, javlja se na glavi i vratu, ali može se pojaviti na različitim delovima kože i sluzokože. Malo je češći kod muškaraca. Klinički, desmoplastički melanom može biti amelanotičan i može se javiti kao eritematozni ili bleđi ili blistavi nodul ili plak koji nastaje iz kože oštećene suncem (Slika 18).



Slika 18. Dezmoplastični melanom. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Ovaj tumor je pozitivan na S100 i možda je teško razlikovati desmoplastični melanom od tkiva ožiljaka, jer se S100-pozitivne ćelije mogu videti i u kožnim ožiljcima. Ovaj tumor često pokazuje infiltraciju nerava i karakteriše ga visoka stopa recidiva zbog visokog infiltracijskog rasta i česte perineuralne invazije. Ima visoku incidencu lokalnog recidiva, ali retko metastazira do limfnih čvorova; međutim, ima sklonost ka plućnim metastazama.

Takođe su opisani i drugi retki oblici melanoma, naročito balanom ćelijski melanom, miksoidni melanom, osteogeni melanom, rhabdoid melanom (109).

Terapija

U lečenju melanoma kože primenjuje se hirurško lečenje, hemioterapija, imunoterapija i radioterapija. Hirurška terapija je najefikasniji modalitet lečenja melanoma kože. Kod dijagnostike i terapije primenjuju se najnovije preporuke (292-294).

Protokol obrade pacijenta

Nema dileme da kod pacijenata sa stadijumom IA ne treba posebno tragati za okultnim visceralnim metastazama pregledima krvi niti radiološkim snimcima.

Za pacijente u stadijumu IB i II protokol obrade više ne obuhvata rutinsku radiografiju pluća i nivo laktat dehidrogenaze u serumu (za koji se zna da je važan prognostički faktor u uznapređovaloj bolesti), ovi testovi nisu dovoljno specifični da otkriju okultne metastaze. Pre široke ekscizije treba prodiskutovati o eventualnoj biopsiji sentinel limfnog čvora (SLNB), a u zavisnosti od kliničke slike istu treba po potrebi i sprovesti. U zavisnosti od stadijuma bolesti i SLN statusa, uslediće učešće u trajalima/praćenje ili interferonska terapija, odnosno kod pozitivnih SLN tretman za stadijum III bolesti.

Ako je klinički opravdano, u stadijumu III mogu se raditi kompjuterizovana tomografija (CT), pozitronska emisiona tomografija (PET) ili magnetna rezonanca (MR) u cilju adekvatnog stejdžinga.

Za pacijente u stadijumu III, kod kojih je potvrđen pozitivan sentinel nodus, dalja obrada može podrazumevati primenu radiografije grudnog koša, određivanje serumske laktat dehidrogenaze (LDH) i dodatnu dijagnostiku (CT, MR, PET), ako je klinički indikovano, a nakon diskutovanja rezultata i eventualna disekcija limfnih nodusa sa posledičnom obradom kliničkim trajalom/observacijom ili interferonom alfa/visokim dozama ipilimumaba.

Kod pacijenata u stadijumu III sa klinički pozitivnim regionalnim limfnim nodusima preporučuje se biopsija finom iglom ili otvorena biopsija uvećanih limfnih nodusa. Kod pacijenata koji imaju u anamnezi podatak o operisanom melanomu, a imaju uvećane limfne noduse, dijagnostička obrada počinje biopsijom limfnog čvora. U obradu spada i osnovna dopunska dijagnostika, kao i u nižim stadijumima. Nakon dijagnostike sprovodi se široka ekscizija primarnog tumora i kompletna terapeutska disekcija limfnih čvorova. Nakon toga sprovodi se lečenje kao u prethodnom stadijumu uz eventualnu biohemoterapiju odnosno radioterapiju nodalnih basena kod selektovanih pacijenata visokog rizika.

U stadijumu III sa in transit metastazama pristup je kao u prethodnom stadijumu uz modifikaciju u smislu inicijalnog pristupanja kliničkim trajalima (preferira se), odnosno lokalne (kompletna hirurška ekscizija, intralezionalne injekcije, lokalna ablativna terapija, topička terapija), regionalne (izolovane infuzije/perfuzije ekstremiteta melfalanom) i sistemske terapije. Ako se postigne disease free status sprovodi se klinički trajal/observacija tj. davanje interferona alfa.

Za pacijente u stadijumu IV (metastaze) protokol obrade obuhvata sve principe za predhodnu grupu pacijenata, a procena potrebe CT, MR i PET se donosi na osnovu kliničke simptomatologije.

Lečenje primarnog tumora

Kada je postavljena dijagnoza in situ melanoma, radi se ekscizija 0,5 cm oko promene i treba dobiti histološku potvrdu da su ivice bez tumora. Aktuelne preporuke za hirurški tretman primarnog melanom bazira se na Breslow mikrostejdžingu i predlažu sledeće kožne margine do „u zdravo“ (Tabela 1, Slika 19):

Tabela 1. Preporuke za margine prilikom hirurškog lečenja primarne lezije.

Debljina tumora	Preporučene margine
in situ	0.5 cm
≤ 1.0 mm	1.0 cm
1.01 - 2 mm	1.0-2.0 cm
2.01 - 4 mm	2.0 cm
> 4mm	2.0 cm

Margine mogu biti modifikovane da se prilagode individualnim anatomskim ili kozmetskim zahtevima. Tretman lentigo maligna melanoma može predstavljati problem jer je poznato da ta vrsta melanoma ima nepredvidivu subkliničku infiltraciju po širini u vidu junkcionalne melanocitne hiperplazije koja se može protezati i nekoliko centimetara oko vidljivih ivica tumora.



Slika 19. Radikalno operisani melanom po onkološkom principu. Uzorak sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Pristup ovom problemu nije usaglašen ali je osnovno da se moraju dobiti čiste resekcione ivice. Studijska grupa za melanom je usaglasila da margina od 2 cm može biti smanjena na marginu 1 do 2 cm kada je teško obezbediti punu širinu klinički zdravog tkiva zbog anatomskih karakteristika.

Regionalni limfni čvorovi i biopsija sentinel limfnog čvora

Postoji neslaganje oko tretmana klinički negativnih limfnih nodusa kod pacijenata kod kojih postoji povećani rizik za nodusne metastaze. U celini SLNB se ne preporučuje za primarne melanome debljine ≤ 0.75 mm, osim ako ne postoji značajna nesigurnost adekvatnosti mikrostejdžinga. Za melanome debljine 0.76 do 1.0 mm SLNB može da se razmatra u odgovarajućem kliničkom kontekstu. U pacijenata sa tankim melanomima (≤ 1.0 mm), na stranu od primarne debljine tumora, ne postoji jasni konsenzus sta treba smatrati osobinama visokog rizika za pozitivni SLN. Konvencionalni faktori rizika za pozitivni SLN poput ulceracije, visoke mitotske rate, i LVI (limfovaskularna invazija) su veoma

neobičajeni kod melanoma debljine ≤ 0.75 mm. Kada faktori rizika postoje SLNB mora biti razmotrena na individualnoj osnovi.



Slika 20. Biopsija sentinel limfnog čvora. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš. Napomena: a = melanom na nadlaktici, b = gama kamera, c = identifikacija sentinel limfnog čvora sondom gama kamere, d = odstranjenje sentinel limfnog čvora.

Mikrosatelitoza, kada je prisutna u inicijalnoj biopsiji ili uzorku široke ekscizije, definiše najmanje N2c i najmanje stadijum IIIB bolesti. SLN status ima prognostički značaj kod ovih pacijenata, zbog stadiranja pacijenata na N3, stadijum IIIC kod pozitivnog SLN. Međutim, značaj SLNB u obradi i ishodu kod ovih pacijenata nije jasno definisan. Bez obzira na SLN status, ove pacijente treba tretirati kao stadijum III u diskusijama o obradi, adjuvantnoj terapiji i praćenju.

Iako se uloga SLNB i dalje proučava, trenutne preporuke nalažu SLNB za stadijum IB i stadijum II melanoma. Kada je SLN pozitivan preporučuje se operativno uklanjanje limfnih nodusa zahvaćene regije u smislu radikalne limfadenektomije celog limfnog bazena. U velikim studijama je nađen još jedan pozitivan nodus u preparatima radikalne limfadenektomije kod 10 do 30%.

Na osnovu prospektivnih kontrolisanih studija ne preporučuje se rutinska elektivna limfadenektomija.

Značaj SNLB kod pacijenata kod kojih je primatno urađena široka ekscizija nije moguće proceniti. Zato se smatra da nije dobro uraditi široku eksciziju pre sentinel biopsije. Pacijentu se može uraditi sentinel biopsija i posle široke ekscizije, ali to ne utiče na preživljavanje pa neki autori široku eksciziju koja je urađena pre procene o potrebi sentinel biopsije smatraju prihvatljivim izborom.

Kod pacijenata koji imaju regionalne metastaze (Stadijum III) radi se široka ekscizija primarnog tumora i terapijska radikalna limfadenektomija zahvaćenog limfnog područja. Potrebno je uraditi radikalnu limfadenektomiju celog limfnog područja. Broj limfnih čvorova koji su pregledani ukazuje na adekvatnost operacije i histološkog pregleda.

Kada je moguće treba pregledati najmanje 10 limfnih čvorova iz ingvinuma, 15 limfnih čvorova iz aksile i 15 limfnih čvorova nakon limfadenektomije na vratu uključujući sve grupe čvorova (I do V), sa ili bez parotidektomije. Kod ingvinalne limfadenektomije potrebno je uraditi i duboku disekciju prepone ako na CT pregledu postoji ilijačna i/ili obturatorna limfadenopatija, ili ako je intraoperativno nađen pozitivan Cloquetov limfni nodus. Duboka disekcija prepone treba se uraditi i kada su duboki nodusi klinički pozitivni ili kada je više od tri površna čvora pozitivno na metastaze.

Za pacijente sa in tranzit metastazama postoji veliko neslaganje u terapiji. Kod pacijenata sa malim brojem malih in tranzit metastaza može se raditi ekscizija sa histološki negativnim ivicama. Ako kod pacijenta može da se uradi ekscizija solitarne in tranzit metastaze može da se primeni sentinel biopsija jer je rizik postojanja nodusnih metastaza veliki. Kod ovih pacijenata značaj sentinel biopsije nije dokazan, mada je poznato da je prognoza kod postojanja in tranzit metastaze i pozitivnog limfnog nodusa mnogo lošija.

Kod pacijenata sa manjim brojem dermalnih in tranzit metastaza neki centri primenjuju injekciju BCG (Bacillus Calmette Guerin) vakcine intralezionalno ili injekciju interferona alfa. CO laser se može primeniti kod odabranih pacijenata sa malim multiplim intradermalnim in tranzit metastazama. Druga mogućnost za tretman pacijenata sa neresektabilnim in tranzit metastazama je primena hipertermičke izolovane perfuzije ekstremiteta melfalanom. Radioterapija se može primeniti, ali je relativno neefikasna u kontroli regionalne bolesti. Krajnja mera je pokušati primenu sistemske terapije ako ni jedna terapija ne da efekat.

Kod pacijenata sa stadijumom IV melanoma tretman zavisi od nekoliko faktora. Ako je prisutna solitarna metastaza potrebno je primeniti operaciju ako je moguće. Kada se otkrije solitarna visceralna metastaza treba je pratiti serijom CT pregleda do tri meseca, jer to može biti prva od mase metastaza koje će se pojaviti na narednim pregledima. Ako i nakon

praćenja ostane samo jedna metastaza, radi se operacija. Ako je solitarna metastaza neresektabilna i/ili se dijagnostikuje više metastaza u toku kratkog kliničkog praćenja pacijenti sa metastazama (ali bez metastaza u mozgu) se tretiraju: a) simptomatskom terapijom, b) primenom jednog leka (npr. interleukin 2, dacarbazin (DTIC) ili temozolomidom, ili c) primenom kombinovane terapije na bazi DTIC hemoterapijom i/ili imunoterapijom.

Adjuvantna terapija

Većina pacijenata sa in situ melanomom ili malanomom ranog stadijuma može se izlečiti samo primarnom ekscizijom. Adjuvantna terapija spada u domen onkološke internističke terapije, a primenjuje se prema indikacijama za stadijume bolesti.

Kod primene interferona produžen je period bez bolesti tzv. disease free interval, ali je ukupno preživljavanje jednako i kod terapije sa interferonom i bez nje.

Pacijentu pre početka terapije treba realno obrazložiti pozitivne strane terapije ali i neželjene efekte.

Kod pacijenata stadijuma IIIC sa multiplim pozitivnim nodusima i sa ektranodalnim širenjem u meka tkiva pogotovo na glavi i vratu neki centri primenjuju hiperfrakcionisanu radioterapiju.

Praćenje

U prvih pet godina nakon primarnog tretmana se dijagnostikuje recidiv kod većine pacijenata. Postoji i fenomen pojave kasnog recidiva i nakon 10 godina od primarnog tretmana. Pacijenti nakon 5 godina od tretmana se manje rigorozno kontrolišu. Kod 4 do 6 % pacijenata u toku života može nastati drugi primarni melanom, pa je obavezno doživotno kontrolisati pacijenta periodičnim dermatološkim pregledom najmanje jednom godišnje. Pacijenta treba obučiti za samopregled kože i limfnih čvorova koji obavlja jednom mesečno.

Kod melanoma stadijuma IA vrši se pregled pacijenta na 3 do 12 meseci koji obuhvata pregled cele kože, kao i operisane regije i limfnih čvorova.

Kod melanoma stadijuma IB do III potrebno je pregledati pacijenta na 3 do 6 meseci prve tri godine, zatim na 4 do 12 meseci još dve godine a zatim doživotno jednom godišnje.

Radiografije pluća i LDH treba raditi prema indikacijama na 3 do 12 meseci. Ne treba raditi rutinski CT preglede u toku praćenja, osim kada je to klinički indikovano.

Kod pacijenata u stadijumu IV kliničko praćenje je identično kao i za stadijum III.

Recidivi

Klinički recidiv treba prvo potvrditi histološki biopsijom finom iglom ili klasičnom biopsijom. Postoji razlika između recidiva na ožiljku posle neadekvatne lokalne ekscizije (to predstavlja i dalje lokalnu bolest) i lokalnog recidiva nakon adekvatne primarne ekscizije, koja predstavlja dermalnu limfnu bolest koja nastaje u blizini ožiljka. Pravi lokalni recidiv na ožiljku ima bolju prognozu nakon radikalne ekscizije, nego recidiv u blizini ožiljka koji ima karakteristike regionalnog recidiva.

Kada postoji lokalni recidiv na ožiljku posle neadekvatne primarne ekscizije klinička obrada je ista kao za primarni tumor (zavisi od debljine). Radi se široka ekscizija sa ili bez limfoscintigrafije i sentinel biopsije. Potreba za limfoscintigrafijom zavisi od mikroskopskog nalaza.

Kada postoji lokalni recidiv u okolini ožiljka tj. nakon adekvatne primarne ekscizije, klinička obrada se radi kao kod pacijenata sa III stadijumom bolesti. Ako nema širenja bolesti van lokoregionalnog područja, tretman obuhvata principe kao za ograničenu recidivnu in tranzit bolest tj. radi se hirurška ekscizija sa negativnim ivicama ako je moguće. Limfoscintigrafija i sentinel biopsija se rade samo kada se individualno proceni potreba za tim. Nakon operativnog lečenja neki centri primenjuju adjuvantnu terapiju interferonom alfa 2-b.

Kod pacijenata sa in tranzit recidivom klinička obrada je identična opisanoj. Kada je moguće uraditi radikalnu eksciziju radi se operacija ekscizije sa negativnim marginama, a potrebu sentinel biopsije treba proceniti individualno. Kod neoperabilnih pacijenata moguće je primeniti interferon alfa 2-b, CO laser, hipertemičku perfuziju ekstremiteta sa melphalanom, radioterapiju ili sistemsku terapiju.

Kod pacijenata kod kojih se jave nodalne metastaze dijagnozu je najbolje potvrditi aspiracionom biopsijom tankom iglom. Klinička obrada je ista kao kod pacijenata u stadijumu III.

Kod pacijenata kod kojih nije primenjivana limfadenektomija radi se radikalna limfadenektomija regionalnog limfnog područja. Ako je kod pacijenata primenjena ranije limfadenektomija, radi se radikalna disekcija limfnih čvorova. Ako je predhodno rađena radikalna limfadenektomija onda se radi ekscizija recidiva do negativnih margina. Primena postoperativnog zračenja može smanjiti rizik nastanka novog regionalnog recidiva naročito kod pacijenata sa multiplim nofusima ili ekstranodalnim širenjem pogotovo na glavi i vratu.

Sistemska terapija i/ili radioterapija se mogu primeniti kod pacijenata sa nekompletno reseciranim nodusnim recidivima. Kod pacijenata sa neresektabilnim nodalnim recidivima može se sprivesti i palijativna radio terapija ili palijativna radioterapija.

Pacijenti kod kojih se razviju sistemske metastaze obrada je ista kao i kod pacijenata koji su primarno dijagnostikovani sa metastazama (stadijum IV). Pacijenti sa solitarnom operabilnom metastazom mogu se planirati za operaciju, a moguća je i primena interferona alfa 2-b.

Kod pacijenata sa solitarnom asimptomatskom metastazom u plućima potrebno je uraditi kontrolni CT najmanje tri meseca nakon dijagnostičkog i proceniti da li je došlo do pojave novih metastaza ili ne. Ako je i posle tri meseca metastaza solitarna radi se operacija. Posle operacije može se primeniti adjuvantna terapija.

Pacijenti sa simptomatskim visceralnim metastazama (npr. crevna okluzija) moraju se hitno operisati palijativno (resekcija ili crevni by-pass). Kod pacijenata sa neoperabilnim metastazama ili multiplim metastazama primenjuje se neki od protokola i to: a) kliničko praćenje i simptomatska terapija, b) standardna terapija sa jednim lekom DTIC, c) primenom kombinovane terapije na bazi DTIC hemoterapijom i/ili imunoterapijom, d) termozolomid, e) interleukin 2. Ne postoji stroga preporuka niti utvrđen stav o ovoj terapiji.

Kod pacijenata sa metastazama u mozgu mogu biti određene operacija ili radioterapija, zavisno od broja i veličine metastaza i lokalizacije.

Hirurško lečenje pacijenta sa melanomom

Nakon pregleda pigmentovanog tumora kože kod pacijenta potrebno je kod sumnje na melanom uzeti dobru anamnezu i detaljno pregledati bolesnika. Kod anamnestičkih podataka treba insistirati na: vremenu nastanka lezije, postojanju drugih sličnih lezija, ranijim operacijama, porodičnoj opterećenosti, drugim simptomima koji mogu da upute na metastaze i dr.

Kliničkim pregledom mora se dobro pregledati sama lezija, koža oko lezije i to golim okom i pod uvećanjem (korišćenjem lupe). Palpacijom treba potražiti čvorove u mekim tkivima ispod kože oko lezije i limfne čvorove drenažnih regiona.

Rutinske laboratorijske analize, eho pregled lezije na koži, eho pregled trbuha, eho pregled regionalnih limfnih čvorova, radiografije pluća, CT mozga, laboratorijske analize, posebno serumski nivo LDH i druge analize i dopunska ispitivanja su od velikog značaja za utvrđivanje stadijuma bolesti i određivanja plana lečenja.

Ako se prva intervencija na melanomu ne uradi po protokolu lečenja, onda su šanse za izlečenje nepovratno smanjene, ako ne i izgubljene. Ovo se posebno odnosi na uklanjanje melanoma kiretažom, elektroskalpelom i sl.

Lečenje primarne promene

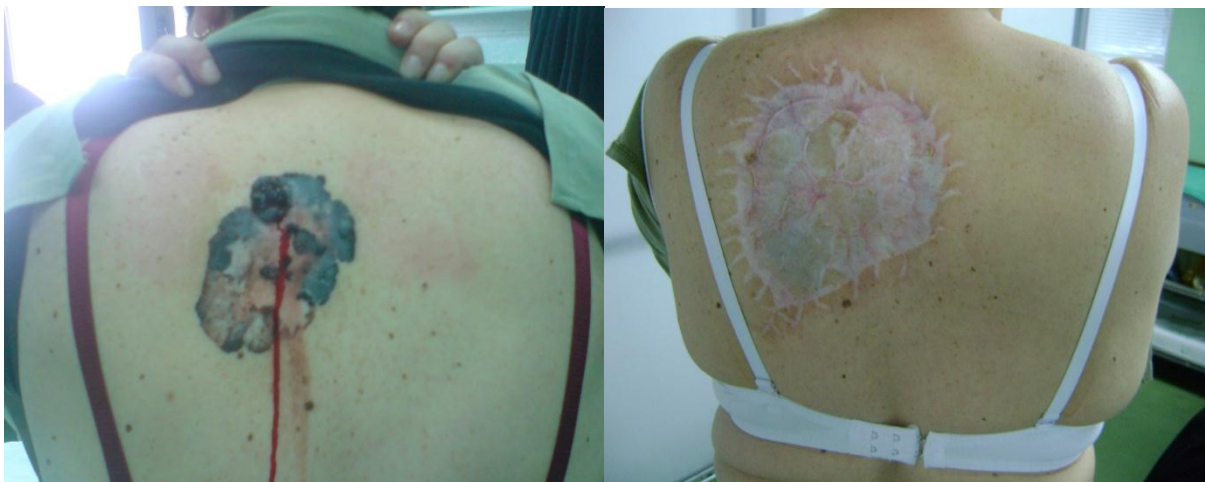
Patohistološka verifikacija melanoma je jedina potvrda da se radi o toj bolesti. Danas se uglavnom radi ekscizionna biopsija na oko 1 cm oko promene. Incizionna biopsija se ne preporučuje zbog mogućnosti diseminacije, mada je neki autori opisuju kod velikih lezija, ali pri tom naglašavaju da je za biopsiju potrebno uzeti sve slojeve kože. Široka hirurška ekscizija tumora se obično primenjuje u svim slučajevima histološki dokazanog melanoma.



Slika 21. Prikaz melanoma desne lumbalne regije i suture nakon hirurškog lečenja. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Svrha ovakvog postupka je da se ukloni bilo koji reziduum malignih ćelija sa mesta gde je postojala lezija i time smanji ili ukloni mogućnost pojave lokalnog recidiva bolesti. Zbog opreznosti i straha, obzirom na visoki maligni potencijal melanoma, danas se većina autora slaže da se ekscizija radi na 2 cm od ivice tumora na svim delovima tela. Naravno uvek patolog mora da verifikuje da li je promena skinuta u celosti. Dubina ekscizije nije jasno definisana jer postoje mišljenja da je duboka (mišićna) fascija dobra barijera širenju procesa u limfne čvorove. Veći broj radova ukazivao je na to da nije bilo statističke razlike u preživljavanju i pojavi recidiva kod tankih melanoma bez obzira da li je fascija očuvana ili ekscidirana. Kod debelih melanoma gde je fascija zahvaćena ili postoji sumnja da je zahvaćena, ekscizija fascije je obavezna. Individualno se sagledavaju melanomi blizu oka, uha, nosa i ostalih vitalnih struktura. Kod subungvalnih melanoma indikovana je amputacija terminalne falange.

Rekonstrukcija postoperativnog defekta obično ne predstavlja veliki tehnički problem, posebno ako je lezija van lica. Autotransplantat kože je ranije smatran metodom izbora jer se smatralo da se ispod transplantata lokalni recidiv lakše, a time i pre otkrije. Međutim, i lokalni reznjevi se sa uspehom koriste posebno na licu i dokazano je da nema bitnih razlika u pojavi recidiva, progresiji bolesti i preživljavanju zavisno od tehnike rekonstrukcije postoperativnog defekta.



Slika 22. Prikaz pacijenta sa džinovskim krvarećim melanomom leđa i rezultat nakon radikalne operacije i rekonstrukcije defekta kožnim transplantatom po Tiršu. Pacijent sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Terapijske disekcije regionalnih limfnih čvorova

Ako su regionalni limfni čvorovi uvećani i metastatski izmenjeni ili je ultrazvučno verifikovana limfadenopatija indikovana je terapijska limfadenektomija limfnog bazena sa PH verifikacijom svih limfnih čvorova.



Slika 23. Prikaz različitih tipova metastaza i lečenja po lokalizacijama. *Napomena:* a = egzulcerisane metastaze limfnih čvorova u levoj aksili, b = disekcija aksile, b = metastaze u limfnim čvorovima ingvinalne regije, c = ingvinalna disekcija, d = metastaze u limfnim čvorovima desne strane vrata, f = disekcija vrata sa eksponiranjem vitalnih struktura vrata i njihovom prezervacijom, g = metastaze u limfnim čvorovima trbuha. Pacijenti sa Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš.

Kod disekcije limfnih čvorova aksile treba odstraniti limfne čvorove I, II i III reda uz konzervaciju vitalnih struktura. Neki autori preporučuju skidanje i malog pektoralnog mišića sa sadržajem aksile, ali nije dokazana prednost u smislu dužeg preživljavanja ako se isti sačuva, s tim što je tehnički lakše ekstirpirati III red limfnih čvorova ako se mali pektoralni mišić odstrani.

Radikalna ekscizija promene u bloku sa regionalnom disekcijom limfnih čvorova (operacija po Pack-u) je ranije primenjivana ako je tumor udaljen 15 do 20 cm od regionalne limfne drenaže. Ova operacija se ne opisuje u savremenim protokolima lečenja melanoma.

Udaljene solitarne metastaze u plućima, CNS i drugim organima se mogu operisati.

Nehirurško lečenje

Melanomi kože, pa čak i visceralne metastaze mogu doduše vrlo retko da regrediraju, verovatno zbog aktivacije imunoloških mehanizama (BCG, interferon, interleukin II i dr). Konvencionalne metode zračenja nisu dale adekvatne rezultate pa se koriste samo kao simptomatska terapija kod metastatskih promena (npr. analgetski efekat).

Kombinovano lečenje hemioterapijom i hirurģijom primarno nije dalo očekivane rezultate i prednosti u odnosu na hirurģsko lečenje u smislu stope preživljavanja i perioda remisije.

Prevenција

Treba da svaki čovek koji ima nevus bar jednom u dva meseca osmotri svoje nevuse. Ukoliko primeti bilo kakvu promenu u rastu, obimu, boji, vlaženje ili krvarenje nevusa, nevus je potrebno odstraniti. Svaki nevus koji je traumatizovan na bilo koji način treba takođe hirurģski odstraniti i histološki verifikovati. Nevusi izloženi hroničnim mehaničkim nadražajima skloni su malignoj alteraciji. Stoga te nevuse treba ekscidirati. Jednom odstranjen benigni nevus definitivno je rešen kao problem.

Stadijumi melanoma

Stadijum bolesti određuje stepen proširenosti melanoma i treba da ukaže na buduće biološko ponašanje tumora. Patološki stadijum preporučen od američkog udruženja za stadiranje kancera/internacionalna unija za borbu protiv kancera (AJCC/UICC) prihvaćen kao TNM klasifikacioni sistem se stalno revidira i trenutno je najzastupljeniji klasifikacioni sistem u kliničkoj upotrebi (Tabela 2) (292).

Tabela 2. Patološki TNM stadijumi melanoma (TNM/WHO) po 7. izdanju AJCC.

Primarni tumor (pT)
pTx: primarni tumor ne može biti procenjen (na pr. regresirani melanom)
pT0: Nema evidentnog primarnog tumora
pTis: Melanoma in situ (neinvazivni tumor: anatomski nivo I)
pT1: Melanom $\leq 1,0$ mm debljine, sa ili bez ulceracije
pT1a: Melanom $\leq 1,0$ mm debljine, bez ulceracije, < 1 mitoze/mm ²
pT1b: Melanom $\leq 1,0$ mm debljine, sa ulceracijom i/ili 1 ili više mitoz/mm ²
pT2: Melanom 1,01 – 2,0 mm debljine, sa ili bez ulceracije
pT2a: Melanom 1,01 – 2,0 mm debljine, bez ulceracije
pT2b: Melanom 1,01 – 2,0 mm debljine, sa ulceracijom
pT3: Melanom 2,01 – 4,0 mm debljine, sa ili bez ulceracije
pT3a: Melanom 2,01 – 4,0 mm debljine, bez ulceracije
pT3b: Melanom 2,01 – 4,0 mm debljine, sa ulceracijom
pT4: Melanom $> 4,0$ mm debljine, sa ili bez ulceracije
pT4a: Melanom $> 4,0$ mm debljine, bez ulceracije
pT4b: Melanom $> 4,0$ mm debljine, sa ulceracijom
Regionalni limfni nodusi (pN)
pNx: Regionalni limfni nodusi ne mogu biti procenjeni
pN0: Nema regionalnih metastaza
pN1: Metastaza u 1 regionalnom limfnom nodusu
pN1a: Klinički okultna (mikroskopska) metastaza
pN1b: Klinički vidljiva (makroskopska) metastaza
pN2: Metastaze u 2-3 regionalna limfna nodusa ili intra-limfatične regionalne metastaze bez nodalnih metastaza
pN2a: Klinički okultna (mikroskopska) metastaza
pN2b: Klinički vidljiva (makroskopska) metastaza
pN2c: Sateliti ili in-tranzit metastaze bez nodalnih metastaza
pN3: Metastaze u 4 ili više regionalnih limfnih nodusa ili sliveni metastatski nodusi, ili in-tranzit metastaze, ili satelitoza sa metastazama u regionalnim nodusima
Distalne metastaze (pM)
pM1: Distalne metastaze (dokazane u ovom uzorku)
pM1a: Metastaze u koži, potkožnom masnom tkivu, ili udaljenom limfnom nodusu
pM1b: Metastaze u plućima
pM1c: Metastaze u svim drugim organima ili sve udaljene metastaze na bilo kom mestu udružene sa povišenim nivom LDH u serumu

Značajne izmene u 7. izdanju AJCC važne za patologe praktičare uključuju:

1. dodeljivanje pT1b statusa lezijama manjim od 1 mm debljine melanoma sa ≥ 1 mitoz/mm²
2. upućivanje Clark nivoa IV i V na tercijarni značaj u dodeljivanju pT1b statusa
3. prisustvo bilo kojih nodalnih melanomskih ćelija (uključujući izolovane tumorske ćelije, ITCs) klasifikuje se kao nodalna zahvaćenost (>pN0)
4. dozvoljena je isključivo imunohistohemijska (HMB-45 ili MART-1) detekcija nodalnih metastaza (292).

Novine u pM kategoriji:

1. pMx i pM0 su isključene iz patohistološkog izveštaja,
2. anatomski nivo (Clark) zamenjen je brojem mitoz odnosno mitotskim indeksom (292).

The American Joint Committee on Cancer (AJCC) stejdžing sistem (293) je globalno prepoznat i predstavlja nezamenljivi alat u predviđanju ishoda kod pacijenata sa dijagnozom melanoma. Baziran je na podacima proisteklim iz analiza desetina hiljada pacijenata sa kožnim melanomom; aktuelna (do 2018) sedma edicija je uvedena rano u 2010. i uvedeni su novi faktori koji prethodno nisu korišćeni u proceni prognoze melanoma. Histopatološki parametri logično formiraju glavne kriterijume za određivanje prognoze. Povećanje debljine primarne kožne promene udruženo je sa pogoršanjem ishoda, opadajući od 96% 10-godišnjeg preživljavanja za lezije <1mm, do 54% za lezije >4mm; čak i lezije <1mm debljine postoji razlika u ishodu između lezija <0,25mm i >0,75mm debljine (295). Štaviše, za svaku debljinu tumora pokazano je da postojanje ulceracije na primarnoj promeni vodi gorjoj prognozi nego bez ulceracije (93, 296). Ove dve osobine (debljina tumora i ulceracija) su diskutabilno najjači nezavisni prognostički faktori za kožni melanom (93, 297, 298). Treća značajna patološka osobina je stepen mitoz (299, 300); broj mitoz >20 mitoz/mm² rezultuje 10-godišnjim preživljavanjem od otprilike 48% u odnosu na 93% kod osoba sa <1 mitoze/mm². Ostale osobine primarnog tumora udružene sa visokim rizikom za relaps ili metastaze su visoka vaskularnost tumora (npr.formacija novog krvnog suda pri bazi invazivnog melanoma) (301, 302) i limfovaskularna invazija (tumorska

invazija dermalne mikrovaskulature) (303); dokazi za ove parametre nisu tako konkluzivni kao za prva dva. Mesto pojave primarnog tumora takođe ima važne prognostičke implikacije; oni koji se pojavljuju centralno (trup, glava i vrat) teže da imaju goru prognozu nego oni koji se jave na ekstremitetima (donji<gornji) (93, 304, 305). Dodatno, kožni melanom može metastazirati u limfne čvorove. Pojava bolesti u limfnim čvorovima ima različite prognostičke implikacije, sa daljim varijacijama zavisnim od tereta nodalne bolesti – u smislu mikrometastatska vs.makrometastatska bolest kao i broj zahvaćenih limfnih čvorova.

Prisustvo mikroskopske bolesti limfnih čvorova vodi 10-godišnjoj stopi preživljavanja u 63% slučajeva, ali ako je prisutna makroskopska bolest, ona se smanjuje na 47% (93, 294). Slično tome, postoji pogoršanje 5-godišnjeg preživljavanja za 10% sa porastom broja uključenih čvorova (od 1 do 3) (294); za one sa makroskopskim metastazama ovaj povećani rizik je nezavisan od drugih primarnih karakteristika tumora. Metastaze na drugim lokacijama imaju negativne prognostičke implikacije. Satelitske kožne lezije smanjuju preživljavanje u sličnom odnosu kao i metastaze limfnih čvorova (306), sa pogoršavajućom prognozom kod metastaza na plućima i dalje pogoršanjem kod bilo kojeg zahvatanja drugih organa (93, 293). Što se tiče karakteristika pacijenta, dobro je ustanovljeno da je uzrast nezavistan prognostički faktor, sa pogoršanjem ishoda povezanim sa povećanjem starosti (93, 307, 308). Interesantno, za melanom u ranoj fazi (I-II), ženski pol ima i pozitivne prognostičke implikacije (297, 309-311), što je moguće povezano sa većim brojem tankih, neulcerisanih lezija na ekstremitetima dijagnostikovanih kod žena. Histopatološki faktori koji su prethodno razmatrani su prognostički značajniji od pola. U pogledu biohemijskih karakteristika, serumska LDH je dobro poznata kao nezavisni prognostički faktor kod kožnog melanoma; u multivarijantnoj analizi (293, 312) povećani nivo LDH predviđa približno 50% nižu stopu preživljavanja kod pacijenata sa udaljenim metastazama. Takođe su proučavani i drugi serumski prognostički biomarkeri; najobećavajući je nivo proteina S100, koji korelira sa preživljavanjem kod pacijenata sa reseciranom lokaloregionalnom bolešću (313, 314), gde visoki nivoi predviđaju znatno lošiji ishod nego kod normalnih nivoa. Povećana upotreba profilisanja genske ekspresije takođe pruža dalje genetske prognostičke tragove. Mutacija BRAF gena - koja je, kako je ranije opisana, integralna za patogenezu melanoma - istražena je i kao prognostički marker. Izgleda da je povezana sa poznatim prognostičkim faktorima kao što su starost i mesto primarnog, dok je nepovezana sa faktorima kao što je lokacija metastaza i LDH (315). U napredovaloj bolesti, meta-analize su pokazale da je prisustvo BRAF mutacije nezavisno povezano sa lošijim ishodom preživljavanja (315-317). Podaci u ovoj oblasti nastavljaju da se razvijaju.

Imunohistohemijska bojenja značajna za istraživanje

AJJC navodi u obavljenim parametrima o kojima se izjašnjava patolog postojanje leukocitne infiltracije tumora. Sa ciljem da se preciznije definiše ćelijska populacija leukocitnog infiltrata i razmotri značaj vrste i broja ćelija primenjene su sledeće imunohistohemijske tehnike identifikacije ćelija u zapaljenjskom infiltratu.

Bojenje CD4

Marker CD4 je karakteristika T-helper ćelija, važan u aktivaciji T ćelija i receptor za HIV, kodiran na hromozomu 12p13.31 (318). Pozitivno CD4 bojenje javlja se kod T helper ćelija, timocita (80-90%), granulocita, makrofaga, Langerhansovih ćelija i dendritičkih ćelija, ekspirira se u specifičnim oblastima mozga (318). Bojenje je obično citoplazmatsko i naglašava membrane.

Strukturno, CD4 je nopolimorfni glikoprotein, koji pripada superfamiliji imunoglobulina (319), koji se ekspirira na površini T-helper ćelija; on učestvuje kao koreceptor u indukovanoj aktivaciji T ćelija ograničenoj na MHC klasu II-antigena. Održavanje periferne tolerancije i sprečavanje autoimunosti funkcioniše uz pomoć CD4+, CD25+, FOXP3+regulatornih T ćelija (320), a on može biti i prognostički faktor kod maligniteta(321, 322); ima funkciju HIV receptora na T ćelijama, makrofagima i mozgu, nishodno je regulisan HIV proteinima tokom progresije AIDS-a (323, 324), obično se to stanje manifestuje odnosom $CD4 < CD8$ kod pacijenata sa HIV-om; odnos $CD4/CD8$ je normalno obrnut (tj. $CD4 > CD8$). Ti pacijenti su u opasnosti od oportunističkih infekcija, naročito ako je broj $CD4 < 200$. On je homologan CD223. CD4 je zajednički marker za T ćelije, koji se može koristiti za klasifikaciju limfoma i inflamatornih stanja; niži nivoi u serumu su pokazatelji progresije HIV bolesti (325). Serumski nivoi CD4 se koriste i za dijagnozu idiopatske CD4 limfocitopenije (326).

Pozitivno bojenje vezano za patološka stanja javlja se kod mnogih post-timičnih T ćelijskih leukemija/limfoma i T ćelijskih limfoproliferativnih poremećaja, kožne limfomatoidne granulomatoze (327), ekrintropne limfomatoidne papuloze (328), indolentnog tankocrevnog limfoma CD4+ T ćelija (329), indolentne T-ćelijske limfoblastne proliferacije, dendritičnih/histiocitičnih neoplazmi, neoplazme blastičnih plazmocitoidnih dendritičnih ćelija, granulomatoznog histiocitičkog limfoma/sarkoma, drugih

hematoloških/inflamatornih lezija, akutne mijeloidne leukemije (M4, M5 (330)), floridnog antivirusnog inflamatornog odgovora (331), Kikuchi-Fujimoto bolesti (smanjeni odnos CD4:CD8 u pogođenim područjima limfnog čvora, nasuprot limfomu (332)), pityriasis lichenoides, limfoma udruženog sa piotoraksom.

Bojenje CD8

CD8 je marker citotoksičnih T ćelija, strukturno, on je glikoprotein površine ćelije, član imunoglobulinske superfamilije; kodiran na hromozomu 2p12. Pozitivno CD8 bojenje javlja se kod kortikalnih timocita (70-80%), T ćelija (25-35% zrelih perifernih T ćelija, uglavnom citotoksične T ćelije), NK ćelija (30%) i dendritičnih ćelija. CD8 antigen (koji se ponaša kao koreceptor) kao i T ćelijski receptor prepoznaju antigene koje prikazuje antigen prezentujuće ćelija (APC) u kontekstu molekula MHC klase I; CD8 se vezuje za nepolimorfni region molekula klase I; može povećati poželjnost interakcija između citotoksične T ćelije i ciljne ćelije tokom antigen-specifične aktivacije. Može da ubije ciljne ćelije prepoznavanjem peptid-MHC kompleksa na njima ili sekretujući citokine sposobne da signaliziraju preko receptora smrti na površini ciljne ćelije.

CD8 alfa ćelije promovišu preživljavanje i diferencijaciju aktiviranih T ćelija u memorijske CD8+ T ćelije. Klonalna ekspanzija CD8+ T ćelija javlja se kod normalnih mladih (333) i starijih odraslih (334). Može doprineti inicijaciji, progresiji i regulaciji autoimunskih odgovora (335). Limfocitni infiltrat u karcinomima sličnim limfoepiteliomima je često CD8+ u cerviksu (336), jednjaku (337), jetri (338) i plućima (339); mutacije u alfa lancu uzrokuju nedostatak CD8, sa recidivnim bakterijskim infekcijama (340), a i akumulira se u naprednim aterosklerotičnim plakovima (341). Dijagnostički, CD8 je marker T ćelija (normalnih i malignih), marker citotoksičnih/supresornih T ćelija, ima ulogu u klasifikovanju limfoma, diferencijacija spleničnog hamartoma (CD8+) od hemangioma ili litoralnog ćelijskog angioma (CD8-) (342).

Pozitivno bojenje u patološkim stanjima javlja se kod posttimičnih (nekih) T ćelijskih limfoma, heterotopskog ovarijalnog splenoma, Hodgkin limfoma – kod nodularne limfocitne predominacije (reaktivne T ćelije su CD4+ CD8+ u 58% (343)), melanoma (CD4+ CD8+ u 60% (344)), Mycosis fungoides - epidermotrofni limfociti, NK/T ćelijski limfom (varijabilno), spleničnog hamartoma – “sinus lining” ćelije, subkutanog limfoma T ćelija sličnim panikulitisu, retko kod: B-CLL (345), limfomatoidne papuloze, tip "D" (346, 347), limfom mantle ćelija (348).

Bojenje CD15

CD15 (3-fucozil-N-acetil-laktozamin) je imunološki značajan molekul (molekul adhezije ugljenih hidrata) (349), koji se može ekspimirati na glikoproteinima, glikolipidima i proteoglikanima. Strukturno, on je ugljeni hidrat koji se često koristi za dijagnozu Hodgkinovog limfoma. Takođe poznat i kao LeuM1, Levis X, 3-fukosil-N-acetil-laktozamin. Funkcionalno, on olakšava fagocitozu i hemotaksu. Njegova sinteza se vrši uz pomoć FUT4 u limfoidnim ćelijama i zrelim granulocitima, i FUT9 u promijelocitima i monocitima (350). CD15 predstavlja složenu grupu glikoproteina i glikolipida ćelijske površine, koji imaju zajednički terminalni pentasaharid poznat kao Lewis^X (Le^X) antigen. Verovatno je da se proteini i lipidi jedara (vezano za CD15) razlikuju među različitim vrstama ćelija, jer postoji značajna varijabilnost vezivanja antitela unutar i među njima. CD15 postoji u sijalizovanim i nesijalizovanim oblicima. Njegova funkcija nije u potpunosti okarakterisana i najverovatnije je multifaktorna. CD15 je i antigen hematopoetske diferencijacije, izražen na većini krajnje diferentovanih mijeloidnih ćelija uključujući granulocite, eozinofile, mastocite, monocite/makrofage i Langerhansove ćelije. Nije ekspimiran u eritrocitima, trombocitima i limfocitima (351). CD15 takođe nije značajno izražen na hematopoetskim progenitorskim ćelijama. Do 1% progenitora CD34+ ćelija kostne srži i do 3,8% progenitora CD34+ ćelija u perifernoj krvi ekspimiraju CD15. Ogromna većina limfocita je CD15 negativno, ali aktivirani limfociti (naročito T4) mogu biti pozitivni. CD15 se smatra uključenim u funkcije neutrofila, tj. interakcije ćelija-ćelija, adhezije na endotelne ćelije (352, 353), fagocitozu (354), stimulaciju degranulacije i respiratorni "burst". Međutim, funkcija CD15 nije u potpunosti jasna (351, 355-357). Pretpostavlja se njegova uloga u aktivaciji monocita (358). Pored leukocita, CD15 se takođe registruje kod različitih epitela kao što je dojka (sekretorni epitel), bubreg (proksimalni tubuli) (359), pluća, pancreas (360) i crevni trakt (uključujući Panethove ćelije) (361, 362). Pozitivnost za CD15 je karakteristična za Hodgkinove ćelije u klasičnom Hodgkinovom limfomu (HL) (363-366), 10-15% limfoma perifernih T-ćelija ekspimiraju CD15 (uključujući povremene slučajeve mycosis fungoides) (367, 368), dok se B-ćelijski limfomi boje u još nižem procentu (obično kod limfoma difuznih velike B-ćelija). Ima retkih slučajeva akutne limfoblastne leukemije u kojima su mijeloidni antigeni često CD15 pozitivni. Ćelije mijeloidne leukemije heterogeno ekspimiraju CD15. CML su redovno CD15 pozitivne. CD15 se ekspimiraju u različitom procentu epitelnih tumora poput adenokarcinoma (naročito dojke (369), pluća (370) i debelog creva (362)), renal cell carcinoma (371), apokrinog karcinoma kože, papilarnog i folikularnog karcinoma tiroidne

žlezde i seroznog karcinoma jajnika. Moguće je da sijalil-CD15 sugerira tumorskim ćelijama sposobnost metastaziranja. Mezoteliom je praktično uvek CD15 negativan (pozitivnost je zabeležena u do 6%, naročito kod dezmozoplastične varijante). Kod diferencijacije mezotelioma i adenokarcinoma, CD15 se može koristiti u primarnom panelu. Izgleda da je prognoza gora kod hepatocelularnog, karcinoma želuca i kolona i medularnog karcinoma tiroidne žlezde ako je pozitivan za CD15. CD15 se može koristiti za histopatološko sortiranje glioma i diferenciranje između malignih glioma i neneoplastičnih glijalnih ćelija (koje se obično obično snažno boje). Ekspresija CD15 kod renal cell karcinoma je usko povezana sa boljem prognozom (371).

Bojenje za CD15 je membransko, Golgi-tip ili citoplazmatsko. Membransko i Golgi-tip su daleko češća od citoplazmatskog obrasca. Obrazac je obično kombinovan. Golgi-tip je veoma čest u Hodgkinovim ćelijama i može se videti sa ili bez membranskog bojenja (372).

Osim spomenutih ćelija CD15 mogu se bojiti i: Reed-Sternbergove ćelije u klasičnom i folikularnom Hodgkinovom limfomu (373), određeni kolorektalni karcinomi (374), serozni tumori jajnika/peritonealni serozni tumori (375), 15% limfoma perifernih T ćelija (367, 376) 5% limfoma B ćelija, uključujući neke B-CLL i pre-pre B ALL (377, 378), neke AML, naročito AML-M4/M5 (protočna citometrija je osetljivija od imunohistohemije), neki granulocitni sarkomi(379), neki histiocitički sarkomi, povremeno anaplastični limfom velikih ćelija (380), ali obično negativan (381). Napomena: EBV infekcije mogu imati ćelije poput Reed-Sternberga koje su fokalno CD15+ (382, 383).

Bojenje CD117

CD117 (c-kit, KIT, receptor faktora matičnih ćelija) je poznat kao proto-onkogen aktiviran u GIST tumorima. Gen za protoonkogen je kodiran na hromozomu 4q11-21 (384). Strukturno on predstavlja receptor (receptorski protein) za kit protein (ligand), poseduje molekularnu težinu od 145kD. Funkcionalno, on je tirozin kinazni faktor rasta, važan za razvoj i opstanak mastocita, hematopoetskih stem ćelija, melanocita, germinativnih ćelija, intersticijskih ćelija Cajal-a. Poseduje funkciju aktivacije ili pojačanja mutacija funkcije u većini GIST tumora, često na egzonu 11, a manje često na egzonima 9 i 13 (385). Bojenje je jako i difuzno citoplazmatsko. Pozitivno bojenje se normalno javlja se kod intersticijskih ćelija Cajal-a, hematopoetskih progenitorskih ćelija, melanocita, embrionskog/fetalnog mozga, endotela, gonada, mastocita, epitela dojke, germinativnih ćelija. U patološkoj praksi pozitivno bojenje javlja se kod AML, angiomiolipoma (386), angiosarkoma (50%), "clear

cell” sarkoma, CML, epitelioidnog sarkoma, Ewing sarkoma, gastrointestinalnog autonomnog tumora (GANT), gastrointestinalnog stromalnog tumora (GIST), granulocitnog sarkoma, Hodgkin limfoma (neke Reed-Sternberg ćelije), intraabdominalne fibromatoze (387), bolesti mastocita, melanoma, mezenterične fibromatoze (388) i brojnih drugih bolesti.

2. Ciljevi istraživanja i hipoteza

Ciljevi istraživanja

- Utvrditi demografske i epidemiološke karakteristike bolesnika sa melanomom kože
- Utvrditi modalitete hiruskog lečenja
- Utvrditi biološki tok melanoma (recidivi, in tranzit, limfogene i udaljene metastaze)
- Utvrditi kariometrijske i imunohistohemijske parametre tumora
- Komparirati biološki tok melanoma sa kariometrijskim i imunohistohemijskim karakteristikama i utvrditi njihov prognostički značaj

Radna hipoteza

Očekuje se da analiza epidemioloških nalaza ukaže na karakteristike biološkog toka bolesti tokom ispitivanog perioda, kao i kretanja po različitim ispitivanim distribucijama (polna, starosna itd.). Očekuje se da korelacija između ispitivanih kariometrijskih parametara, imunohistohemijskih parametara i kliničkih parametara ukaže na statistički značajnu prognostičku vrednost imunohistohemijskih i kariometrijskih varijabli.

H0 Ne postoji prognostički značaj imunohistohemijskih i kariometrijskih karakteristika melanoma za predviđanje biološkog toka melanoma (recidivi metastaze, smrtni ishod).

H1 Postoji prognostički značaj imunohistohemijskih i kariometrijskih karakteristika melanoma za predviđanje biološkog toka melanoma (recidivi metastaze, smrtni ishod).

3. Pacijenti i metode

Epidemiološki deo istraživanja je primarno obuhvatio 645 pacijenata sa melanomom kože iz regiona Južne i Istočne Srbije hirurški lečenih tokom perioda 01.01.2002.-31.12.2011., a potom praćenih na Klinici za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju i Klinici za onkologiju Kliničkog Centra Niš. Svi tumori su bili primarno hirurški uklonjeni ekscizionom biopsijom ili metodom radikalne ekscizije, uključujući i potkožno masno tkivo sa okolnom zdravom kožom vodeći računa o marginama. Kod slučajeva primarno nejasne dijagnoze (a nakon patohistološke potvrde) nakon ekscizione biopsije vršena je radikalna reekscizija.

Praćena je starosna i polna distribucija obolelih. Takođe je praćena lokalizacija javljanja primarnog tumora, kao i eventualno primarno postojanje diseminovane bolesti. Određivana je i lokalizacija i vreme pojavljivanja recidiva, kao i progresije bolesti (lokalni recidivi, in tranzit, limfogene i hematogene metastaze). Period praćenja za sve pacijente iznosio je minimalno 5 godina. Pacijenti sa nepotpunim epidemiološkim podacima isključeni su iz studije. Nakon selekcije ostalo je 466 pacijenata koji ispunjavaju propisane uslove. Kod tih pacijenata učinjena je epidemiološko-statistička analiza i tumačenje podataka.

Analizom biološkog toka tumora (lokalne i udaljene metastaze, recidivi itd.) pacijenti su podeljeni u dve kliničke grupe:

A dobar klinički tok (grupa D)

B loš klinički tok (grupa L)

Dobar klinički tok je definisan periodom od 5 godina bez recidiva ili sa pojavom jednog recidiva, i kod kojeg nakon jednokratnog hirurškog lečenja nije došlo do progresije bolesti (tokom pet godina). Loš klinički tok definisan je progresijom bolesti, mutliplim recidivima, smrću ili postojanjem metastatske bolesti u vreme primarne dijagnoze.

Kod pacijenata sa odgovarajućom dokumentacijom i adekvatnim propisanim parametrima izvršeno je stadiranje patohistološkog i kliničkog stadijuma bolesti, prema preporukama za stadiranje iz 2009 godine AJCC (293). Kliničkopatološko stadiranje učinjeno je za period od 5 godina kod 466 pacijenata.

Patohistološki hematoksilin-eozin (HE) iseći su izrađivani na Klinici za patološku anatomiju Kliničkog Centra Niš od materijala dobijenog od operisanih pacijenata. Za analizu je korišćena metoda potpune ili delimične obrade tkiva. Manji tumori su obrađivani u potpunosti, dok je kod većih tumora primenjena delimična obrada tkiva, odnosno uzorkovan

je određeni broj isečaka po odgovarajućoj šemi datoj u prilogu konačnog patohistološkog izveštaja. Mikroskopski su prosečno analizirana 4 tkivna isečka po svakom tumoru.

Isecci tkiva fiksirani su u neutralnom, puferisanom 4% formalinu, 18-24 sata, dehidrisani u etil-alkoholu progresivne koncentracije i ukalupljivani u parafin. Iz parafinskih blokova tkivo je sečeno na debljinu od 5 mikrometara (μm), bojeno HE metodom i mikroskopski analizirano na mikroskopu Olympus BX50. Određivan je Breslow status, status ulceracije, i broj mitoz, prema preporukama AJCC iz 2009 (293). Pri postojanju metastaza (lokalnih, regionalnih, udaljenih ili sistemskih) pacijenti su klasifikovani u odgovarajuće kliničkopatološke stadijume prema AJCC preporukama. U okviru petogodišnjeg kliničkog praćenja pacijenata, praćena je eventualna pojava recidiva i/ili metastaza, vreme njihovog javljanja i lokalizacija.

Drugi deo istraživanja obuhvata 60 pacijenata, odabranih metodom slučajnog izbora, iz grupa pacijenata sa dobrom (30 pacijenata) i lošom (30 pacijenata) kliničkom slikom. I pored razlika u polu i starosti radi se o statistički homogenom grupama. Svi pacijenti su praćeni na Klinici za onkologiju Kliničkog Centra Niš. Kod svih bolesnika rađena je nuklearna morfometrija prema prethodno definisanim parametrima na HE preparatima dobijenih od operisanih pacijenata. Kod istih pacijenata obavljeno je imunohistohemijsko bojenje na prethodno definisane markere (CD4, CD8, CD15 i CD117), a potom je učinjena analiza tih preparata.

Morfometrija i imidž analiza

Morfološka dijagnoza bolesti zasniva se na prepoznavanju određenih karakteristika, odnosno na dijagnostičkim kriterijumima. Tokom poslednjih nekoliko decada razvijene su brojne kvantitativne tehnike u cilju poboljšanja preciznosti i reproducibilnosti dijagnostičkih i prognostičkih kriterijuma u patologiji (389). Kvantitativne metode su: morfometrija, citometrija i mikrofotometrija. Morfometrija se definiše kao kvantitativni opis strukture. Morfometrija označava sve vrste merenja struktura i obuhvata i stereologiju koja podrazumeva merenje u prostoru, tj. u tri dimenzije. U patohistološkoj analizi radi isključenja subjektivnosti patologa sve više se primenjuju objektivne, morfometrijske metode, naročito kariometrija. Stereologija predstavlja analizu veličine partikula na dvodimenzionalnoj slici. Iako je histološki isečak trodimenzionalna struktura, debljine oko 5 mikrona, korišćenjem objektiva x100 koji ima malu dubinsku oštrinu koja se može zanemariti, dobija se slika u jednoj ravni. Većina poluautomatskih i automatskih sistema za analizu slike koristi upravo

asterološki pristup. Slika na monitoru kompjutera sastoji se od sitnih tačaka (piksela) i uzima se kao polazna veličina za određivanje drugih varijabli, kao što su projekciona površina (areal) partikule, obim (perimetar) partikule, faktori oblika (odnos areala i perimetra), itd. Digitalna mikroskopska kamera digitalizuje sliku, tj. analogni signal pretvara u digitalni zapis koji se dalje može obrađivati na personalnom računaru pomoću odgovarajućih programa za analizu slika, a dobijene vrednosti statistički analizirati. Većina morfometrijskih studija sprovedena je na histološkim preparatima, mada se može sprovoditi i na citološkim preparatima (389). Morfometrijske studije se osim u humanoj medicini, često koriste i u veterinarskoj medicini (390, 391).

Metodologija morfometrijskih analiza

Merenje debljine tumora

Debljina tumora merena je tokom rutinske obrade preparata okularnim mikrometrom a dobijene vrednosti izražavali u milimetrima (vrednost debljine tumora po Breslow). Prema debljini melanomi su podeljeni u grupe koje su kasnije korišćene za patohistološko i kliničko stadiranje.

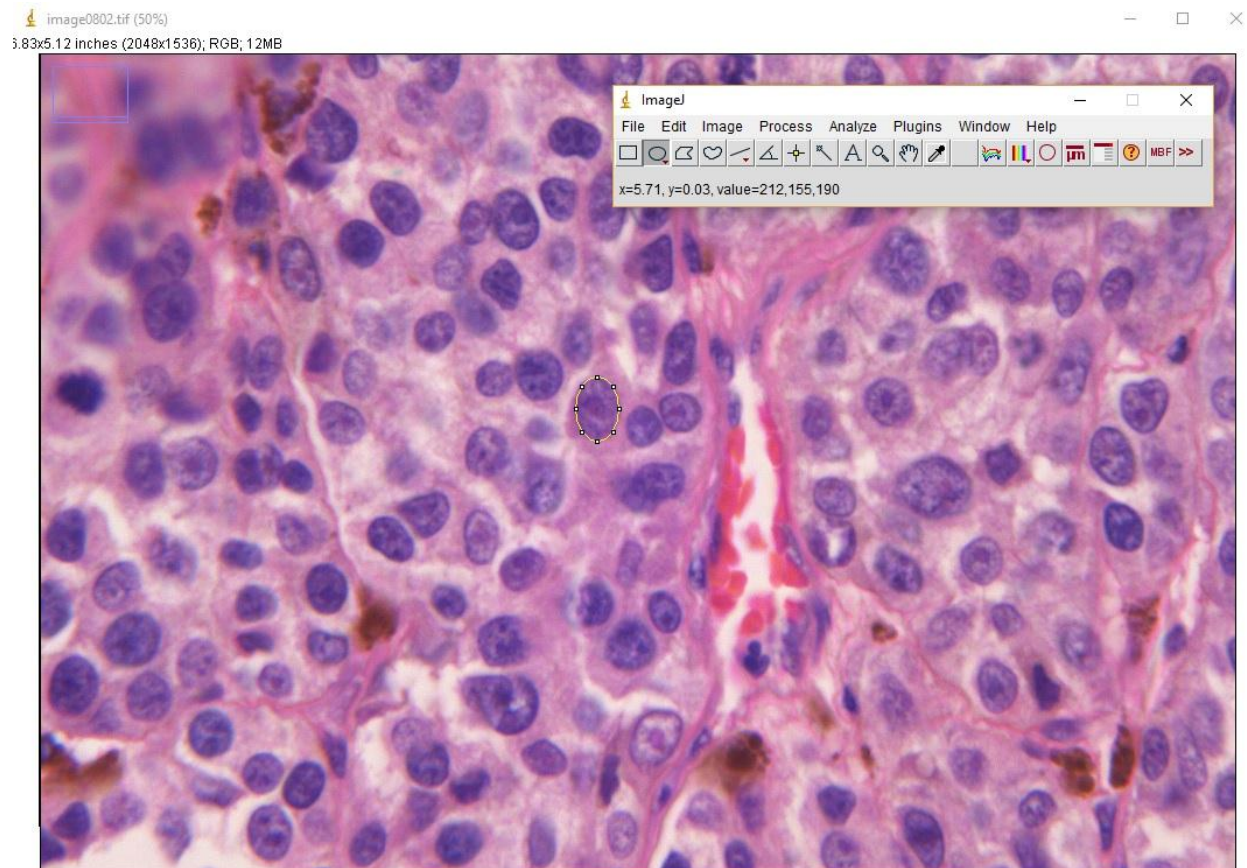
Broj mitoza

Broj mitoza (mitotski indeks, MI) određivan je u područjima tumora sa najvećim brojem mitoza na mm² površine, odnosno na 10 polja najvećeg mikroskopskog uveličanja, x400 po uzorku; (ukupan broj mitoza/10 High Power Field-HPF). Mitotski indeks određivan je samo kod tumora debljine do 1,00mm, radi klasifikovanja postadijuma u stadijumu I bolesti (prema podacima o prognostičkom značaju mitotskog indeksa).

Imidž (image) analiza

Za kariometrijsku analizu korišćen je program za analizu slike Image-J (Image J, verz. 1.46r (*National institute of health, USA*), na mikroskopu Olympus BX50 opremljen digitalnom kamerom *Leica DFC 295 (Leica Micro-System, Reuil-Malmaison, France)*. Standardni mikroskop je bio povezan sa računarskim video sistemom koji je omogućavao pregled slika na monitoru. Korišćeno je uvećanje x800, a rezolucija u svim slučajevima je bila 1024x768 piksela. Nuklearna morfometrija je sprovedena na odabranim histološkim HE preparatima. U svakom slučaju mereno je po 300 jedara. Nasumice selektovana, intaktna

jedra su merena, dok preklapajuća i fragmentisana jedra nisu analizirana. Selekcija jedara vršena je manuelno (Slika 18).



Slika 24. Selekcija jedara tumorskih ćelija tokom imidž analize nuklearnih varijabli.

Morfometrijskom analizom određivane su sledeće nuklearne varijable:

1. areal jedara (AREA),
2. srednja optička gustina jedara (MEAN OD),
3. standardna devijacija optičke gustine jedara (SD OD),
4. modna vrednost optičke gustine jedara (MODE OD),
5. minimalna vrednost optičke gustine (MIN OD),
6. maksimalna vrednost optičke gustine (MAX OD),
7. obim jedara (PERIMET),
8. cirkularnost jedara (CIRKULAR),
9. Feret-ov dijametar jedara (FERET),
10. integrisana optička gustina jedara (IOD),
11. zaobljenost (ROUND).

Pre merenja vrši se kalibracija sistema koja može biti prostorna i kalibracija intenziteta (389). Merenje može biti manuelno i automatsko posle selekcije odgovarajućih polja. Najčešće se analiziraju jedarni areal ili faktori oblika jedra.

Areal (A) jedne površine dobija se kao proizvod testnih tačaka koje su pale na partikulu i površine koja odgovara jednoj testnoj tački. Areal jedra je projekciona površina koja je definisana kao broj piksela i prikazuje se u μm^2 .

Obim (perimetar) partikule, odnosno njene dvodimenzionalne projekcije, dobija se na osnovu broja intersekcija (preseka, I_f) konture partikule i linija testnog sistema. Obim jedra se dobija na osnovu 4 projekcije na 0° , 45° , 90° i 135° ; izražava se u μm .

$$\text{Perimetar} = \frac{\pi \cdot (Pr_0 + Pr_{45} + Pr_{90} + Pr_{135})}{4}$$

Optička gustina (OD) određuje količinu svetlosti koja prolazi kroz objekat i dobija se na više načina pomoću više formula. Na primer:

$$\text{OD}(x,y) = -\log(\text{intenzitet}(x,y) - \text{crno}) / (\text{incidentno svetlo} - \text{crno})$$

Cirkularnost jedra ima vrednost 1 za krug, dok je za ostale oblike manja od 1. To je izvedena mera, dobijena iz areala i perimetra:

$$\text{Cirkularnost} = 4\pi \cdot \text{areal} / \text{perimetar}^2$$

Zaobljenost je takođe izvedena mera, predstavlja recipročnu vrednost cirkularnosti. Krug će imati neznatno veću vrednost ili vrednost jednaku 1. Ostali oblici će imati više vrednosti.

$$\text{Zaobljenost} = \text{perimetar}^2 / 4\pi \cdot \text{areal}$$

Integralna gustina jedra (IOD) je suma individualnih optičkih gustina (OD) svih piksela u arealu koja se meri i izražava se u arbitrarnim jedinicama (au).

Feret-ov dijametar je maksimalno rastojanje između bilo koje dve tačke na konturi jedra, izražava se u μm .

Imunohistohemijske metode ispitivanja

Urađena su imunohistohemijska bojenja na ćelijske antigene (CD4, CD8, CD15 i CD117). Svi preparati su mikroskopirani na mikroskopu Olympus BX50 opremljen digitalnom kamerom Leica DFC 295 (Leica Micro-System, Reuil-Malmaison, France). Standardni mikroskop je bio povezan sa računarskim video sistemom koji je omogućavao

pregled slika na monitoru. Korišćena su uvećanja korišćenjem objektivna x10 i x40, (NA 0,65; N plan) za CD4, CD8 i CD117 i dodatno x20 za CD15. Preparati su kvalitativno i semikvantitativno analizirani.

Imunohistohemijska analiza je sprovedena je na uzorcima melanoma kože fiksiranim u formalinu i uklopljenim u parafin, uzetih od 60 pacijenata. Pločice na koje su nanešeni tkivni preseći debljine 3- μ m sušene su u termostatu na 60°C u trajanju od jednog sata. Pločice sa presecima su postavljene u Bond Max Automated Immunohistochemistry Vision Biosystem (Leica Microsystems GmbH, Nemačka) prema sledećem protokolu. Prvo, tkiva su deparafinisana, nakon čega sledi demaskiranje antigena izlaganjem tkivnih preseka rastvorima Epitope Retrieval 1 ili 2 (videti Tabelu 3) na 100°C tokom 20 min. Nakon toga sledi ispiranje TBS puferom pH 7.6, a potom blokiranje endogene peroksidaze 5 min na ambijentalnoj T koristeći kit za detekciju Bond Polymer Refine Detection Kit DC9800 (Leica Microsystems GmbH). Pločice su ponovo isprane puferom a zatim inkubirane sa primarnim antitelima 15/30 minuta. Nakon toga, tkivni preseći su prvo inkubirani sa post-primarnim reagensom (Post Primary Reagent) u trajanju od 8 minuta, a zatim sa Polimerom 8 minuta. Nakon ispiranja, preseći su inkubirani sa DAB-hromogenom 10 minuta, a potom kontrastirani hematoksilinom 8 minuta.

Kontrola kvaliteta i specifičnosti imunohistohemijske reakcije

Imunohistohemijska bojenja vrše se uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja primenom pozitivnih i negativnih kontrolnih postupaka, prema propozicijama UK NEQAS (engl. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*).

Tokom procesa bojenja preparata paralelno se boje i “pozitivni“ i “negativni“ kontrolni uzorci za potvrdu specifičnosti i kvaliteta imunohistohemijske metode. Kao pozitivna kontrola u toku imunohistohemijskog bojenja služe uzorci tkiva za koja je ranije sigurno utvrđeno da sadrže antigene koje je moguće vizuelizovati primenjenom metodom. Ovi preseći se tretiraju na isti način kao i ispitivani tkivni uzorci. Negativnu kontrolu (kontrola reagenasa) predstavljaju tkivni uzorci na koje se umesto primarnih antitela aplikuje neimuni serum.

Tabela 3. Osnovne karakteristike primenjenih primarnih antitela.

Metoda	Leica BOND MAX Refine Kit	Leica BOND MAX Refine Kit	Leica BOND MAX Refine Kit	Leica BOND MAX Refine Kit
Primarno antitelo	Monoklonsko mišje anti hu CD4, klon 4B12	Monoklonsko mišje anti hu CD8, klon 4B11	Monoklonsko mišje anti hu CD15, klon MMA	Poliklonsko kunićevo CD117, c-kit
Proizvođač	DAKO	Leica	Thermoscientific	DAKO
Kat. br.	M7130	CD8-4B11-L-CE	MS-1259	A4502
Razblaženje	1:50	1:50	1:200	1:400
Pretretman	Leica ER2 20 min (high pH)	Leica ER2 20 min (high pH)	Leica ER2 20 min (high pH)	Leica ER1 20 min (low pH)
Inkubacija sa primarnim antitelom	15 min	15 min	15 min	30 min
Kit za detekciju	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)

Semikvantitativna i kvalitativna procena imunohistohemijske reakcije

Semikvantitativna procena ekspresije CD4, CD8, CD17 i CD117 vršena je na preparatima bojenim imunohistohemijski, na osnovu intenziteta imunohistohemijskog nuklearnog (CD15), plazmaleminog (CD4 i CD8) i citoplazmatskog (CD15 i CD117) bojenja i procenta imunoreaktivnih tumorskih i netumorskih ćelija. Pozitivna imunohistohemijska reakcija ispoljavala se u vidu svetlo i tamnobraon prebojenosti.

CD4 i CD8: Izvršena je semikvantitativna analiza u vidu određivanja udela imunoreaktivnih netumorskih ćelija (limfocita) u odnosu na ukupni broj registrovanih limfocita intra i peritumorski na celom preparatu, kao i intenzitet njihove prebojenosti. Praćena je i njihova distribucija po kompartmanima na preparatu.

CD15: Određivan je prosečni broj CD15 pozitivnih ćelija u vidnom polju na uvećanju x20, kao i intenzitet njihove prebojenosti i njihova distribucija na preparatu, intratumorski i u peritumorskim tkivima, kao i zasebno po kompartmanima.

CD117: Izvršena je semikvantitativna analiza, izražena kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija. Izvršena je i kvalitativna analiza, izražena kao intenzitet bojenja i istovremeno procentualna zastupljenost imunohistohemijski pozitivnih ćelija kroz i oko samog tumora. Praćeno je i postojanje gubitka prebojenja tumorskih ćelija po vertikali.

Učinjena je i analiza distribucije i koncentracije pozitivnih ćelija (CD4, CD8 i CD15) u i oko tumora i ispitivanje prognostičke značajnosti te zastupljenosti.

U tabelama je predstavljen naziv bojenja (CD4, CD8 ili CD15), kao i grupa pacijenata kojoj podaci pripadaju D – dobri, L – loši; druga kolona je klasifikacija mera koncentracije, tj. zastupljenosti pozitivno bojenih ćelija. Te vrednosti variraju od 1 do 6, gde je 1 – u tragovima, 2 – vrlo malo, 3 – malo, 4 – umereno mnogo, 5 – mnogo, 6 – većina bojenih ćelija. Na njih se odnose promenljive koje se nalaze u kolonama P-Dif, gde ove predstavljaju prostornu zastupljenost ispitivanih pozitivnih ćelija za odgovarajući marker na preseku tumorskog preparata. Dodeljene su sledeće vrednosti za distribucije u samom tumoru i oko njega: P – peritumorski, B – bazalno u odnosu na tumor, L – limfocitna gnezda u tumoru, S – u stromalnim septama, PIV – peri i intravaskularno, G – gnezda tumorskih ćelija, U – ispod ulceracije, Dif – difuzna distribucija u tumoru. Razlika između CD4 i CD8 u odnosu na CD15 je u koloni G odnosno U, jer je zasebna distribucija CD15 u tumorskim gnezdima (G) bila minimalna, dok, nasuprot tome, distribucija CD4 i CD8 nije zavisila od postojanja ulceracije (U). Brojevi u kolonama P – Dif pokazuju sumaciju koncentracija pozitivnih ćelija u odgovarajućim područjima tumora. Samim tim definisane su „koncentracijska distribucija“ gde je praćena zastupljenost pojedinih kategorija koncentracije (1-6) odnosno „prostorna distribucija“ gde je opisana zastupljenost ćelija u pojedinim strukturama tumorskog tj. peritumorskog tkiva (P/B/L/S/PIV/G/U/Dif).

Učinjena je i sumacija i klasifikacija intenziteta bojenja (izražena plusevima: + = slab intenzitet, ++ = umeren intenzitet, +++ = jak intenzitet prebojenja), kao i procentualna zastupljenost imunohistohemijski pozitivnih ćelija za odgovarajuće bojenje, u odnosu na ukupnu populaciju odgovarajućih netumorskih ćelija (za CD4 i CD8), odnosno prosečna vrednost broja pozitivnih ćelija u jednom vidnom polju na uvećanju 20x (za CD15).

U tabelu su uneseni i sumirani podaci o procentualnoj zastupljenosti pozitivnih ćelija (CD4 odnosno CD8) u odnosu na ukupnu populaciju potencijalno pozitivnih ćelija (tumor infiltrišući limfociti – TIL). Prvi red odnosi se na kategorije D i L pacijenata. Drugi red odnosi se na procentualnu zastupljenost pozitivnih ćelija.

Registrovano je prebojenje citoplazme i plazmaleme kod CD117 pozitivnih tumorskih ćelija. U prvoj fazi je praćeno postojanje prebojenja, odnosno odsustvo istog, kao i promena intenziteta prebojenja po tumorskoj vertikalil. Potom je ućinjena klasifikacija procentualne zastupljenosti pozitivnih ćelija (koristeći primer semikvantitativnog sistema za procenu ekspresije).

Pošto imunoreaktivno prebojenje nije bilo homogeno ućinjena je i kvantifikacija intenziteta prebojenja istih tih ćelija.

Osnovne metode statistiće obrade podataka

U obradi podataka korišćena je standardna deskriptivna i analitićka statistiće metodologija. Deskriptivnom statistićkom analizom prikazani su sledeći statistiće parametri: aritmetiće sredina, standardna devijacija, koeficijent varijacije, apsolutna frekvencija (N) i indeks strukture (%).

Analitićkom statistićkom metodologijom izmerena je statistiće znaćajnost mećusobnih razlika prosećnih vrednosti odrećenih obeleća kod svih ispitanika i razdvojeno na grupe. Korišćeni su parametrijski testovi ili neparametrijski (ako je $CV > 30\%$).

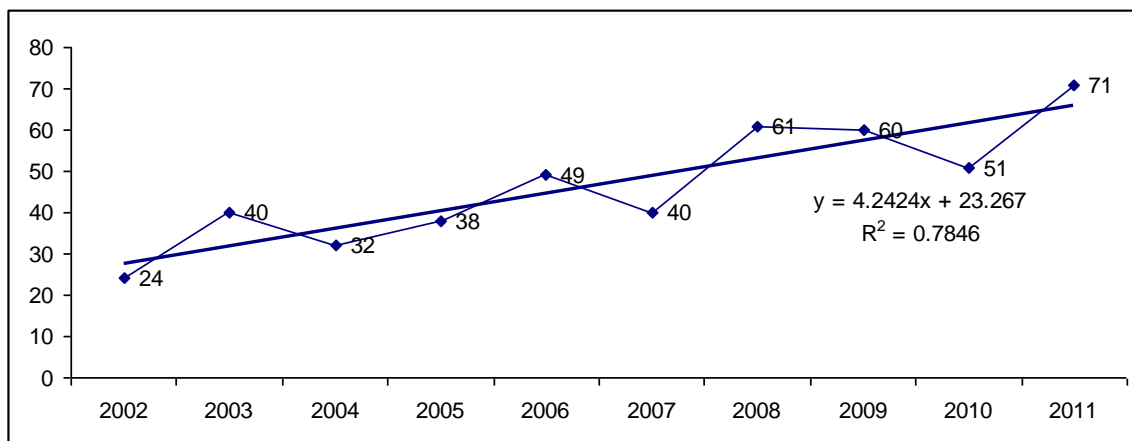
Porećenje ućestalosti javljanja pojedinih modaliteta atributivnih obeleća izmeću grupa vršeno je Pearson χ^2 testom/Fisher exact testom. Porećenje srednjih vrednosti numerićkih obeleća izmeću dve nezavisne grupe ispitanika vršeno je Student-ovim t-testom ili Mann-Whitney U-testom.

Za merenje povezanosti odrećenih obeleća uraćena je korelaciona analiza (Pearson). Prediktorni uticaj odrećenih nezavisnih varijabli na zadatu dihotomnu zavisnu varijablu izmeren je logistićkom regresionom analizom, najpre univarijantnom a zatim multivarijantnom (varijable koje su univarijantno znaćajne uvode se u multivarijantni model). Za analizu znaćajnosti trenda kretanja promena praćenih u periodu 2002.-2012. korišćena je Joinpoint regresiona analiza.

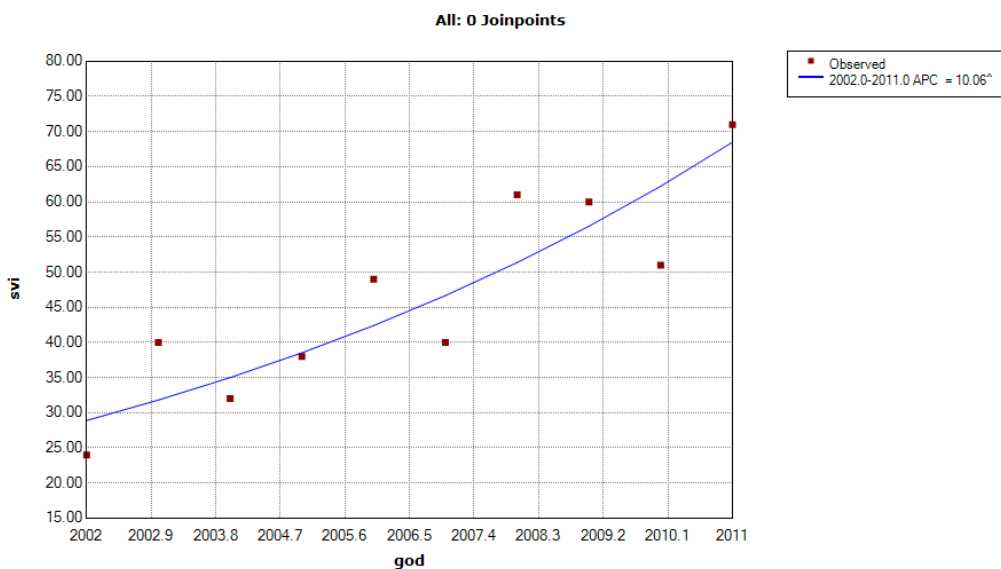
Statistiće analiza je uraćjena korišćenjem Excel program iz Microsoft Office programskog paketa i SPSS programa u verziji 18.0 i Joinpoint softvera. Kao prag statistiće znaćajnosti korišćen je nivo greške procene manji od 5% ($p < 0,05$). Rezultati statistiće analize prikazani su tabelarno i grafićki.

4.Rezultati

Statističkom obradom obuhvaćeno je 466 pacijenata. Evidentirani broj obolelih tokom posmatranog perioda 2002-2011. pokazuje značajan porast (APC=10.06, p=0.0007 Joinpoint regresija) (Grafikon 1 i 2).



Grafikon 1. Grafički prikaz incidencije melanoma kože među ispitivanim pacijentima za period 2002-2011.

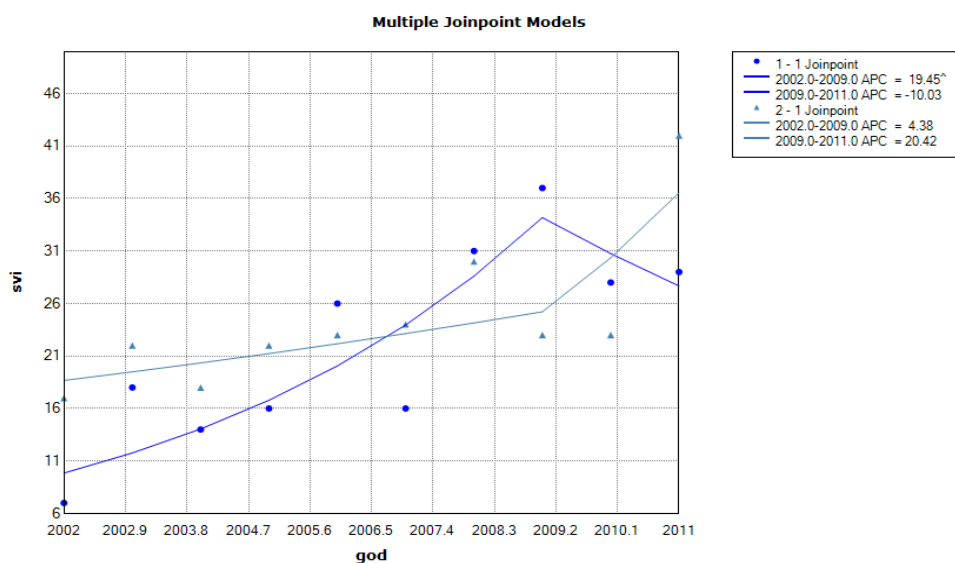


* Indicates that the Annual Percent Change (APC) is significantly different from zero at the alpha = 0.05 level.
Final Selected Model: 0 Joinpoints.

Grafikon 2. Grafički prikaz incidencije iz Joinpoint regresije za period 2002-2011.

Polna struktura ispitivanih pacijenata

Polna struktura pokazuje da je među pacijentima bilo više žena (muškarci vs. žene, 222 vs. 244). Kod muškaraca se do 2009. godine evidentira značajan porast obolelih (APC=19,45 p=0,0348), a onda počinje pad (koji nije signifikantan APC=10.03 p=0,57). Kod žena se do 2009. godine evidentira blaži porast koji nije značajan (APC=4.38 p=0,0755), a onda počinje nagli porast (koji takođe nije signifikantan APC=20.42 p=0,369) (Grafikon 3).



Grafikon 3. Grafički prikaz polne strukture iz Joinpoint regresije za period 2002-2011.

Starosna struktura ispitivanih pacijenata

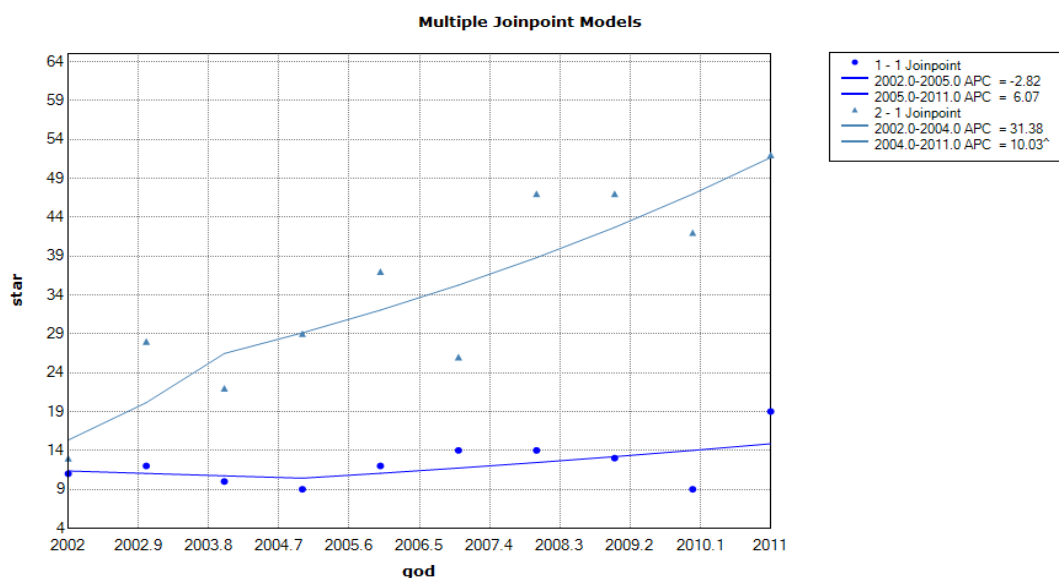
Učinjena je analiza i prikaz starosne strukture ispitivanih pacijenata, njihova sumacija po kategorijama (Tabela 4), kao i poređenje starosnih grupa do i preko 50 godina, sa ispitivanjem značajnosti porasta incidence (Grafikon 4).

Kod pacijenata mladih od 50 godina se do 2004. godine evidentira minimalan pad (skoro ravna linija APC=-2.82 p=0,875) a onda počinje blagi porast (koji nije signifikantan APC=6.07 p=0,358). Kod pacijenata starijih od 50 godina se do 2003. godine evidentira porast koji nije značajan (APC=31.38 p=0,345) a onda počinje signifikantan porast (APC=10.03 p=0,041).

Tabela 4. Prikaz starosne strukture novoobolelih pacijenata sa melanomom kože za period 2002-2011.

	<30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	>80	<50	50+
N	15	36	72	125	146	56	16	123	343
%	3.52	8.09	16.31	26.44	30.60	11.72	3.32	27.93	72.07

Napomena: procena je vršena na sedmostepenoj skali (<30 = pacijenti mlađi od 30 godina, 80> = pacijenti stariji od 80 godina, % = procentualni iznos pojedinih starosnih struktura u odnosu na ukupni broj pacijenata, <50 = broj pacijenata mlađih od 50 godina, 50+ = broj pacijenata starijih od 50 godina).



Grafikon 4. Grafički prikaz starosne strukture iz Joinpoint regresije za period 2002-2011.

Lokalizacija primarne bolesti

Učinjena je analiza distribucije lokalizacije primarne bolesti i izražavanje u apsolutnim i relativnim brojevima. Vrednosti su prikazane u Tabeli 5.

Tabela 5. Tabelarni prikaz distribucije lokalizacije primarnih melanoma kože za period 2002-2011.

G	%	T	%	L	%	R	%	N	%
83	17.27	67	14.48	136	29.32	75	16.21	105	22.72

Napomena: G = glava i vrat, T = prednja strana trupa, L = leđa, R = ruka, N = noga, % = procentualna zastupljenost po godinama.

Prognostički značaj prisustva ulceracije na primarnom tumoru u odnosu na pojavu recidiva, metastaza ili smrtnog ishoda

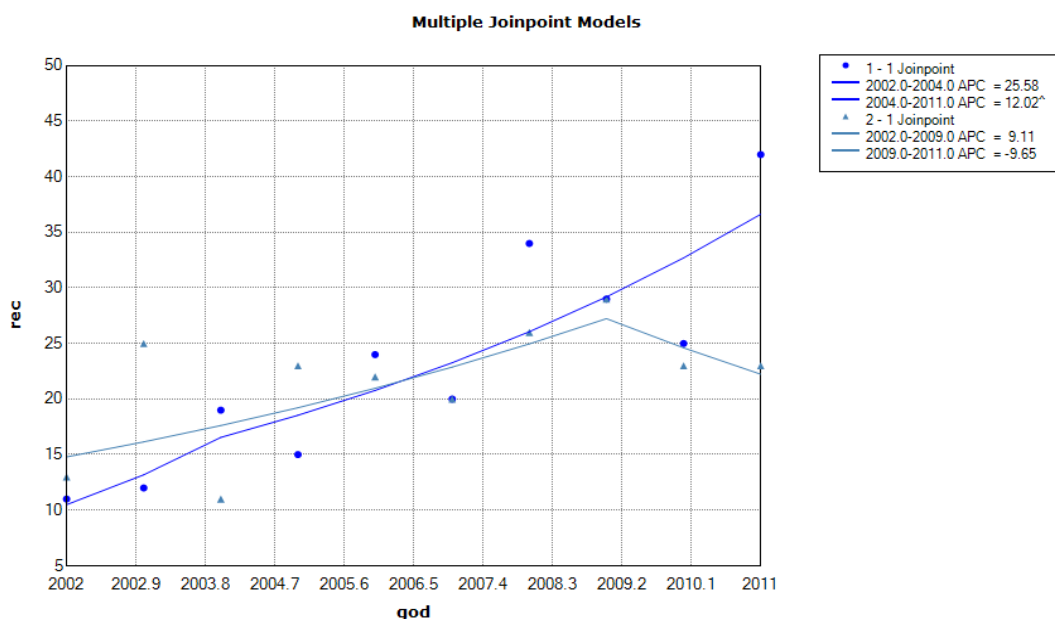
Po dizajnu studije, pacijenti su podeljeni u dve kliničke grupe, sa dobrim i lošim kliničkim tokom. Dobar klinički tok je definisan time da je pacijent posle primarne operacije i eventualno sekundarne operacije recidiva ili limfogenih metastaza imao disease free interval od najmanje 5 godina. Loš klinički tok definisan je pojavom recidivne bolesti kod koje jednokratnim operativnim ili drugim modalitetom lečenja nije mogla biti postignuta remisija bolesti.

Zabeležen je i predstavljen broj obolelih pacijenata, kao i pacijenata kod kojih se javio ili nije javio recidiv (Tabela 6).

Tabela 6. Prikaz broja obolelih pacijenata, recidiva, slučajeva bez recidiva i umrlih.

Bez recidiva	Recidivi	Umrlih	Oboleli (zbirno)
231	215	20	466

Kod nerecidivirajućih melanoma (grupa pacijenata sa dobrim kliničkim tokom) se do 2004. godine evidentira blagi porast (APC=25.58 p=0,499), a onda počinje značajan porast (APC=12,02 p=0,042). Kod recidivirajućih melanoma (grupa sa agresivnim kliničkim tokom) se do 2009. godine evidentira porast koji nije značajan (APC=9,11 p=0,198), a onda počinje pad (koji takođe nije signifikantan APC=-9.65 p=0,827) (Grafikon 5). Od ukupnog broja pacijenata (N = 466), kod 129 je nađena ulceracija na primarnom tumoru.



Grafikon 5. Grafički prikaz strukture nerekidivni vs. recidivni kožni melanomi iz Joinpoint regresije za period 2002-2011.

Izvršena je i analiza recidiva i učinjena podela na pacijente sa recidivima koji su imali dobar i loš klinički tok. Dobar klinički tok definisan je potpunom remisijom nakon hirurškog lečenja postojanja solitarnog recidiva tokom perioda od 5 godina. Loš klinički tok manifestovao se ponovljenim recidivima odnosno metastazama. Među ovim pacijentima registrovano je 27 pacijenata sa dobrim i 188 pacijenata sa lošim klinički tokom.

Prvi osnov klasifikacije pacijenata je da posle operacije primarnog tumora 5 godina nisu imali recidive i metastaze (N = 231), a toj grupi je pridruženo još 27 pacijenata kod kojih je, nakon operacije primarnog tumora učinjena još jedna operacija lokalnog recidiva i/ili metastaza i koji za period naknadnog praćenja od 5 godina nisu imali nove relapse bolesti. Time ukupan broj pacijenata sa dobrim kliničkim tokom iznosi 258. Ostali pacijenti N = 208 su imali agresivan loš klinički tok, uključujući i smrtni ishod u opservacionom periodu.

Praćeno je i vreme pojave recidiva posle primarne dijagnoze. Oko dve trećine recidiva javilo se u toku prve godine, a još trećina recidiva tokom naredne 4 godine (Tabela 7).

Tabela 7. Distribucija perioda do pojave recidiva od prve dijagnoze za period 2002-2011.

	Broj meseci od primarne dijagnoze kada se javio recidiv						UMRLIH
	1-6	7-12	12-24	25-36	37-48	49-60	
Broj recidiva	100	46	38	19	8	4	20

Napomena: UMRLIH = broj pacijenata koji su tokom praćenja preminuli od posledica melanoma kože.

Najveći broj recidiva javio se tokom prvih 6 meseci (N = 100), a još 46 javilo se tokom prve godine. Najveći broj recidiva/metastaza javio se po tipu lokalnog recidiva (N = 44) odnosno metastatskog zahvatanja regionalnih tkiva (N = 93). Sistemske metastaze registrovane su kod 64 slučaja. Ovi podaci su vezani za značaj praćenja bolesti, čime je opravdan ovakav dizajn ove studije.

Tabela 8. Tip javljanja recidiva/metastaza.

L	%	R	%	U	%	S	%	K	%
44	20.16	92	43.84	3	1.32	64	29.36	11	5.32

Napomena: L = lokalni recidiv, R = regionalne metastaze, U = udaljene kožne metastaze, S = sistemske metastaze, K = kombinacija prikazanih mesta, % = procentualna zastupljenost u odnosu na ukupni broj recidiva.

TNM klasifikacija i kliničkopatološki stadijum bolesti

Tabela 9. Tabelarni prikaz sumacije TNM stadijuma bolesti za period 2002 – 2011.

Stadijum T								Stadijum N							Stadijum M			
1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	0	1a	1b	2a	2b	2c	3	0	1a	1b	1c
55	20	92	28	92	59	42	78	420	2	15	3	8	2	16	457	0	3	6

Tabela 10. Tabelarni prikaz kliničkopatološkog stadijuma bolesti 2002-2011.

IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
53	100	97	91	70	3	15	28	9

Korelacija stadijuma T sa pojavom recidiva, ulceracijom i lokalizacijom

Tabela 11. Tabelarno predstavljena korelacija stadijuma T sa pojavom recidiva, postojanjem ulceracije primarnog tumora i lokacijom primarnog tumora.

		T1	T2	T3	T4
Rec+	Pearson Correlation	.378	.478	.537	.775**
	Sig. (2-tailed)	.281	.162	.109	.008
	N	10	10	10	10
U	Pearson Correlation	.562	.272	.560	.623
	Sig. (2-tailed)	.091	.448	.092	.054
	N	10	10	10	10
G	Pearson Correlation	.722*	.785**	.765**	.565
	Sig. (2-tailed)	.018	.007	.010	.089
	N	10	10	10	10
T	Pearson Correlation	.403	.356	.327	.664*
	Sig. (2-tailed)	.249	.313	.356	.036
	N	10	10	10	10
L	Pearson Correlation	.714*	.589	.640*	.919**
	Sig. (2-tailed)	.020	.073	.046	.000
	N	10	10	10	10
R	Pearson Correlation	.690*	.526	.656*	.587
	Sig. (2-tailed)	.027	.119	.040	.074
	N	10	10	10	10
N	Pearson Correlation	.723*	.799**	.549	.548
	Sig. (2-tailed)	.018	.006	.101	.101
	N	10	10	10	10

Napomena: Rec+ = pojava recidiva, U = ulceracija, G = glava i vrat, T = prednja strana trupa, L = leđa, R = ruka, N = noga

Korelacija stadijuma bolesti sa pojavom recidiva, ulceracijom i lokalizacijom

Tabela 12. Tabela predstavljena korelacija stadijuma bolesti (I, II, III/IV) sa pojavom recidiva, postojanjem ulceracije primarnog tumora i lokacijom primarnog tumora.

		I	II	III i IV
Rec+	Pearson Correlation	.588	.626	.338
	Sig. (2-tailed)	.074	.053	.339
	N	10	10	10
U	Pearson Correlation	.402	.646*	.446
	Sig. (2-tailed)	.250	.043	.197
	N	10	10	10
G	Pearson Correlation	.776**	.693*	.716*
	Sig. (2-tailed)	.008	.026	.020
	N	10	10	10
T	Pearson Correlation	.478	.427	.415
	Sig. (2-tailed)	.163	.218	.233
	N	10	10	10
L	Pearson Correlation	.742*	.755*	.598
	Sig. (2-tailed)	.014	.012	.068
	N	10	10	10
R	Pearson Correlation	.761*	.600	.468
	Sig. (2-tailed)	.011	.066	.172
	N	10	10	10
N	Pearson Correlation	.847**	.556	.565
	Sig. (2-tailed)	.002	.095	.088
	N	10	10	10

Napomena: Rec+ = pojava recidiva, U = ulceracija, G = glava i vrat, T = prednja strana trupa, L = leđa, R = ruka, N = noga

Korelacija T stadijuma sa polom

Tabela 13. Tabela predstavljena korelacija T stadijuma bolesti sa polom pacijenata.

		T1	T2	T3	T4
m	Pearson Correlation	.620	.707*	.547	.898**
	Sig. (2-tailed)	.056	.022	.102	.000
	N	10	10	10	10
f	Pearson Correlation	.884**	.696*	.840**	.523
	Sig. (2-tailed)	.001	.025	.002	.121
	N	10	10	10	10

Napomena: m = muški pol, f = ženski pol

Korelacija kliničkopatološkog stadijuma bolesti sa polom

Tabela 14. Tabela predstavljena korelacija stadijuma bolesti (I, II, III/IV) sa polom pacijenata.

		I	II	III i IV
m	Pearson Correlation	.785**	.680*	.519
	Sig. (2-tailed)	.007	.031	.124
	N	10	10	10
f	Pearson Correlation	.839**	.710*	.794**
	Sig. (2-tailed)	.002	.022	.006
	N	10	10	10

Napomena: m = muški pol, f = ženski pol

Nuklearna morfometrija – polna i starosna distribucija i lokalizacija tumora

Dve grupe pacijenata (D i L) od po 30 ispitanika sastoje se od 24 (40%) pacijentkinja i 36 (60%) pacijenata. Rodna struktura između grupa D i L nije značajno različita ($\chi^2=1,11$ $p=0,292$ n.s.) (Tabela 15).

Tabela 15. Tabela predstavljena polna distribucija grupa D i L pacijenata.

Pol	Grupa D	%	Grupa L	%	Ukupno	%
f	14	23.33%	10	16.67%	24	40.00%
m	16	26.67%	20	33.33%	36	60.00%
Ukupno	30	50.00%	30	50.00%	60	100.00%

Napomena: f = ženski pol, m = muški pol

Prosečna starost svih pacijenata je 58.43 ± 10.64 godina, žene su stare 56.79 ± 10.12 , a muškarci 59.53 ± 10.97 godina. Razlika od 2,7 godine ne daje značajnu razliku ($t=0,961$ $p>0,05$ n.s.). Prosečne starosti grupa D i L žena se ne razlikuju značajno ($t=1.459$ $p>0,05$ n.s.), kao ni muškaraca ($t=0,276$ $p>0,05$ n.s.), a takođe ni cele grupe ($t=1,212$ $p>0,05$ n.s.).

Tabela 16. Prosečna starost pacijenata po grupama N = 60.

Pol	Grupa D	SD	Grupa L	SD	Ukupno	SD	t-test
f	54.21	± 11.31	60.4	± 7.21	56.79	± 10.12	$t=1.459$ n.s.
m	58.94	± 11.05	60.0	± 11.18	59.53	± 10.97	$t=0.276$ n.s.
Ukupno	56.73	± 11.24	60.13	± 9.90	58.43	± 10.64	$t=1.212$ n.s.

Dve trećine pacijenata je starosti 51-70 godina, stariji i mlađi čine jednu trećinu. U grupi D dominantna starost je 51-60, dok je u grupi L to u 61-70 godina, ali ipak je variranje distribucije starosnih kategorija grupa D i L u opsegu koji nije značajno različit ($\chi^2=5,24$ p=0,264 n.s.).

U grupi D dominantna lokalizacija je noga, pa zatim leđa, dok je u grupi L to leđa, ali ipak je variranje distribucije lokalizacija grupa D i L u opsegu koji nije značajno različit ($\chi^2=6,26$ p=0,181 n.s.) (Tabela 17).

Tabela 17. Struktura lokalizacije po grupama primarnog melanoma kože N = 60.

Lokalizacija	Grupa pacijenata				Ukupno	%
	D	%	L	%		
G	5	16.67%	3	10.00%	8	13.33%
L	9	30.00%	12	40.00%	21	35.00%
N	10	33.33%	4	13.33%	14	23.33%
R	1	3.33%	5	16.67%	6	10.00%
T	5	16.67%	6	20.00%	11	18.33%
Ukupno	30	100.00%	30	100.00%	60	100.00%

Napomena: G = glava i vrat, T = prednja strana trupa, L = leđa, R = ruka, N = noga,
% = procentualna zastupljenost po godinama.

Nivo Breslow se u grupi D najčešće javljao nivoom 1 i 2, a u grupi L se najčešće prezentovao nivoom 3 i 4. Razlika distribucije nivoa Breslow između grupa D i L je visoko značajno različita ($\chi^2=22,40$ p=0,00005) (Tabela 18).

Tabela 18. Nivo Breslow po grupama pacijenata.

Nivo Breslow	Grupa pacijenata				Ukupno	%
	D	%	L	%		
1	8	26.67%	0	0.00%	8	13.33%
2	11	36.67%	2	6.67%	13	21.67%
3	4	13.33%	15	50.00%	19	31.67%
4	7	23.33%	13	43.33%	20	33.33%
Ukupno	30	100.00%	30	100.00%	60	100.00%

U grupi D ulceracija je nađena kod 8 pacijenata, kod 22 pacijenta nije nađena, dok je u grupi L bilo 19 pacijenata sa ulceracijom, a 11 pacijenata bez ulceracije. Razlika u registrovanju ulceracije na primarnom tumoru između grupa D i L je visoko značajna

($\chi^2=8,15$ $p=0,004$) (Tabela 19). Distribucija pojave ulceracija po svakom Breslow nivou se značajno razlikuje između grupa D i L ($\chi^2=9,70$ $p=0,021$) (Tabela 20).

Tabela 19. Distribucija pojave ulceracija po grupama pacijenata.

Status ulceracije	Grupa pacijenata				Ukupno	%
	D	%	L	%		
Ima	8	13.33%	19	31.67%	27	45.00%
Nema	22	36.67%	11	18.33%	33	55.00%
Ukupno	30	50.00%	30	50.00%	60	100.00%

Tabela 20. Distribucija pojave ulceracija po Breslow nivouima.

Nivo Breslow	Status ulceracije	Grupa pacijenata				Ukupno	%
		D	%	L	%		
1	ne	7	23.33%	0	0.00%	7	11.67%
	da	1	3.33%	0	0.00%	1	1.67%
2	ne	8	26.67%	1	3.33%	9	15.00%
	da	3	10.00%	1	3.33%	4	6.67%
3	ne	4	13.33%	7	23.33%	11	18.33%
	da	0	0.00%	8	26.67%	8	13.33%
4	ne	3	10.00%	3	10.00%	6	10.00%
	da	4	13.33%	10	33.33%	14	23.33%
Ukupno		30	100.00%	30	100.00%	60	100.00%

Između grupa D i L postoji statistički značajna razlika samo kod dva obrađivana parametra – kod cirkularnosti (Circ) ($t=5,194$ $p<0,001$) i zaobljenosti (Round) ($t=3,696$ $p<0,0001$). U grupi L vrednosti ova dva parametra su visoko značajno veće, kod ostalih parametara razlike između grupa variraju u opsegu koji nije statistički značajan (Tabela 21).

Tabela 21. Prikaz testiranja ispitivanih morfometrijskih parametara između grupa D i L.

Grupa	N	Mean	Std. Deviation	CV	t-test	
Area	D	30	.068384	.0178796	26.15	t=1.570
	L	30	.075912	.0192316	25.33	p=0.122
Mean	D	30	126.662380	21.6957733	17.13	t=1.643
	L	30	117.959611	19.2537997	16.32	p=0.106
StdDev	D	30	17.581774	2.2439600	12.76	t=0.629
	L	30	17.148192	3.0357455	17.70	p=0.532
Mode	D	30	125.022105	23.1935633	18.55	t=1.650
	L	30	115.551556	21.2125752	18.36	p=0.104
Min	D	30	80.011865	18.1806726	22.72	t=1.427
	L	30	73.219444	18.6976947	25.54	p=0.159
Max	D	30	183.897990	21.5382771	11.71	t=1.819
	L	30	174.659000	17.6052985	10.08	p=0.074
Perim	D	30	1.038068	.1223405	11.79	t=0.272
	L	30	1.047173	.1366226	13.05	p=0.787
Circ	D	30	.779342	.0655873	8.42	t=5.194
	L	30	.848884	.0327953	3.86	p=0.000
Feret	D	30	.397200	.0516378	13.00	t=0.308
	L	30	.392978	.0544585	13.86	p=0.759
IntDen	D	30	8.846838	3.3080760	37.39	t=0.204
	L	30	9.004727	2.6491675	29.42	p=0.839
Round	D	30	.592157	.0796685	13.45	t=3.696
	L	30	.659989	.0613138	9.29	p=0.000

Nuklearna morfometrija - prediktori nepovoljnog razvoja bolesti

Univarijantne logističke regresione analize su izdvojile dva značajna prediktora pojave grupe L cirkularnost (Circ) (Wald=12,396 $p<0,0001$) i zaobljenost (Round) (Wald=9,317 $p<0,005$) (Tabela 22). Univarijantno značajni prediktori Circ i Round su stavljani u multivarijantni model.

Tabela 22. Logističke regresione analize i Omnibus Test za ispitivane morfometrijske parametre.

Univarijantne logističke regresione analize							
Variabla	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
						Lower	Upper
AREA	23,339	15,431	2,288	,130	1.368E10	,001	1.866E23
MEAN	-,021	,013	2,558	,110	,979	,954	1,005
Perim	,560	2,028	,076	,782	1,751	,033	93,299
Circ	34,665	9,846	12,396	,000	1.135E15	4.721E6	2.727E23
FERET	-1,551	4,957	,098	,754	,212	,000	3511,050
INTDEN	,018	,088	,043	,836	1,018	,857	1,210
ROUND	14,377	4,710	9,317	,002	1.752E6	171,597	1.798E10
MODE	-,020	,012	2,577	,108	,980	,957	1,004
Multivarijantna logistička regresiona analiza							
Circ	66.493	21.839	9.270	.002	7.545E28	1.943E10	2.929E47
Round	-22.042	11.813	3.482	.062	.000	.000	3.036
Omnibus Tests of Model Coefficients				Model Summary	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
Chi-square	29.879	Sig	p<0.0001		53.298	.392	.523

Daljom analizom podataka i primenom multivarijantne logističke regresione analize i Omnibus testa pokazano je da cirkularnost (Circularity) sa najvećom verovatnoćom u odnosu na druge morfometrijske parametre može odrediti klinički tok melanoma (Wald=9,270 $p<0,005$). U manjoj meri to može pokazati i parametar okruglost (Roundness). Promene vrednosti Circ uslovljavaju 52,3% promena odnosa verovatnoća za loš razvoj bolesti (grupa L) (Nagelkerke $R^2=0,523$).

Distribucija CD4

Testiranje CD4 između grupa D i L ne pokazuje značajnu razliku niti kod distribucije koncentracija na preparatima ($\chi^2=4,21$ $p=0,378$ n.s.), niti kod distribucije lokalizacija ($\chi^2=7,66$ $p=0,264$ n.s.). U grupi D ima više 1 (u tragovima) i 3 (malo), ali i kod D i kod L dominiraju 4 (umereno mnogo) (Tabela 23).

Tabela 23. Tabelarni prikaz distribucije koncentracije i lokalizacije CD4 pozitivnih ćelija.

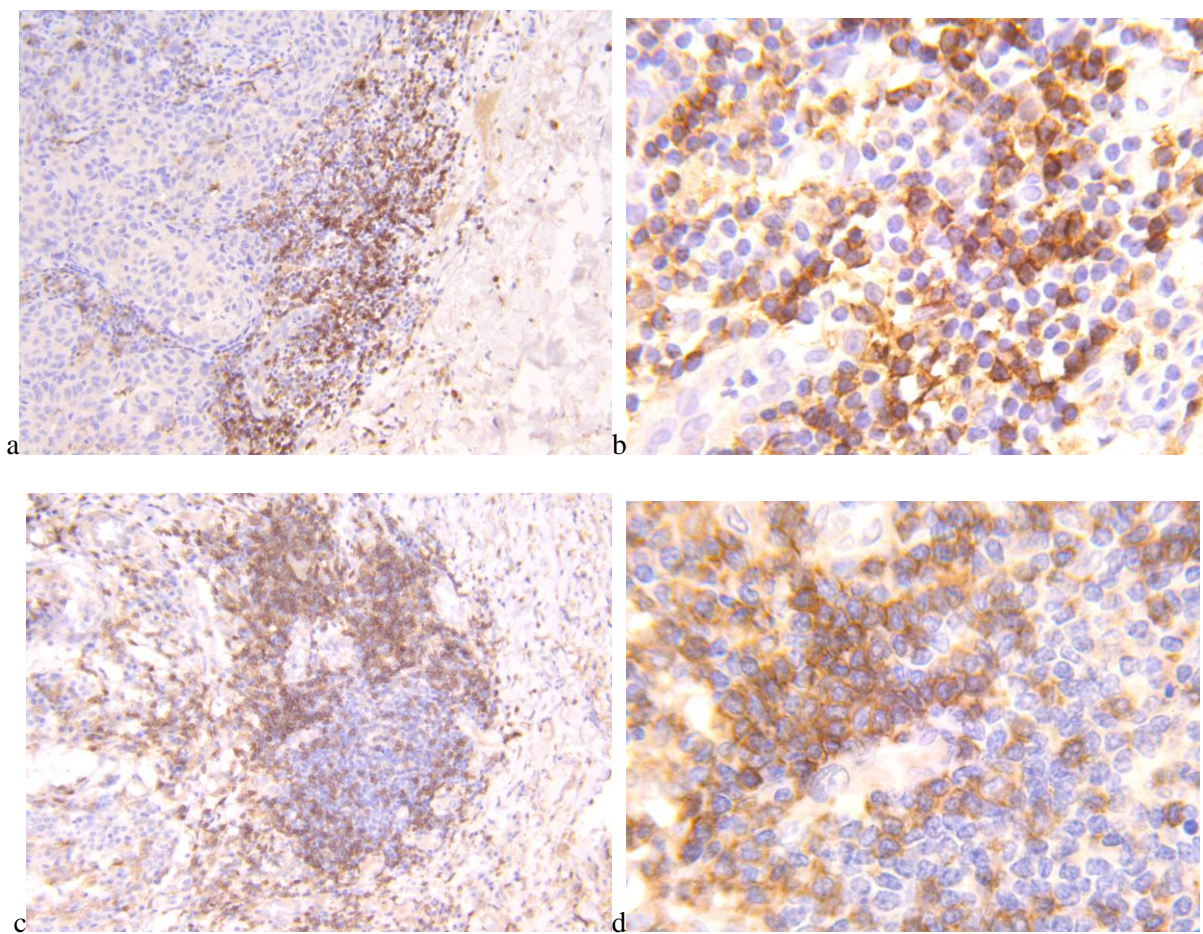
CD4	Koncentracija	P	B	L	S	PIV	G	Dif
D	1	0	0	0	0	0	14	0
	2	0	0	0	0	0	4	0
	3	3	0	4	4	2	0	14
	4	19	15	14	20	8	0	0
	5	2	2	0	1	1	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
L	1	0	0	0	0	0	8	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	5	3	0	0	7
	4	16	18	4	17	2	0	3
	5	2	1	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0

Napomena: 1 – u tragovima, 2 – vrlo malo, 3 – malo, 4 – umereno mnogo, 5 – mnogo, 6 – većina bojenih ćelija, P – peritumorski, B – bazalno u odnosu na tumor, L – limfocitna gnezda u tumoru, S – u stromalnim septama, PIV – peri i intravaskularno, G – gnezda tumorskih ćelija, Dif – difuzna distribucija.

Intenzitetom ++ bojile su se ćelije u grupi D na 22 preparata, a u grupi L na 28 preparata, dok su se intenzitetom +++ bojile ćelije u grupi D na 8 preparata, a u grupi L na 2 preparata. Distribucija intenziteta bojenja između D i L se značajno razlikuje ($\chi^2=4,32$ $p=0,038$), kao i struktura procentualne zastupljenosti ($\chi^2=17,02$ $p=0,00002$).

Tabela 24. Distribucija procentualne zastupljenosti CD4 pozitivnih ćelija.

	D	L
0-5%	0	0
6-25%	0	0
26-50%	4	19
51-75%	23	11
76-100%	3	0



Slika 25. Prikaz pozitivnog bojenja CD4. *Napomena:* a = uvećanje 200x kod pacijenta iz grupe „dobri“, b = Uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „dobri“, c = uvećanje 200 x kod pacijenta iz grupe „loši“, d = uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „loši“

Distribucija CD8

Testiranje CD8 između grupa D i L ne pokazuje značajnu razliku niti kod distribucije koncentracija na preparatima ($\chi^2=5,35$ $p=0,253$ n.s.), niti kod distribucije lokalizacija ($\chi^2=11,71$ $p=0,069$ n.s.). Kod dobrih ima više 1 (u tragovima), ali i kod D i kod L dominiraju 3 (malo) (Tabela 25).

Tabela 25. Tabelarni prikaz distribucije koncentracije i lokalizacije CD8 pozitivnih ćelija.

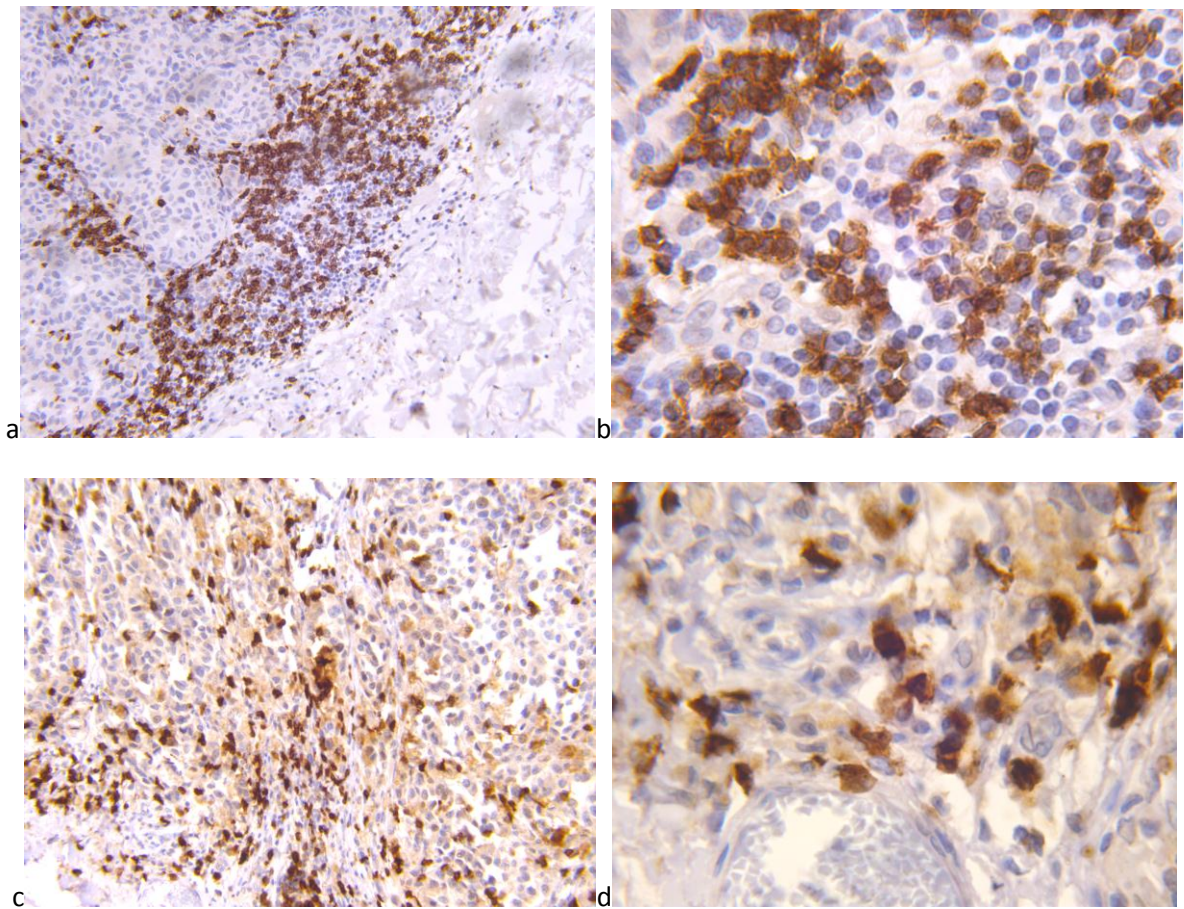
CD8	Koncentracija	P	B	L	S	PIV	G	Dif
D	1	0	0	0	0	0	12	0
	2	0	0	0	0	0	6	0
	3	16	14	13	18	10	0	12
	4	3	1	2	3	0	0	3
	5	1	0	1	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
L	1	0	0	0	0	0	7	0
	2	0	0	0	0	0	1	0
	3	15	19	8	17	1	2	11
	4	2	4	0	1	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0

Napomena: 1 – u tragovima, 2 – vrlo malo, 3 – malo, 4 – umereno mnogo, 5 – mnogo, 6 – većina bojenih ćelija, P – peritumorski, B – bazalno u odnosu na tumor, L – limfocitna gnezda u tumoru, S – u stromalnim septama, PIV – peri i intravaskularno, G – gnezda tumorskih ćelija, Dif – difuzna distribucija.

Intenzitetom ++ bojile su se ćelije u grupi D na 4 preparata, i u grupi L na 4 preparata, dok su se intenzitetom +++ bojile ćelije u grupi D na 26 preparata, i u grupi L na 26 preparata. Distribucija intenziteta bojenja između D i L se ne razlikuje, struktura procentualne zastupljenosti se značajno razlikuje ($\chi^2=23,09$ $p=0,00012$).

Tabela 26. Distribucija procentualne zastupljenosti CD8 pozitivnih ćelija.

	D	L
0-5%	0	1
6-25%	4	21
26-50%	22	8
51-75%	3	0
76-100%	1	0



Slika 26. Prikaz pozitivnog bojenja CD8. *Napomena:* a = uvećanje 200x kod pacijenta iz grupe „dobri“, b = Uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „dobri“, c = uvećanje 200 x kod pacijenta iz grupe „loši“, d = uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „loši“

Distribucija CD15

Testiranje CD15 između grupa D i L se značajno razlikuje ($\chi^2=12,83$ $p=0,012$) kod distribucije koncentracija na preparatima, ali ne i kod distribucije lokalizacija ($\chi^2=11,07$ $p=0,086$ n.s.). U grupi D javlja se dominantno koncentracija 3 (malo), a u grupi L značajno više 4 (umereno mnogo).

Tabela 27. Tabelarni prikaz distribucije koncentracije i lokalizacije CD15 pozitivnih ćelija.

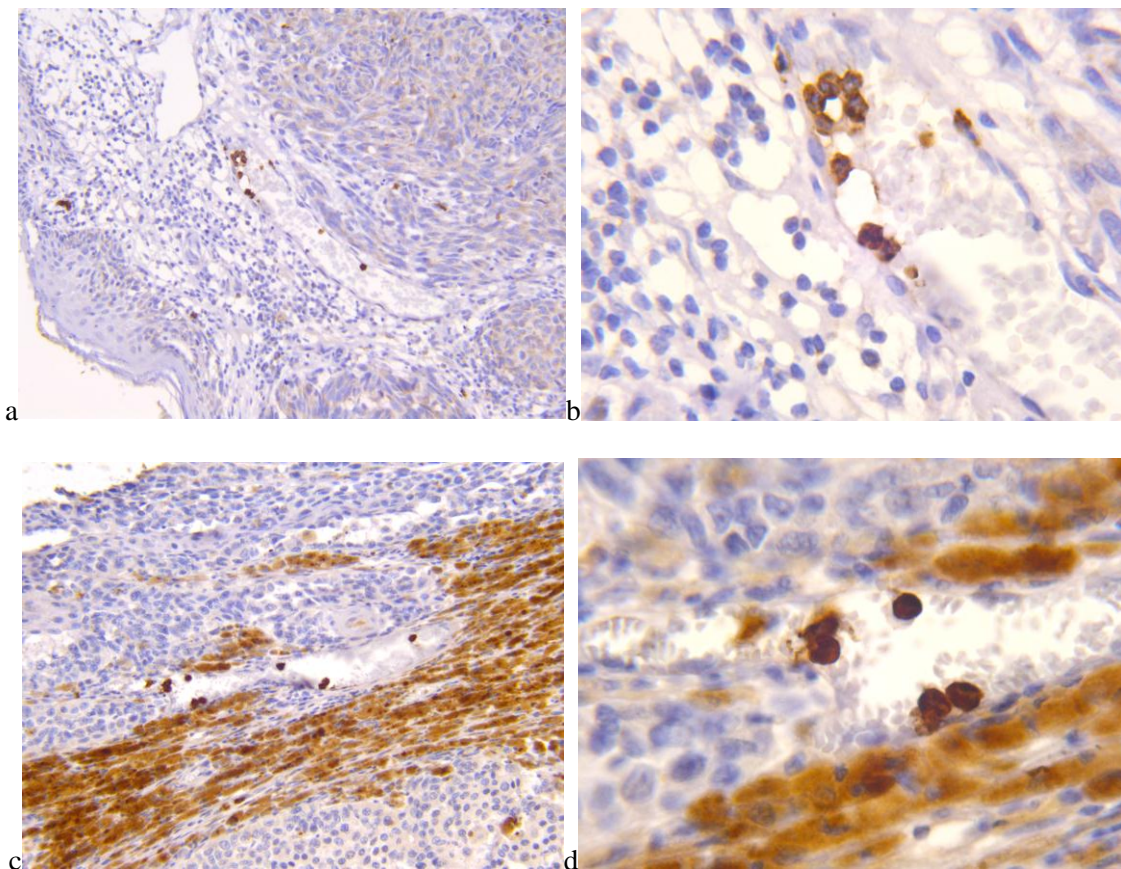
CD15	Koncentracija	P	B	L	S	PIV	U	Dif
D	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	3	0	3	6	2	2	13
	4	2	3	2	1	8	1	1
	5	1	1	0	0	20	1	0
	6	0	0	0	0	0	1	0
L	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	1
	3	3	1	1	1	2	1	8
	4	7	4	1	1	16	1	4
	5	6	4	4	2	3	3	1
	6	3	1	0	0	1	2	0

Napomena: 1 – u tragovima, 2 – vrlo malo, 3 – malo, 4 – umereno mnogo, 5 – mnogo, 6 – većina bojenih ćelija, P – peritumorski, B – bazalno u odnosu na tumor, L – limfocitna gnezda u tumoru, S – u stromalnim septama, PIV – peri i intravaskularno, U – ispod ulceracije, Dif – difuzna distribucija.

Distribucija intenziteta bojenja između D i L se ne razlikuje, a i brojčana struktura nije značajno različita ($\chi^2=7,63$ $p=0,267$ n.s.) (Tabela 28).

Tabela 28. Prosečna vrednost broja CD15+ ćelija na jednom vidnom polju (uvećanje 20x).

	D	L
0-2	1	1
3 do 6	11	4
7 do 10	8	9
11 do 20	3	5
21 do 40	3	6
41 do 80	1	4
81 i više	3	1



Slika 27. Prikaz pozitivnog bojenja CD15. *Napomena:* a = uvećanje 200x kod pacijenta iz grupe „dobri“, b = Uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „dobri“, c = uvećanje 200 x kod pacijenta iz grupe „loši“, d = uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „loši“

Distribucija CD117

Distribucija postojanja bojenja između grupa D i L je ista (i ne testira se), smanjenje intenziteta prebojenosti po dubini također nije značajno različito ($\chi^2=0,31$ $p=0,579$ n.s.).

Tabela 29. Postojanje prebojenja CD117 po grupama i smanjenja intenziteta po dubini.

	Grupa D		Grupa L	
	ne	da	ne	da
Bojenje	4	26	4	26
Smanjenje po dubini	12	14	14	12

Analiza procenta obojenih ćelija između grupa D i L ne pokazuje značajnu razliku ($\chi^2=1,87$ $p=0,759$ n.s.) (Tabela 29).

Tabela 30. Procenat imunoreaktivnih tumorskih ćelija.

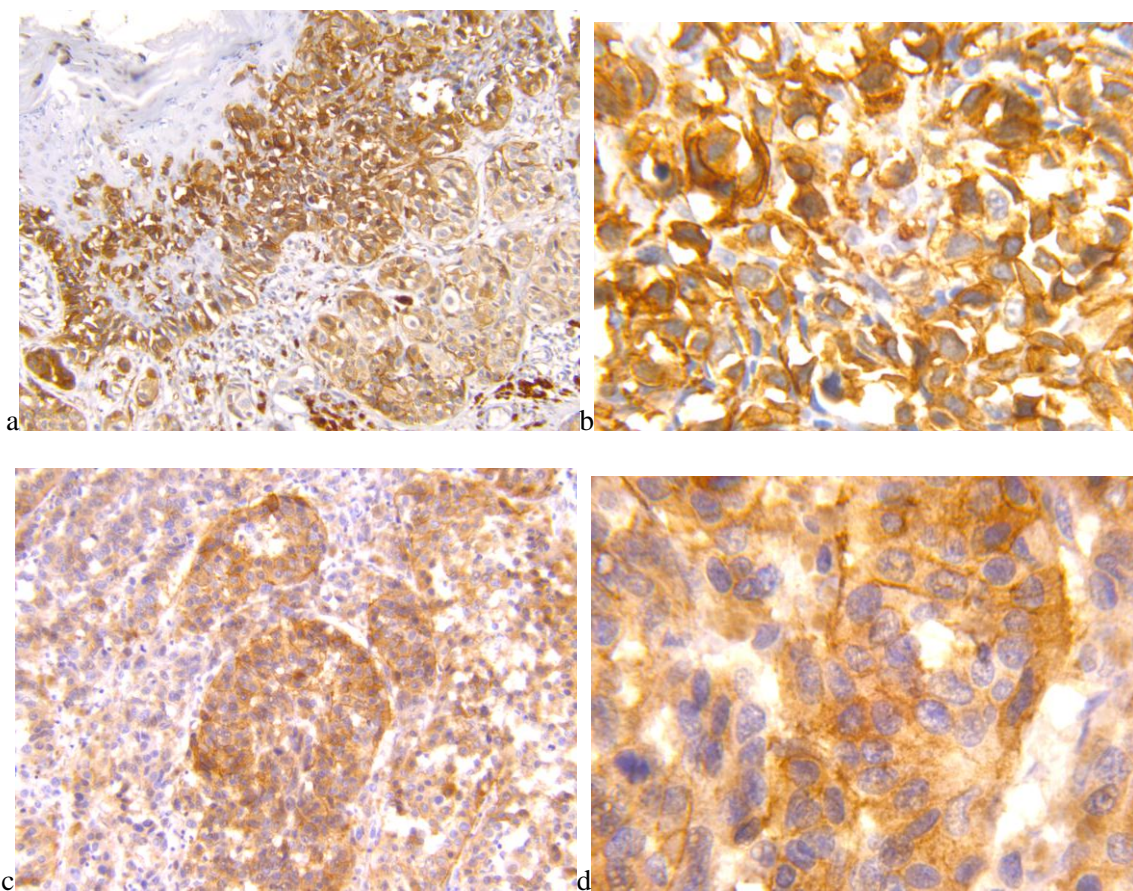
	0-5%	6-25%	26-50%	51-75%	76-100%
Grupa D	4	4	3	5	14
Grupa L	6	5	5	3	11

Testiranje obojenih ćelija između grupa D i L u odnosu na intenzitet bojenja nije značajno različito ($\chi^2=0,46$ $p=0,794$ n.s.), kao ni u odnosu na distribuciju procenata obojenih ćelija ($\chi^2=0,35$ $p=0,95$ n.s.) (Tabele 30 i 31).

Tabela 31. Tabela prikaz intenziteta prebojenja i procenta obojenih ćelija.

	Intenzitet bojenja	Procenat prebojenih ćelija			
		0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
Grupa D	1+	6	4	4	3
	2+	10	9	3	1
	3+	4	3	0	1
Grupa L	1+	5	8	2	0
	2+	6	4	3	2
	3+	3	2	1	1

Napomena: 1+ = slab intenzitet bojenja, 2+ = umeren intenzitet bojenja, 3+ = izražen intenzitet bojenja



Slika 28. Prikaz pozitivnog bojenja CD117. *Napomena:* a = uvećanje 200x kod pacijenta iz grupe „dobri“, b = Uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „dobri“, c = uvećanje 200 x kod pacijenta iz grupe „loši“, d = uvećanje 800x kod pacijenta iz grupe „loši“

Korelacije ispitivanih imunohistohemijskih parametara

Tabela 32. Međusobna korelacija ispitivanih imunohistohemijskih parametara.

		CD4	CD8	CD15	CD117B (+/-)
CD4	Pearson Correlation	1	.588**	.139	.132
	Sig. (2-tailed)		.000	.288	.313
	N	60	60	60	60
CD8	Pearson Correlation	.588**	1	.294*	.022
	Sig. (2-tailed)	.000		.022	.868
	N	60	60	60	60
CD15	Pearson Correlation	.139	.294*	1	-.069
	Sig. (2-tailed)	.288	.022		.598
	N	60	60	60	60
CD117B (+/-)	Pearson Correlation	.132	.022	-.069	1
	Sig. (2-tailed)	.313	.868	.598	
	N	60	60	60	60

Marker CD4 značajno korelira samo sa CD8, marker CD8 značajno korelira sa CD4 i CD15, ali CD4 i CD15 ne koreliraju međusobno. Sa CD 117 prethodni parametri ne koreliraju značajno (Tabela 32).

U testiranju između grupa za markere - CD4 i CD8 su značajno veći u grupi D. Kod markera CD15 su vrednosti veće kod grupe L, ali ne značajno (Tabela 33).

Tabela 33. Testiranje između grupa.

Grupa	N	Mean	Std. Deviation	CV	t-test / Mann-Whitney U	
CD4	D	30	6.680	2.6068	39.02	Z=2.637
	L	30	4.793	1.8251	38.08	p=0.008
4%	D	30	66.667	13.4762	20.21	t=6.160
	L	30	46.500	11.8285	25.44	p=0.000
CD8	D	30	3.973	1.4093	35.47	Z=2.650
	L	30	3.007	1.2334	41.02	p=0.008
8%	D	30	40.000	13.8340	34.59	Z=4.784
	L	30	24.167	8.5181	35.25	p=0.000
CD15	D	30	4.600	2.1432	46.59	Z=0.689
	L	30	6.500	5.0838	78.21	p=0.491
15#	D	30	12.1667	15.84643	130.24	Z=2.623
	L	30	19.3667	15.84730	81.83	p=0.009

Korelacija morfolometrijskih parametara sa imunohistohemijskim parametrima

Morfometrijski parametri ne koreliraju značajno sa ispitivanim imunohistohemijskim markerima. Jedina značajna korelacija je između zaobljenosti (Round) i CD117 (porast Round korelira sa negativnim vrednostima CD117).

Tabela 34. Tabelarni prikaz korelacije morfolometrijskih i imunohistohemijskih parametara.

		CD4	CD8	CD15	CD117B (+/-)
Area	Pearson Correlation	-.156	.055	.177	.061
	Sig. (2-tailed)	.235	.679	.176	.644
	N	60	60	60	60
Mean	Pearson Correlation	.132	.107	.161	-.176
	Sig. (2-tailed)	.313	.418	.220	.179
	N	60	60	60	60
Mode	Pearson Correlation	.129	.114	.155	-.186
	Sig. (2-tailed)	.325	.385	.236	.155
	N	60	60	60	60
Min	Pearson Correlation	.152	.112	.159	-.138
	Sig. (2-tailed)	.246	.396	.225	.291
	N	60	60	60	60
Max	Pearson Correlation	.111	.073	.155	-.195
	Sig. (2-tailed)	.399	.579	.236	.135
	N	60	60	60	60
Perim.	Pearson Correlation	-.089	.044	.106	.129
	Sig. (2-tailed)	.499	.739	.419	.325
	N	60	60	60	60
Circ.	Pearson Correlation	-.235	-.062	.236	-.220
	Sig. (2-tailed)	.071	.639	.069	.091
	N	60	60	60	60
Feret	Pearson Correlation	-.048	.050	.047	.194
	Sig. (2-tailed)	.713	.705	.724	.137
	N	60	60	60	60
IntDen	Pearson Correlation	-.049	.115	.215	-.032
	Sig. (2-tailed)	.707	.383	.099	.809
	N	60	60	60	60
Round	Pearson Correlation	-.215	-.091	.196	-.270*
	Sig. (2-tailed)	.100	.488	.134	.037
	N	60	60	60	60

Korelacija morfometrijskih parametara sa markerima po grupama

Korelacija morfometrijskih parametara sa ispitivanim imunohistochemijskim markerima u okviru ispitivanih grupa posebno pokazuje da CD4 i CD8 nemaju značajnu korelaciju sa ispitanim morfometrijskim parametrima kod obe grupe, CD15 korelira značajno sa nekoliko morfometrijskih parametara u grupi D dok CD117 ne korelira u grupi D (Tabela 35). U grupi L CD15 ne korelira, ali CD117 pokazuje značajnu negativnu korelaciju sa cirkularnosti (Circ) i zaobljenost (Round) (Tabela 36).

Tabela 35. Korelacija morfometrijskih parametara sa ispitivanim imunohistochemijskim markerima u grupi D.

		CD4	CD8	CD15	CD117B (+/-)
Area	Pearson Correlation	-.133	.243	.492**	-.005
	Sig. (2-tailed)	.485	.195	.006	.977
	N	30	30	30	30
Mean	Pearson Correlation	-.048	.104	.167	-.214
	Sig. (2-tailed)	.803	.585	.379	.255
	N	30	30	30	30
Mode	Pearson Correlation	-.054	.115	.181	-.222
	Sig. (2-tailed)	.776	.546	.337	.238
	N	30	30	30	30
Min	Pearson Correlation	-.025	.139	.207	-.212
	Sig. (2-tailed)	.895	.464	.272	.261
	N	30	30	30	30
Max	Pearson Correlation	-.062	.035	.105	-.207
	Sig. (2-tailed)	.744	.854	.581	.271
	N	30	30	30	30
Perim.	Pearson Correlation	-.123	.136	.330	.075
	Sig. (2-tailed)	.516	.473	.075	.693
	N	30	30	30	30
Circ.	Pearson Correlation	-.019	.211	.388*	-.238
	Sig. (2-tailed)	.921	.263	.034	.206
	N	30	30	30	30
Ferret	Pearson Correlation	-.081	.113	.183	.138
	Sig. (2-tailed)	.671	.551	.332	.469
	N	30	30	30	30
IntDen	Pearson Correlation	-.103	.254	.455*	-.108
	Sig. (2-tailed)	.587	.175	.012	.570
	N	30	30	30	30
Round	Pearson Correlation	-.077	.089	.396*	-.236
	Sig. (2-tailed)	.687	.638	.030	.210
	N	30	30	30	30

Tabela 36. Korelacija morfometrijskih parametara sa ispitivanim imunohistochemijskim markerima u grupi L.

		CD4	CD8	CD15	CD117B (+/-)
Area	Pearson Correlation	-.026	.023	.007	.125
	Sig. (2-tailed)	.891	.903	.969	.510
	N	30	30	30	30
Mean	Pearson Correlation	.222	-.051	.285	-.142
	Sig. (2-tailed)	.239	.789	.127	.455
	N	30	30	30	30
Mode	Pearson Correlation	.217	-.044	.266	-.156
	Sig. (2-tailed)	.249	.818	.155	.412
	N	30	30	30	30
Min	Pearson Correlation	.250	-.045	.238	-.072
	Sig. (2-tailed)	.182	.813	.206	.706
	N	30	30	30	30
Max	Pearson Correlation	.170	-.069	.329	-.194
	Sig. (2-tailed)	.370	.716	.076	.304
	N	30	30	30	30
Perim.	Pearson Correlation	-.033	-.017	.022	.178
	Sig. (2-tailed)	.862	.930	.907	.346
	N	30	30	30	30
Circ.	Pearson Correlation	-.019	.106	-.022	-.367*
	Sig. (2-tailed)	.922	.576	.909	.046
	N	30	30	30	30
Feret	Pearson Correlation	-.059	-.043	.013	.248
	Sig. (2-tailed)	.759	.823	.944	.186
	N	30	30	30	30
IntDen	Pearson Correlation	.066	-.041	.134	.063
	Sig. (2-tailed)	.730	.828	.480	.742
	N	30	30	30	30
Round	Pearson Correlation	-.008	.046	-.032	-.391*
	Sig. (2-tailed)	.968	.808	.865	.033
	N	30	30	30	30

Urađeno je upoređivanje pozitivnih ćelija za ispitivane markere (CD4, CD8, CD15) u i oko tumora (vrednosti P i B vs. vrednosti L, S, PIV, G/U, Dif iz Tabela 23, 25, 27) između grupa D i L. Kod kvantifikovanih peritumorski lokalizovanih ćelija postoji značajna razlika samo kod markera CD15. Upoređivanje kvantifikovanih intratumorskih imunohistochemijski pozitivnih ćelija se razlikuje značajno kod markera CD4 i CD8 dok se kod markera CD15 ne razlikuje (Tabela 38).

Tabela 37. Testiranje između grupa za intra i peritumorske imunohistohemijske pozitivne ćelije.

Grupa		N	Srednja vrednost	SD	cv
Peritumorski	D	30	2.77	1.382	49.89
CD4	L	30	2.63	1.450	55.13
Peritumorski	D	30	1.37	.964	70.36
CD8	L	30	1.50	1.009	67.27
Peritumorski	D	30	.63	1.129	179.21
CD15	L	30	2.47	2.432	98.46
Intratumorski	D	30	3.91	2.157	55.17
CD4	L	30	2.26	1.308	57.88
Intratumorski	D	30	2.61	1.150	44.06
CD8	L	30	1.54	.774	50.26
Intratumorski	D	30	3.97	1.732	43.63
CD15	L	30	4.03	3.557	88.26

Napomena: N = broj pacijenata, SD = standardna devijacija, cv = koeficijent varijacije

Tabela 38. Tabelarni prikaz upoređivanja intra i peritumorskih imunohistohemijski pozitivnih ćelija.

	Peritumorski			Intratumorski		
	CD4	CD8	CD15	CD4	CD8	CD15
Mann-Whitney U	443.500	419.000	252.000	238.500	190.000	341.500
Z	-.101	-.488	-3.185	-3.146	-3.898	-1.640
Asymp. Sig. (2-tailed)	.919	.625	.001	.002	.000	.101

Napomena: a. Grouping Variable: grupa

5. Diskusija

Epidemiološke karakteristike istraživanja

I pored napretka dijagnostike i terapije, kao i preventivnih mera, incidencija melanoma nastavlja da raste (87). Epidemiološko kretanje melanomske bolesti opisali su brojni autori (109-115). Rezultati ovog istraživanja su u velikoj meri u korelaciji sa podacima iz literature.

Među ispitivanim pacijentima (ukupno 466 koji su ispunili uslove istraživanja) za period 2002 – 2011. utvrđen je statistički značaj porasta broja novoobolelih (APC=10.06 $p=0,0007$) (Figure 1 i 2). Nije poznato da li se u ovim slučajevima radi o napretku u dijagnostičkom pristupu i ranom prepoznavanju melanoma, što uzrokuje porast broja na račun pacijenata koji ranije nisu adekvatno dijagnostikovani, ili se radi o stvarnom porastu broja novoobolelih tokom ovog perioda.

Analiza polne strukture novoobolelih bolesnika za period 2002 – 2011. pokazala je veći broj žena (muškarci vs. žene, 222 vs. 244). Ova razlika ipak nije značajna. Pronađen je značajan porast novoobolelih (APC=19.45 $p=0,0348$), kod muškaraca do 2009. godine, a onda dolazi do pada tog broja (koji nije signifikantan APC=10.03 $p=0,57$). Kod žena je do 2009. godine pronadjen je blaži porast broja novoobolelih, koji nije značajan (APC=4.38 $p=0,0755$), nakon toga počinje nagli porast (koji takođe nije signifikantan APC=20.42 $p=0,369$).

Analiza starosne strukture pokazala je da je kod pacijenata mlađih od 50 godina do 2004. godine pronadjen minimalan pad (skoro ravna linija APC=-2.82 $p=0,875$), a onda počinje blagi porast (koji nije signifikantan APC=6.07 $p=0,358$). Kod pacijenata starijih od 50 godina se do 2003. godine evidentira porast koji nije značajan (APC=31.38 $p=0,345$) a onda počinje značajan porast (APC=10.03 $p=0,041$). Sve ovo usmerava na zaključak da i u slučaju ove studije se melanom pokazuje kao bolest populacije starije srednje dobi i mlađe stare dobi.

Takođe, za period 2002 – 2011. učinjena je analiza distribucije lokalizacije primarne bolesti. Najviše slučajeva javilo se na leđima, a potom na nogama. S obzirom da se radi o delovima tela sa najvećom površinom ovi rezultati i jesu očekivani.

Učinjena je analiza postojanja ulceracije prilikom prve dijagnoze i javljanja recidiva bolesti, kao i praćenja broja umrlih kao posledice oboljenja. Paralelno je ispraćen broj novoobolelih u odnosu na pacijente sa i bez recidiva, i u odnosu na postojanje ulceracije. Kod nerecidivirajućih melanoma (pacijenti sa dobrom prognozom) je do 2004. godine pronadjen

blagi porast broja novoobolelih (APC=25.58 p=0,499) a onda počinje značajan porast (APC=12,02 p=0,042), što može govoriti u prilog tome da se tokom perioda nakon 2004. fokus u oblasti melanoma pomera u pravcu rane dijagnostike i primarne prevencije bolesti. Naravno, promene u domenu dijagnostike bile su praćene adekvatnim pristupom na polju proširene dijagnostike radi tačnog stadiranja bolesti, kao i u dokumentu terapijskog pristupa. U najvećem broju slučajeva kod primarnog melanoma najoptimalniji terapijski modalitet je adekvatna hirurška intervencija, prema onkološkim (AJCC, NCCN) principima za melanom. Kod recidivirajućih melanoma se do 2009. godine evidentira porast broja novoobolelih koji nije značajan (APC=9,11 p=0,198), a onda se registruje pad koji takođe nije signifikantan (APC=-9.65 p=0,827). Praćenje vremena pojave recidiva posle primarne dijagnoze pokazalo je da se dve trećine recidiva javi se u toku prve godine, a još trećina recidiva tokom naredne 4 godine.

Radi tačnije distribucije lokalizacije, starosne strukture pacijenata, polne i drugih struktura, kao i odnosa između ovih parametara na prostoru Istočne i Južne Srbije potrebno je sprovesti adekvatni sistematski i uniformizovani pristup epidemiološkoj i kliničkoj analizi pacijenata i bolesti.

Kliničkopatološke karakteristike

Kriterijumi kliničkopatološke analize postavljeni su na osnovu 7. izdanja The American Joint Committee on Cancer (AJCC) stejdžing sistema i na osnovu pređašnjih saznanja pokazano je da porast debljine primarne kožne promene direktno korelira sa preživljavanjem. Naime, melanomi debljine do 1mm imaju preživljavanje od 10 godina u 96% slučajeva, do 54% slučajeva za lezije >4mm. Takođe, postojanje ulceracije je negativni prognostički faktor (93, 292, 293, 295-303). Rezultati ove disertacije su u korelaciji sa podacima iz dostupne literature.

Postojanje metastatskih limfnih čvorova pri dijagnozi bolesti takođe ima svoj značaj. Postojanje mikroskopske bolesti limfnih čvorova vodi 10-godišnjem preživljavanju u 63% slučajeva, takođe dolazi do pogoršanja 5-godišnjeg preživljavanja za 10% sa porastom broja zahvaćenih limfnih čvorova, od 1 do 3 (93, 294). Satelitske kožne lezije smanjuju preživljavanje u sličnom odnosu kao i metastaze limfnih čvorova (306) (uz pogoršanje prognoze kod metastaza na plućima i daljim pogoršanjem kod zahvatanja bilo kojeg drugog organa) (93, 293).

Što se tiče karakteristika pacijenta, u literaturi postoje raznorodni podaci. Jedni autori ustanovili su da je uzrast nezavistan prognostički faktor, sa pogoršanjem ishoda povezanim sa povećanjem starosti (93, 307, 308). Drugi autori navode podatak da se melanom javlja uglavnom kod mlađih i sredovečnih osoba, sa linearnim povećanjem incidence nakon 25 godina starosti do 50 godina, kada počinje usporavanje incidence, naročito kod žena. Studije o razlikama među polovima pokazale su da je incidenca melanoma veća kod žena do 40 godina starosti, dok je nakon te dobi kod muškaraca skoro tri puta veća učestalost, do dobi od 75 godina (87, 110).

U ovoj studiji učinjena je analiza dobijenih podataka, a potom izvršena TNM klasifikacija pacijenata prema preporukama iz 7.izdanja AJCC za period 2002 – 2011. Potom je učinjeno kliničkopatološko stadiranje bolesti.

Potom je učinjena statistička obrada, gde je utvrđivana korelacija stadijuma T sa lokalizacijom primarnog tumora, pojavom recidiva i postojanjem ulceracije primarnog tumora. Pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija pojave recidiva i T4 stadijuma bolesti, što govori u prilog lošije prognoze u T4 stadijumu. Melanomi glave i vrata su pozitivno korelirali sa T stadijumima (T1-3) bolesti, dok je prednja strana trupa je korelirala sa T4 stadijumom. Lokalizacija na leđima korelirala je sa T1, T3 i T4 stadijumima, lokalizacija na ruci i nozi korelirala je sa stadijumima T1 i T3 odnosno T1 i T2, redom.

U analizi korelacije kliničkopatološkog stadijuma bolesti (I, II, III/IV) sa lokalizacijom primarnog tumora, pojavom recidiva i postojanjem ulceracije primarnog tumora pronađena je značajnost između I stadijuma i lokalizacije na glavi i vratu, leđima, ruci i nozi. Drugi stadijum bolesti korelirao je sa lokalizacijom na glavi i vratu i na leđima, kao i sa postojanjem ulceracije. Stadijum III/IV korelirao je sa lokalizacijom na glavi i vratu.

Ispitivanje korelacije pola i T stadijuma bolesti pokazala je korelaciju između ženskog pola i T1, T2, i T3 stadijuma, dok je muški pol korelirao sa T4 stadijumom melanoma, što ukazuje na to da su se ispitanice verovatno javljale lekarima u ranijim fazama bolesti.

Ispitivanje korelacije stadijuma bolesti sa polom pacijenta pokazala je korelaciju muškog pola sa I i II stadijumom, dok je ženski pol korelirao sa svim stadijumima bolesti.

Prognostički značaj kariometrijskih parametara

Nuklearna morfometrija je kao metoda našla svoje mesto u dijagnostičkom i diferencijalno dijagnostičkom polju patologije i samim tim hirurgije. Kao što je već navedeno, poznati su brojni parametri koji se, primenom naučnih i imunohistohemijskih metoda mogu kvantifikovati i, samim tim, analizirati (389).

Postoje brojna istraživanja na temu nuklearne morfometrije i melanoma kože. Podaci iz literature ukazuju na složeni varijetet dobijenih podataka, često kontradiktornih.

Talve i sar. u svom istraživanju ispitivali su kariometrijske parametre, mitotski indeks i ekspresiju p53 kod pacijenata sa melanomom. Oni su pokazali nezavisni prognostički značaj odnosa srednje nuklearne duge i kratke ose, dok srednja area nukleusa, mitotski indeks, i stepen ekspresije p53 nisu bili značajno udruženi sa preživljavanjem. U Cox proportional hazard modelu kao nezavisni prognostički parametri spomenuti su odnos srednje duge i kratke ose i debljina melanoma. Morfometrijski je pokazano da su jedra koja ekspimiraju p53 veća od p53 negativnih jedara (392).

Bjornhagen i sar. su analizirali PH isečke primarnih i metastatskih melanoma, poredeći nuklearnu morfometriju, DNK sadržaj i PCNA (nuklearni antigen proliferišućih ćelija). U ovoj studiji autori su Cox stepwise regresionom analizom utvrdili da velika varijabilnost nuklearne aree u prvim metastazama korelira sa povećanim preživljavanjem nakon rekurence, kao i sa preživljavanjem (393).

Acker i sar. su određivali više kariometrijskih parametara u cilju diferencijacije MIS (melanoma in situ) na suncem oštećenoj koži od hronične suncem oštećene kože (SDS - sun damaged skin). Koristeći višestruku analizu logističke regresije ispravno su klasifikovali 100% slučajeva korišćenjem broja melanocita na 0,5mm i maksimalnu nuklearnu areu melanocita podeljenu sa maksimalnom nuklearnom areom keratinocita (394). Williams i sar. su vršili diskriminaciju između benignih i malignih slučajeva kariometrijski, kao i određivanjem intenziteta bojenja S-100 i sadržajem DNK (395).

U studiji Mijović i sar. iz 2013. pokazana je značajna razlika između NM i SSM za nuklearnu areu, OD i perimetar. Mitotski indeks je pokazao značajnu korelaciju sa nuklearnom areom, perimetrom, i Feretovim dijametrom. Utvrđena je značajna razlika za OD i cirkularnost jedra u odnosu na Clark nivo između nivoa II i IV, dok za Breslow nivo nije

pronađena statistički značajna korelacija sa kariometrijskim varijablama. Značajno negativna korelacija je primećena između OD i ekspresije p53 i bcl-2, a značajna pozitivna između nuklearne cirkularnosti i intenziteta imunoreaktivnosti p53 (396).

Talve i sar. su upoređivali veličinu nukleusa sa debljinom melanoma kod euploidinih i aneuploidnih ćelija. Genetička nestabilnost aneuploidnih melanoma korelirala je sa debljinom melanoma. Ta korelacija u aneuploidnim melanomima delimično je objašnjavala odnos između nuklearne veličine i debljine melanoma (397).

U drugom radu Talve i sar. pokazali su da broj Ki-67 pozitivnih ćelija na 200 tumorskih ćelija nije korelirao ni sa jednim kariometrijskim parametrom, ali se približio (ali bez dostizanja) značajnoj korelaciji sa debljinom po Breslowu. Area nukleusa, kratka i duga nuklearna osa su korelirali sa debljinom melanoma, ali odnos nuklearnih oda (pokazatelj sferičnosti jedra) i debljina melanoma nisu pokazali značajnu korelaciju. Registrovani mitotski indeks je bio viši u debelim melanomima i kod melanoma sa visokom Ki-67 pozitivnošću, kod melanoma sa velikom areom nukleusa, dugačkom nuklearnom kratkom osovinom i malim odnosom nuklearnih osovina. Prema Coxovom postupnom modelu srazmernog rizika, debljina melanoma i odnos nuklearnih osovina predstavljali su značajne nezavisne prognostičke faktore za preživljavanje pacijenata. Ostalim ispitivanim faktorima nedostajala je statistička značajnost prognostičke vrednosti, što ukazuje na to da proliferativna aktivnost tumorskih ćelija ne objašnjava veliku važnost debljine tumora kao prognostičkog parametra kod melanoma (398).

Još jedna studija je rađena u svrhu procene nuklearne aree, odnosa nuklearnih osovina, perimetra i zaobljenosti (Roundness) nukleusa tumorskih ćelija sa i bez ekspresije Ki-67 antigena (pokazano imunohistohemijski korišćenjem MIB-1 antitela) u primarnom i metastatskom malignom melanomu kože. Takođe, ovi faktori su posmatrani u odnosu na dubinu tumora po Clarku i Breslowu. Registrovana je prosečna nuklearna area MIB-1 pozitivnih nukleusa značajno veća od one kod negativnih ($p < 0,0001$) i kod primarnog i metastatskog malignog melanoma. Nukleusi metastatskih ćelija melanoma su u poređenju sa primarnim melanomom imali veću areu i roundness, gde su pozitivna jezgra MIB-1 dodatno pokazala veći stepen polimorfizma njihove aree i oblika. Sa rastućom debljinom invazije prema Breslowu i povećanim Clarkovim nivoom, povećavala se i srednja nuklearna area tumorskih ćelija, a njihov oblik je postao okrugliji (Roundness) (399).

Schochlin i sar. su radi diferencijacije dezmoplastičnog (DM) od spindle – cell (SM) melanoma sprovedli morfometrijsku studiju poredeći vrednosti cirkularnosti i vršeci klasifikaciju u 4 kategorije oblika (vretenast, izdužen, ovalni, okrugli). Korišćenjem statističkih metoda pokazali su, pri značajnosti $p < 0,05$, značajne razlike u kategorijama vretenasti i okrugli, gde je DM sadržao više vretenastih, a SM više okruglih jedara. Oni su zaključno pokazali da se melanom vretenastih ćelija i dezmoplastički melanom značajno razlikuju u nuklearnoj morfologiji u odnosu na frakcije okruglih i vretenastih nukleusa (400).

U studiji Tan i sar. učinjena je karakterizacija prognostičkih parametara za kožni melanom stadijuma I. Karakterizacija parametara i statistička analiza pokazali su značajne razlike između dve kategorije ispitanika (dobre i loša prognoza) za ulceraciju ($P = 0,005$), indeks mitotske aktivnosti ($P = 0,006$), histološki tip ($P = 0,03$), nivo invazije prema Clarku = 0.004), Breslow debljinu tumora ($P = 0.003$), standardnu devijaciju indeksa nuklearne konture ($P = 0.04$) i koeficijent nuklearne korelacije ($P = 0.008$) (401).

Još jedan rad bavio se kariometrijskim parametrima kao markerima prognoze kliničkog toka bolesti. Pokazane su značajno veće vrednosti srednje nuklearne aree u površinskom sloju tumora u odnosu na areu dubokog sloja i kod dobre i kod loše prognoze. Odnos između nuklearne aree površinskog u odnosu na duboki sloj (indeks maturacije) nije se razlikovao između grupa sa dobrom i onih sa lošom kliničkom slikom. Međutim, zabeleženo je statistički značajno povećanje nuklearne aree nepreživelih i u površnom i u dubokom sloju u odnosu na odgovarajući sloj kod preživelih (51,1 mikrona² naspram 43,7 mikrona² površni sloj, $p < 0,01$ i 42,9 mikrona² naspram 36,4 mikrona², duboki sloj $p < 0,05$), što je autorima ukazivalo na uopšteno povećanje nuklearnih area u metastazirajućim tumorima. S druge strane koeficijent varijacije nuklearne aree [(standardna devijacija/srednja vrednost) x 100] nije bio različit između preživelih i nepreživelih, bilo u površnom niti u dubokom sloju. Takođe, registrovano je homogeno povećanje nuklearne aree u grupi nepreživelih, što govori o povećanju srednje nuklearne aree kod nepreživelih na osnovu tog homogenog porasta svih nukleusa u celom tumoru. Razlika u srednjoj nuklearnoj arei u površinskim i dubokim slojevima ukazuje na to da je pažljiv izbor nukleusa u bilo kom od ovih slojeva od suštinskog značaja za dobijanje reproduktivnih i uporedivih rezultata (402).

Publikacija Karjalainen pratila je ukupno preživljavanje pacijenata tokom 5 godina. Ono koje se odnosilo na bolest iznosilo je 76,4%. U univarijantnoj analizi faktori predikcije preživljavanja su bili TNM stepen ($p = 0,0001$), pol ($p = 0,0024$), indeks M/V ($p = 0,003$),

standardna devijacija faktora nuklearnog oblika ($p = 0,023$), MAI ($p = 0,02$), najkraća nuklearna osa ($p = 0,023$) i Breslow ($p = 0,044$). Multivarijantna analiza, uključujući kliničke, histološke i morfometrijske osobine, pokazala je dubinu Clark kao najvažniji prediktor preživljavanja ($p = 0,002$), dok ostale uključene varijable nisu imale nezavisnu prognostičku vrednost (403).

Radi razdvajanja benignih i malignih melanocitnih lezija sprovedena je analiza varijabli u površnim, srednjim i dubokim zonama svake lezije. Uz pomoć multivarijantne diskriminantne analize, postignuta je dijagnostička efikasnost i do 97% koevaluacijom varijabli za DNK mikrodensitometriju, kariometriju i AgNOR. Smatra se da bi se dijagnostička efikasnost od 100% mogla bi se postići ako bi se izvršila dalja koevaluacija sa MIB1-Ki67 imunoreaktivnošću (404).

U drugom istraživanju Mijović i sar. utvrđeno je da su 6 osobina značajno različite između benignih i malignih grupa ($P < .0001$). Od ispitivanih, sve merene nuklearne varijable (izuzev cirkularnosti) bile su veće kod melanoma. Nisu pronađene značajne razlike među lezijama u odnosu na nuklearni oblik. Autori su, koristeći analizu diskriminantne funkcije, postigli tačnu dijagnozu kod 95,8% benignih nevusa i 84,0% slučajeva melanoma. Najbolja diskriminantna varijabla u istraživanju bila je nuklearna area (405).

Analiza odnosa nuklearnog prečnika sa intenzitetom bojenja 5-hidroksimetilcitozina unutar lezijskih ćelija od strane Larson i sar. pokazala je značajnu korelaciju između većeg nuklearnog prečnika i smanjenih nivoa 5-hidroksimetilcitozina. Štaviše, borderline lezije jedinstveno su pokazale raznovrstan spektar bojenja svakog pojedinačnog slučaja. Ova studija dalje potvrđuje asocijaciju gubitka 5-hidroksimetilcitozina sa displastičnim citomorfološkim osobinama i progresijom tumora i podržava klasifikaciju bordeline lezija kao biološki različitih kategorija melanocitnih lezija (406).

U prognostičkom delu ove studije bilo je ukupno 60 pacijenata, koji su podeljeni u dve grupe od po 30. Klasifikovana je grupa D („dobri“) sa dobrom i L („loši“), sa lošom prognozom, prema parametrima propisanim u poglavlju pacijenti i metode. Te grupe sastojale su se od 24 pacijentkinja i 36 pacijenata (40 vs. 60%) Rodna struktura se u ovom istraživanju i pored nejednakih vrednosti nije pokazala kao statistički značajna.

Prosečna starost ovih ispitanika iznosila je 58.43 ± 10.64 godina, gde je prosečna starost žena i muškaraca iznosila redom 56.79 ± 10.12 i 59.53 ± 10.97 godina. Registrovana prosečna razlika od 2,7 godina nije predstavljala statistički značajnu razliku ($t=0,961$ $p>0,05$).

Prosečna starost u okviru grupa D i L u okviru polova, kao i u celini nisu značajno različite, tako da se u grupi ispitanika ove studije radi o homogenoj populaciji ispitanika.

Dve trećine pacijenata je bilo starosti 51-70 godina, u grupi D dominantna starost iznosila je 51-60, a u grupi L 61-70 godina, varijacija u starosti nije statistički značajna ($\chi^2=5,24$ $p=0,264$ n.s.).

U grupi D dominantna lokacija javljanja tumora bila je noga, a zatim leđa, u grupi L dominantna lokacija su leđa, same varijacije u distribucijama lokacija nisu statistički značajne ($\chi^2=6,26$ $p=0,181$ n.s.).

Debljina Breslow se, u skladu sa podacima iz dostupne literature, pokazala stabilnim prognostičkim parametrom, u grupi D vrednost Breslow je dominantno iznosila 1 ili 2, dok se u grupi L dominantno javljala vrednost 3 i 4. Razlika distribucije debljine Breslow između grupa D i L je visoko značajno različita ($\chi^2=22,40$ $p=0,00005$). Faktor ulceracije se takođe javlja kao visoko značajni prognostički faktor. Naime, razlika u javljanju ulceracije između grupa D i L veća od dvostruke i statistički je visoko značajna ($\chi^2=8,15$ $p=0,004$). Takođe javljanje ulceracije po različitim kategorijama Breslow je takođe statistički značajno različita između grupa D i L ($\chi^2=9,70$ $p=0,021$).

Kariometrijski su analizirane prethodno formirane grupe, prema propozicijama iz poglavlja Pacijenti i metode. Praćen je prognostički značaj 11 kariometrijskih parametara. Za dva parametra, cirkularnost (Circularity) ($t=5,194$ $p<0,001$) i zaobljenost (Roundness) ($t=3,696$ $p<0,0001$), nađena je statistički značajna razlika između grupa D i L. U grupi L ispitanika vrednosti ova dva parametra su visoko značajno veće. Između grupa postoje i razlike kod ostalih parametara, ali u opsegu koji nije statistički značajan.

Takođe postoji i korelacija između vrednosti pojedinih parametara u skupu svih pacijenata $N=60$. U svim slučajevima se radi o pozitivnoj korelaciji, osim u odnosu Round. i Circ. prema Feret, gde se radi o obrnutoj srazmernosti.

U univariјantnoj logističkoj regresionj analizi izdvojena su dva značajna prediktora loše prognoze: Circ (Wald=12,396 $p<0,0001$), i Round (Wald=9,317 $p<0,005$). U

multivarijantnoj logističkoj regresionoj analizi kao jedini značajni prediktor loše prognoze je Circ. (Wald=9,270 $p < 0,005$). Promene vrednosti Circ. uslovljavaju 52,3% promena odnosa verovatnoća za loš razvoj bolesti (grupa L) (Nagelkerke $R^2 = 0,523$). To znači da kad sumnjamo na loš razvoj bolesti najsigurniji pokazatelj je Circ. i ako je on veliki onda je gotovo izvesno da će bolest poći u lošem pravcu. U nešto manjoj meri postoji sumnja ako ima porasta kod Round.

Prognostički značaj imunohistohemijskih parametara

Značaj infiltracije T ćelijama je prepoznat od mnogih autora. Analiziranje T ćelija direktno iz mikrookruženja melanoma, kao i priroda mikrookruženja sama, je centralna za razumevanje ključnih nizvodnih mehanizama za tumorski "beg" (407). Međutim u podacima iz dostupne literature naišlo se na varijetet podataka vezanih za infiltraciju CD4 i CD8 pozitivnim ćelijama. Sa druge strane, u nama dostupnoj literaturi nije pronađen veliki broj radova vezanih za infiltraciju melanoma kože CD15 pozitivnim ćelijama.

Jedna analiza podataka iz prospektivnog, randomizovanog ispitivanja obuhvatila je pacijente sa kožnim melanomom debljine veće/jednake 1,0 mm Breslow, kod kojih je učinjena široka lokalna ekscizija i biopsija sentinel limfnog čvora (SLN). Izvedene su univarijantne i multivarijantne analize za određivanje faktora povezanih sa TIL (tumor infiltrirajući limfociti) odgovorom, preživljavanjem bez bolesti (disease-free survival - DFS) i ukupnim preživljavanjem (overall survival - OS). Bilo je uključeno ukupno 515 pacijenata; TIL odgovor je klasifikovan kao "brzi" ili "ne-brzi". Pacijenti u grupi TIL grupe koja nije „brza“ imala je veću verovatnoću da imaju tumor pozitivne SLN (17,6% u odnosu na 7%, $P = 0,0087$). Na multivarijantnoj analizi, "ne-brzi" TIL-odgovor, povećana debljina tumora i ulceracija bili su značajni nezavisni prediktori tumor-pozitivnog SLN-a. Prema Kaplan-Meierovoj analizi, stopa 5-godišnjeg DFS je bila 91 procenat za osobe sa „brzim“ TIL odgovorima u poređenju sa 86 procenata u grupi koja nije „brza“ ($P = 0,41$). Petogodišnja stopa OS bila je 95% u odnosu na 84% u „brzim“ odnosno „nebrzim“ TIL grupama, redom ($P = 0,0083$). Međutim, na multivarijantnoj analizi, TIL odziv nije bio značajan nezavisan faktor koji predviđa DFS ili OS. TIL odgovor je značajan prediktor SLN metastaza, ali nije glavni prediktor DFS ili OS (408).

Značaj CD4 i CD8

Eksperimenti deplecije ukazuju da su i CD4+ i CD8+ T limfociti bili potrebni tokom efektorne faze antitumorskog odgovora. Stoga, dizajniranje strategija usmerenih na rendering melandoma-infiltrirajućih dendritičnih ćelija vidljivih T domaćim ćelijama može povećati spontani imunitet protiv tumora (409). Postoje i rezultati koji su govorili da je spontana regresija ljudskih tumora kože verovatno imunološki posredovana i da CD4+ T limfociti izgleda da posreduju ovu regresiju (410). Prolazno smanjenje T ćelija kod pacijenata sa karcinomom može poremetiti homeostatičku kontrolu srodne imunosti i omogućiti širenje

efektorskih T ćelija sa specifičnostima protiv neoplastičnih ćelija. Nekoliko agenasa koji dovode do smanjenja T ćelija je klinički dostupno (411).

Fortis i sar. sproveli su istraživanje u cilju ispitivanja mogućih karakteristika koje kombinuju imunski-vezanu gensku ekspresiju i limfocitnu infiltraciju. Pokazano je da tumori koji istovremeno izražavaju niske nivoe *Tnf-a*, *Pd-1*, IL-10, IL-1ra, *Ccl5*, *Ido*, visoki IL-9, sa niskom infiltracijom CD45+, CD3+, CD4+ i CD8+ ćelija i visok CD4+/CD8+ T ćelijski odnos pokazuju najagresivnije karakteristike rasta. Ovi rezultati podupiru kocept da intratumorska imunološka mreža oblikuje agresivne fenotipove melanoma (412).

T ćelije u tumorima - takozvani tumor infiltrišući limfociti (TIL) intenzivno su proučavani tokom godina. Ubedljivi dokazi ukazuju na klinički značaj velikog broja T ćelija na mestu tumora, sa CD8 memorijskim T-ćelijama, kao ključnim imeniteljem ukupnog preživljavanja (OS) kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (CRC), ali i kod drugih solidnih karcinoma. Ovi podaci idu ruku pod ruku sa studijama klonaliteta TIL pokazujući da su T ćelije među TIL klonalno ekspandirane, a takođe i da su tumor specifične T ćelije CD4, kao i CD8 obogaćene na mestu tumora. Mikrookruženje tumora je neprijateljsko prema T ćelijskoj funkciji npr. zbog ekspresije enzima koji umanjuju triptofan i arginin, visoke koncentracije laktata koju izlučuje tumor i prisutnih urođenih ćelija ili regulatornih T ćelija sa supresivnom aktivnošću. Analize specifičnosti TIL u melanomu pokazuju da je tek nekoliko poznatih antigena ustvari prepoznato u tim kulturama naglašavajući pacijentove jedinstvene i/ili mutirane antigene koji mogu predstavljati važnu metu za prepoznavanje (413).

U studiji Diem i sar. rađena je karakterizacija TIL u primarnim melanomima i odgovarajućim metastazama limfnih čvorova pacijenata tretiranih inhibitorom kontrolne tačke ipilimumabom. Kontrolisana je ekspresija CD3, CD4 i CD8 kod tretiranih pacijenata. Kod respondera se javila CD4 i CD8 invazija u svim metastazama limfnih čvorova, kod non-respondera se nije javila infiltracija TIL. Razlika u postojanju infiltracije je bila statistički značajna. Dobijeni podaci ukazivali su na korelaciju između infiltracije metastaza limfnih čvorova T ćelijama u melanomu III stadijuma i odgovora na ipilimumab kada ovi pacijenti napreduju do stadijuma IV bolesti (414).

Rezultati Spranger i sar. tvrde da su glavni imunosupresivni putevi, indolamin-2,3-diooksigenazni (IDO), PD-L1/B7-H1 i FoxP3(+) regulatornih T ćelija (Tregs), bazično pokretani od strane imunog sistema, a ne da su orkestrirani od ćelija raka, i impliciraju da bi pristupi imunoterapiji kancera usmereni na negativne regulatorne imunološke kontrolne tačke

mogli biti posebno korisni za pacijente sa već postojećom T ćelijskom inflamiranom tumorskom mikro-sredinom (415). Patološke analize nakon tretmana prethodno postojećih tumora otkrile su linearnu korelaciju između tumorske nekroze i odnosa intra-tumorskih CD8+ efektorskih ćelija prema FoxP3+ regulatornim ćelijama (Tregs). Efektivni imunitet protiv tumora i ozbiljna autoimunost mogu biti razdvojeni. Dalja ciljanja anti-tumorskih T(regs) u kombinatorijalnim terapijskim pristupima mogu biti dobra osnova za buduća istraživanja (416).

Demonstrirano je da topikalna primena tretinoin masti (atRA kao aktivni sastojak) efikasno inhibira rast melanoma B16F10. Ovo je praćeno vidno poboljšanim odgovorom CD8+ T ćelija, što je potvrđeno značajno povećanim iznosom efektornih CD8+ T ćelija. Topikalni atRA tretman promovirao je diferencijaciju efektornih CD8+ T ćelija u odvodnim limfnim čvorovima (draining lymph nodes DLN) miševa sa tumorima. Interesantno, atRA nije uticala na tumorski CD4+ T ćelijski odgovor, pa je čak i inhibirala diferencijaciju interferon- γ -ekspimirajućih T helper tip 1 ćelija u DLN. Pokazano je da je tumor-inhibišući efekat atRA delimično zavisio od CD8+ T ćelija, pošto je smanjenje broja CD8+ T ćelija dovelo do obnavljanja volumena tumora kod miševa tretiranih sa atRA, iako je on i dalje bio značajno manji od onog kod miševa tretiranih sa vazelinom (417).

Van Houdt i sar. su u svojoj studiji istražili da li je prisustvo specifičnih populacija TIL u dijagnostičkim biopsijama primarnih melanoma povezano sa ishodom kod pacijenata sa melanomom kliničkog stadijuma II. Pored toga, ispitali su da li prisustvo TIL korelira sa ekspresijom MHC klase I antigena i MHC klase II antigena na tumorskim ćelijama i/ili na tumor infiltrišućim antigen prezentujućim ćelijama. Pozitivni klinički ishod je bio jako povezan sa prisustvom GrB+ i CD4+ TIL, sa ekspresijom MHC klase I antigena na tumorskim ćelijama i sa ekspresijom antigena MHC klase II na intratumorskim antigen prezentujućim ćelijama. Ovi podaci su podržavali ideju da je kod pacijenata sa melanomom ćelijski imuni odgovor glavni faktor u sprečavanju diseminacije ćelija melanoma (418). U publikaciji Donia i sar. spomenuta je i uloga pojedinačnih frakcija TIL u mehanizmu imunološkog „izbegavanja“. Oni su u svom modelu došli do novog mehanizma imunološkog izbegavanja, koji može biti aktiviran aberantnom ekspresijom molekula MHC klase II. Ona, privlačeći tumor specifične CD4+ T ćelije, izaziva lokalni inflamatorni odgovor, u kojem dominira TNF. TNF inhibira citotoksični CD8+ T ćelijski odgovor (419).

Haymaker i sar. pokazali su ulogu Grail (Gene related to anergy in lymphocytes) u razumevanju imunološke tolerancije. Ekspresija E3 ubikvitin ligaze Grail je ushodno regulisana u CD8+ T ćelijama koje su infiltrisane u transplantirane limfomske tumore, a nedostatak Grail daje dugotrajnu kontrolu tumora. Što znači da gubitak Graila povećava anti-tumorsku reaktivnost i funkcionalnost CD8+ T ćelija i pokazano je da je Grail verovatno jedan od ključnih faktora koji kontrolišu funkciju CD8+ T ćelija i potencijalni cilj za poboljšanje njihove citotoksične aktivnosti (420).

U radu Al-Batran i sar. registrovana je značajna korelacija između ekspresije MHC klase I i prisustva CD4+ i CD8+ T ćelija ($P < 0,0001$). Postojala je jaka veza između ove dve promenljive u odnosu na gustinu i raspodelu infiltrišućih T ćelija i obrazac ekspresije MHC klase I (fokusno nasuprot homogenom). Intratumorska T-ćelijska infiltracija je blisko korelirala sa ekspresijom MHC klase I, ali ne sa ekspresijom antigena diferencijacije, antigena povezanih sa rakom ili molekula MHC klase II (421).

Hernberg i sar. su procenjivali promene aktivnosti proliferacije i odnosa CD4+/CD8+ u toku bolesti. Većina pacijenata sa smanjenim odnosom CD4+/CD8+ imala je i povećanu p53 imunoreaktivnost (422).

Ekspерименти na miševima pokazali su da se određeni veliki tumori mogu lečiti kombinacijom tumor specifičnih CD8+ i CD4+ T ćelija. Pored toga, ponovljeni tumori su pokazali smanjenu Ag ekspresiju, koja je bio praćena konverzijom terapijske tumor-specifične CD4+ T ćelijske populacije u Foxp3+CD4+ T regs ćelijsku populaciju (423).

Wilmott i sar. pokazali su uz pomoć kontrole koncentracije CD4+ i CD8+ limfocita da povećanje tumor infitrišućih limfocita indukovano tretmanom inhibitorima BRAF-a pruža snažnu podršku za sprovođenje ispitivanja koja kombinuju BRAF inhibitore sa imunoterapijom u nadi za produženim kliničkim odgovorom. U njihovom istraživanju u tretiranim slučajevima dolazilo je do smanjenja ispitivanih neresektabilnih tumora i povećanja nekroze u posttretmanskim biopsijama (424).

Dvostruko pozitivne (DP) CD4CD8 Talphabete ćelije su nađene kod normalnih pojedinaca, kao i u različitim patološkim uslovima uključujući inflamatorne bolesti, virusne infekcije i rak, ali njihova funkcija ostaje nejasna. U zaključku je postulirano da, prema njihovoj širokoj tumorskoj reaktivnosti i njihovom prvobitnom profilu citokina, tumor-asocirane DP T ćelije mogu učestvovati u imunskom odgovoru na tumore *in vivo*. Zbog toga

će prisustvo ovih ćelija i njihova uloga verovatno biti značajni za rešavanje kod pacijenata sa karcinomom, naročito u kontekstu imunoterapije (344).

Davanje tremelimumaba bilo je povezano sa masivnim intratumorskim infiltratima CD8+ CTL (Cytotoxic T lymphocytes) kod pacijenata sa regresirajućim tumorima, ali je imala različite efekte na intratumoralne infiltrate CD4+ i FoxP3+ ćelije ili intratumorsku ekspresiju IDO (425).

U istraživanju kod vitiliga rezultati Dwivedi i sar. sugerisali su da bi neravnoteža odnosa CD4+/CD8+ i broj i funkcija prirodnih Treg mogli biti uključeni u patogenezu GV (generalizovani vitiligo) i njegovu progresiju posredovanu T ćelijama (426).

U radu Gadiot i sar. nađeno je u primarnom i metastatičnom melanomu 40% uzoraka tumora koji sadrže TIL infiltrate. Analiza za CD8, CD4 i FoxP3 otkrila je da 52% ima većinu CD8 pozitivnih TIL, dok samo 3% tumora ima uglavnom CD4 pozitivne TIL. Preostalih 45% tumora pokazalo je uporedive brojeve CD4 i CD8 T ćelija. Analizirani su i dodatni imunološki markeri za koje se smatra da su u korelaciji sa boljem prognozom (TIL infiltracija) ili lošijom prognozom (Treg infiltracija, TGF- β ekspresija i gubitak MHC) u kohorti pacijenata sa melanomom. Nijedan od ovih imunoloških parametara nije pokazao bilo kakvu povezanost sa ishodom pacijenta u ispitivanom uzorku (427).

U meta-analizi Gooden i sar. cilj je bio uspostavljanje udruženih procena za ishode preživljavanja zasnovane na prisustvu TIL kod karcinoma. Zaključeno je da svaka buduća istraživanja treba pažljivo osmisliti, kako bi se sprečilo precenjivanje efekta TIL na prognozu. U ovom kontekstu, odnosi između TIL podskupova mogu biti informativniji (428).

U radu Park i sar. iz 2017. navodi se da je prisustvo TIL je povoljan prognostički faktor kod kožnog melanoma, ali da je njihov kliničkopatološki značaj u intratumorskom odeljku u poređenju sa peritumorskim delom nejasan. Istraživan je kliničko-patološki značaj TIL i limfocitnog skora u intra- i peritumorskim odeljcima kod 177 korejskih pacijenata koji su podvrgnuti hirurškoj eksciziji kožnog melanoma. Prisustvo limfocita i visoki limfocitni skor u intratumorskim i peritumorskim kompartmanima je po autorima validni prognostički faktori kod kožnog melanoma (429). Azimi i sar. zaključili su da je TIL gradus je nezavisan prediktor preživljavanja i SLN statusa kod pacijenata sa melanomom. Pacijenti sa izraženim TIL infiltratom imaju odličnu prognozu (430). Podaci iz disertacije su u delimičnoj saglasnosti sa ovim podacima.

Dostupni podaci o CD4 T ćelijama su više dubiozni, što bi moglo biti uzeto kao podrška konceptu da su CD4 T ćelije plastičnije i igraju dvostruku ulogu; tako da se CD4+ T ćelije mogu pretvoriti iz antitumorskih u protumorske (431, 432). Neke studije su bile detaljnije u smislu podtipova T ćelija, a prikupljeni podaci koje su opisali Fridman i kolege pokazuju da su CD8/CD45RO i Th1 T ćelije utvrđeni kao pozitivan prognostički faktor u većini većina studija (433).

U ovome je verovatno razlog da je prognostički značaj CD4 T ćelija kontroverzan - bez obzira na podtip - uprkos brojnim i prilično velikim studijama (433).

CD4+ T ćelije u mnogim slučajevima neće moći da prepoznaju ćelije raka direktno zbog nedostatka MHC klase II na većini (čvrstih) karcinoma. Očigledno, hematološki maligni tumori predstavljaju izuzetak, jer mnogi ćelijski tipovi imunog sistema mogu eksprimirati molekule klase II, npr. B i T ćelije. Međutim, čvrsti tumori mogu eksprimirati molekule klase II konstitutivno, kao preko 40% melanoma (434) ili nakon indukcije sa IFN-gama.

U podacima o ljudskim tumorima iz nekoliko studija pokazano je da su TIL klonalno ekspandirani. U tom smislu, prisutnost ekspandiranih klonotipova T ćelija pokazano je u melanomu (435, 436), a ovi nalazi potkrepljeni su i od drugih.

U ovoj disertaciji distribucija CD4 pozitivnih ćelija ne pokazuje statistički značajnu razliku između kategorija D i L, ni kod koncentracijske ($\chi^2=4,21$ $p=0,378$ n.s.), niti kod prostorne distribucije ($\chi^2=7,66$ $p=0,264$ n.s.). U grupi D zastupljene su koncentracijske grupe „u tragovima“ i „malo“, ali i kod D i L dominira grupa „umereno mnogo“. Distribucija intenziteta prebojenosti, pokazuje da je u 22 slučaja intenzitet prebojenosti „umeren“ u grupi D, prema 28 slučaja „umeren“ u grupi L, a razlika između grupa je statistički značajna ($\chi^2=4,32$ $p=0,038$). Razlika u procentualnoj zastupljenosti pozitivnih ćelija u grupama D i L pokazala je statističku značajnost ($\chi^2=17,02$ $p=0,0002$).

Testiranje CD8 između grupa D i L ne pokazuje značajnu razliku niti kod koncentracijske ($\chi^2=5,35$ $p=0,253$ n.s.), niti kod prostorne distribucije ($\chi^2=11,71$ $p=0,069$ n.s.). U grupi D od koncentracijskih grupa ima više „u tragovima“, ali i kod D i kod L dominiraju „malo“. Distribucija intenziteta prebojenosti između D i L je ista (nije testirana), a procentualna struktura se značajno razlikuje ($\chi^2=23,09$ $p=0,00012$).

Značaj CD15

Krvne i tumor – infiltrišuće mijeloidne ćelije (Lin(-)CD11b(+)) se mogu fenotipno i morfološki razvrstati u monocite/makrofage, neutrofile, eozinofile i nezrele mijeloidne ćelije, u skladu sa ekspresijom markera(CD14+), CD14(-) CD15(hi), CD14(-)CD15(int) i CD14(-)CD15(-), redom). Osim toga, MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) populacija je takođe CD15 pozitivna.

Gros i sar. su kontrolišući krv pacijenata sa melanomom u poređenju sa zdravim donorima nisu našli razlike u učestalosti i fenotipu mijeloidnih subsetova. Mijeloidne ćelije su predstavljale 12% živih ćelija u suspenzijama ćelija melanoma i bile su fenotipski raznovrsne sa visokom varijabilnošću između tumora. Zanimljivo je da je pronađena pozitivna povezanost između procenta Tregs-a i granulocitnih ćelija (Lin(-) CD11b(+) CD14(-) CD15(+)) koje infiltrišu tumor melanoma. Međutim, melanom infiltrišuće mijeloidne ćelije pokazale su umanjenu supresiju nespecifične proliferacije T ćelija u poređenju sa mijelodnim ćelijama periferne krvi, u kojima su monociti i eozinofili supresivni. Dobijeni podaci ukazuju na izgleda daleko manju supresivnu funkciju MDSC kod pacijenata sa melanomom od one zasnovane na modelima tumora kod miševa (437). Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) su heterogena populacija nezrelih dendritičnih ćelija, makrofaga i granulocita. Kod pacijenata sa rakom, ove ćelije se akumuliraju u mikrookruženju tumora, drenažnim limfnim čvorovima iz tumora, perifernoj krvi i jetri, a njihovi brojevi su u korelaciji sa stadijumom bolesti i metastatskim bolestima (438).

Postoji studija koja izveštava o povećanju ćelija sa fenotipom Mo-MDSC i ćelija sa fenotipom PMN-MDSC u krvi pacijenata sa glioblastoma multiforme, dok se u suspenzijama tumorskih ćelija, MDSC populacija se sastoji gotovo isključivo od CD15-pozitivnih ćelija. Uvažavajući imunosupresivni efekat MDSC-a, autori su utvrdili da dugotrajno praćenje sastava ovih ćelija u uzorcima krvi od pacijenata sa gliomom može biti od visokog značaja, posebno kada se razmatra imunoterapija (439).

U radu Stanojević i sar. pacijentima sa melanomom davan je subkutano interferon alfa, u optimalnoj dozi, u periodu od najmanje 6 meseci pre analize. Sakupljeni su uzorci krvi od pacijenata sa melanomom (n=91), a dob/pol je odgovarala zdravim kontrolama (n=8). Poređenje vrednosti MDSC kod bolesnika sa melanomom stadijuma 2 sa i bez terapije interferonom alfa nije pokazalo značajnu razliku. Upoređivanjem vrednosti MDSC-a kod

pacijenata sa melanomom stadijuma 3, nađena je značajna razlika u vrednostima granulocitnih podsetova između interferonom alfa tretiranih i netretiranih grupa. Poređenjem vrednosti svih populacija supresornih ćelija između pacijenata lečenih interferonom alfa i zdravih kontrola pokazano je značajno povećanje procenta supresorskih ćelija kod pacijenata sa melanomom. Granulocitne i ukupne vrednosti MDSC-a bile su značajno niže kod pacijenata sa melanomom tretiranih interferonom alfa sa progresijom u poređenju sa netretiranim pacijentima sa stabilnom obojenošću. Takođe je pronađen neočekivani „povratni udar“ nivoa ovih supresorskih ćelija, mnogo meseci nakon prekida terapije interferonom alfa (438).

Stanojević i sar. su u svojoj studiji iz 2016. ispitivali perifernu krv sedamdeset osam pacijenata sa melanomom i 10 zdravih osoba. Praćenje svih bolesnika sa melanomom vršeno je redovno svaka tri meseca. MDSC definisane su kao linijski negativne (CD3-, CD19-, CD56-), HLA-DR-/low, CD11b+ i CD33+. Klasifikacija granulocitnih (GrMDSC) i monocitnih (MoMDSC) podsetova zasnovana je na CD15 i CD14 ekspresiji, redom. Za razliku od MoMDSC-a, koji su bili prisutni u 60% zdravih kontrola i 15% bolesnika sa melanomom, GrMDSC je bio prisutan kod svih ispitivanih učesnika, a kod pacijenata sa melanomom je utvrđeno da imaju statistički veće učestalosti u poređenju sa zdravim kontrolama. Vrednosti GrMDSC bile su najveće kod pacijenata sa melanomom stadijuma IV, sa statističkom značajnošću u poređenju sa stadijumima IA, IB, IIA i IIB. Pacijenti sa progresijom su imali statistički veći broj GrMDSC-a u poređenju sa onima sa stabilnom bolešću ($P = 0,0079$). Pacijenti koji su imali interval bez progresije (progression-free interval PFI) <12 meseci pokazali su znatno veće vrednosti GrMDSC u poređenju sa onima sa PFI > 12 meseci ($P = 0.0333$). GrMDSC je pokazao značajnu negativnu korelaciju sa intervalima PFI ($P = 0,0095$). Podset GrMDSC bio je dominantan kod svih pacijenata. Autori su potvrdili da se GrMDSC akumuliraju rano u perifernoj krvi pacijenata sa melanomom, i učinili su usko povezivanje učestalosti sa kliničkim stadijumom i širenjem bolesti, što navodi na to, da povećanje učestalosti GrMDSC dobro korelira sa progresivnom bolešću i moglo bi se smatrati potencijalnim prediktivnim biomarkerom visokorizičnih slučajeva melanoma koji će verovatnije imati kraći PFI (440).

McKenna i sar. pratili su ekspresiju CD15 i CD68 na CD11b(+) mijeloidnim ćelijama unutar PBMC i primarnih uvealnih melanoma flow citometrijom. Ekspresija lanca CD3 zeta pomoću CD3 epsilon(+) T ćelija u PBMC i unutar primarnih uvealnih melanoma je meren kao indirektna indikacija funkcije T-ćelija. Aktivirani CD11b(+) CD15(+) granulociti

povećavali su se u krvi pacijenata sa uvealnim melanomom i mogu doprinosti imunskom izbegavanju očnih tumora putem inhibiranja funkcije T-ćelija smanjenjem ekspresije lanca CD3zeta (441).

Shan i sar. su u svom radu iz 2015 zaključili da agens Rg3 indukuje apoptozu tumorskih ćelija u korelaciji sa njegovim inhibitornim efektom na ekspresiju FUT4 (koji je značajan u sintezi CD15), posredovanog signalinim putem NF-kB. Rezultati su sugerisali da Rg3 može biti novi terapijski agens za tretman melanoma (442).

U ovoj studiji testiranje CD15 između grupa D i L pokazuje značajnu razliku ($\chi^2=12,83$ $p=0,012$) kod koncentracijske distribucije, ali ne i kod prostorne distribucije ($\chi^2=11,07$ $p=0,086$ n.s.). To znači da je koncentracija CD15 pozitivnih ćelija u okviru odgovarajućih intra i peritumorskih kompartmana u grupi D značajno različita u odnosu na grupu L, što govori o prediktivnom karakteru ovog markera. U grupi D prevashodno je registrovana koncentracija „malo“, dok je u grupi L registrovana koncentracija pozitivnih ćelija „umereno mnogo“.

Testiranje intenziteta prebojenja nije vršeno, jer je u obe grupe intenzitet prebojenosti kod svih pacijenata u svim ćelijama iznosio +++ (jak intenzitet).

Prosečni broj pozitivno bojenih ćelija u vidnom polju nije pokazao statistički značajnu razliku između grupa D i L ($\chi^2=7,63$ $p=0,267$ n.s.).

Poređena je prostorna distribucija pozitivnih ćelija (CD4, CD8 i CD15) intra i ekstratumorski između grupa D i L. Pronađena je statistički značajna razlika za peritumorski lokalizovane CD15 pozitivne ćelije, dok je u slučaju CD4 i CD8 pozitivnih ćelija registrovana statistički značajna razlika između intratumorskog infiltrata između grupa D i L.

Značaj CD117

Nakon nekoliko decenija frustrirajućih studija poslednjih godina stvorene su nove terapijske strategije. Proizveden je veliki broj „ciljanih“ terapija za različite tipove tumora. Takođe, kao posledica sve većeg uvida u u genetske aberacije melanoma pojavile su se brojne ciljane terapije. Iako je još uvek mali broj tih supstanci zvanično odobren velika

količina tih agenasa je u razvoju. Pojavljuju se različiti modaliteti za mono kao i za kombinovanu terapiju. Jedan od mogućih puteva je i blokiranje KIT tirozin kinaze.

Kombinacija ciljanih i nepersonalizovanih modaliteta terapija rezultuje ne samo poboljšanjem stepena odgovora, već i ukupnim preživljavanjem kod metastatske bolesti što predstavlja prekretnicu u terapiji melanomom. Međutim, koristeći ove terapije još treba mnogo naučiti u vezi sa efektima, neželjenim efektima i ograničenjima ovih obećavajućih supstanci (443).

Kalinsky i sar. su sproveli dvostepeno ispitivanje, gde je uz pomoć ekspresije CD117 utvrđivana stopa odgovora prema oralno primenjenom dasatinibu. Faza II je sprovedena na KIT+ melanomima mukoznog, akralnog i melanomu hroničnog oštećenja suncem (cronically-sun damage CSD). Iz faze II su zbog nepodobnosti isključeni CSD melanomi, a dodati su vulvovaginalni melanomi. Sama primena je zbog niske rate odgovora i neželjenih dejstava obustavljena pre planiranog završetka studije. U celini, stopa odgovora dasatiniba kod pacijenata sa KIT+ melanomom je bila niska. S bzirom na njegovu kliničku aktivnost, preporučeno je da imatinib ipak ostane inhibitor KIT tirozin-kinaze izbora za neodređeni KIT+ melanom (444). Sa druge strane, i kao potvrda prethodne publikacije javlja se publikacija Posch i sar. koja kaže da inhibicija KIT može pomoći pri ciljanju migratornih aktivnih KIT mutantnih ćelija melanoma, što predstavlja potencijalnu strategiju za smanjenje širenja i rekurencije (445). Među pacijentima sa naprednim melanomom koji imaju izmene KIT, tretman sa imatinib mesilatom rezultira značajnim kliničkim odgovorima u podskupu pacijenata. Odgovori mogu biti ograničeni na tumore koji sadrže KIT izmene dokazane funkcionalne važnosti (446).

Receptorska tirozin kinaza KIT promovise preživljavanje i migraciju melanocita u toku razvoja, a prekomerna aktivnost KIT-a hiperaktivira put RAS/MAPK i može dovesti do formiranja melanoma, posebno retkih formi koje se javljaju na volarnim i mukoznim površinama kože. Mnogo veći broj melanoma, koji se javljaju na koži izloženoj suncu, vođen je prvenstveno mutacijama koje aktiviraju BRAF ili NRAS, ali ovi melanomi pokazuju iznenađujući gubitak ekspresije KIT, što dovodi do pitanja da li gubitak KIT u ovim tumorima olakšava tumorigenezu. Neiswender i sar. utvrdili su da bi ushodna stimulacija puta BRAFV600E mogla paradoksalno smanjiti signalizaciju nizhodno od BRAFV600E, a za ovaj efekat je neophodan wild-type BRAF, što ukazuje na to da njegova aktivacija može umanjiti onkogenu BRAFV600E signalizaciju. In vivo, ekspresija wild-type BRAF-a odložila je

početak melanoma, ali samo na KIT zavisni način. Zajedno, ovi rezultati ukazuju na to da KIT može aktivirati signalizaciju preko RAF proteina divljeg tipa, čime se ometa onkogeno formiranje melanoma kroz BRAFV600E (447).

Cilj studije Lukenda i sar. je bio imunohistohemijsko istraživanje ekspresije i prognostičkog značaja potencijalnih markera matičnih ćelija raka CD117 (c-kit), CD34, CD20 i CD15 u kohorti pacijenata sa primarnim horoidalnim i cilijarnim melanomom. Prekomerna ekspresija CD117 je primećena kod 12 od 31 uzorka (39%) kada je korišćen AEC hromogen, a kod 14 od 26 (54%) uzoraka kada se koristi DAB. CD15 pozitivnost je prikazana u tri od 30 (10%) uzoraka sa AEC i u šest od 26 (23%) uzoraka sa DAB. Kaplan-Meier test pokazao je značajno kraće opšte i preživljavanje bez bolesti (overall and disease-free survival) kod CD117-pozitivnih pacijenata kada je korišćen AEC hromogen. Ekspresija CD15 nije bila u odnosu sa opstankom pacijenata. U multivarijantnoj analizi, pacijenti koji su ekspresirali CD117 AEC imali su 4.13 puta veći rizik od smrtonosnog ishoda u poređenju sa CD117 AEC negativnim pacijentima. Prekomerna ekspresija CD117 AEC bila je povezana sa lošijim ishodom kod pacijenata sa horoidalnim i melanomom ciliarnog tela (448).

Ukratko, c-KIT protein se ekspresira u normalnim melanocitima, benignim nevusima, displastičkim nevusima i netumorigenom melanoma (RGP sa infiltracijom derma), ali ekspresija se gubi kod tumorigenih primarnih melanoma (VGP) i metastaza. Značaj gubitka c-KIT kod naprednog melanoma zahteva dodatnu istragu (449).

Da bi se ispitala uloga c-KIT receptora u razvoju i progresiji melanocitnih tumora, Ohashi i sar. analizirali su ekspresiju i lokalizaciju c-KIT-a imunohistohemijom i Western blotom. Rezultati su ukazali na to da se displastični nevusi razlikuju od običnih nevusa u smislu ekspresije c-KIT i da bazalno rastuće ćelije u akralnom lentiginoznom melanomu mogu biti u početnoj fazi tumorske progresije, pre nego što dođe do gubitka c-KIT (450).

Janku i sar. sprovedli su univarijantne i multivarijantne analize koje su ispitivale uticaj KIT ekspresije, debljine Breslow-a, nivoa Clark i mikroskopske ulceracije na preživljavanje bez bolesti (disease-free survival). U populaciji od 261 bolesnika sa ranim stadijumom melanoma, sa 62 recidiva u toku 64-mesečnog praćenja, ekspresija KIT-a je pronađen u 144 slučajeva (55%). KIT je bio ekspresiran u više od 60% ćelija kod 20 pacijenata (8%), kod 30-60% ćelija kod 64 pacijenta (24%) i kod manje od 30% ćelija kod 60 pacijenata (23%). Ekspresija KIT nije pronađena kod 117 pacijenata (45%). U univarijantnoj analizi, uticaj KIT ekspresije na preživljavanje bez bolesti nije dokazan ($P = 0.4956$; log-rank test). U

multivarijantnoj analizi, debljina Breslow-a, stadijum i KIT ekspresija bili su značajni negativni prognostički faktori za kraće preživljavanje bez bolesti ($P < 0,0001$, $P = 0,0028$, $P = 0,0488$, redom; postepeni Cox regresioni model). Može se zaključiti da je KIT eksprimiran u više od polovine melanoma ranih stadijuma. KIT može poslužiti kao dodatni prognostički faktor uz debljinu Breslow-a i stadijum u testiranoj populaciji. Terapijski uticaj ekspresije KIT kod melanoma je neizvestan (451).

Drugi autori su pokazali da je CD117 malo verovatno korisna dijagnostička alatka u diferenciranju Spitz nevusa od primarnog melanoma. Sa druge strane pokazano je da CD117 može biti koristan u diferenciranju metastatskog melanoma od primarnog melanoma kod pacijenata koji su imali istoriju melanoma i koji se javljaju sa novim dermalnim lezijama (452).

Genetsku osnovu CD117 ekspresije treba pažljivo tumačiti. Postoje studije koje potvrđuju da su KIT mutacije najčešće kod akralnih i mukoznih melanoma, ali ne moraju nužno biti u korelaciji sa brojem KIT kopija ili CD117 ekspresijom. Skrining za KIT mutacije može otvoriti nove opcije tretmana za pacijente sa melanomom (453). Drugi autori pokazali su da je proizvod c-KIT nishodno regulisan u melanocitima nakon maligne transformacije. Funkcionalni značaj ove modulacije ostaje da se proceni (454).

Drugi autori su pratili ekspresiju imunohistohemijskih parametara kod melanoma i nevusa. Pokazana je znatno viša ekspresija c-KIT, p-ERK i ciklina D1 kod primarnih melanoma nego kod nevusa. Imunoreaktivnost c-KIT je bila najviša u tankim (Tis-pT2) melanomima i pokazala značajno smanjenje sa progresijom tumora i metastazama. Analiza preživljavanja nije uspela da otkrije bilo kakve trendove u pogledu kraćeg ili dužeg preživljavanja kod pacijenata koji su eksprimirali c-KIT, p-ERK ili ciklin D1 (455).

Asocijacije između imunohistohemijske ekspresije, tumorskih mesta i kliničkih parametara nisu jasne. Lin i sar. ispitivali su korelaciju ekspresije proteina i genske mutacije c-KIT sa klinikopatološkim parametrima i lokacijama lezije kod pacijenata sa melanocitnim lezijama. Rezultati ispitivanja imunohistohemijskih prebojenja za c-KIT su bili statistički viši u displastičnim nevusima nego u običnim nevusima i melanomu. Pored toga, citoplazmatsko bojenje na c-KIT-a značajno je koreliralo sa lošim preživljavanjem kod pacijenata sa AM (acral melanoma), ali ne i kod onih sa NAM (non-AM). Nalazi potvrđuju da mutacije KIT ne moraju nužno biti u korelaciji sa c-kit ekspresijom. Takođe, javlja se značajno različita asocijacija između ekspresije imunoreaktivnosti c-kit i rizika za smrtnost od melanoma na

akralnim nasuprot neakralnim mestima (456). Slični nalaz su dobili i Dai i sar. koji su istraživali ekspresiju i mutaciju KIT u 39 primarnih akralnih melanoma zajedno sa odgovarajućim sekundarnim tumorima (17 metastaza limfnih čvorova, 6 lokalnih recidiva i 3 metastaze kože) i odnos između KIT ekspresije i mutacije i kliničkopatoloških karakteristika. Ekspresija KIT nije korelirala sa statusom KIT mutacije (457). Kang i sar. su pratili odnos ekspresije KIT i postojanja KIT mutacije kod različitih kineskih populacija. Stopa KIT mutacija pacijenata iz jedne oblasti bila je znatno viša od onih kod pacijenata iz druge ispitivane geografske oblasti ($P = 0,02$). Uočena je redom ekspresija c-KIT u 71,4% odnosno 42,9% uzoraka tumorskog tkiva sakupljenih od pacijenata (iz dve različite kineske oblasti). Takođe, pokazano je da mutacije u KIT genu nisu u korelaciji sa ekspresijom c-KIT (458).

U studiji Sari Aslani i sar. muški pol korelirao sa većim stadijumom tumora ($p < 0,05$). Šezdeset dva posto ($n = 31$) slučajeva pokazalo je najmanje 5% KIT pozitivnih ćelija, a sastojale su se od 18% ($n = 9$) 5-50%, 16% ($n = 8$) 51-95% i 28% ($n = 14$) 95% ćelija koje ekspresiraju KIT. U 38% ($n = 19$) slučajeva KIT ekspresija je bila manja od 5% pozitivnih ćelija. Stadijum tumora je pozitivno korelirao sa imunoreaktivnošću tumorskih ćelija i intenzitetom bojenja ($p < 0,05$). Metastatski melanom je pokazao niži procenat (43%) pozitivnosti. Intenzitet bojenja i procenat pozitivnih ćelija su pozitivno korelirani ($p < 0,001$). Sve to može biti korisno za skrining pacijenata za savetovanje za KIT mutacijsku analizu i ciljanu terapiju (459). Drugi autori su pronašli veza između imunohistohemijske ekspresije KIT i statusa mutacije ($P = 0,007$). Imunohistohemijska ekspresija KIT u manje od 10% ćelija invazivne komponente akralnih lentiginoznih/mukoznih melanoma izgleda da je jak negativni prediktor KIT mutacije i stoga se potencijalno može koristiti za trijažu slučajeva za dodatnu genotipizaciju KIT (460).

Postoje i studije gde je većina ispitanih nevusa i melanoma bilo pozitivno za KIT, sa minimalnim razlikama između benignih i malignih lezija. Citoplazmatska KIT imunoreaktivnost u intraepidermalno proliferišućim ćelijama nevusa otkrivena je u benignim pigmentovanim lezijama, kao i u melanomu, povećavajući se sa uzrastom pacijenata ($P = 0,007$) u obe grupe. Intenzitet i procenat KIT pozitivnosti u proliferišućim ćelijama nevusa u dermisu značajno je povećan kod malignih melanocitnih lezija ($P = 0,015$ i $P = 0,008$) u poređenju sa benignim lezijama (složeni melanocitni nevusi, Spitz nevusi, intradermalni nevusi, blue nevusi). Prebojenje za KIT kod metastatskih melanoma je bilo negativno. Čini se da KIT nije jak imunohistohemijski marker za razlikovanje melanoma od melanocitnih nevusa, ako uzmemo u obzir KIT ekspresiju u intraepidermalno proliferišućim ćelijama.

Ekspresija KIT u proliferišućim melanocitima u dermisu mogla bi da pomogne u diferencijalnoj dijagnozi između SSM (sa invazijom dermisa) i kompaund nevusa ili intradermalnog nevusa (461).

Postoje i radovi gde je zaključeno da je ekspresija KIT, osim Breslow dubine, još jedan važan prediktor prognoze i opstanka (462). Po drugima je ekspresija c-KIT vredan negativni prediktor prognoze i preživljavanja, posebno u debelim (> 4 mm) melanomima (463).

U radu Oyama i sar. mutacija BRAF i KIT nije pokazala nikakvu korelaciju sa kliničkim stadijumom, metastazama u limfnim čvorovima, debljinom tumora, ulceracijom i patohistološkim nalazom. Rezultati pokazuju da mutacije BRAF-a i KIT postoje kod japanskih pacijenata sa melanomom, međutim, signalizacija rasta ćelija može biti regulisana ne samo ovim mutiranim genima već i drugim nepoznatim regulatornim faktorima koji mogu uticati na prognozu melanoma (464).

Istraživanje Ponti i sar. je pokazalo da BRAF, NRAS i KIT melanomi predstavljaju različite kliničko-patološke entitete. KIT mutirani melanom je bio lociran na akralnim mestima i mukozama dok su BRAF mutirani melanoma su uglavnom bili locirani na mestima sa intermitentnom izloženošću suncu, a bili su povezani sa većom debljinom Breslow-a i povećanim brojem mitozama. NRAS mutirani melanom je uglavnom primećen na hronično oštećenim delovima kože sunčevim zračenjem i imao je negativnu prognostičku vrednost, sa kraćim vremenom do progresije i visokom učestalošću zahvatanja centralnog nervnog sistema. Autori su zaključili da BRAF-mutirani melanom beneficiraju i anti-BRAF i anti-MEK ciljanim terapijama, dok trostruko negativni melanom mogu imati koristi od novih anti-CTLA-4 i anti-PD-L1 imunoterapijskih pristupa (465).

U ovoj studiji je prvo učinjeno poređenje ukupnog broja preparata koji su se pozitivno bojili. U obe grupe se od po 30 preparata, na CD117 pozitivno bojilo 24, statistička razlika u ovom slučaju nije tražena. S druge strane, praćena je promena intenziteta prebojenosti po vertikali. Sama promena prebojenosti nije bila statistički značajna između ispitivanih grupa ($\chi^2=0,31$ $p=0,579$ n.s.)

Distribucija intenziteta prebojenja između grupa D i L takođe nije pokazala statistički značajnu razliku ($\chi^2=0,46$ $p=0,794$ n.s.), kao ni razlike u procentualnim razlikama intenziteta prebojenja pozitivnih ćelija ($\chi^2=0,35$ $p=0,95$ n.s.).

Analiza procentualne distribucije obojenih ćelija između grupa D i L ne pokazuje statistički značajnu razliku između grupa ($\chi^2=1,87$ $p=0,759$ n.s.).

Korelacija između imunohistohemijskih parametara

U ovom istraživanju pronađena je statistički značajna korelacija CD4 sa CD8, takođe CD8 sa CD4 i CD15, ne postoji korelacija između ispitivanih CD4 i CD 15, niti korelacija ostalih markera sa CD117.

U analizi IHH parametara između obe grupe pokazana je statistički značajna veća vrednosti parametara CD4 i CD8 u grupi sa dobrim ishodom, a za CD15 pronađene su veće vrednosti u grupi sa lošim ishodom, ali bez statističke značajnosti.

Javlja se nove paradigma u terapiji melanoma u kojoj će se molekularna analiza tumora koristiti za dodeljivanje najprikladnijeg terapijskog modaliteta za svakog pojedinačnog pacijenta, kako bi se maksimizovao terapijski uspeh (466).

Nije teško pretpostaviti da će u narednih nekoliko godina tumori melanoma biti rutinski ispitivani na prisustvo panela specifičnih markera kako bi se odredilo dodeljivanje pojedinačnih pacijenata za najprikladnije terapijske pristupe. Zapravo, analiza ovih markera se sada često koristi u akademskim centrima za većinu novih pacijenata koji se javljaju sa metastatskom bolešću i na ivici je da postane standardna praksa.

Prisustvo "upaljenog" tumorskog mikrookruženja, za koje se predviđa da će moći da se okarakterišu pomoću malog seta gena, analiziranog pomoću qRT-PCR, moglo se koristiti za razmatranje pacijenata za opseg imunoterapijskih intervencija. Posedovanje ovih prediktivnih biomarkera će uticati na brigu o pacijentima sa melanomom na više načina.

Korelacija morfometrijskih parametara sa imunohistochemijskim parametrima

U analizi svih ispitivanih parametara zajedno nađeno je da morfometrijski parametri ne koreliraju značajno sa ispitivanim imunohistochemijskim parametrima. Jedina značajna korelacija je između Roundness i CD117 (porast Roundness korelira sa negativnim vrednostima CD117 – obrnuta korelacija).

U analizi po grupama pronađena je korelacija po grupama (D i L) između morfometrijskih parametara i imunohistochemijskih parametara. U grupi D pronađena je pozitivna korelacija parametara Area, Circ., IntDen i Round sa CD15, dok sa ostalima nije postojala korelacija. U grupi L pronađena je negativna značajna korelacija između cirkularnosti (Circ.) i zaobljenosti (Roundness) sa CD117.

Urađeno je upoređivanje pozitivnih ćelija za ispitivane markere (CD4, CD8, CD15) intra i peritumorski, između grupa D i L. Kod kvantifikovanih peritumorski lokalizovanih ćelija postoji značajna razlika samo kod markera CD15. Upoređivanje kvantifikovanih intratumorskih imunohistochemijski pozitivnih ćelija se razlikuje značajno kod markera CD4 i CD8 dok se kod markera CD15 ne razlikuje.

6. Zaključci:

1. Za ispitivani period 2002 – 2011. postoji statistički značajan godišnji porast incidence oboljevanja od melanoma kože, za period nakon 2004. je registrovan i značajan porast novoobolelih, kod kojih se tokom kliničkog praćenja nije javio recidiv/metastatska bolest, što odgovara povećanom broju dijagnoza u ranijim stadijumima. Takođe, postoji statistički značajan porast broja novoobolelih pacijenata u populaciji starijih od 50 godina.
2. U periodu 2009. do 2011. postoji smanjenje incidence agresivnih kliničkih formi melanoma, ali bez statističke značajnosti. Dve trećine recidiva javlja se u toku prve godine.
3. Klinički stadijum bolesti je pokazao uslovljenost I stadijuma sa lokalizacijom na glavi i vratu, leđima, ruci i nozi; II stadijum najčešće se manifestovao pojavljivanjem na glavi i vratu i na leđima. Isti stadijum je u značajnom broju slučajeva bio povezan i sa postojanjem ulceracije na primarnom tumoru; stadijum III/IV značajno je povezan sa lokalizacijom na glavi i vratu.
4. Među 60 pacijenata morfometrijski i imunohistohemijski obrađenih veća debljina po Breslowu i postojanje ulceracije su negativni prognostički parametri.
5. Porast vrednosti nuklearnomorfometrijskih parametara cirkularnosti i zaobljenosti praćen je lošom prognozom bolesti.
6. Raspored i koncentracija CD4 pozitivnih ćelija u različitim kompartmanima u tumoru i peritumorskom tkivu nije pokazala prognostički značaj. Porast ukupne koncentracije intratumorski lokalizovanih CD4 pozitivnih ćelija imala je pozitivan prognostički značaj. Jače prebojene CD4 pozitivne ćelije kao i procentualno veći udeo CD4 pozitivnih ćelija u odnosu na nebojene ćelije istih morfoloških karakteristika imale su pozitivan prognostički značaj.
7. Raspored i koncentracija analiziranih CD8 pozitivnih ćelija u oviru tumorskog preparata (intra i peritumorski) nije imala prognostički značaj. Porast ukupne koncentracije intratumorski lokalizovanih CD8 pozitivnih ćelija imala je pozitivan prognostički značaj, kao i procentualno veći udeo CD8 pozitivnih ćelija u odnosu na nebojene ćelije istih morfoloških karakteristika.
8. Analiza CD15 prebojenja pokazala je da razlike u koncentracijama CD15 ćelija u pojedinim kompartmanima, intra i peritumorski, imaju prognostički značaj. Sa druge strane, samo prisustvo pozitivnih ćelija u kompartmanima preparata bez postojanja

gradijenta koncentracije, intenzitet bojenja i broj CD15 pozitivnih ćelija u vidnom polju na preparatu nisu imali prognostički značaj. Veća koncentracija peritumorski lokalizovanih CD15 ćelija nosi lošu prognozu.

9. Analiza CD117 bojenja nije pokazala prognostički značaj ni u jednoj zasebno ispitivanoj karakteristici bojenja.
10. Povoljan prognostički značaj ima istovremeni porast broja CD4 i CD8 pozitivnih ćelija.
11. Jedina značajna korelacija morfometrijskog parametra Roundness nađena je sa CD117 pozitivnim ćelijama, tj. porast Roundness korelira sa smanjenjem vrednosti parametara CD117.
12. Porast CD15 pozitivnih ćelija sa porastom Area, Circularity, IntDen, Roundness predviđa dobru prognozu, dok nasuprot tome ispodprosečan nivo CD117 parametara sa porastom cirkularnosti i zaobljenosti može ukazivati na lošu prognozu bolesti.

7. Literatura:

1. Storm C, Elder D. Skin. 6th ed. Rubin R, Strayer DS, editors: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
2. Horstman E. Die Haut. Berlin: Springer-Verlag; 1957.
3. Li M, Urmacher C. Normal skin. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
4. Montagna W, Parakkal P. The structure and function of the skin. 3rd ed. New York: Academic Press, Inc; 1974.
5. Montagna W, Kligman A, Carlisle K. Atlas of normal human skin. New York: Springer-Verlag; 1992.
6. Elder D. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
7. Weler R, Hunter J, Savin J, Dahl M. Clinical Dermatology. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
8. Mescher A. Junqueira's Basic Histology. 13th ed.
9. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 10th ed: Elsevier Inc; 2011.
10. Clark WH, Jr., Watson MC, Watson BE. Two kinds of "clear" cells in the human epidermis; with a report of a modified DOPA reaction for electron microscopy. The American journal of pathology. 1961;39:333-44.
11. Masson P. Pigment cells in man. Miner R, editor. New York: The New York Academy of Sciences; 1948.
12. LeDouarin N. Cell migration in early vertebrate development studied in inter-specific chimaeras. Amsterdam: Elsevier Excerpta Medica-North Holland; 1976.
13. Holbrook KA VA, Underwood RA, Foster CA. Melanocytes in human embryonic and fetal skin: a review and new findings. Pigment Cell Res. 1988;1(Suppl):6-17.
14. Rawles ME. Origin of melanophores and their role in development of color patterns in vertebrates. Physiological reviews. 1948;28(4):383-408.
15. Barnhill R. Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma. 2nd ed. New York: Springer Science; 2004.
16. Perris R, von Boxberg Y, Lofberg J. Local embryonic matrices determine region-specific phenotypes in neural crest cells. Science (New York, NY). 1988;241(4861):86-9.
17. Staricco R. Mechanism of migration of the melanocyte from the hair follicle into the epidermis following dermabrasion. The Journal of investigative dermatology. 1961;36:99-104.

18. Dermatology in general medicine. 3rd ed. Fitzpatrick T, Eisen A, Wolff K, Freedberg I, Austen K, editors. New York 1987.
19. Grichnik JM. Melanoma, neovogenesis, and stem cell biology. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(10):2365-80.
20. Becker SW, Jr., Zimmermann AA. Further studies on melanocytes and melanogenesis in the human fetus and newborn. *The Journal of investigative dermatology*. 1955;25(2):103-12.
21. Boyle JL, Haupt HM, Stern JB, Mulhaupt HA. Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2002;126(7):816-22.
22. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al. A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *The American journal of surgical pathology*. 1998;22(5):595-602.
23. King R, Weilbaecher KN, McGill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for Melanoma Diagnosis. *The American journal of pathology*. 1999;155(3):731-8.
24. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *The American Journal of dermatopathology*. 2002;24(3):270-81.
25. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *The American journal of surgical pathology*. 2008;32(9):1291-8.
26. Plummer RS, Shea CR, Nelson M, Powell SK, Freeman DM, Dan CP, et al. PAX3 expression in primary melanomas and nevi. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2008;21(5):525-30.
27. Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I. Presence of fibroblast-type intermediate filaments (vimentin) and absence of neurofilaments in pigmented nevi and malignant melanomas. *Journal of cutaneous pathology*. 1983;10(3):188-92.
28. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. *Journal of cutaneous pathology*. 1989;16(2):49-53.
29. van den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *The American journal of pathology*. 1994;145(2):294-300.

30. Plettenberg A, Ballaun C, Pammer J, Mildner M, Strunk D, Weninger W, et al. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *The American journal of pathology*. 1995;146(3):651-9.
31. Ramsay JA, From L, Kahn HJ. bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 1995;8(2):150-4.
32. Herlyn M. *Molecular and cellular biology of melanoma*. Austin, TX: Landes; 1993.
33. Fletcher C. *Diagnostic histopathology of tumors*. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2007.
34. Zembowicz A, Scolyer RA. Nevus/Melanocytoma/Melanoma: an emerging paradigm for classification of melanocytic neoplasms? *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(3):300-6.
35. Zembowicz A, Carney JA, Mihm MC. Pigmented epithelioid melanocytoma: a low-grade melanocytic tumor with metastatic potential indistinguishable from animal-type melanoma and epithelioid blue nevus. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(1):31-40.
36. Laidlaw GF, Murray MR. Addenda to a Theory of Pigmented Moles. *The American journal of pathology*. 1934;10(2):319-20.
37. Bloethner S, Snellman E, Bermejo JL, Hiripi E, Gast A, Thirumaran RK, et al. Differential gene expression in melanocytic nevi with the V600E BRAF mutation. *Genes, chromosomes & cancer*. 2007;46(11):1019-27.
38. Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(2):342-8.
39. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics*. 2003;33(1):19-20.
40. Johnson WT, Helwig EB. Benign nevus cells in the capsule of lymph nodes. *Cancer*. 1969;23(3):747-53.
41. Ridolfi RL, Rosen PP, Thaler H. Nevus cell aggregates associated with lymph nodes: estimated frequency and clinical significance. *Cancer*. 1977;39(1):164-71.
42. Massi G, Leboit P. *Histological diagnosis of nevi and melanoma*. Wurzburg: Steinkopff Verlag Darmsadt-Springer; 2004.

43. Clark WH, Jr., Hood AF, Tucker MA, Jampel RM. Atypical melanocytic nevi of the genital type with a discussion of reciprocal parenchymal-stromal interactions in the biology of neoplasia. *Human pathology*. 1998;29(1 Suppl 1):S1-24.
44. Crowson AN, Magro CM, Sanchez-Carpintero I, Mihm MC, Jr. The precursors of malignant melanoma. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2002;160:75-84.
45. Stanec S, Stanec Z. *Melanom*. Zagreb: Medicinska Naklada; 2006.
46. Boyle P, Levin B. *Cutaneous melanoma*. Lion: 2008.
47. Lynch HT, Fritchot BC, 3rd, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *Journal of medical genetics*. 1978;15(5):352-6.
48. Elder DE. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006;19 Suppl 2:S4-20.
49. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH, Jr. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer*. 1980;46(8):1787-94.
50. Kelly JW, Crutcher WA, Sagebiel RW. Clinical diagnosis of dysplastic melanocytic nevi. A clinicopathologic correlation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1986;14(6):1044-52.
51. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *Jama*. 1997;277(18):1439-44.
52. Pearson JP, Weiss SW, Headington JT. Cutaneous malignant melanotic neurocristic tumors arising in neurocristic hamartomas. A melanocytic tumor morphologically and biologically distinct from common melanoma. *The American journal of surgical pathology*. 1996;20(6):665-77.
53. Gonzalez-Campora R, Galera-Davidson H, Vazquez-Ramirez FJ, Diaz-Cano S. Blue nevus: classical types and new related entities. A differential diagnostic review. *Pathology, research and practice*. 1994;190(6):627-35.
54. Sun J, Morton TH, Jr., Gown AM. Antibody HMB-45 identifies the cells of blue nevi. An immunohistochemical study on paraffin sections. *The American journal of surgical pathology*. 1990;14(8):748-51.

55. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457(7229):599-602.
56. Masson P. [Blue neuro-nevi]. *Archivio "de Vecchi" per l'anatomia patologica e la medicina clinica*. 1950;14(1):1-28.
57. Rodriguez HA, Ackerman LV. Cellular blue nevus. Clinicopathologic study of forty-five cases. *Cancer*. 1968;21(3):393-405.
58. Maize JC, Jr., McCalmont TH, Carlson JA, Busam KJ, Kutzner H, Bastian BC. Genomic analysis of blue nevi and related dermal melanocytic proliferations. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29(9):1214-20.
59. Cesinaro AM, Foroni M, Sighinolfi P, Migaldi M, Trentini GP. Spitz nevus is relatively frequent in adults: a clinico-pathologic study of 247 cases related to patient's age. *The American Journal of dermatopathology*. 2005;27(6):469-75.
60. Echevarria R, Ackerman LV. Spindle and epithelioid cell nevi in the adult. Clinicopathologic report of 26 cases. *Cancer*. 1967;20(2):175-89.
61. Kern JA, Ackerman LV. Spindle cell nevi and epithelioid cell nevi (so-called juvenile melanomas) in children and adults: a clinicopathological study of 27 cases. *Cancer*. 1960;13:612-25.
62. Hamm H, Happle R, Brocker EB. Multiple agminate Spitz naevi: review of the literature and report of a case with distinctive immunohistological features. *The British journal of dermatology*. 1987;117(4):511-22.
63. Mooi WJ. Spitz nevus and its histologic simulators. *Advances in anatomic pathology*. 2002;9(4):209-21.
64. Paniago-Pereira C, Maize JC, Ackerman AB. Nevus of large spindle and/or epithelioid cells (Spitz's nevus). *Archives of dermatology*. 1978;114(12):1811-23.
65. Bastian BC, Wesselmann U, Pinkel D, Leboit PE. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi shows clear differences to melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 1999;113(6):1065-9.
66. Gill M, Cohen J, Renwick N, Mones JM, Silvers DN, Celebi JT. Genetic similarities between Spitz nevus and Spitzoid melanoma in children. *Cancer*. 2004;101(11):2636-40.
67. Mooney MA, Barr RJ, Buxton MG. Halo nevus or halo phenomenon? A study of 142 cases. *Journal of cutaneous pathology*. 1995;22(4):342-8.
68. Wayte DM, Helwig EB. Halo nevi. *Cancer*. 1968;22(1):69-90.

69. Davis NC, Herron J, McLeod GR. The macroscopic appearance of malignant melanoma of the skin. *The Medical journal of Australia*. 1966;2(19):883-6.
70. Cox AJ, Walton RG. THE INDUCTION OF JUNCTIONAL CHANGES IN PIGMENTED NEVI. *Archives of pathology*. 1965;79:428-34.
71. Kornberg R, Ackerman AB. Pseudomelanoma: recurrent melanocytic nevus following partial surgical removal. *Archives of dermatology*. 1975;111(12):1588-90.
72. King R, Hayzen BA, Page RN, Gooze PB, Zeagler D, Mihm MC, Jr. Recurrent nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma with regression. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009;22(5):611-7.
73. Pemberton O. Part I, Melanosis. London: J Churchill; 1858.
74. Carswell R. Part 9, Melanoma. London: Longman; 1838.
75. Eiselt T. Ueber pigment Krebs1861.
76. Handley W. The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. *The Lancet Oncology*. 1907;1:927-33.
77. Pringle J. A method of operation in cases of melanotic tumours of the skin. *Edinb Med J*. 1908;23:496-9.
78. Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966;19(5):607-10.
79. Jones TB. MELANOMA OF THE NAIL BED. *Annals of surgery*. 1924;80(6):839-47.
80. Galloway. *Brit M J*. 1892;2:873.
81. Bloodgood *Prog. Med*. 1903:153.
82. Hertzler A. *Arch f Dermat u Syph*. 1922;6:701.
83. Hutchinson. *Brit M J*. 1886;1:491.
84. Malignant Melanoma. *British medical journal*. 1939;2(4096):81-2.
85. Ewing J. THE PROBLEMS OF MELANOMA. *British medical journal*. 1930;2(3646):852-6.
86. Hiles RW. Should lymphadenectomy be discarded? II. Malignant melanoma. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*. 1973;18(6):368-72.
87. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2009;20 Suppl 6:vi1-7.
88. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016*. CA: a cancer journal for clinicians. 2016;66(1):7-30.

89. Robsahm TE, Bergva G, Hestvik UE, Moller B. Sex differences in rising trends of cutaneous malignant melanoma in Norway, 1954-2008. *Melanoma research*. 2013;23(1):70-8.
90. Weir HK, Marrett LD, Cokkinides V, Barnholtz-Sloan J, Patel P, Tai E, et al. Melanoma in adolescents and young adults (ages 15-39 years): United States, 1999-2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(5 Suppl 1):S38-49.
91. Reed KB, Brewer JD, Lohse CM, Bringe KE, Pruitt CN, Gibson LE. Increasing incidence of melanoma among young adults: an epidemiological study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clinic proceedings*. 2012;87(4):328-34.
92. Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2009;23(3):501-13, ix.
93. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(16):3622-34.
94. Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Metzler G, Moehrl M, et al. Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 2008;112(8):1795-804.
95. Joosse A, Collette S, Suci S, Nijsten T, Patel PM, Keilholz U, et al. Sex is an independent prognostic indicator for survival and relapse/progression-free survival in metastasized stage III to IV melanoma: a pooled analysis of five European organisation for research and treatment of cancer randomized controlled trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(18):2337-46.
96. Gamba CS, Clarke CA, Keegan TH, Tao L, Swetter SM. Melanoma survival disadvantage in young, non-Hispanic white males compared with females. *JAMA dermatology*. 2013;149(8):912-20.
97. Downing A, Newton-Bishop JA, Forman D. Recent trends in cutaneous malignant melanoma in the Yorkshire region of England; incidence, mortality and survival in relation to stage of disease, 1993-2003. *British journal of cancer*. 2006;95(1):91-5.
98. Courtenay WH. Constructions of masculinity and their influence on men's well-being: a theory of gender and health. *Social science & medicine (1982)*. 2000;50(10):1385-401.
99. Morvillo V, Luthy IA, Bravo AI, Capurro MI, Portela P, Calandra RS, et al. Androgen receptors in human melanoma cell lines IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN and in human melanoma metastases. *Melanoma research*. 2002;12(6):529-38.

100. Mervic L, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Forschner A, Metzler G, et al. Sex differences in survival of cutaneous melanoma are age dependent: an analysis of 7338 patients. *Melanoma research*. 2011;21(3):244-52.
101. Kemeny MM, Busch E, Stewart AK, Menck HR. Superior survival of young women with malignant melanoma. *American journal of surgery*. 1998;175(6):437-44; discussion 44-5.
102. Molife R, Lorigan P, MacNeil S. Gender and survival in malignant tumours. *Cancer treatment reviews*. 2001;27(4):201-9.
103. Richardson B, Price A, Wagner M, Williams V, Lorigan P, Browne S, et al. Investigation of female survival benefit in metastatic melanoma. *British journal of cancer*. 1999;80(12):2025-33.
104. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, et al. Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Annals of surgery*. 2006;243(5):693-8; discussion 8-700.
105. Unger JM, Flaherty LE, Liu PY, Albain KS, Sondak VK. Gender and other survival predictors in patients with metastatic melanoma on Southwest Oncology Group trials. *Cancer*. 2001;91(6):1148-55.
106. Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ, et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(4):527-34.
107. Joosse A, de Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AM, Holzel D, et al. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(3):719-26.
108. Enninga EAL, Moser JC, Weaver AL, Markovic SN, Brewer JD, Leontovich AA, et al. Survival of cutaneous melanoma based on sex, age, and stage in the United States, 1992-2011. *Cancer medicine*. 2017;6(10):2203-12.
109. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinic proceedings*. 2007;82(3):364-80.
110. Rigel DS. Epidemiology of melanoma. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2010;29(4):204-9.
111. Wu YP, Kohlmann W, Curtin K, Yu Z, Hanson HA, Hashibe M, et al. Melanoma risk assessment based on relatives' age at diagnosis. *Cancer causes & control : CCC*. 2017.

112. Lasithiotakis K, Leiter U, Kruger-Krasagakis S, Tosca A, Garbe C. Comparative analysis of incidence and clinical features of cutaneous malignant melanoma in Crete (Greece) and southern Germany (central Baden-Wurttemberg). *The British journal of dermatology*. 2006;154(6):1123-7.
113. Clarke CA, McKinley M, Hurley S, Haile RW, Glaser SL, Keegan THM, et al. Continued Increase in Melanoma Incidence across all Socioeconomic Status Groups in California, 1998-2012. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(11):2282-90.
114. American Cancer Society. Cancer Facts & figures 2018. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>. Accessed 01 Jan 2018.
115. National Cancer Institute. SEER Stats Fact Sheets: Melanoma of the skin. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>. Accessed 30 Dec 2016.
116. Monshi B, Vujic M, Kivaranovic D, Sesti A, Oberaigner W, Vujic I, et al. The burden of malignant melanoma--lessons to be learned from Austria. *European journal of cancer*. 2016;56:45-53.
117. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(2):385-400.
118. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(7):1666-74.
119. Shaikh WR, Dusza SW, Weinstock MA, Oliveria SA, Geller AC, Halpern AC. Melanoma Thickness and Survival Trends in the United States, 1989 to 2009. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(1).
120. Higgins HW, 2nd, Lee KC, Galan A, Leffell DJ. Melanoma in situ: Part I. Epidemiology, screening, and clinical features. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2015;73(2):181-90, quiz 91-2.
121. Frangos JE, Duncan LM, Piris A, Nazarian RM, Mihm MC, Jr., Hoang MP, et al. Increased diagnosis of thin superficial spreading melanomas: A 20-year study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;67(3):387-94.
122. Welch HG, Woloshin S, Schwartz LM. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005;331(7515):481.

123. Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. *Archives of dermatology*. 1999;135(3):275-80.
124. de Vries E, Coebergh JW. Cutaneous malignant melanoma in Europe. *European journal of cancer*. 2004;40(16):2355-66.
125. Chiarugi A, Quaglino P, Crocetti E, Nardini P, De Giorgi V, Borgognoni L, et al. Melanoma density and relationship with the distribution of melanocytic naevi in an Italian population: a GIPMe study--the Italian multidisciplinary group on melanoma. *Melanoma research*. 2015;25(1):80-7.
126. Echeverria B, Botella-Estrada R, Serra-Guillen C, Martorell A, Traves V, Requena C, et al. [Increased risk of developing a second primary cutaneous nevus-associated melanoma in patients previously diagnosed with the disease]. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2010;101(8):710-6.
127. Bulliard JL, De Weck D, Fisch T, Bordoni A, Levi F. Detailed site distribution of melanoma and sunlight exposure: aetiological patterns from a Swiss series. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2007;18(4):789-94.
128. Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fagnoli MC, Boniol M, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *European journal of cancer*. 2009;45(17):3054-63.
129. Kvaskoff M, Pandeya N, Green AC, Perry S, Baxter C, Davis MB, et al. Site-specific determinants of cutaneous melanoma: a case-case comparison of patients with tumors arising on the head or trunk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2013;22(12):2222-31.
130. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(11):806-12.
131. Montero I, Requena C, Traves V, Garcia-Casado Z, Kumar R, Nagore E. Age-related characteristics of cutaneous melanoma in a Spanish Mediterranean population. *International journal of dermatology*. 2015;54(7):778-84.
132. Pena-Vilabelda MM, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, Lopez-Guerrero JA, Guillen C, et al. Clinical characteristics of patients with cutaneous melanoma according to

variants in the melanocortin 1 receptor gene. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2014;105(2):159-71.

133. Kvaskoff M, Pandeya N, Green AC, Perry S, Baxter C, Davis MB, et al. Solar elastosis and cutaneous melanoma: a site-specific analysis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;136(12):2900-11.

134. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

135. Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;52(5):743-75; quiz 75-8.

136. Crowson AN, Magro C, Miller A, Mihm MC, Jr. The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. *Seminars in oncology*. 2007;34(6):476-90.

137. Barnhill R. Tumors of melanocytes. Barnhill R, editor. New York: McGraw-Hill; 1998.

138. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer*. 2000;88(6):1484-91.

139. AJCC cancer staging manual. 6th ed. Greene F, Page D, Fleming I, editors. New York: Wiley-Liss; 2002.

140. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006;19 Suppl 2:S71-87.

141. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(5):1845-53.

142. Loggini B, Rinaldi I, Pingitore R, Cristofani R, Castagna M, Barachini P. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanomas: p53, PCNA, Bcl-2 expression and multidrug resistance. *Tumori*. 2001;87(3):179-86.

143. Hazan C, Melzer K, Panageas KS, Li E, Kamino H, Kopf A, et al. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 2002;95(3):634-40.

144. Polsky D, Cordon-Cardo C. Oncogenes in melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3087-91.

145. Ilmonen S, Hernberg M, Pyrhonen S, Tarkkanen J, Asko-Seljavaara S. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma research*. 2005;15(5):375-81.
146. Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, et al. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(6):1366-71.
147. Sirigu P, Piras F, Minerba L, Murtas D, Maxia C, Colombari R, et al. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p16 and p53 in cutaneous melanoma: a comparison of two populations from different geographical regions. *European journal of histochemistry : EJH*. 2006;50(3):191-8.
148. Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, et al. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(21):10557-61.
149. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science (New York, NY)*. 1992;258(5085):1148-52.
150. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature genetics*. 1994;8(1):15-21.
151. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science (New York, NY)*. 1994;264(5157):436-40.
152. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368(6473):753-6.
153. Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000;42(5 Pt 1):705-22; quiz 23-6.
154. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *Journal of medical genetics*. 2007;44(2):99-106.
155. Molven A, Grimstvedt MB, Steine SJ, Harland M, Avril MF, Hayward NK, et al. A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and CDK4 mutation. *Genes, chromosomes & cancer*. 2005;44(1):10-8.

156. Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(5):357-63.
157. Eng C, Li FP, Abramson DH, Ellsworth RM, Wong FL, Goldman MB, et al. Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(14):1121-8.
158. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & development*. 2006;20(16):2149-82.
159. Berwick M, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD, et al. The prevalence of CDKN2A germ-line mutations and relative risk for cutaneous malignant melanoma: an international population-based study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(8):1520-5.
160. Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *American journal of human genetics*. 2001;69(4):765-73.
161. Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, Goldstein AM, Newton Bishop JA, Bishop DT, et al. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(20):1568-83.
162. Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zimetkin DP, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *The New England journal of medicine*. 1995;333(15):970-4.
163. Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;87(6):809-11.
164. Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *The New England journal of medicine*. 1995;333(15):975-7.
165. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(15):1310-6.

166. Kadouri L, Temper M, Grenader T, Abeliovich D, Hamburger T, Peretz T, et al. Absence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations in cutaneous malignant melanoma patients of Ashkenazi origin. *Familial cancer*. 2009;8(1):29-32.
167. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nature genetics*. 2009;41(8):920-5.
168. Brown KM, Macgregor S, Montgomery GW, Craig DW, Zhao ZZ, Iyadurai K, et al. Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nature genetics*. 2008;40(7):838-40.
169. Chatzinasiou F, Lill CM, Kypreou K, Stefanaki I, Nicolaou V, Spyrou G, et al. Comprehensive field synopsis and systematic meta-analyses of genetic association studies in cutaneous melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(16):1227-35.
170. Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRAF. *Cancer research*. 2001;61(9):3595-8.
171. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2008;27(2):253-61.
172. Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, et al. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular cell*. 2005;17(2):215-24.
173. Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(6):1483-9.
174. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
175. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(17):6483-8.
176. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599E-BRAF regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer research*. 2005;65(6):2412-21.
177. Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma research*. 2006;16(4):267-73.

178. Anderson DE, Smith JL, Jr., McBride CM. Hereditary aspects of malignant melanoma. *Jama*. 1967;200(9):741-6.
179. Carey WP, Jr., Thompson CJ, Synnestvedt M, Guerry Dt, Halpern A, Schultz D, et al. Dysplastic nevi as a melanoma risk factor in patients with familial melanoma. *Cancer*. 1994;74(12):3118-25.
180. Goldstein AM, Chidambaram A, Halpern A, Holly EA, Guerry ID, Sagebiel R, et al. Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma research*. 2002;12(1):51-5.
181. Goldstein AM. Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Human mutation*. 2004;23(6):630.
182. Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. CDKN2A (P16(INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes, chromosomes & cancer*. 1999;25(4):339-48.
183. Laud K, Marian C, Avril MF, Barrois M, Chompret A, Goldstein AM, et al. Comprehensive analysis of CDKN2A (p16INK4A/p14ARF) and CDKN2B genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma. *Journal of medical genetics*. 2006;43(1):39-47.
184. Meyle KD, Guldborg P. Genetic risk factors for melanoma. *Human genetics*. 2009;126(4):499-510.
185. Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombled J, Spatz A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Human molecular genetics*. 1998;7(2):209-16.
186. Eide J. Pathogenesis of generalized melanosis with melanuria and melanoptysis secondary to malignant melanoma. *Histopathology*. 1981;5(3):285-94.
187. Murray C, D'Intino Y, McCormick R, Nassar B, Walsh N. Melanosis in association with metastatic malignant melanoma: report of a case and a unifying concept of pathogenesis. *The American Journal of dermatopathology*. 1999;21(1):28-30.
188. Balabanov K, Andreev VC, Tchernozemski I. Malignant melanoma and vitiligo. *Dermatologica*. 1969;139(3):211-9.
189. O'Leary T. *Skin*. O'Leary T, editor. Philadelphia: Saunders; 2003.
190. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986;320(6057):84-5.

191. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO journal*. 1984;3(13):3257-62.
192. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research*. 1994;54(18):4855-78.
193. Zhang S, Davidson D, Zhang D, Parks J, Cheng L. *Principles of Clinical Molecular Biology*. Cheng L, Zhang D, editors. Totowa: Humana Press; 2008.
194. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer gene therapy*. 2009;16(1):1-12.
195. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology*. 2006;38(4):287-301.
196. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2005;353(20):2135-47.
197. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2006;355(1):51-65.
198. Jacks T, Weinberg RA. Cell-cycle control and its watchman. *Nature*. 1996;381(6584):643-4.
199. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis*. 2001;22(6):851-60.
200. Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, Vallacchi V, Campi V, Di Stasi D, et al. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene*. 2004;23(35):5968-77.
201. Weedon D. *Lentiginos, nevi and melanomas*. 2nd ed. Weedon D, editor. Edingurgh: Churchill Livingstone; 2002.
202. Sra KK, Babb-Tarbox M, Aboutalebi S, Rady P, Shipley GL, Dao DD, et al. Molecular diagnosis of cutaneous diseases. *Archives of dermatology*. 2005;141(2):225-41.
203. Carlson JA, Ross JS, Slominski AJ. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clinics in dermatology*. 2009;27(1):75-102.

204. Crotty KA, Scolyer RA, Li L, Palmer AA, Wang L, McCarthy SW. Spitz naevus versus Spitzoid melanoma: when and how can they be distinguished? *Pathology*. 2002;34(1):6-12.
205. McNutt NS, Urmacher C, Hakimian J, Hoss DM, Lugo J. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *Journal of cutaneous pathology*. 1995;22(6):502-17.
206. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *Journal of cutaneous pathology*. 2008;35(5):433-44.
207. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC cancer*. 2010;10:140.
208. Hastrup N, Osterlind A, Drzewiecki KT, Hou-Jensen K. The presence of dysplastic nevus remnants in malignant melanomas. A population-based study of 551 malignant melanomas. *The American Journal of dermatopathology*. 1991;13(4):378-85.
209. IARC. Solar and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992.
210. Whiteman D, Green A. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *The New England journal of medicine*. 1999;341(10):766-7.
211. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3099-112.
212. Gordon D, Hansson J, Eloranta S, Gordon M, Gillgren P, Smedby KE. Primary tumor sites in relation to ultraviolet radiation exposure and skin visibility correlate with survival in cutaneous melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2017;141(7):1345-54.
213. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;73(2):198-203.
214. Cooke KR, Fraser J. Migration and death from malignant melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1985;36(2):175-8.
215. Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types. *Journal of the National Cancer Institute*. 1984;73(1):75-82.

216. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European journal of cancer*. 2005;41(1):45-60.
217. Nelemans PJ, Groenendal H, Kiemeneij LA, Rampen FH, Ruiten DJ, Verbeek AL. Effect of intermittent exposure to sunlight on melanoma risk among indoor workers and sun-sensitive individuals. *Environmental health perspectives*. 1993;101(3):252-5.
218. White E, Kirkpatrick CS, Lee JA. Case-control study of malignant melanoma in Washington State. I. Constitutional factors and sun exposure. *American journal of epidemiology*. 1994;139(9):857-68.
219. Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(5):837-46.
220. Elwood JM, Gallagher RP, Worth AJ, Wood WS, Pearson JC. Etiological differences between subtypes of cutaneous malignant melanoma: Western Canada Melanoma Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1987;78(1):37-44.
221. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(5):1116-22.
222. Stern RS. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(5):755-61.
223. Stern RS, Study PFu. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(5):755-61.
224. Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(6):1557-68.
225. Cust AE, Armstrong BK, Goumas C, Jenkins MA, Schmid H, Hopper JL, et al. Sunbed use during adolescence and early adulthood is associated with increased risk of early-onset melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;128(10):2425-35.
226. Veierod MB, Adami HO, Lund E, Armstrong BK, Weiderpass E. Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for*

Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.

2010;19(1):111-20.

227. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--part D: radiation. *The Lancet Oncology*. 2009;10(8):751-2.

228. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC supplements : EJC : official journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer* [et al]. 2013;11(2):81-91.

229. Bulliard JL, Cox B, Elwood JM. Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand. *Cancer causes & control : CCC*. 1994;5(3):234-40.

230. Pennello G, Devesa S, Gail M. Association of surface ultraviolet B radiation levels with melanoma and nonmelanoma skin cancer in United States blacks. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2000;9(3):291-7.

231. Lea CS, Scotto JA, Buffler PA, Fine J, Barnhill RL, Berwick M. Ambient UVB and melanoma risk in the United States: a case-control analysis. *Annals of epidemiology*. 2007;17(6):447-53.

232. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *The New England journal of medicine*. 1999;340(17):1341-8.

233. Garibyan L, Fisher DE. How sunlight causes melanoma. *Current oncology reports*. 2010;12(5):319-26.

234. Krickler A, Armstrong BK, Goumas C, Litchfield M, Begg CB, Hummer AJ, et al. Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. *Cancer causes & control : CCC*. 2007;18(3):295-304.

235. Merimsky O, Inbar M. Cigarette smoking and skin cancer. *Clinics in dermatology*. 1998;16(5):585-8.

236. Balch C, Houghton A, Sober A, Soong S. *Cutaneous melanoma*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc; 2003.

237. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007;445(7130):843-50.

238. Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annual review of genetics*. 2003;37:67-90.

239. Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of dermatology*. 1994;130(8):1018-21.

240. Rivers JK. Melanoma. *Lancet*. 1996;347(9004):803-6.
241. Olsen CM, Zens MS, Stukel TA, Sacerdote C, Chang YM, Armstrong BK, et al. Nevus density and melanoma risk in women: a pooled analysis to test the divergent pathway hypothesis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(4):937-44.
242. DiFronzo LA, Wanek LA, Elashoff R, Morton DL. Increased incidence of second primary melanoma in patients with a previous cutaneous melanoma. *Annals of surgical oncology*. 1999;6(7):705-11.
243. Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, Berwick M, Halpern AC, Patel A, et al. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *Jama*. 2005;294(13):1647-54.
244. Levi F, Randimbison L, Te VC, La Vecchia C. High constant incidence rates of second cutaneous melanomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;117(5):877-9.
245. Whiteman DC, Parsons PG, Green AC. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1998;77(6):843-8.
246. Bulliard JL. Site-specific risk of cutaneous malignant melanoma and pattern of sun exposure in New Zealand. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;85(5):627-32.
247. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer*. 1995;75(10):2492-8.
248. Wachsmuth RC, Turner F, Barrett JH, Gaut R, Randerson-Moor JA, Bishop DT, et al. The effect of sun exposure in determining nevus density in UK adolescent twins. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;124(1):56-62.
249. Gallagher RP, Rivers JK, Yang CP, McLean DI, Coldman AJ, Silver HK. Melanocytic nevus density in Asian, Indo-Pakistani, and white children: the Vancouver Mole Study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991;25(3):507-12.
250. Carli P, Naldi L, Lovati S, La Vecchia C. The density of melanocytic nevi correlates with constitutional variables and history of sunburns: a prevalence study among Italian schoolchildren. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002;101(4):375-9.
251. Purdue MP, From L, Armstrong BK, Kricker A, Gallagher RP, McLaughlin JR, et al. Etiologic and other factors predicting nevus-associated cutaneous malignant melanoma.

Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.

2005;14(8):2015-22.

252. Goldgar DE, Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Piepkorn MW, Zone JJ, Skolnick MH. Inheritance of nevus number and size in melanoma and dysplastic nevus syndrome kindreds. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991;83(23):1726-33.

253. Gibbs P, Brady BM, Robinson WA. The genes and genetics of malignant melanoma. *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2002;6(3):229-35.

254. Gallagher RP, Rivers JK, Lee TK, Bajdik CD, McLean DI, Coldman AJ. Broad-spectrum sunscreen use and the development of new nevi in white children: A randomized controlled trial. *Jama*. 2000;283(22):2955-60.

255. Barrett JH, Gaut R, Wachsmuth R, Bishop JA, Bishop DT. Linkage and association analysis of nevus density and the region containing the melanoma gene CDKN2A in UK twins. *British journal of cancer*. 2003;88(12):1920-4.

256. Florell SR, Meyer LJ, Boucher KM, Grossman D, Cannon-Albright LA, Harris RM, et al. Increased melanocytic nevi and nevus density in a G-34T CDKN2A/p16 melanoma-prone pedigree. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(8):2122-5.

257. Florell SR, Meyer LJ, Boucher KM, Porter-Gill PA, Hart M, Erickson J, et al. Longitudinal assessment of the nevus phenotype in a melanoma kindred. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;123(3):576-82.

258. Purdue MP, From L, Kahn HJ, Armstrong BK, Krickler A, Gallagher RP, et al. Etiologic factors associated with p53 immunostaining in cutaneous malignant melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;117(3):486-93.

259. Martin-Gorgojo A, Llinares M, Viros A, Requena C, Garcia-Casado Z, Traves V, et al. Cutaneous melanoma primary site is linked to nevus density. *Oncotarget*. 2017;8(58):98876-86.

260. Liu-Smith F, Farhat AM, Arce A, Ziogas A, Taylor T, Wang Z, et al. Sex differences in the association of cutaneous melanoma incidence rates and geographic ultraviolet light exposure. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;76(3):499-505.e3.

261. Penn I. The effect of immunosuppression on pre-existing cancers. *Transplantation*. 1993;55(4):742-7.

262. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1996;61(2):274-8.

263. Marghoob AA, Slade J, Salopek TG, Kopf AW, Bart RS, Rigel DS. Basal cell and squamous cell carcinomas are important risk factors for cutaneous malignant melanoma. Screening implications. *Cancer*. 1995;75(2 Suppl):707-14.
264. Kahn HS, Tatham LM, Patel AV, Thun MJ, Heath CW, Jr. Increased cancer mortality following a history of nonmelanoma skin cancer. *Jama*. 1998;280(10):910-2.
265. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Archives of dermatology*. 2003;139(12):1620-4; discussion 4.
266. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1987;17(3):459-68.
267. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, et al. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer*. 1990;66(2):387-95.
268. Halpern AC, Guerry Dt, Elder DE, Clark WH, Jr., Synnestvedt M, Norman S, et al. Dysplastic nevi as risk markers of sporadic (nonfamilial) melanoma. A case-control study. *Archives of dermatology*. 1991;127(7):995-9.
269. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European journal of cancer*. 2005;41(1):28-44.
270. Watt AJ, Kotsis SV, Chung KC. Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;113(7):1968-74.
271. Tannous ZS, Mihm MC, Jr., Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;52(2):197-203.
272. Naldi L, Adamoli L, Fraschini D, Corbetta A, Imberti L, Reseghetti A, et al. Number and distribution of melanocytic nevi in individuals with a history of childhood leukemia. *Cancer*. 1996;77(7):1402-8.
273. Pfahlberg A, Uter W, Kraus C, Wienecke WR, Reulbach U, Kolmel KF, et al. Monitoring of nevus density in children as a method to detect shifts in melanoma risk in the population. *Preventive medicine*. 2004;38(4):382-7.
274. Schuurman MS, de Waal AC, Thijs EJM, van Rossum MM, Kiemeny L, Aben KKH. Risk factors for second primary melanoma among Dutch patients with melanoma. *The British journal of dermatology*. 2017;176(4):971-8.

275. Welkovich B, Landthaler M, Schmoeckel C, Braun-Falco O. [The number and distribution of nevus cell nevi in patients with malignant melanoma]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 1989;40(10):630-5.
276. Rodenas JM, Delgado-Rodriguez M, Farinas-Alvarez C, Herranz MT, Serrano S. Melanocytic nevi and risk of cutaneous malignant melanoma in southern Spain. *American journal of epidemiology*. 1997;145(11):1020-9.
277. Randi G, Naldi L, Gallus S, Di Landro A, La Vecchia C. Number of nevi at a specific anatomical site and its relation to cutaneous malignant melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(9):2106-10.
278. Rieger E, Soyer HP, Garbe C, Buttner P, Kofler R, Weiss J, et al. Overall and site-specific risk of malignant melanoma associated with nevus counts at different body sites: a multicenter case-control study of the German Central Malignant-Melanoma Registry. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1995;62(4):393-7.
279. Tsao H, Niendorf K. Genetic testing in hereditary melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004;51(5):803-8.
280. Stam-Posthuma JJ, van Duinen C, Scheffer E, Vink J, Bergman W. Multiple primary melanomas. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(1):22-7.
281. Veierod MB, Weiderpass E, Thorn M, Hansson J, Lund E, Armstrong B, et al. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(20):1530-8.
282. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;116(1):144-9.
283. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Survival differences between patients with scalp or neck melanoma and those with melanoma of other sites in the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Archives of dermatology*. 2008;144(4):515-21.
284. International Classification of Diseases. ICD-10 Version. Available from: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/C43-C44>.
285. Levi F, Randimbison L, La Vecchia C, Te VC, Franceschi S. Prognostic factors for cutaneous malignant melanoma in Vaud, Switzerland. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1998;78(3):315-9.
286. Karakousis CP, Driscoll DL. Prognostic parameters in localised melanoma: gender versus anatomical location. *European journal of cancer*. 1995;31a(3):320-4.

287. Pollack LA, Li J, Berkowitz Z, Weir HK, Wu XC, Ajani UA, et al. Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(5 Suppl 1):S78-86.
288. Tseng WH, Martinez SR. Tumor location predicts survival in cutaneous head and neck melanoma. *The Journal of surgical research*. 2011;167(2):192-8.
289. Tarkov SA, Mikhnin AE, Shelekhova KV, Frolova OS, Nefedov AO. [Clinical course of cutaneous melanoma of the head and neck, and the factors affecting patient survival]. *Voprosy onkologii*. 2013;59(1):114-7.
290. Xie C, Pan Y, McLean C, Mar V, Wolfe R, Kelly J. Impact of scalp location on survival in head and neck melanoma: A retrospective cohort study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;76(3):494-8.e2.
291. Ge L, Vilain RE, Lo S, Aivazian K, Scolyer RA, Thompson JF. Breslow Thickness Measurements of Melanomas Around American Joint Committee on Cancer Staging Cut-Off Points: Imprecision and Terminal Digit Bias Have Important Implications for Staging and Patient Management. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(8):2658-63.
292. Edge S, Byrd D, Carducci M, Lompton C. 7th ed. Edge S, Byrd D, Carducci M, Lompton C, editors. New York, NY: Springer; 2009.
293. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6199-206.
294. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(14):2452-9.
295. Green AC, Baade P, Coory M, Aitken JF, Smithers M. Population-based 20-year survival among people diagnosed with thin melanomas in Queensland, Australia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(13):1462-7.
296. Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer*. 1980;45(12):3012-7.
297. Schuchter L, Schultz DJ, Synnestvedt M, Trock BJ, Guerry D, Elder DE, et al. A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The Pigmented Lesion Group. *Annals of internal medicine*. 1996;125(5):369-75.

298. Soong SJ, Shaw HM, Balch CM, McCarthy WH, Urist MM, Lee JY. Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach. *World journal of surgery*. 1992;16(2):191-5.
299. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(16):2199-205.
300. Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma research*. 2005;15(3):169-77.
301. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, 3rd. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Archives of dermatology*. 2001;137(9):1169-73.
302. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, 3rd. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(7):1826-31.
303. Xu X, Chen L, Guerry D, Dawson PR, Hwang WT, VanBelle P, et al. Lymphatic invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(1):229-37.
304. Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stromberg AJ, et al. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. *American journal of surgery*. 2011;202(6):659-64; discussion 64-5.
305. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer*. 1995;75(10):2484-91.
306. Day CL, Jr., Harrist TJ, Gorstein F, Sober AJ, Lew RA, Friedman RJ, et al. Malignant melanoma. Prognostic significance of "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Annals of surgery*. 1981;194(1):108-12.
307. Chang CK, Jacobs IA, Vizgirda VM, Salti GI. Melanoma in the elderly patient. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2003;138(10):1135-8.

308. Austin PF, Cruse CW, Lyman G, Schroer K, Glass F, Reintgen DS. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Annals of surgical oncology*. 1994;1(6):487-94.
309. Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma research*. 2001;11(5):435-45.
310. Vossaert KA, Silverman MK, Kopf AW, Bart RS, Rigel DS, Friedman RJ, et al. Influence of gender on survival in patients with stage I malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1992;26(3 Pt 2):429-40.
311. Joosse A, Collette S, Suci S, Nijsten T, Lejeune F, Kleeberg UR, et al. Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(18):2240-7.
312. Shivers SC, Wang X, Li W, Joseph E, Messina J, Glass LF, et al. Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. *Jama*. 1998;280(16):1410-5.
313. Martenson ED, Hansson LO, Nilsson B, von Schoultz E, Mansson Brahme E, Ringborg U, et al. Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(3):824-31.
314. Tarhini AA, Stuckert J, Lee S, Sander C, Kirkwood JM. Prognostic significance of serum S100B protein in high-risk surgically resected melanoma patients participating in Intergroup Trial ECOG 1694. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(1):38-44.
315. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1239-46.
316. Moreau S, Saiag P, Aegerter P, Bosset D, Longvert C, Helias-Rodzewicz Z, et al. Prognostic value of BRAF(V(6)(0)(0)) mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. *Annals of surgical oncology*. 2012;19(13):4314-21.
317. Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(10):e47054.

318. CD4. PathologyOutlines.com. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd4.html>. Accessed February 14th, 2018.
319. Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Axel R. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell*. 1985;42(1):93-104.
320. Taams LS, Akbar AN. Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 2005;293:115-31.
321. Davidsson S, Ohlson AL, Andersson SO, Fall K, Meisner A, Fiorentino M, et al. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(3):448-55.
322. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(7):2873-92.
323. Casartelli N, Di Matteo G, Potesta M, Rossi P, Doria M. CD4 and major histocompatibility complex class I downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 nef protein in pediatric AIDS progression. *Journal of virology*. 2003;77(21):11536-45.
324. Arganaraz ER, Schindler M, Kirchhoff F, Cortes MJ, Lama J. Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(36):33912-9.
325. Westerman LE, Kohatsu L, Ortiz A, McClain B, Kaplan J, Spira T, et al. A quality management systems approach for CD4 testing in resource-poor settings. *American journal of clinical pathology*. 2010;134(4):556-67.
326. Allard JE, Lee RU. Idiopathic CD4 lymphocytopenia manifesting as refractory genital dysplasia. *Obstetrics and gynecology*. 2013;122(2 Pt 2):455-8.
327. Beaty MW, Toro J, Sorbara L, Stern JB, Pittaluga S, Raffeld M, et al. Cutaneous lymphomatoid granulomatosis: correlation of clinical and biologic features. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(9):1111-20.
328. Crowson AN, Baschinsky DY, Kovatich A, Magro C. Granulomatous eccrinotropic lymphomatoid papulosis. *American journal of clinical pathology*. 2003;119(5):731-9.
329. Margolskee E, Jobanputra V, Lewis SK, Alobeid B, Green PH, Bhagat G. Indolent small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a distinct entity with unique biologic and clinical features. *PloS one*. 2013;8(7):e68343.

330. Larson RS, McCurley TL, 3rd. CD4 predicts nonlymphocytic lineage in acute leukemia. Insights from analysis of 125 cases using two-color flow cytometry. *American journal of clinical pathology*. 1995;104(2):204-11.
331. Taddesse-Heath L, Feldman JI, Fahle GA, Fischer SH, Sorbara L, Raffeld M, et al. Florid CD4+, CD56+ T-cell infiltrate associated with Herpes simplex infection simulating nasal NK-/T-cell lymphoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003;16(2):166-72.
332. Bosch X, Guilabert A, Miquel R, Campo E. Enigmatic Kikuchi-Fujimoto disease: a comprehensive review. *American journal of clinical pathology*. 2004;122(1):141-52.
333. Degauque N, Boeffard F, Foucher Y, Ballet C, Brouard S, Soullillou JP. The blood of healthy individuals exhibits CD8 T cells with a highly altered TCR Vb repertoire but with an unmodified phenotype. *PloS one*. 2011;6(6):e21240.
334. Clambey ET, van Dyk LF, Kappler JW, Marrack P. Non-malignant clonal expansions of CD8+ memory T cells in aged individuals. *Immunological reviews*. 2005;205:170-89.
335. Walter U, Santamaria P. CD8+ T cells in autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2005;17(6):624-31.
336. Takai N, Nakamura S, Goto K, Hayashita C, Kira N, Urabe S, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the uterine cervix. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2009;280(5):725-7.
337. Chen PC, Pan CC, Hsu WH, Ka HJ, Yang AH. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like carcinoma of the esophagus. *Human pathology*. 2003;34(4):407-11.
338. Nemolato S, Fanni D, Naccarato AG, Ravarino A, Bevilacqua G, Faa G. Lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma: a case report and a review of the literature. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(29):4694-6.
339. Chang YL, Wu CT, Shih JY, Lee YC. New aspects in clinicopathologic and oncogene studies of 23 pulmonary lymphoepithelioma-like carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(6):715-23.
340. de la Calle-Martin O, Hernandez M, Ordi J, Casamitjana N, Arostegui JI, Caragol I, et al. Familial CD8 deficiency due to a mutation in the CD8 alpha gene. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(1):117-23.
341. Gewaltig J, Kummer M, Koella C, Cathomas G, Biedermann BC. Requirements for CD8 T-cell migration into the human arterial wall. *Human pathology*. 2008;39(12):1756-62.
342. Hudacko R, Kathy Zhou X, Yantiss RK. Immunohistochemical stains for CD3 and CD8 do not improve detection of gluten-sensitive enteropathy in duodenal biopsies. *Modern*

pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2013;26(9):1241-5.

343. Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *American journal of clinical pathology*. 2006;126(5):805-14.
344. Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, Godet Y, Khammari A, Dreno B, et al. Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PloS one*. 2010;5(1):e8437.
345. Carulli G, Stacchini A, Marini A, Ciriello MM, Zucca A, Cannizzo E, et al. Aberrant expression of CD8 in B-cell non-Hodgkin lymphoma: a multicenter study of 951 bone marrow samples with lymphomatous infiltration. *American journal of clinical pathology*. 2009;132(2):186-90; quiz 306.
346. Magro CM, Crowson AN, Morrison C, Merati K, Porcu P, Wright ED. CD8+ lymphomatoid papulosis and its differential diagnosis. *American journal of clinical pathology*. 2006;125(4):490-501.
347. Saggini A, Gulia A, Argenyi Z, Fink-Puches R, Lissia A, Magana M, et al. A variant of lymphomatoid papulosis simulating primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ cytotoxic T-cell lymphoma. Description of 9 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(8):1168-75.
348. Hoffman DG, Tucker SJ, Emmanoulides C, Rosen PA, Naeim F. CD8-positive mantle cell lymphoma: a report of two cases. *American journal of clinical pathology*. 1998;109(6):689-94.
349. <https://meshb.nlm.nih.gov>. Available from:
<https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=CD15%20Antigen>
350. CD15. *PathologyOutlines.com*. Available from:
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd15.html>. Accessed February 13th, 2018.
351. Civin CI, Mirro J, Banquerigo ML. My-1, new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody. *Blood*. 1981;57(5):842-5.
352. Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science (New York, NY)*. 1990;250(4984):1132-5.

353. Forsyth KD, Simpson AC, Levinsky RJ. CD15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1-dependent mechanism. *European journal of immunology*. 1989;19(7):1331-4.
354. Warren HS, Altin JG, Waldron JC, Kinnear BF, Parish CR. A carbohydrate structure associated with CD15 (Lewis x) on myeloid cells is a novel ligand for human CD2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(8):2866-73.
355. Melnick DA, Meshulam T, Manto A, Malech HL. Activation of human neutrophils by monoclonal antibody PMN7C3: cell movement and adhesion can be triggered independently from the respiratory burst. *Blood*. 1986;67(5):1388-94.
356. Skubitz KM, Snook RW, 2nd. Monoclonal antibodies that recognize lacto-N-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion-promoting glycoprotein family (LFA-1/HMac-1/gp 150,95) and CR1 on human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1987;139(5):1631-9.
357. Melnick DA, Nauseef WM, Markowitz SD, Gardner JP, Malech HL. Biochemical analysis and subcellular localization of a neutrophil-specific antigen, PMN-7, involved in the respiratory burst. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1985;134(5):3346-55.
358. Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood*. 1997;89(1):307-14.
359. Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Kaneko M, Hiraga T, Sasaki K, et al. Expression cloning and characterization of a novel murine alpha1, 3-fucosyltransferase, mFuc-TIX, that synthesizes the Lewis x (CD15) epitope in brain and kidney. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(41):26729-38.
360. Mas E, Pasqualini E, Caillol N, El Battari A, Crotte C, Lombardo D, et al. Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. *Glycobiology*. 1998;8(6):605-13.
361. Hakomori S, Nudelman E, Levery SB, Kannagi R. Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. I. Glycolipids with di- or trifucosylated type 2 chain. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259(7):4672-80.
362. Itzkowitz SH, Yuan M, Fukushi Y, Palekar A, Phelps PC, Shamsuddin AM, et al. Lewisx- and sialylated Lewisx-related antigen expression in human malignant and nonmalignant colonic tissues. *Cancer research*. 1986;46(5):2627-32.
363. Valente AM, Taatjes DJ, Mount SL. Comparison of the pattern of expression of Leu-M1 antigen in adenocarcinomas, neutrophils and Hodgkin's disease by immunoelectron microscopy. *Histochemistry and cell biology*. 1995;103(3):181-6.

364. Memon GM, Alam SM. Use of LeuM1 monoclonal antibody for the diagnosis of Hodgkin's disease. *JPM The Journal of the Pakistan Medical Association*. 1990;40(7):156-9.
365. Benharroch D, Pilosof S, Gopas J, Levi I. Primary Refractory and Relapsed Classical Hodgkin Lymphoma - Significance of Differential CD15 Expression in Hodgkin-Reed-Sternberg Cells. *Journal of Cancer*. 2012;3:322-7.
366. Benharroch D, Dima E, Levy A, Ohana-Malka O, Ariad S, Prinsloo I, et al. Differential expression of sialyl and non-sialyl-CD15 antigens on Hodgkin-Reed-Sternberg cells: significance in Hodgkin's disease. *Leukemia & lymphoma*. 2000;39(1-2):185-94.
367. Gorczyca W, Tsang P, Liu Z, Wu CD, Dong HY, Goldstein M, et al. CD30-positive T-cell lymphomas co-expressing CD15: an immunohistochemical analysis. *International journal of oncology*. 2003;22(2):319-24.
368. Perkins PL, Ross CW, Schnitzer B. CD30-positive, anaplastic large-cell lymphomas that express CD15 but lack CD45. A possible diagnostic pitfall. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1992;116(11):1192-6.
369. Brooks SA, Leathem AJ. Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *The Histochemical journal*. 1995;27(9):689-93.
370. Sherwood AL, Holmes EH. Analysis of the expression and enzymatic properties of alpha1-->3fucosyltransferase from human lung carcinoma NCI-H69 and PC9 cells. *Glycobiology*. 1999;9(7):637-43.
371. Ohtani H, Fukushi Y, Orikasa S, Nagura H. Qualitative difference of subcellular localization of tumor-associated carbohydrate (Le(x)) antigens in renal cell carcinoma and normal kidney. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1991;39(4):479-84.
372. <http://qcmark.org>. Available from: <http://qcmark.org/epitopes/cd15/>.
373. Kansal R, Singleton TP, Ross CW, Finn WG, Padmore RF, Schnitzer B. Follicular hodgkin lymphoma: a histopathologic study. *American journal of clinical pathology*. 2002;117(1):29-35.
374. Jang TJ, Park JB, Lee JI. The Expression of CD10 and CD15 Is Progressively Increased during Colorectal Cancer Development. *Korean journal of pathology*. 2013;47(4):340-7.
375. Ordonez NG. Role of immunohistochemistry in distinguishing epithelial peritoneal mesotheliomas from peritoneal and ovarian serous carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 1998;22(10):1203-14.

376. Barry TS, Jaffe ES, Sorbara L, Raffeld M, Pittaluga S. Peripheral T-cell lymphomas expressing CD30 and CD15. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(12):1513-22.
377. Thalhammer-Scherrer R, Mitterbauer G, Simonitsch I, Jaeger U, Lechner K, Schneider B, et al. The immunophenotype of 325 adult acute leukemias: relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. *American journal of clinical pathology*. 2002;117(3):380-9.
378. Dunphy CH, Gardner LJ, Evans HL, Javadi N. CD15(+) acute lymphoblastic leukemia and subsequent monoblastic leukemia: persistence of t(4;11) abnormality and B-cell gene rearrangement. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2001;125(9):1227-30.
379. Menasce LP, Banerjee SS, Beckett E, Harris M. Extra-medullary myeloid tumour (granulocytic sarcoma) is often misdiagnosed: a study of 26 cases. *Histopathology*. 1999;34(5):391-8.
380. Juco J, Holden JT, Mann KP, Kelley LG, Li S. Immunophenotypic analysis of anaplastic large cell lymphoma by flow cytometry. *American journal of clinical pathology*. 2003;119(2):205-12.
381. Vassallo J, Lamant L, Brugieres L, Gaillard F, Campo E, Brousset P, et al. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma mimicking nodular sclerosis Hodgkin's lymphoma: report of 10 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(2):223-9.
382. Vasiliu V, Suarez F, Canioni D, Hermine O, Varet B, Brousse N. Anorectal Epstein-Barr virus infection mimicking Hodgkin lymphoma in an immunocompetent man. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(11):1715-9.
383. Dojcinov SD, Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. EBV positive mucocutaneous ulcer--a study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(3):405-17.
384. CD117. *PathologyOutlines.com*. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd117.html>. Accessed February 13th, 2018.
385. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Human pathology*. 2002;33(5):484-95.
386. Makhlof HR, Remotti HE, Ishak KG. Expression of KIT (CD117) in angioyolipoma. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(4):493-7.

387. Miettinen M. Are desmoid tumors kit positive? *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(4):549-50.
388. Montgomery E, Torbenson MS, Kaushal M, Fisher C, Abraham SC. Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(10):1296-301.
389. Kutlešić Č, Mihailović D. Uvod u dijagnostičku kvantitativnu patologiju. Kutlešić Č, Mihailović D, editors. Niš: Sven; 2000.
390. Simeonov R, Simeonova G. Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Veterinary clinical pathology*. 2006;35(1):88-90.
391. Maiolino P, Restucci B, Papparella S, Paciello O, De Vico G. Correlation of nuclear morphometric features with animal and human World Health Organization International Histological Classifications of canine spontaneous seminomas. *Veterinary pathology*. 2004;41(6):608-11.
392. Talve L, Kainu J, Collan Y, Ekfors T. Immunohistochemical expression of p53 protein, mitotic index and nuclear morphometry in primary malignant melanoma of the skin. *Pathology, research and practice*. 1996;192(8):825-33.
393. Bjornhagen V, Lindholm J, Auer G. Analysis of nuclear DNA and morphometry, and proliferating cell nuclear antigen in primary and metastatic malignant melanoma. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*. 1997;31(2):109-18.
394. Acker SM, Nicholson JH, Rust PF, Maize JC. Morphometric discrimination of melanoma in situ of sun-damaged skin from chronically sun-damaged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998;39(2 Pt 1):239-45.
395. Williams RA, Rode J, Baak JP, Charlton IG. Discrimination between benign and malignant melanocytic skin lesions by multivariate analysis, quantitative S-100 immunohistochemistry, nuclear morphometry and DNA cytometry. *Analytical and quantitative cytology and histology*. 1999;21(4):353-7.
396. Mijovic Z, Kostov M, Mihailovic D, Zivkovic N, Stojanovic M, Zdravkovic M. Correlation of nuclear morphometry of primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor suppressor proteins (p53 and p16(INK4a)) and bcl-2 oncoprotein. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2013;18(2):471-6.

397. Talve LA, Collan YU, Ekfors TO. Primary malignant melanoma of the skin. Relationships of nuclear DNA content, nuclear morphometric variables, Clark level and tumor thickness. *Analytical and quantitative cytology and histology*. 1997;19(1):62-74.
398. Talve LA, Collan YU, Ekfors TO. Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. *Journal of cutaneous pathology*. 1996;23(4):335-43.
399. Karbowniczek M, Chosia M, Domagala W. Nuclear morphometry of MIB-1 positive and negative tumor cells in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*. 1999;50(4):235-41.
400. Schochlin M, Weissinger SE, Brandes AR, Herrmann M, Moller P, Lennerz JK. A nuclear circularity-based classifier for diagnostic distinction of desmoplastic from spindle cell melanoma in digitized histological images. *Journal of pathology informatics*. 2014;5(1):40.
401. Tan GJ, Baak JP. Evaluation of prognostic characteristics of stage I cutaneous malignant melanoma. *Analytical and quantitative cytology*. 1984;6(3):147-54.
402. Tosi P, Luzi P, Sforza V, Santopietro R, Vindigni C, Miracco C, et al. The nuclei in cutaneous malignant melanoma, stage I, are smaller in survivors than in non-survivors. *Pathology, research and practice*. 1989;185(5):625-30.
403. Karjalainen J, Eskelinen M, Kosma VM, Lipponen P, Tuominen L, Alhava E. Clinical, histological and quantitative prognostic factors in cutaneous malignant melanoma. *Anticancer research*. 1992;12(5):1507-11.
404. Li LX, Crotty KA, Scolyer RA, Thompson JF, Kril JJ, Palmer AA, et al. Use of multiple cytometric markers improves discrimination between benign and malignant melanocytic lesions: a study of DNA microdensitometry, karyometry, argyrophilic staining of nucleolar organizer regions and MIB1-Ki67 immunoreactivity. *Melanoma research*. 2003;13(6):581-6.
405. Mijovic Z, Mihailovic D. Discriminant analysis of image karyometric variables in benign and malignant melanocytic skin lesions. *Analytical and quantitative cytology and histology*. 2002;24(6):314-6.
406. Larson AR, Dresser KA, Zhan Q, Lezcano C, Woda BA, Yosufi B, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine correlates with increasing morphologic dysplasia in melanocytic tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2014;27(7):936-44.

407. Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewski TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2006;55(10):1185-97.
408. Burton AL, Roach BA, Mays MP, Chen AF, Ginter BA, Vierling AM, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *The American surgeon*. 2011;77(2):188-92.
409. Preynat-Seauve O, Contassot E, Schuler P, French LE, Huard B. Melanoma-infiltrating dendritic cells induce protective antitumor responses mediated by T cells. *Melanoma research*. 2007;17(3):169-76.
410. Halliday GM, Patel A, Hunt MJ, Tefany FJ, Barnetson RS. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World journal of surgery*. 1995;19(3):352-8.
411. Rasku MA, Clem AL, Telang S, Taft B, Gettings K, Gragg H, et al. Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *Journal of translational medicine*. 2008;6:12.
412. Fortis SP, Mahaira LG, Anastasopoulou EA, Voutsas IF, Perez SA, Baxevanis CN. Immune profiling of melanoma tumors reflecting aggressiveness in a preclinical model. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2017;66(12):1631-42.
413. Hadrup S, Donia M, thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*. 2013;6(2):123-33.
414. Diem S, Hasan Ali O, Ackermann CJ, Bomze D, Koelzer VH, Jochum W, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node metastases of stage III melanoma correspond to response and survival in nine patients treated with ipilimumab at the time of stage IV disease. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2018;67(1):39-45.
415. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Science translational medicine*. 2013;5(200):200ra116.
416. Hodi FS. Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4. *Asia-Pacific journal of clinical oncology*. 2010;6 Suppl 1:S16-23.
417. Yin W, Song Y, Liu Q, Wu Y, He R. Topical treatment of all-trans retinoic acid inhibits murine melanoma partly by promoting CD8(+) T-cell immunity. 2017;152(2):287-97.
418. van Houdt IS, Sluijter BJ, Moesbergen LM, Vos WM, de Gruijl TD, Molenkamp BG, et al. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the

presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(3):609-15.

419. Donia M, Andersen R, Kjeldsen JW, Fagone P, Munir S, Nicoletti F, et al. Aberrant Expression of MHC Class II in Melanoma Attracts Inflammatory Tumor-Specific CD4+ T-Cells, Which Dampen CD8+ T-cell Antitumor Reactivity. *Cancer research*. 2015;75(18):3747-59.

420. Haymaker C, Yang Y, Wang J, Zou Q, Sahoo A, Alekseev A, et al. Absence of Grail promotes CD8(+) T cell anti-tumour activity. *Nature communications*. 2017;8(1):239.

421. Al-Batran SE, Rafiyan MR, Atmaca A, Neumann A, Karbach J, Bender A, et al. Intratumoral T-cell infiltrates and MHC class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer research*. 2005;65(9):3937-41.

422. Hernberg M, Turunen JP, von Boguslawsky K, Muhonen T, Pyrhonen S. Prognostic value of biomarkers in malignant melanoma. *Melanoma research*. 1998;8(3):283-91.

423. Jensen SM, Twitty CG, Maston LD, Antony PA, Lim M, Hu HM, et al. Increased frequency of suppressive regulatory T cells and T cell-mediated antigen loss results in murine melanoma recurrence. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;189(2):767-76.

424. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(5):1386-94.

425. Ribas A, Comin-Anduix B, Economou JS, Donahue TR, de la Rocha P, Morris LF, et al. Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(1):390-9.

426. Dwivedi M, Laddha NC, Arora P, Marfatia YS, Begum R. Decreased regulatory T-cells and CD4(+) /CD8(+) ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo. *Pigment cell & melanoma research*. 2013;26(4):586-91.

427. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, van Tinteren H, van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer*. 2011;117(10):2192-201.

428. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British journal of cancer*. 2011;105(1):93-103.

429. Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget*. 2017;8(9):14759-69.
430. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(21):2678-83.
431. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*. 2009;113(24):6102-11.
432. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(9):2423-33.
433. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.
434. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, et al. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009;58(9):1507-15.
435. thor Straten P, Becker JC, Guldberg P, Zeuthen J. In situ T cells in melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 1999;48(7):386-95.
436. thor Straten P, Guldberg P, Gronbaek K, Hansen MR, Kirkin AF, Seremet T, et al. In situ T cell responses against melanoma comprise high numbers of locally expanded T cell clonotypes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;163(1):443-7.
437. Gros A, Turcotte S, Wunderlich JR, Ahmadzadeh M, Dudley ME, Rosenberg SA. Myeloid cells obtained from the blood but not from the tumor can suppress T-cell proliferation in patients with melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(19):5212-23.
438. Stanojevic I, Gavevic M, Jovic M, Mijugovic Z, Zevevic R, Zolotarevski L, et al. Interferon alpha-induced reduction in the values of myeloid-derived suppressor cells in melanoma patients. *Vojnosanitetski pregled*. 2015;72(4):342-9.
439. Gielen PR, Schulte BM, Kers-Rebel ED, Verrijp K, Petersen-Baltussen HM, ter Laan M, et al. Increase in both CD14-positive and CD15-positive myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the blood of patients with glioma but predominance of CD15-positive

- myeloid-derived suppressor cells in glioma tissue. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2015;74(5):390-400.
440. Stanojevic I, Miller K, Kandolf-Sekulovic L, Mijuskovic Z, Zolotarevski L, Jovic M, et al. A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma. *International Immunology*. 2016;28(2):87-97.
441. McKenna KC, Beatty KM, Bilonick RA, Schoenfield L, Lathrop KL, Singh AD. Activated CD11b(+) CD15(+) Granulocytes Increase in the Blood of Patients with Uveal Melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(9):4295-303.
442. Shan X, Tian LL, Zhang YM, Wang XQ, Yan Q, Liu JW. Ginsenoside Rg3 suppresses FUT4 expression through inhibiting NF-kappaB/p65 signaling pathway to promote melanoma cell death. *International journal of oncology*. 2015;47(2):701-9.
443. Tronnier M, Mitteldorf C. Treating advanced melanoma: current insights and opportunities. *Cancer management and research*. 2014;6:349-56.
444. Kalinsky K, Lee S, Rubin KM, Lawrence DP, Iafrate AJ, Borger DR, et al. A phase 2 trial of dasatinib in patients with locally advanced or stage IV mucosal, acral, or vulvovaginal melanoma: A trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E2607). 2017;123(14):2688-97.
445. Posch C, Moslehi H, Sanlorenzo M, Green G, Vujic I, Panzer-Grumayer R, et al. Pharmacological inhibitors of c-KIT block mutant c-KIT mediated migration of melanocytes and melanoma cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(29):45916-25.
446. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *Jama*. 2011;305(22):2327-34.
447. Neiswender JV, Kortum RL, Bourque C, Kasheta M, Zon LI, Morrison DK, et al. KIT Suppresses BRAF(V600E)-Mutant Melanoma by Attenuating Oncogenic RAS/MAPK Signaling. *Cancer research*. 2017;77(21):5820-30.
448. Lukenda A, Dotlic S, Vukojevic N, Saric B, Vranic S, Zarkovic K. Expression and prognostic value of putative cancer stem cell markers CD117 and CD15 in choroidal and ciliary body melanoma. *Journal of clinical pathology*. 2016;69(3):234-9.
449. Montone KT, van Belle P, Elenitsas R, Elder DE. Proto-oncogene c-kit expression in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1997;10(9):939-44.
450. Ohashi A, Funasaka Y, Ueda M, Ichihashi M. c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma research*. 1996;6(1):25-30.

451. Janku F, Novotny J, Julis I, Julisova I, Pecen L, Tomancova V, et al. KIT receptor is expressed in more than 50% of early-stage malignant melanoma: a retrospective study of 261 patients. *Melanoma research*. 2005;15(4):251-6.
452. Isabel Zhu Y, Fitzpatrick JE. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. *Journal of cutaneous pathology*. 2006;33(1):33-7.
453. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(21):6821-8.
454. Natali PG, Nicotra MR, Winkler AB, Cavaliere R, Bigotti A, Ullrich A. Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1992;52(2):197-201.
455. Oba J, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *Journal of dermatological science*. 2011;62(2):116-23.
456. Lin YC, Chang YM, Ho JY, Lin HC, Tsai YM, Chiang CP, et al. C-kit expression of melanocytic neoplasm and association with clinicopathological parameters and anatomic locations in Chinese people. *The American Journal of dermatopathology*. 2013;35(5):569-75.
457. Dai B, Cai X, Kong YY, Yang F, Shen XX, Wang LW, et al. Analysis of KIT expression and gene mutation in human acral melanoma: with a comparison between primary tumors and corresponding metastases/recurrences. *Human pathology*. 2013;44(8):1472-8.
458. Kang XJ, Shi XH, Chen WJ, Pu XM, Sun ZZ, Halifu Y, et al. Analysis of KIT mutations and c-KIT expression in Chinese Uyghur and Han patients with melanoma. *Clinical and experimental dermatology*. 2016;41(1):81-7.
459. Sari Aslani F, Geramizadeh B, Dehghanian AR. Comparison of c-Kit expression between primary and metastatic melanoma of skin and mucosa. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. 2015;29:203.
460. Torres-Cabala CA, Wang WL, Trent J, Yang D, Chen S, Galbincea J, et al. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009;22(11):1446-56.
461. Pilloni L, Bianco P, Difelice E, Cabras S, Castellanos ME, Atzori L, et al. The usefulness of c-Kit in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions. *European journal of histochemistry : EJH*. 2011;55(2):e20.

462. Heinzlmann-Schwarz VA, Nixdorf S, Valadan M, Diczbalis M, Olivier J, Otton G, et al. A clinicopathological review of 33 patients with vulvar melanoma identifies c-KIT as a prognostic marker. *International journal of molecular medicine*. 2014;33(4):784-94.
463. Salcedo-Hernandez RA, Lino-Silva LS, Isla-Ortiz D, Posada-Torres JA, Chanona-Vilchis JG, Perez-Montiel MD, et al. Satellitosis and CD117 immunohistochemical expression correlates with poor outcome in thick vulvar melanoma. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*. 2017;152(1):8-12.
464. Oyama S, Funasaka Y, Watanabe A, Takizawa T, Kawana S, Saeki H. BRAF, KIT and NRAS mutations and expression of c-KIT, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and phosphorylated AKT in Japanese melanoma patients. *The Journal of dermatology*. 2015;42(5):477-84.
465. Ponti G, Manfredini M, Greco S, Pellacani G, Depenni R, Tomasi A, et al. BRAF, NRAS and C-KIT Advanced Melanoma: Clinico-pathological Features, Targeted-Therapy Strategies and Survival. *Anticancer research*. 2017;37(12):7043-8.
466. Gajewski TF. Molecular profiling of melanoma and the evolution of patient-specific therapy. *Seminars in oncology*. 2011;38(2):236-42.

Prilog:

Tabela 39. Pearsonova korelacija između ispitivanih morfometrijskih parametara N=60.

		Grupa	Area	Mean	Mode	Perim.	Circ.	Feret	IntDen	Round
Grupa	r	1	.202	-.211	-.212	.036	.563**	-.040	.027	.437**
	Sig.		.122	.106	.104	.787	.000	.759	.839	.000
Area	r	.202	1	.137	.111	.944**	.155	.843**	.847**	.104
	Sig.	.122		.298	.398	.000	.238	.000	.000	.427
Mean	r	-.211	.137	1	.997**	.102	.144	.075	.625**	.059
	Sig.	.106	.298		.000	.439	.271	.570	.000	.653
Mode	r	-.212	.111	.997**	1	.079	.136	.056	.606**	.048
	Sig.	.104	.398	.000		.547	.299	.672	.000	.713
Perim.	r	.036	.944**	.102	.079	1	-.160	.962**	.785**	-.186
	Sig.	.787	.000	.439	.547		.221	.000	.000	.154
Circ.	r	.563**	.155	.144	.136	-.160	1	-.343**	.178	.895**
	Sig.	.000	.238	.271	.299	.221		.007	.173	.000
Feret	r	-.040	.843**	.075	.056	.962**	-.343**	1	.697**	-.428**
	Sig.	.759	.000	.570	.672	.000	.007		.000	.001
IntDen	r	.027	.847**	.625**	.606**	.785**	.178	.697**	1	.093
	Sig.	.839	.000	.000	.000	.000	.173	.000		.478
Round	r	.437**	.104	.059	.048	-.186	.895**	-.428**	.093	1
	Sig.	.000	.427	.653	.713	.154	.000	.001	.478	

Napomena: **. Korelacija je značajna na nivou 0.01.

Tabela 40. Pearsonova korelacija između vrednosti Min i Max i ostalih parametara N=60.

		Grupa	Area	Mean	Mode	Perim.	Circ.	Feret	IntDen	Round
Min	r	-.184	.021	.952**	.957**	-.009	.115	-.033	.520**	.061
	p	.159	.874	.000	.000	.945	.381	.801	.000	.643
	N	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Max	r	-.232	.298*	.905**	.879**	.264*	.158	.229	.685**	.068
	p	.074	.021	.000	.000	.042	.229	.078	.000	.606
	N	60	60	60	60	60	60	60	60	60

Napomena: **. Korelacija je značajna na nivou 0.01 (2-tailed), *. Korelacija je značajna na nivou 0.05 (2-tailed).

Tabela 41. Pearsonova korelacija između vrednosti Min i Max N=60.

		Min	Max
Min	Pearson Correlation	1	.750**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	60	60
Max	Pearson Correlation	.750**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	60	60

Napomena: **. Korelacija je značajna na nivou 0.01 (2-tailed).

Biografija kandidata

Doktor medicine Asen Veličkov je rođen u Pirotu 07.07.1983. godine. Osnovnu školu i gimnaziju završava u Dimitrovgradu. Proglašen je za đaka generacije nakon završetka osnovnog obrazovanja, kao i za najboljeg đaka škole tokom trećeg i četvrtog razreda gimnazije.

Medicinski fakultet upisuje 2002. godine i tokom studija radi kao demonstrator na predmetu Medicinska genetika tokom jedne i na predmetu Fiziologija tokom 4 godine. Za vreme studija bavi se i naučnoistraživačkim radom iz oblasti mikrobiologije, fiziologije i interne medicine. Za vreme studija obavlja i stručno usavršavanje iz oblasti Hirurgije tokom letnje prakse u inostranstvu 2007. i 2008. godine. Tokom studija je i član studentskog parlamenta tokom 3 školske godine.

Studije medicine završava u Nišu 2009. godine kao stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka sa prosečnom ocenom 9,81. Iste godine odlazi na služenje vojnog roka u ŠRO pri Vojsci Srbije u Beogradu i tokom obavljanja vojničkog staža 2009. godine započinje akademske doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu na smeru Molekularna medicina. Kao stipendista Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja usmerava se na oblast plastične hirurgije i patologije. Tokom doktorskih studija radi kao stručni saradnik - volonter na premetu Biohemija od oktobra 2010., a juna 2011. godine počinje sa radom kao klinički lekar – volonter na Klinici za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KC Niš gde aktivno učestvuje u radu Klinike. Ispite na doktorskim studijama položio je sa prosečnom ocenom 9,94.

Specijalizaciju iz ortopedije i traumatološke hirurgije na Klinici za ortopediju i traumatološku hirurgiju na II Hirurškoj Klinici, Klinike Koburg u Bajernu, Nemačka započinje jula 2014. godine. Autor je više radova iz oblasti medicine. Oženjen je i otac dvoje dece.

Izjava 1.

IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ NUKLEARNE MORFOMETRIJE I IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA KOD MELANOMA KOŽE

koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivao/la na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredio/la autorska prava, niti zloupotrebio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, _____.

Asen V. Veličkov

Izjava 2.

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANOG I ELEKTRONSKOG OBLIKA
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Naslov disertacije:

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ NUKLEARNE MORFOMETRIJE I
IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA KOD MELANOMA KOŽE**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predao/la za unošenje u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom obliku.

U Nišu, _____.

Asen V. Veličkov

Izjava 3.

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom:

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ NUKLEARNE MORFOMETRIJE I IMUNOHISTOHEMIJSKIH PARAMETARA KOD MELANOMA KOŽE

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Nišu, _____.

Asen V.Veličkov