Mutacije gena BRAF i NRAS u pacijenata s melanomom kože čiji su tkivni uzorci analizirani tijekom 2017. i 2018. godine u Kliničkom bolničkom centru Split

Pavić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:509154

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Pavić

MUTACIJE GENA BRAF I NRAS U BOLESNIKA S MELANOMOM KOŽE ČIJI SU TKIVNI UZORCI ANALIZIRANI TIJEKOM 2017. I 2018. GODINE U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT

Diplomski rad

Akademska godina:
2018./2019.

Mentor:
Prof.dr.sc. Katarina Vilović, dr. med.

Split, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Pavić

MUTACIJE GENA BRAF I NRAS U BOLESNIKA S MELANOMOM KOŽE ČIJI SU TKIVNI UZORCI ANALIZIRANI TIJEKOM 2017. I 2018. GODINE U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT

Diplomski rad

Akademska godina:
2018./2019.

Mentor:
Prof.dr.sc. Katarina Vilović, dr. med.

Split, srpanj 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. Anatomija kože.....2

1.2. Novotvorine kože.....3

1.3. Melanom.....3

1.3.1. Epidemiologija.....4

1.3.2. Etiologija i čimbenici rizika.....5

1.3.2.1. Čimbenici rizika vezani uz pojedinca.....5

1.3.2.2. Čimbenici rizika vezani uz okoliš.....6

1.3.3. Klinička slika.....7

1.3.4. Dijagnostika.....8

1.3.5. Patohistološka analiza.....10

1.3.6. Genska analiza.....13

1.3.6.1. Gen BRAF.....13

1.3.6.2. Gen NRAS.....13

1.3.6.4. Divlji tip.....14

1.3.7. Klasifikacija melanoma.....14

1.3.8. Terapijski postupak.....17

1.3.8.1. Kirurgija.....17

1.3.8.2. Radioterapija.....18

1.3.8.3. Kemoterapija.....18

1.3.8.4. Imunoterapija.....18

1.3.8.5. Ciljana terapija.....20

1.3.9. Prognostički čimbenici.....20

1.3.10. Praćenje.....22

1.3.11. Prevencija.....23

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....25

3. ISPITANICI I METODE 27

3.1. Organizacija i opis istraživanja 28

3.2. Metoda prikupljanja i obrade podataka 28

3.3. Ispitanici 28

3.4 Test za molekularnu analizu 30

4. REZULTATI 31

5. RASPRAVA 40

6. ZAKLJUČAK 45

7. POPIS CITIRANE LITERATURE 47

8. SAŽETAK 60

9. SUMMARY 62

10. ŽIVOTOPIS 64

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Katarini Vilović,

na pristupačnosti, susretljvosti i podršci pri pisanju ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnom razumijevanju i potpori

tijekom akademskog obrazovanja.

1. UVOD

1.1. Anatomija kože

Koža (lat. *cutis*) je najveći čovjekov organ koji oblaže površinu cijelog tijela (1). U odraslog čovjeka koža zauzima površinu od 1,1 do 1,8 m^2 te čini 1/6 ukupne tjelesne mase (2).

Koža služi kao fizička barijera prema okolini, što je njena osnovna i najvažnija funkcija. Štiti organizam od fizičkih, kemijskih i mikrobioloških utjecaja okoline te sprječava gubitak vode i elektrolita. Sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature, sintezi vitamina D, izlučivanju štetnih tvari i imunološkom odgovoru organizma. Ujedno je i medijator osjeta pomoću receptora za dodir, hladnoću i toplinu (1, 2).

Morfološki gledano, koža se sastoji od dva sloja, epidermisa i dermisa. Ispod dermisa se nalazi potkožno masno tkivo koje se ne smatra dijelom kože, ali joj čini potporu (1).

Epidermis je vanjski sloj kože, podrijetlom iz ektoderma. Sastoji se od pet slojeva: temeljni, nazubljeni, zrnati, svijetli i rožnati sloj. Temeljni sloj (lat. *stratum basale*) je najdublji sloj epidermisa u kojem se nalaze epidermalne matične stanice. One se intenzivno mitotski dijele i tako osiguravaju neprekidno obnavljanje epidermisa. Nakon diobe jedna stanica ostaje u temeljnom sloju dok druga migrira kroz ostale slojeve te je podložna diferencijaciji i keratinizaciji. Nazubljeni sloj (lat. *stratum spinosum*) se sastoji od 4 do 7 redova stanica s jezgrama koje sintetiziraju keratin i pri sintezi se počinju morfološki mijenjati i diferencirati. Zrnati sloj (lat. *stratum granulosum*) se sastoji od 3 do 5 slojeva stanica u kojima započinje razgradnja jezgre. Svijetli sloj (lat. *stratum lucidum*) je prisutan samo u dijelovima kože koji su izloženi trenju. U ovom sloju dolazi do potpune razgradnje jezgre i daljnje keratinizacije stanica. Rožnati sloj (lat. *stratum corneum*) sadrži 10 do 30 slojeva mrtvih, spljoštenih stanica koje ne posjeduju jezgru kao ni ostale stanične organele. Stanice su nepovezane, kontinuirano se ljušte i zamjenjuju novima iz dubljih slojeva epidermisa. Vrijeme potrebno da stanica iz temeljnog sloja stigne do površine iznosi otprilike 15 do 30 dana, a to ovisi o dobi, spolu, i području tijela na kojem se koža nalazi (2-4).

Epidermis ne sadrži krvne žile, već se transport hranjivih tvari odvija difuzijom između epidermisa i dermisa preko dermoepidermalne granice. Ona je vrlo neravna te se tako povećava površina kroz koju difuzijom prolaze tvari potrebne za metabolizam epidermisa (3, 4).

Dermis je unutarnji sloj kože, podrijetlom iz mezoderma. Sastoji se od dva sloja vezivnog tkiva: papilarnog i retikularnog dermisa. Slojevi su izgrađeni od kolagenih i elastičnih vlakana raspoređenih u snopove. Papilarni dermis je gornji sloj dermisa, koji se sastoji od pravilno raspoređenih snopova kolagena i elastina. U ovom sloju se nalaze krvne kapilare, završetci živaca i osjetilna tjelešca za dodir. Retikularni dermis je donji sloj dermisa, sastavljen

od nepravilno raspoređenog vezivnog tkiva s debljim vlaknima kolagena (3). U retikularnom dermisu se nalaze krvne i limfne žile, živci, receptori za hladnoću, žlijezde lojnice i mišić koji podiže dlaku (lat. *m. arrector pili*) (2).

1.2. Novotvorine kože

Novotvorine kože predstavljaju najčešću skupinu malignih neoplazmi i čine trećinu svih dijagnosticiranih tumora (5). Kada govorimo o novotvorinama kože najčešće mislimo na bazocelularni i planocelularni karcinom te melanom. Bazocelularni karcinom čini između 70 i 80%, planocelularni karcinom oko 20%, a melanom oko 4% svih dijagnosticiranih slučajeva malignih neoplazmi kože. Uz ova tri najčešća tipa postoje i drugi tipovi novotvorina kože koji zajedno čine manje od 1% dijagnosticiranih slučajeva. To su karcinom Merkelovih stanica, dermatofibrosarkom, Pagetova bolest i kožni limfom T stanica (6, 7).

Učestalost pojavljivanja novotvorina kože se kontinuirano povećava te u svijetu predstavlja sve veći javnozdravstveni problem (8). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*) godišnje se dijagnosticira između 2 i 3 milijuna slučajeva malignih neoplazmi kože. Taj broj se smatra preniskim, osobito u svjetlu istraživanja Rogersa i sur. koji procjenjuju da se samo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) godišnje dijagnosticira 3,5 milijuna slučajeva novotvorina kože (9).

1.3. Melanom

Melanom je neuroektodermalni tumor koji nastaje zloćudnom preobrazbom melanocita. Melanociti su stanice koje potječu od stanica neuralnog grebena. Prekursorske stanice melanocita migriraju u prvom tromjesečju embrionalnog razvoja iz neuralnog grebena te nastanjuju kožu, meningealne ovojnice, oko i sluznice organa (10). Zbog ove migracije melanocita, primarno sijelo melanoma može biti bilo koja od ovih lokacija. U 91,2% slučajeva primarno sijelo melanoma je koža, u 5,2% slučajeva je oko, a u 1,3% slučajeva sluznica organa (11).

Melanociti se u koži nalaze u temeljnom sloju epidermisa i u folikulima dlaka. Zaduženi su za proizvodnju melanina, pigmenta odgovornog za boju kože i kose i zaštitu stanica od oštećenja induciranog ultraljubičastim (UV) zračenjem (12). Melanin u koži nastaje prilikom izlaganja sunčevoj svjetlosti u procesu koji se naziva melanogeneza. Tijekom melanogeneze melanociti sintetiziraju pigment melanin te ga pohranjuju u citoplazmatskim organelama, melanosomima. Melanosomi se nakupljaju u citoplazmi iznad jezgre stanice te tako štite stanicu od štetnog djelovanja UV zračenja (3).

1.3.1. Epidemiologija

Melanom kože čini 1,79% ukupne incidencije svih zloćudnih tumora. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) u 2018. godini je dijagnosticirano 287 723 slučaja melanoma (13).

Posljednjih nekoliko desetljeća incidencija melanoma ubrzano raste (8). Primjerice u SAD-u, 1975. godine stopa incidencije melanoma je iznosila 7,9/100 000 stanovnika. U 2018. godini je iznosila 22,8/100 000 stanovnika (14). O ozbiljnosti ove pojave govori procjena Halla i sur. da će svaka 75. osoba rođena 2000. godine u SAD-u oboljeti od melanoma kože (15). Kao i broj novodijagnosticiranih bolesnika, i broj bolesnika umrlih od melanoma kože tijekom posljednjih nekoliko desetljeća pokazuje trend rasta. U 2018. godini u svijetu je broj umrlih od melanoma iznosio 60 712 (13). Guy i sur. u 2019. godini predviđaju stabilnost stope smrtnosti, dok će stopa incidencije i dalje rasti (16).

Epidemiološke studije o učestalosti melanoma kože pokazuju povezanost broja oboljelih i geografskog položaja zemlje. Najviša stopa incidencije je u Australiji i Novom Zelandu (ASR, eng. *age standardised rate* 33,6 i 33,3/100 000 stanovnika), a najniža u zemljama srednje Azije (0,3/100 000 stanovnika). U Europi je najviša stopa incidencije zabilježena u zemljama sjeverne Europe: Norveškoj, Danskoj i Švedskoj (29,6, 27,6 i 24,7/100 000 stanovnika) (13).

Melanom se najčešće dijagnosticira između 40. i 70. godine života. Medijan godina u trenutku postavljanja dijagnoze iznosi 65 (14). Melanom se može pojaviti i u bolesnika mlađih od 40 godina i takvih je 15% od ukupnog broja dijagnosticiranih slučajeva (17).

Muškarci češće obolijevaju od melanoma kože nego žene. Tijekom 2018. godine postotak muškaraca oboljelih od melanoma je iznosio 52,4%, a žena 47,6% (13). Istovremeno promatrajući spol, starost i incidenciju, može se primijetiti da to ne vrijedi za sve dobne skupine. Adolescentice i mlade, odrasle žene podložnije su razvoju melanoma nego muškarci iste dobi. Nakon 40. godine života ovaj podatak se mijenja te učestalost melanoma među muškarcima postaje viša (18).

Melanom kože je poznat kao bolest bijele rase. Stopa incidencije melanoma je približno deset puta veća u bijelaca nego u osoba crne rase koje žive na istom području. Usprkos manjoj pojavnosti melanoma u osoba crne rase, stopa smrtnosti je viša (19, 20).

Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske iz 2015. godine melanom čini 3% svih zloćudnih novotvorina. Prema učestalosti pojavljivanja među malignomima je na 11. mjestu. Oboljeli su u 55,8% slučajeva bile osobe muškog spola, dok su 44,2% slučajeva bile osobe ženskog spola. Gledajući regionalnu raspodjelu najviše oboljelih je bilo u gradu Zagrebu

i Zagrebačkoj županiji, potom slijede Primorska-goranska i Osječko-baranjska županija. Većina bolesnika je u vrijeme dijagnoze bila između 75. i 79. godine života (21).

1.3.2. Etiologija i čimbenici rizika

Iako precizna etiopatogeneza melanoma još nije u potpunosti razjašnjena, poznati su brojni čimbenici koji povećavaju rizik za nastanak melanoma. Te čimbenike dijelimo u dvije skupine: čimbenici rizika vezani uz pojedinca i čimbenici rizika vezani uz okoliš (22).

1.3.2.1. Čimbenici rizika vezani uz pojedinca

Čimbenici rizika vezani uz pojedinca su obiteljska sklonost razvoju melanoma, prethodno dijagnosticiran melanom ili neki drugi zloćudni tumor kože, broj i tip nevusa, pigmentacija i tip kože te imunosupresija (22).

Obiteljska anamneza melanoma je pozitivna u 6-14% oboljelih od melanoma (23). Bolesnici koji imaju jednog rođaka u prvom koljenu oboljelog od melanoma imaju dvostruko veći rizik za razvoj istog. Ako se melanom dijagnosticira u dva ili više rođaka u prvom koljenu, rizik postaje 6 puta veći (24). Ovi bolesnici su najčešće mlađi u trenutku pojave bolesti i imaju veću vjerojatnost razvoja višestrukih primarnih lezija (25).

U obiteljima visokorizičnima za nastanak melanoma kože identificirana su dva gena odgovorna za sklonost razvoju bolesti. To su geni CDKN2A i CDK4, koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa. Gen koji je najčešće uključen u razvoj obiteljskog melanoma je CDKN2A. Njegova mutacija se pojavljuje u 20% obitelji sklonih razvoju bolesti. Kod bolesnika bez pozitivne obiteljske anamneze, vjerojatnost mutacije gena CDKN2A je oko 1%. Pojavnost mutacije gena CDK4 je mnogo rjeđa. Pojavljuje se u 1% obitelji sklonih razvoju melanoma (26).

Prisutnost drugih zloćudnih tumora kože povećava vjerojatnost nastanka melanoma. Bolesnici s osobnom anamnezom karcinoma kože imaju 4 puta veći rizik od razvoja melanoma (27). Također već postavljena dijagnoza melanoma povećava vjerojatnost nastanka nove lezije. Ovi bolesnici imaju 9 puta veći rizik koji ostaje povišen 20 godina nakon prvotne dijagnoze (28).

Pod povećanim rizikom razvoja melanoma su i osobe s većim brojem nevusa. Osobe s više od 100 melanocitnih nevusa imaju 7 puta veći rizik za razvoj melanoma u usporedbi s osobama koje imaju manje od 15 melanocitnih nevusa (29). Cho i sur. su ustanovili da je povišen broj nevusa bio jače povezan s pojavom melanoma na trupu, a manje s pojavom na glavi i udovima (30).

Osim broja nevusa, za razvoj melanoma je važna i vrsta prisutnih nevusa. Displastični

nevusi predstavljaju čimbenik rizika neovisan o ukupnom broju istih. Osobe sa sporadičnim displastičnim nevusom imaju 27 puta veći rizik razvoja melanoma u usporedbi s općom populacijom. U bolesnika s obiteljskim sindromom displastičnih nevusa rizik postaje 148 puta veći (22, 31).

Fenotipske značajke pojedinca poput pigmentacije i tipa kože, boje kose i očiju predstavljaju bitnu značajku u razvoju melanoma (32). U dermatologiji se tip i pigmentacija kože klasificiraju prema reakciji na UV zračenje. Tu metodu je 1975. godine razvio Thomas B. Fitzpatrick te se po njemu naziva Fitzpatrickova klasifikacija tipova kože (Tablica 1) (33).

Tablica 1. Tipovi kože prema Fitzpatricku (33).

Tip	Značajke kože	Karakteristike kože
I	Bijela koža s pjegicama	Nikada ne potamni, uvijek izgori
II	Bijela koža	Katkad potamni, uvijek izgori
III	Maslinasta koža	Obično potamni, nekada izgori
IV	Svijetlo smeđa koža	Uvijek potamni, rijetko izgori
V	Tamno smeđa koža	Uvijek potamni, nikada ne izgori
VI	Crna koža	Uvijek potamni, nikada ne izgori

U osoba s tipom kože I i II prema Fitzpatricku te u osoba s prisutnim pjegicama rizik nastanka melanoma je dvostruko veći. Također, rizik je dvostruko veći u crvenokosih i plavokosih osoba. Boje šarenice oka je također su povezana s melanomom kože. Osobe s plavom i zelenom bojom očiju imaju 50% veći rizik razvoja melanoma u usporedbi s osobama s tamnim očima (34).

Imunosuprimiranost je još jedan čimbenik koji povećava vjerojatnost nastanka melanoma kože. U primatelja transplantiranih organa, rizik nastanka bolesti je 2,4 puta veći u usporedbi s općom populacijom (35). Rizik obolijevanja je povećan i kod bolesnika s bolestima koje uzrokuju imunodeficijenciju organizma poput AIDS-a (36).

1.3.2.2. Čimbenici rizika vezani uz okoliš

Od čimbenika rizika vezanih uz okoliš, najveći značaj u nastanku melanoma kože ima izlaganje UV zrakama. Smatra se da između 60 i 70% svih melanoma nastaje zbog prekomjerne izloženosti UV zračenju (37). Ultraljubičasto zračenje koje direktno utječe na malignu alteraciju melanocita je UVB zračenje. Ono se nalazi između 280 i 320 nm u elektromagnetskom spektru svjetlosti. Nukleinske kiseline i proteini u stanicama kože apsorbiraju ovaj tip zračenja, što rezultira oštećenjem deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u melanocitima. Ovo oštećenje uzrokuje alteraciju genskog materijala i posljedični razvoj melanoma (38, 39). Fears i sur. su

utvrdili da povećanje UVB zračenja za 10% povećava rizik nastanka melanoma u muškaraca za 19%, a u žena za 16% (40).

Osim vrste zračenja kojoj se bolesnici izlažu, za razvoj melanoma je važan i način ekspozicije sunčevoj svjetlosti. U etiologiji melanoma važnije je intermitentno, povremeno, ali intenzivno izlaganje, naspram kontinuiranog izlaganja tijekom dužeg vremenskog razdoblja (41). Kontinuirano izlaganje sunčevoj svjetlosti je manje intenzivno te čak ima blagi zaštitni učinak za razvoj svih podtipova melanoma osim lentiginoznog zloćudnog melanoma (42, 43). Za vrijeme intermitentnog izlaganja UV zračenju ne dolazi do pojačavanja sposobnosti popravka oštećene DNK, niti do sinteze melanina koji ju štiti od oštećenja. Zbog toga lakše dolazi do zloćudne pretvorbe melanocita i nastanka melanoma (41).

Opekline izazvane pretjeranim izlaganjem sunčevoj svjetlosti povezane su s većom učestalosti razvoja melanoma. Smatra se da jednom zadobivene opekline s mjehurima udvostručuju rizik nastanka melanoma (44).

Do sada provedena istraživanja navode da izlaganje umjetnim izvorima UV zračenja, kao npr. solarijima, povećava rizik nastanka melanoma (45). Rizik je povećan za 20% kod onih osoba koje su se jednom izložile ovom tretmanu sunčanja (46). S povećanjem broja izlaganja rizik raste te se udvostručuje kada se s tretmanima započinje prije 35. godine života (47).

Fotokemoterapija koja se koristi u liječenju psorijaze povećava rizik od razvoja melanoma. Rizik je povećan kod bolesnika koji su primili više od 250 tretmana. Zbog toga je oboljele koji su bili podvrgnuti ovakvoj vrsti terapije potrebno pažljivo pratiti tijekom cijelog života (48).

1.3.3. Klinička slika

Melanom se klinički manifestira kao pigmentirana kožna lezija koja pokazuje morfološke promjene tijekom vremena. Prati ga neuobičajena raznolikost jer varira u veličini, obliku, boji i dubini prodora. Upravo zbog različite kliničke slike kojom se prezentira, otkrivanje melanoma kože je otežano (49).

Da bi olakšali prepoznavanje melanoma u što ranijoj fazi bolesti, skupina dermatologa sa Sveučilišta u New Yorku je 1985. godine navela 4 klinička znaka pod akronimom ABCD na temelju kojih se postavlja sumnja na melanom i indicira dodatna obrada. Svjetska zdravstvena organizacija je 2004. godine proširila akronim na ABCDE (50). Slovo A predstavlja asimetriju (eng. *Assymetry*). Za razliku od benignih nevusa melanomi su neravne i nepravilno oblikovane promjene. Slovo B predstavlja rubove (eng. *Border*). Rubovi melanoma su nepravilni, nazubljeni ili izbrazdani. Slovo C predstavlja boju (eng. *Color*). Boja melanoma je raznolika,

najčešće nehomogena. Može varirati od crne, tamnosmeđe, svijetlosmeđe do žute. Rijetko se može pojaviti melanom bez melanina-amelanotični melanom. Slovo D predstavlja promjer (eng. *Diameter*). Promjena u promjeru lezije može uputiti na razvoj melanoma. Slovo E predstavlja evoluciju (eng. *Evolving*). Bilo koja promjena boje, oblika, promjera ili pojava krvarenja može ukazivati na razvoj melanoma (2, 49, 50). Osjetljivost ove metode je između 82 i 96%, a specifičnost između 28 i 46% (51).

U uznapredovalim stadijima bolesti dolazi do promjene konzistencije primarne lezije te pojave sekundarnih promjena, kao što su vlaženje, stvaranje krasta, erozija, ranica i ulceracija. Također se mogu pojaviti znakovi krvarenja i upale na području tvorbe te povećanje regionalnih limfnih čvorova. Melanom koji je metastazirao, osim navedenih simptoma, može uzrokovati nespecifične simptome poput gubitka apetita, mučnine, povraćanja i umora (52).

Tijekom kliničkog pregleda posebnu pozornost treba obratiti na dijelove tijela na kojima se melanom najčešće pojavljuje. Primarna lezija se u 43% slučajeva nalazi na ekstremitetima, u 34% slučajeva na trupu, 12% slučajeva na licu, 7% slučajeva na vlasištu te u 4% slučajeva na drugim, neklasificiranim mjestima (53). Kod muškaraca se primarni melanom u 52% slučajeva javlja na leđima i ramenima, a kod žena u 31% slučajeva na donjim udovima (54).

Melanom se u 70-80% slučajeva razvija *de novo*, a u 20-30% slučajeva iz prekursorskih lezija (55). Zato je pri kliničkom pregledu kože nužno obratiti pozornost na novonastale lezije kao i na promjene nastale na već postojećim lezijama. Prekursorske lezije melanoma koje je potrebno prepoznati i kontinuirano pratiti su displastični nevus i kongenitalni melanocitni nevus (56).

Diferencijalna dijagnoza obuhvaća čitav niz dermatoloških entiteta koje je bitno razlikovati od samog melanoma kože. Neki od njih su melanocitni nevus, Spitzin nevus, *naevus coeruleus*, kongenitalni nevus, nevus spilus, bazocelularni karcinom, aktinička keratoza, Bowenova bolest, seboroična keratoza, virusna bradavica, angiokeratom, dermatofibrom i Kaposijev sarkom (57).

1.3.4. Dijagnostika

Rano prepoznavanje melanoma ima značajan utjecaj na smanjenje smrtnosti uzrokovane ovom zloćudnom novotvorinom. Debljina lezije je parametar koji je najsnažnije povezan s dugoročnom prognozom. Tijekom vremena debljina melanoma se povećava što nepovoljno utječe na prognozu oboljelih (58). Prema epidemiološkoj studiji Referentnog centra za melanom Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske, srednja vrijednost debljine melanoma u trenutku postavljanja dijagnoze je 2,24 mm. To većinu oboljelih svrstava u 3. stupanj debljine

tumora prema Breslowu s petogodišnjim preživljenjem od 63%. Ova činjenica ukazuje na važnost pravovremenog otkrivanja i postavljanja dijagnoze melanoma, čime se oboljelima poboljšava prognoza (59).

Klinički pregled kože je temeljno sredstvo za rano otkrivanje melanoma. Obuhvaća pregled cijele kože, kožnih adneksa, genitalne regije i vidljivih sluznica (60). U svakodnevnoj praksi se kliničari, uz ABCDE pravilo, oslanjaju i na znak ružnog pačeta (eng. *ugly duckling sign*). On označava promjenu koja je drugačija od svih promjena na koži te se kao takva ističe i može uputiti na razvoj melanoma (61). U uporabi je i Glasgowska lista sedam karakterističnih znakova, kojom se tvorba označava sumnjivom te se u budućnosti pomno prati (62).

Do 80-ih godina prošlog stoljeća dijagnoza melanoma se postavljala isključivo na temelju makroskopskih značajki lezije. Melanomi su se često prepoznavali samo kad su bili velike, ulcerirane tvorbe, zbog čega je prognoza bolesti bila loša. No tada u kliničku praksu polako ulazi dermatoskopija, koja postaje dio kliničkog pregleda sumnjivih kožnih lezija (63).

Dermatoskopija je neinvazivna dijagnostička metoda koja omogućuje bolju vizualizaciju pigmentnih lezija kože. Primjenom dermatoskopije morfološke strukture i promjene kože, inače nevidljive golim okom, postaju vidljive. Uz pomoć optičkog instrumenta-dermatoskopa, moguće je analizirati strukture u području epidermisa, bazalne membrane i papilarnog dermisa (64). Dermatoskopija omogućuje preciznije prepoznavanje zloćudnih i dobroćudnih promjena, bolje planiranje kirurških zahvata te smanjenje broja nepotrebnih biopsija i ekscizija. Točnost kliničkog pregleda je oko 65% što se može poboljšati za 20% uz korištenje dermatoskopa (65).

Pigmentirane lezije koje se prilikom kliničkog i dermatoskopskog pregleda identificiraju kao sumnjive, podvrgnu se biopsiji. Biopsija je temeljna dijagnostička metoda na temelju koje se postavlja dijagnoza melanoma kože. Postoji više vrsta biopsija koje se mogu koristiti pri dijagnosticiranju melanoma. To su ekscizijska, incizijska (eng. *punch*) i tangencijalna (eng. *shave*) biopsija (66).

Ekscizijska biopsija obuhvaća potpunu eksciziju pigmentirane promjene s 1 do 2 mm susjednog zdravog ruba kože. Uzorak mora obuhvaćati kožu pune debljine i potkožno tkivo, bez oštećenja mišićne fascije. Trenutno, Nacionalni institut za zdravlje SAD-a (eng. *National Institute for Health*) preporučuje ekscizijsku biopsiju kao najbolju metodu za dobivanje točne dijagnoze lezije koja je sumnjiva na melanom (66, 67).

Incizijska biopsija se provodi u području najvišeg ili najnepravilnijeg dijela pigmentirane promjene. Uzorak mora biti veličine 5-7 mm, te mora obuhvaćati kožu pune debljine i dio potkožnog tkiva. Incizijska biopsija ne pogoršava prognozu, ali se njome može

izostaviti najdeblji dio tumora. Prihvatljiva je za velike lezije lica i sluznice, kada je ekscizija cijele lezije nepraktična, a vjerojatnost melanoma malena (66, 68).

Tangencijalna biopsija je korisna metoda za uklanjanje površinskih lezija. Izvodi se dovoljno duboko da ukloni leziju, ali dovoljno plitko da spriječi oštećenje dermisa. Tangencijalnu biopsiju treba izbjegavati pri sumnji na melanom, jer ometa histološku dijagnozu i procjenu Breslow debljine tumora (66, 69).

Nakon biopsije obavlja se patohistološka analiza bioptiranog uzorka za potvrdu dijagnoze melanoma. Potom slijedi podvrgavanje oboljelog dodatnim pretragama kojima se nastoji isključiti klinički neispoljena metastatska bolest. Pretrage mogu uključivati snimanje srca i pluća rendgenom, magnetsku rezonancu mozga, ultrazvučni pregled regionalnih limfnih čvorova i trbušne šupljine, kompjuteriziranu tomografiju prsnog koša, trbušne šupljine i zdjelice te pozitronsku emisijsku tomografiju. Rezultati pretraga se koriste za klasifikaciju primarne lezije melanoma i razvrstavanje bolesnika u prognostičke skupine (66). Rezultati metaanaliza upućuju na ultrazvuk kao najpouzdaniju metodu za procjenu statusa regionalnih limfnih čvorova, s osjetljivosti između 60 i 80% i specifičnosti koja doseže 97%. Pozitronska emisijska tomografija je najpouzdanija metodu za procjenu statusa cijelog tijela (70, 71).

1.3.5. Patohistološka analiza

Patohistološka analiza melanoma se temelji na kombinaciji morfoloških i citoloških značajki lezije. Ona pruža niz podataka koji, osim u postavljanju dijagnoze, mogu pomoći u određivanju prognoze i terapije za oboljele. Mikroskopskom analizom tumora dobiju se podaci o histološkom podtipu lezije, stupnju invazije melanoma, prisutnosti ulceracije, mitotskom indeksu, limfokapilarnoj invaziji, neurotropizmu, staničnoj regresiji i prisutnosti infiltrirajućih limfocita u leziji (72).

Razlikuju se četiri najčešća histološka podtipa melanoma: površinsko-širećі melanom (lat. *melanoma superficiale*), nodularni melanom (lat. *melanoma nodulare*), lentiginozni zloćudni melanom (lat. *lentigo maligna melanoma*) i akralni lentiginozni melanom (lat. *lentigo melanoma acrale*) (2, 73).

Površinsko-širećі melanom je najčešći podtip melanoma u ljudi bijele rase te čini 70-80% svih slučajeva. Javlja se između 30. i 50. godine života, češće u žena (74). Ovaj podtip melanoma se može pojaviti na bilo kojoj anatomskoj lokalizaciji, ali se najčešće javlja na trupu u muškaraca i na donjim udovima u žena. U 20-50% oboljelih površinsko-širećі melanom nastaje iz nevusa (75). Histološki gledano, stanice površinsko-širećeg melanoma su velike, bogate citoplazmom i s naglašenom eozinofilnom jezgricom. U dermisu je prisutan upalni

infiltrat (73).

Nodularni melanom je drugi najčešći histološki podtip melanoma. Javlja se u 15-30% svih oboljelih. Obično nastaje između 40. i 50. godine života, podjednako učestalo u oba spola. Najčešće lokalizacije nodularnog melanoma su trup, glava i vrat (76). Razvoj ovog podtipa je brz, tako da se dijagnoza postavlja unutar nekoliko mjeseci do dvije godine od njegova nastanka (77). U histološkoj slici nodularnog melanoma prisutni su intradermalni čvorići sastavljeni od velikih epiteloidnih melanocita s izraženim jezgrama (73).

Lentiginozni zloćudni melanom čini 5-15% svih melanoma. Nastaje u starijoj životnoj dobi, najčešće nakon 65. godine života. Pojavnost ovog podtipa je češća u žena nego u muškaraca (78). Lentiginozni zloćudni melanom je oblik melanoma kod kojeg je kumulativni učinak UV zračenja presudan za nastanak i razvoj. Nastaje na dijelovima tijela koji su kronično izloženi sunčevoj svjetlosti, poput kože na obrazima, nosu i rukama. Iznimno rijetko se javlja na ostalim djelovima kože (79). U histološkoj slici lentiginozni zloćudni melanom karakteriziraju atipični melanociti, atrofičan epidermis i povećana količina vezivnog tkiva u gornjem dermisu (80).

Akralni lentiginozni melanom je najrjeđi histološki podtip melanoma. Javlja se u 2-8% svih oboljelih. Iako je po pojavnosti najrjeđi, u ljudi crne i žute rase ovaj podtip melanoma je najčešći. Nastaje između 60. i 70. godine života, češće u muškaraca. Akralni lentiginozni melanom se javlja na neobraslim područjima kože, najčešće na okrajinama i subungvalno (81). Histološki gledano, akralni lentiginozni melanom se sastoji od atipičnih melanocita smještenih u donjim dijelovima epidermisa. Obično raste tijekom nekoliko mjeseci do nekoliko godina (82).

Uz ova četiri najčešća histološka podtipa melanoma, postoji još nekoliko podtipova koji se rjeđe javljaju. To su amelanotični, dezmoplastični, verukozni, nevoidni melanom i melanom nepoznatog primarnog sijela (74).

Stupanj invazije melanoma se mikroskopski mjeri od vrha zrnatog sloja epidermisa do najdublje stanice na bazi tumora. Nakon mikroskopske procjene stupnja invazije, melanom se svrstava u pripadajuću kategoriju prema Breslowljevoj klasifikaciji debljine tumora (Tablica 2). Određivanje stupnja invazije melanoma je važno jer je viši stupanj invazije povezan s većom učestalošću metastaziranja i pogoršanjem prognoze u oboljelih (83).

Tablica 2. Breslowljeva klasifikacija debljine tumora (83).

Stupanj	Debljina lezije od površine do baze tumora
I	≤ 0,75 mm
II	0,76-1,5 mm
III	1,51-4 mm
IV	> 4 mm

Mikroskopskom analizom uzorka utvđuje se ulceriranost lezije melanoma. Ulceriranje se definira kao odsustvo netaknutog epidermisa u punoj debljini te postojanje reaktivnih promjena poput depozita fibrina i neutrofila. Ulcerirani melanomi tipično pokazuju invaziju kroz epidermis dok neulcerirani melanomi odižu nadležeći epidermis. Ulceriranje se smatra značajkom biološki agresivnijeg oblika tumora koji ima veću sposobnost metastaziranja (72, 85)

Patohistološkom analizom melanoma utvrđuje se prisutnost neurotropizma u uzorku melanoma. Neurotropizam se označava kao prisutnost atipičnih melanocita u endoneuriju i perineuriju živaca kože. Pojava neurotropizma je povezana s povećanom frekvencijom lokalnih recidiva (72, 85).

Mikroskopska analiza melanoma obuhvaća i procjenu mitotskog indeksa u leziji tumorskog tkiva. Mitotski indeks se navodi kao broj mitoza na 1 mm^2 lezije. Što je veći mitotski indeks, to je veća vjerojatnost diseminacije melanoma te je preživljenje oboljelih kraće (72, 85).

Limfovaskularna invazija se definira kao prisutnost stanica melanoma unutar lumena krvnih i limfnih žila. Invazija se smatra znakom agresivne bolesti te je značajan prognostički čimbenik za širenje melanoma u regionalne limfne čvorova, pojavu recidiva te preživljenje bolesnika s melanomom kože (72, 86).

Limfociti koji infiltriraju tumorsku leziju predstavljaju imunološku reakciju organizma na stanice melanoma. Prisutnost limfocitnog infiltrata u primarnoj leziji melanoma je povezana s manjom vjerojatnošću širenja bolesti u regionalne limfne čvorove i daljnjeg metastaziranja (72, 87).

Regresija tumorskih stanica se definira kao proces smanjenja broja stanica melanoma praćen dermalnom fibrozom, upalnim infiltratom i melanofagima. Prisutna je u 13% svih melanoma, češće u tanjih lezija. Klinički značaj ove pojave je nepoznat. Ronan i sur. navode da je pojava regresije tumorskih stanica povezana s lošijom prognozom jer omogućava brži razvoj vertikalne faze rasta koja izbjegava imunološki odgovor organizma (88). Nasuprot tome, Ribero i sur. navode da je prisutnost regresije u primarnom melanomu povezana s negativnim

statusom regionalnih limfnih čvorova (89).

1.3.6. Genska analiza

Tijekom posljednjeg desetljeća napravljen je značajan napredak u otkrivanju genetskih alteracija koje imaju važnu ulogu u patogenezi melanoma. Molekularno i genetsko razumijevanje tumorskih stanica melanoma dovelo je do razvoja ciljne terapije kao jednog od načina liječenja ove bolesti. Zbog toga određivanje i analiziranje genskih promjena u uzorcima melanoma postaje nezaobilazan dio postavljanja dijagnoze, određivanja prognoze te predviđanja odgovora na terapiju (90).

1.3.6.1. Gen BRAF

Gen BRAF, smješten na kromosomu 7, je gen koji se najčešće povezuje s melanomom kože. Njegov produkt je citoplazmatska serin/treonin kinaza koja sudjeluje u MAPK/ERK signalnom putu. Glavna uloga tog signalnog puta je kontrola ekspresije gena koji reguliraju rast, diferencijaciju i kretanje stanica te proces apoptoze (91). Kada se dogodi mutacija gena BRAF, on postaje onkogen. Dolazi do kontinuirane aktivnosti serin/treonin kinaze kodirane BRAF genom, uslijed čega dolazi do stalne aktivacije nizvodnih kinaza u MAPK/ERK signalnom putu. Ova promjena uzrokuje nekontroliranu proliferaciju i malignu alteraciju melanocita (92).

Mutacija gena BRAF se najčešće događa na 600 kodonu 15. egzona, gdje aminokiselinu valin zamjeni glutamična kiselina (BRAF V600E). Ostale česte mutacije se događaju na istom kodonu a uključuju zamjenu valina lizinom (BRAF V600K), argininom (BRAF V600R), asparaginskom kiselinom (BRAF V600D) i metioninom (BRAF V600M) (93). Bolesnici s mutacijom gena BRAF u leziji melanoma su mlađi i nemaju oštećenja kože povezana s kroničnim izlaganjem sunčevoj svjetlosti (94). Također mutacija je najčešće prisutna u površinsko-širećem podtipu melanoma kože (95).

1.3.6.2. Gen NRAS

Gen NRAS pripada RAS obitelji protoonkogena. Ona uključuje još dva gena: HRAS i KRAS, koji su zaduženi za kontrolu stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Smatra se da jedna trećina svih ljudskih novotvorina ima mutaciju u RAS obitelji gena (96).

Produkt NRAS gena je RAS protein vezan za transmembranski receptor. Vezanjem liganda za transmembranski receptor dolazi do aktivacije RAS proteina, te nizvodne aktivacije proteina koji sudjeluju u MAPK/ERK i PI3K/AKT/MYC signalnim putevima stanice. Mutacija gena NRAS dovodi do produženog aktivnog stanja RAS proteina te kontinuirane stanične proliferacije, promjena u metabolizmu stanica te daljnjeg razvoja melanoma (97). Otprilike

80% mutacija gena NRAS se događa na 3. egzonu, kodonima 60 i 61. Preostalih 20% mutacija se događa na 2. egzonu, kodonima 12 i 13 (98). Mutacija gena NRAS se najčešće pojavljuje u nodularnom podtipu melanoma kao i u oboljelih koji imaju povijest kronične izloženosti UV zračenju (99).

1.3.6.4. Divlji tip

Oni melanomi koji nemaju navedene genske mutacije u uzorku tumorskog tkiva se označavaju kao divlji tip melanoma kože. Najčešće imaju nereguliranu aktivnost MAPK/ERK signalnog puta zbog mutacija u genima KIT, GNAQ, GNA11, RAF1, MEK1/2, KRAS, HRAS i NF1 (100). Divlji tip je najčešće prisutan u nodularom podtipu melanoma kože kao i u lezijama s povišenim mitotskim indeksom (101).

1.3.7. Klasifikacija melanoma

Klasifikacija melanoma omogućuje razvrstavanje bolesnika u skupine koje se međusobno razlikuju prema prognozi i načinu liječenja. Iako je situacija svakog oboljelog različita, melanomi koji pripadaju istom stadiju ima slične karakteristike i tretiraju se na isti način. Klasificiranje bolesti daje mogućnost usporedbe različitih oblika liječenja i pomaže kliničarima pri donošenju odluka u liječenju bolesnika (8).

Prvi klasifikacijski model za melanom kože uveo je Wallace H. Clark, 1967. godine, procjenjujući dubinu invazije melanoma u pet razina, ovisno o infiltraciji tumorskih stanica u pojedine anatomske slojeve kože (Tablica 3) (102).

Tablica 3. Clarkova klasifikacija dubine invazije (102).

Stupanj	Dubina infiltracije tumora u slojeve kože
I	tumor u epidermisu, melanom in situ
II	zahvaća papilarni dermis, ali ne doseže papilarno-retikularnu granicu
III	ispunjava papilarni dermis, ali ne zahvaća retikularni dermis
IV	zahvaća retikularni dermis, ali ne zahvaća potkožno tkivo
V	zahvaća retikularni dermis i potkožno tkivo

Godine 1970. Alexander Breslow objavljuje klasifikaciju u kojoj svrstava melanome u skupine s obzirom na debljinu primarnog tumora. Za razliku od originalne klasifikacije koja je bolesnike svrstavala u 5 grupa, danas je u uporabi modificirana Breslowljeva klasifikacija koja razlikuje 4 grupe (Tablica 2) (83).

Danas se najsveobuhvatnijim sustavom klasificiranja melanoma smatra TNM sustav Američkog udruženja za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC). Najnovija

revizija sustava je objavljena u siječnju 2018. godine. TNM sustav klasificiranja uključuje procjenu primarnog tumora (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M) (85).

T kategorija melanoma temelji se Breslovljevoj klasifikaciji debljine primarnog tumora i prisutnosti ulceracije u primarnoj leziji melanoma (Tablica 4) (85).

N kategorija melanoma se temelji na broju zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova te prisutnost *in-transit*, satelitskih i mikrosatelitskih metastaza (Tablica 5) (72, 85). *In-transit* metastaze su metastaze kože ili potkožnog tkiva koje su udaljene više od 2 cm od primarne lezije, ali nisu izvan drenažnog područja regionalnog limfnog čvora (85, 103). Satelitske metastaze se klasificiraju se kao lezije koje se javljaju unutar 2 cm od primarnog tumora. Mikrosatelitske metastaze su nakupina melanomskih stanica odvojenih normalnim dermisom od primarne lezije melanoma. Pronalaze se prilikom patohistološkog pregleda primarnog tumora (66, 85).

M kategorija se temelji na prisutnosti udaljenih metastaza. Ako one postoje, dodatno se klasificiraju prema lokalizaciji u tijelu (Tablica 6) (72, 85).

Tablica 4. T kategorija prema TNM klasifikaciji (85).

T kategorija	
TX	primarni tumor se ne može odrediti
T0	nema dokaza o postojanju primarnog tumora
Tis	melanom in situ
T1	melanom do 1,0 mm debljine,
T1a	melanom <0,8 mm debljine, bez ulceracije
T1b	melanom <0,8 mm debljine s ulceracijom ili melanom 0,8-1,0 mm debljine sa ili bez ulceracije
T2	melanom >1,0 do 2,0 mm debljine,
T2a	melanom >1,0 do 2,0 mm debljine, bez ulceracije
T2b	melanom >1,0 do 2,0 mm debljine, s ulceracijom
T3	melanom >2,0 do 4,0 mm debljine
T3a	melanom >2,0 do 4,0 mm debljine, bez ulceracije
T3b	melanom >2,0 do 4,0 mm debljine, s ulceracijom
T4	melanom >4,0 mm debljine
T4a	melanom >4,0 mm debljine, bez ulceracije
T4b	melanom >4,0 mm debljine, s ulceracijom

Tablica 5. N kategorija prema TNM klasifikaciji (85).

N kategorija	
NX	zahvaćenost limfnih čvorova se nemože odrediti
N0	u regionalnim limfnim čvorovima nema presadnica
N1	presadnica u 1 regionalni limfni čvor ili prisutnost mikrosatelitnih presadnica bez zahvaćenosti limfnih čvorova
N1a	klinički okultna presadnica u 1 regionalni limfni čvor, bez prisutnosti *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N1b	klinički vidljiva presadnica u 1 regionalni limfni čvor, bez prisutnosti *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N1c	prisutnost *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza, bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N2	presadnice u 2 do 3 regionalna limfna čvora, ili prisutnost *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza s presadnicom u 1 regionalni limfni čvor
N2a	klinički okultne presadnice u 2 do 3 regionalna limfna čvora, bez prisutnosti *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N2b	presadnice u 2 do 3 regionalna limfna čvora, od čega je barem jedna klinički otkrivena, bez prisutnosti *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N2c	presadnica u 1 regionalni limfni čvor s prisutnim *in-transit*, satelitskim i/ili mikrosatelitskim metastazama
N3	presadnice u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova ili prisutnost *in-transit*, satelitskih ili mikrosatelitskih metastaza u 2 ili više regionalna limfna čvora
N3a	klinički okultne presadnice u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova, bez prisutnosti *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N3b	presadnice u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova, od čega je barem jedna klinički otkrivena, bez prisutnosti *in-transit*, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N3c	presadnice u 2 ili više regionalna limfna čvora s prisutnim *in-transit*, satelitskim i/ili mikrosatelitskim metastazama

Tablica 6. M kategorija prema TNM klasifikaciji (85).

M kategorija	
M0	bez udaljenih metastaza
M1	prisutne udaljene metastaze
M1a	prisutne udaljene metastaze u kožu, meka tkiva uključujući mišiće i/ili neregionalne limfne čvorove
M1b	prisutne udaljene metstaze u pluća, sa ili bez M1a zahvaćenim područjem
M1c	prisutne udaljene metastaze u visceralna područja koja isključuju CNS, sa ili bez M1a i M1b zahvaćenim područjima
M1d	prisutne udaljene metastaze u CNS, sa ili bez M1a, M1b i M1c zahvaćenim područjima

1.3.8. Terapijski postupak

Terapijska metoda izbora u bolesnika s patohistološki dijagnosticiranim melanom kože je kirurška ekscizija, no ovisno o stadiju bolesti još se primjenjuju kemoterapija, imunoterapija, radioterapija te u novije vrijeme ciljana terapija (8).

1.3.8.1. Kirurgija

Nakon biopsije kojom se potvrđuje dijagnoza melanoma, na mjestu primarne lezije se provodi šira i dublja kirurška ekscizija. Njen cilj je potpuno uklanjanje primarnog melanoma, smanjenje rizika od lokalnog recidiva i dobivanje histološki čistih resekcijskih rubova (66).

Širina ekscizijskih rubova ovisi o vrsti primarnog melanoma i dubini tumora. Preuski rezni rubovi rezultiraju većim brojem lokalnih recidiva, ali ne utječu na metastatski potencijal melanoma i preživljenje bolesnika (104). Broj recidiva pada ispod 3% kada se kirurška ekscizija izvodi prema preporukama Američke dermatološke akademije (Tablica 7) (105).

Tablica 7. Preporuke Američke dermatološke akademije za širinu reznih rubova pri kirurškoj eksciziji primarnog melanoma (105).

Debljina tumora	Širina rubova
in situ	0,5-1 cm
≤ 1,0 mm	1 cm
> 1,0 do 2,0 mm	1-2 cm
> 2,0 mm	2 cm

Nakon kirurške ekscizije primarnog sijela melanoma, važno je odrediti prisutnost bolesti u regionalnim limfnim čvorovima. To omogućuje precizno klasificiranje lezije, određivanje prognoze i donošenje odluke o adekvatnom obliku terapije za oboljelog (104). Prilikom širenja melanoma u limfni sustav, prvi zahvaćeni limfni čvor se naziva limfni čvor čuvar. Biopsijom limfnog čvora čuvara (eng. *sentinel lymph node biopsy*, SLNB) se identificiraju bolesnici sa subkliničkim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima. SLNB započinje limfoscintigrafskim snimanjem 24 sata prije samog postupka. Oko periferije postoperacijskog ožiljka intradermalno se injicira između 0,1 i 0,5 ml nanokoloida obilježenog tehnecijem 99m. Injicirano područje se zatim prati transkutanom gama kamerom kojom se prikazuje drenažno područje melanoma, kao i limfni čvor čuvar (34, 106). Ovim postupkom se omogućuje točna identifikacija limfnog čvora čuvara u 99% slučajeva (107). Sljedeći dan prije početka same biopsije u već obilježeno područje kože se injicira do 2 mL 2,5% patent blue-V boje. Potom slijedi ekstirpacija limfnog čvora čuvara koji je obojen plavom bojom, a gama kamerom se

potvrđuje njegova radioaktivnost (34, 106).

Daljnji postupak u terapiji melanoma ovisi o patohistološkoj analizi odstranjenog limfnog čvora. Ako je nalaz biopsije limfnog čvora čuvara negativan smatra se da ni u ostalim limfnim čvorovima tog drenažnog područja nema tumorskih stanica te se takve bolesnike samo klinički prati. Ako je nalaz pozitivan, smatra se da se i u drugim limfnim čvorovima te regije mogu pronaći tumorske stanice te se preporučuje obaviti limfadenektomiju limfnih čvorova regije (107).

1.3.8.2. Radioterapija

Radioterapija nema raširenu primjenu u liječenju melanoma jer je on najmanje radiosenzitivan od svih novotvorina kože (8). Ona se kao definitivan oblik terapije može primjenjivati prilikom liječenja lentiginoznog zloćudnog melanoma, ali samo u onim slučajevima kada kirurška resekcija melanoma nije moguća. Takvim se terapijskim pristupom postiže lokalna kontrola bolesti u 85-95% slučajeva (107). Kao adjuvantan oblik terapije, radioterapija se može koristiti nakon odstranjenja infiltriranih limfnih čvorova, kod ekstrakapsularnog širenja bolesti i kod patohistološki utvrđenog većeg broja infiltriranih limfnih čvorova. Radioterapija se može koristiti i kao palijativan oblik terapije s ciljem smanjenja izoliranih ili multiplih metastaza melanoma (107, 108).

1.3.8.3. Kemoterapija

Kemoterapija nije toliko učinkovita u liječenju melanoma, no može utjecati na smanjenje simptoma ili produljenje preživljenja kod nekih bolesnika (8, 107).

Citostatici se u terapiji melanoma mogu koristiti samostalno (monokemoterapija) ili u kombinaciji (polikemoterapija). U monokemoterapiji melanoma se najčešće primjenjuje citostatik dakarbazin. Odgovor na terapiju dakarbazinom je nizak (10-20%), a potpuna remisija se javlja u manje od 5% oboljelih (109). U malobrojnih bolesnika u kojih postoji odgovor na terapiju, on kratko traje. Medijan trajanja terapijskog odgovora je između 5 i 6 mjeseci (110). Razočaravajući učinci monokemoterapije potaknuli su razvoj polikemoterapije u liječenju melanoma. Polikemoterapijski protokoli koji se najčešće koriste su Dartmouth protokol (carmustin, cisplatina, dakarbazin, tamoksifen i) i CVD protokol (cisplatina, vinblastin i dakarbazin). No ni njihova primjena nije pokazala poboljšanje preživljenja te se rijetko primjenjuju (111).

1.3.8.4. Imunoterapija

Imunoterapija je jedna od metoda liječenja melanoma, kojoj je cilj stimulirati imunološki sustav oboljelog kako bi sam prepoznao i uništio stanice tumora. Postoji više različitih oblika imunoterapije: imunoterapija interleukinima, interferonima i inhibitorima

kontrolne točke (eng. *checkpoint inhibitor*) (8).

Interleukini su skupina citokina koje proizvode CD4+ T-limfociti. Djeluju kao kemijski signali između bijelih krvnih stanica. Interleukin koji se koristi kao oblik imunoterapije prilikom liječenja melanoma je interleukin 2 (IL-2). On ne djeluje izravno na tumorske stanice, već podržava rad CD4+ regulatornih T-limfocita i igra kritičnu ulogu u njihovoj diferencijaciji u različite podtipove. U istraživanjima gdje se IL-2 koristio kao terapija u uznapredovalim stadijima melanoma, zabilježen je odgovor u 16% ispitanika (112).

Interferoni su skupina citokina čija je glavna funkcija usporavanje angiogeneze i rasta stanica tumora te poticanje jače aktivacije imunološkog sustava. U terapiji melanoma se koristi interferon α-2b (IFN α-2b). On pokazuje dobre rezultate u liječenju bolesnika s visokim rizikom za razvoj udaljenih metastaza (113). Analizom učinkovitosti IFN α-2b nađeno je statistički značajno produženje intervala bez bolesti te povećanje petogodišnjeg preživljenja nakon primjene ovog lijeka. Visina primijenjene doze utječe na rezultat imunoterapije interferonom α-2b. Primjena visokih doza smanjuje rizik od recidiva i od smrti u oboljelih od melanoma, dok se primjenom interferona u nižim dozama ne postiže jednak učinak (114).

Jedan od perspektivnijih pristupa u terapiji melanoma je inhibicija imunoloških kontrolnih točaka. U fiziološkim uvjetima, imunološke kontrolne točke su ključne za prevenciju autoimunih zbivanja (115). Njihova ekspresija se razvojem melanoma mijenja, kako bi on izbjegao imunološki odgovor organizma. Terapijskom blokadom kontrolnih točaka organizmu se pokušava vratiti pravilna reakciju na stanice tumora. Kontrolne točke na kojima se ovaj oblik terapije temelji su molekule CTLA-4 i PD-1 (116).

CTLA-4 (eng. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) je molekulski receptor koji se nalazi na T-limfocitima. Melanom na svojim stanicama eksprimira ligand koji se veže za CTLA-4 receptor te dovodi inhibicije aktiviranih T-limfocita i zaustavljanja fiziološkog imunološkog odgovora. Da bi potaknuli imunološki odgovor bolesnika na stanice tumora koristi se anti-CTLA-4 monoklonsko protutijelo-ipilimumab (116). Njegovom primjenom trogodišnje preživljenje u bolesnika s metastatskim melanomom iznosi između 20 i 26% (117).

Druga ciljana molekula u imunoterapiji inhibitorima kontrolnih točaka je PD-1 receptor (eng. *programmed cell death 1*). Vezanjem PD-1 receptora za ligand koji je eksprimiran na tumorskim stanica, suprimira se funkcija T-limfocita i nastaje blokada fiziološkog imunološkog odgovora. U imunoterapiji se koriste anti PD-1 monoklonska protutijela koja se vežu na PD-1 receptor te tako pojačavaju odgovor imunološkog sustava na stanice melanoma (nivolumab) (118). Najbolji učinak u bolesnika s metastatskim melanomom ima kombinacija anti-CTLA-4 i anti PD-1 protutijela koja u 80% oboljelih dovodi regresije tumora (117).

1.3.8.5. Ciljana terapija

Ciljana terapija, zajedno sa imunoterapijom, je osnova modernog sistemskog liječenja metastatski proširenog melanoma. Temelji se na inhibiciji signalnih puteva koji dovode do prekomjerne proliferacije tumorskih stanica. Signalni put čija je neregulirana aktivacija prisutna u visokom postotku melanoma kože je MAPK/ERK signalni put. On je meta do sada poznatih oblika ciljane terapije (119).

Ciljana terapija se temelji na primjeni BRAF inhibitora: vemurafeniba i dabrafeniba. Oni, vezanjem na serin-treonin kinazu kodiranu BRAF genom, sprječavaju kontinuiranu aktivnost MAPK/ERK signalnog puta. Primjena BRAF inhibitora u bolesnika u stadiju IIIC ili IV je povezana s nižim rizikom od progresije tumora (za 74%) i nižim smrtnim rizikom (za 63%), u usporedbi s primjenom monokemoterapije. Iako ovi lijekovi imaju brz i učinkovit terapijski odgovor, najveći problem predstavlja brz razvoj rezistencije (120).

U bolesnika rezistentnih na terapiju BRAF inhibitorima, koriste se MEK inhibitori. Djelovanje MEK inhibitora se temelji na inhibiciji MEK kinaze, koja zatim inhibira MAPK/ERK signalni put i sprječava proliferaciju melanoma. Primjena MEK inhibitora se pokazala boljom od monokemoterapije u bolesnika s metastatskim melanomom. U prvih 6 mjeseci stopa preživljavanja je 81% naspram 61% kod primjene citostatika (121).

Učinkovitost ciljane terapije je veća ako se koristi kombinacija BRAF i MEK inhibitora. Stopa odgovora na kombiniranu terapiju bila je 76% naspram 54% u monoterapiji (122).

1.3.9. Prognostički čimbenici

Na temelju T, N i M kategorija melanoma (Tablice 4, 5, 6) određuje se stadij bolesti (Tablica 8). Određivanje stadija bolesti omogućuje planiranje najprikladnijeg tretmana liječenja za oboljele te predviđa prognozu i preživljenje bolesnika s dijagnosticiranim melanomom kože (85).

Stadij 0 označava melanom in situ, stadiji I i II lokaliziranu bolest, stadij III bolest proširenu na regionalne limfne čvorove te stadij IV bolest s utvrđenim udaljenim metastazama (86). Na temelju stadija bolesti određuje se prosječno petogodišnje preživljenje oboljelih. U stadiju I petogodišnje preživljenje iznosi 95-100%, u stadiju II iznosi 65-93%, u stadiju III iznosi 41-71%, a u stadiju IV 9-28% (123).

Tablica 8. Prognostički stadiji (85).

AJCC prognostičke grupe stadija			
T kategorija	**N kategorija**	**M kategorija**	**STADIJ**
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b ili N3c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a ili N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c ili N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a-T3a	N2c ili N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	bilo koji N >N1	M0	IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
bilo koji T, Tis	bilo koji N	M1	IV

Najvažniji prognostički čimbenik kod lokalizirane bolesti (stadij I i II) je debljina tumora prema Breslowu (Tablica 2). Veći stupanj debljine označava lošiju prognozu za oboljelog. Kod melanoma koji prema Breslowljevoj klasifikaciji pripadaju stupnju 1 (debljina <1 mm) petogodišnje preživljenje iznosi 92%. Kod melanoma stupnja 2 (debljina 1-2 mm) petogodišnje preživljenje je 80%, u stupnju 3 (debljina 2-4 mm) je 63% te u bolesnika s tumorom koji pripada stupnju 4 (debljina>4 mm) petogodišnje preživljenje iznosi 50% (124, 125).

Drugi važan prognostički čimbenik kod lokaliziranog melanoma je prisutnost ulceracije, koja označava lošiju prognozu za oboljelog. Ostali prognostički čimbenici za lokaliziranu bolest su se pokazali manje značajnima. To su mitotski indeks, dubina tumora prema Clarku, lokalizacija i histološki podtip primarnog tumora te dob i spol bolesnika (72, 85).

U bolesnka u kojih se bolest proširila u regionalne limfne čvorove (stadij III) najvažniji prognostički čimbenik je broj zahvaćenih čvorova. Petogodišnje preživljenje u bolesnika s jednim pozitivnim limfnim čvorom je 65%, u bolesnika s dva pozitivna čvora je 59%, u

bolesnika s tri pozitivna čvora je 47%, u bolesnika s četiri pozitivna čvora je 32% te u bolesnika s više od četiri pozitivna limfna čvora preživljenje iznosi 26% (125).

U bolesnika s prisutnim udaljenim metastazama (stadij IV) najvažniji prognostički čimbenik je lokalizacija metastaza. Petogodišnje preživljenje u oboljelih s prisutnim metastazama na koži ili u potkožnom tkivu je 18,8%. Kada su metastaze prisutne u plućima preživljenje iznosi 6,7%, a kod metastaza prisutnih u mozgu i drugim visceralnim organima preživljenje iznosi 9,5%. Manje važni prognostički čimbenici kod diseminirane bolesti su broj udaljenih metastaza, klinički stadij u kojem je bolesnik bio prije otkrivanja udaljenih metastaza te razina enzima laktat-dehidrogenaze u serumu (125, 126).

1.3.10. Praćenje

Skrb za osobe s dijagnosticiranim melanom kože ne prestaje sa završetkom aktivnog liječenja. Nastavlja se sa intenzivnim praćenjem bolesnika, kojemu je svrha tražiti relaps bolesti, diseminaciju iste te razvijanje nove primarne lezije. Praćenje bolesnika s melanomom nema jedinstven, uniforman pristup. Različite dermatološke i onkološke organizacije su razvile vlastite strategije praćenja, koje se međusobno razlikuju (127).

Europsko društvo za medicinsku onkologiju (eng. *European Society for Medical Oncology*, ESMO) ne prati klasifikaciju prema stadijima, već daje općenite preporuke za praćenje bolesnika s dijagnosticiranim melanomom kože. Tanki primarni melanomi imaju mali rizik od razvoja recidiva, pa ESMO ne preporučuje provođenje radioloških pretraga nad tim bolesnicima, već samo redovite kliničke preglede. Kod visoko rizičnih bolesnika, ESMO preporučuje korištenje kompjuterizirane tomografije i pozitronske emisijske tomografije za rano otkrivanje relapsa. ESMO također predlaže edukaciju bolesnika o izbjegavanju sunca i redovitom samopregledu kože (128).

U Republici Hrvatskoj praćenje oboljelih se temelji na prognostičkim stadijima (Tablica 8), a smjernice koje se koriste su napravljene prema preporukama Hrvatskog društva za internističku onkologiju iz 2017. godine. U stadiju IA preporučuju se redoviti klinički pregledi svakih šest mjeseci. U stadijima IB do IIB preporučuju se redoviti klinički pregledi, ultrazvuk perifernih limfnih čvorova i mjerenje tumorskog markera S100B svakih šest mjeseci. U stadiju III indicirani su redoviti klinički pregledi, ultrazvuk perifernih limfnih čvorova, mjerenje S100B prve tri godine svaka tri mjeseca, kasnije šestomjesečno. Obrada kompjuteriziranom tomografijom ili pozitronskom emisijskom tomografijom preporučuje se u prve tri godine svakih šest mjeseci. Magnetna rezonanca, koja ima najveću osjetljivost za otkrivanje metastaza mozga, indicira se jedino kod kolesnika s prisutnim neurološkim simptomima. U stadiju IV se

praćenje bolesti kreira individualno, prema procjeni onkologa. Ovisno o okolnostima, praćenje ovih bolesnika može biti potrebno na mjesečnoj ili čak tjednoj razini (107).

1.3.11. Prevencija

S obzirom na godišnji porast incidencije i važnost ranog prepoznavanja za dugoročno preživljenje bolesnika, prevencija melanoma poprima sve veći značaj. Razlikujemo primarnu, sekundarnu i tercijarnu prevenciju nastanaka melanoma (129).

Cilj primarne prevencije je smanjenje rizika od nastanka melanoma i unapređenje općeg zdravstvenog stanja bolesnika kako bi se spriječio nastanak bolesti. Temelji se na edukaciji populacije o štetnosti prekomjernog izlaganja sunčevoj svjetlosti te načinima zaštite od UV zračenja. Preporuke Američkog udruženja za rak uključuju nošenje zaštitne odjeće s dugim rukavima, sunčanih naočala, pokrivala za glavu, izbjegavanje sunca između 10:00 i 16:00 sati u ljetnom periodu i redovitu upotrebu krema za zaštitu od sunca (130).

Iako preporuke jasno naglašavaju važnost primjene krema za zaštitu od sunca, povezanost između smanjenja učestalosti melanoma i uporabe krema još uvijek nije jasna. Budući da trenutno dostupni podaci ne podržavaju niti osporavaju učinkovitost krema za sunčanje, preporučuje se njihovo korištenje, ali kao dodatak drugim oblicima zaštite (131).

Sekundarna prevencija označava što ranije dijagnosticiranje melanoma, kada je prognoza bolesti još uvijek dobra. Načini sekundarne prevencije su samopregledi bolesnika, pregledi liječnika specijaliste, genetičko testiranje i javnozdravstvene preventivne aktivnosti u cilju ranog otkrivanja melanoma (129).

O važnosti samopregleda kože govori istraživanje Brady i sur. koji navode da se 57% slučajeva melanoma detektira samopregledom kože (132). Samopregledi, kao i pregledi liječnika dermatologa, se trebaju detaljno i sistematično izvoditi, moraju se temeljiti na ABCDE pravilu i obuhvatiti cijelo tijelo. Pregled liječnika dermatologa treba uključivati dermoskopiju. Osobama koje dermatolog nakon temeljitog pregleda kože procjeni rizičnima za nastanak melanoma, preporučuju se daljnji redoviti pregledi jednom godišnje (129, 133).

U obiteljima gdje više članova boluje od melanoma ili jedan član ima multiple primarne melanome preporučuje se genetičko testiranje kojim se utvrđuje postojanje mutacije gena CDKN2A (134).

U zemljama u kojima se desetljećima provode javnozdravstvene akcije za rano otkrivanje melanoma, veći je broj rano otkrivenih i tanjih melanoma, a time i niži mortalitet kod oboljelih. U Australiji, gdje se javnozdravstvene akcije provode još od 80-ih godina prošlog stoljeća, petogodišnje preživljenje u muškaraca iznosi 90%, a u žena 95% (135). Istraživanje

provedeno među ispitanicima na području Republike Hrvatske ukazuje da petogodišnje preživljenje ispitanika s melanomom kože iznosi 72% što ukazuje na povećanu potrebu provođenja javnozdravstvenih akcija i podizanja svijesti građana o opasnostima ove bolesti (136).

Tercijarna prevencija obuhvaća ograničenje smrtnosti i produženje preživljenja u bolesnika s dijagnosticiranim melanomom. Ona uključuje praćenje oboljelih prema već navedenim preporukama onkoloških društava da bi se na vrijeme uočile sekundarne promjene i diseminacija bolesti (127).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj ovog diplomskog rada je istražiti pojavnost mutacija gena BRAF i NRAS u ispitanika oboljelih od melanoma čiji su uzorci tumorskog tkiva analizirani u Kliničkom zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu u periodu od siječnja 2017. do siječnja 2019. godine.

Sekundarni ciljevi su:

1. analizirati raspodjelu ispitanika prema dobi i spolu,
2. analizirati raspodjelu ispitanika s mutacijama gena BRAF i NRAS prema dobi, spolu i genotipu mutacije,
3. odrediti pojavnost divljeg tipa melanoma i melanoma s mutacijama gena BRAF i NRAS u primarnim i metastatskim lezijama te s obzirom na sijelo uzorka tumorskog tkiva za molekularnu analizu.

Hipoteze su:

1. Udio ispitanika s pozitivnim BRAF/NRAS mutacijskim statusom je veći nego udio ispitanika s divljim tipom melanoma.
2. Udio ispitanika s pozitivnim mutacijskim statusom gena BRAF je veći nego udio ispitanika s negativnim mutacijskim statusom gena BRAF.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Organizacija i opis istraživanja

Prema načinu prikupljanja podataka istraživanje je opservacijsko, a prema vremenskoj orijentaciji retrospektivno. Prikupljanje podataka je obavljeno na Kliničkom zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od 1. siječnja 2019. do 1. lipnja 2019. godine. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničnog centra Split te je provedeno u skladu sa svim etičkim principima sedme revizije Helsinške deklaracije iz 2013. godine.

3.2. Metoda prikupljanja i obrade podataka

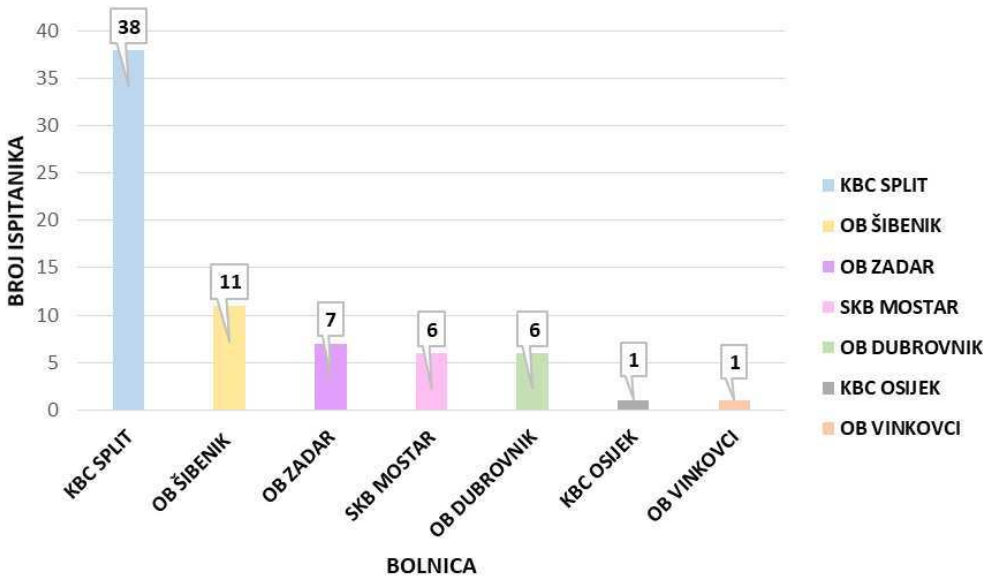
Podaci su prikupljeni pretraživanjem baze podataka Laboratorija za kliničku i sudsku medicinu i Odjela za patologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju. Prikupljeni podaci uneseni su u programske pakete Microsoft Office za obradu teksta te Microsoft Excel za izradu tabličnog prikaza.

U statističkoj obradi prikupljenih podataka korišten je računalni program MedCalc za računalno sučelje Windows 10 (MedCalc software, Mariakerke, Belgija; verzija 11.5.1.0).

3.3. Ispitanici

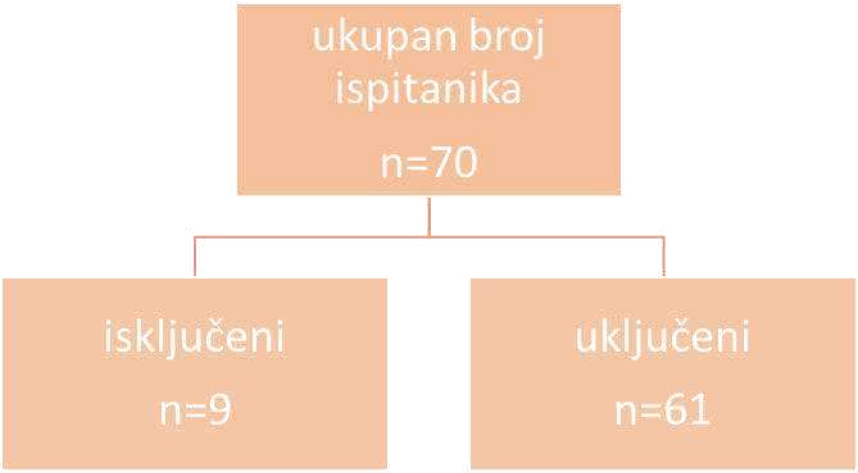
U ovo istraživanje je uključeno 70 ispitanika s dijagnozom melanoma kojima je u uzorcima tumorskog tkiva provedena molekularna analiza mutacija gena BRAF i NRAS. Nakon prikupljanja podataka utvrđeno je da molekularna analiza uzoraka napravljena u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split uključuje bolesnike iz različitih bolnica na području Republike Hrvatske i Federacije Bosne i Hercegovine (Mostar).

Najviše analiziranih uzoraka ispitanika je iz Kliničkog bolničkog centra Split (n=38), zatim Opće bolnice Šibenik (n=11), Opće bolnice Zadar (n=7), Opće bolnice Dubrovnik (n=6), Sveučilišne kliničke bolnice Mostar (n=6), Kliničkog bolničkog centra Osijek (n=1) i Opće županijske bolnice Vinkovci (n=1).



Slika 1. Raspodjela uzoraka prema bolnicama iz kojih su poslani na molekularnu analizu.

Za istraživanje su prikupljeni podaci o spolu i dobi ispitanika, prisutnosti mutacija gena BRAF i NRAS te podaci o mjestu uzorkovanja melanoma. Tijekom prikupljanja podataka ustanovljeno je da za 9 ispitanika nisu dostupni podatci o mjestu uzorkovanja. Prilikom analize pojavnosti mutacija u primarnim i metastatskim lezijama melanoma te analize pojavnosti mutacija ovisno o mjestu uzorkovanja tumorskog tkiva, ovi ispitanici su isključeni (Slika 2).



Slika 2. Prikaz ispitanika koji su uključeni u analizu pojavnosti mutacija u primarnim i metastatskim lezijama te analizu ovisno o mjestu uzorkovanja.

Uzorci ispitanika s primarnom lezijom melanoma, kojima je poznato mjesto uzorkovanja su razvrstani u 3 kategorije: kategorija ekstremiteta, kategorija trupa i kategorija

glave i vrata. U kategoriji ekstremiteta su melanomi kojima je mjesto uzorkovanja na rukama, dlanovima, ramenima, nogama i stopalima. Kategorija trup označava melanome koji su lokalizirani na području leđa, prsa, trbuha i stražnjice. Kategorija glava i vrat označavaju melanome kojima je mjesto uzorkovanja na licu, vratu, ušima i vlasištu (95).

Uzorci ispitanika s metastatskim melanomom, kojima je poznato mjesto uzorkovanja su razvrstani u 3 kategorije: kategorija kože i potkožnog tkiva, kategorija limfnih čvorova i kategorija udaljenih tkiva (137).

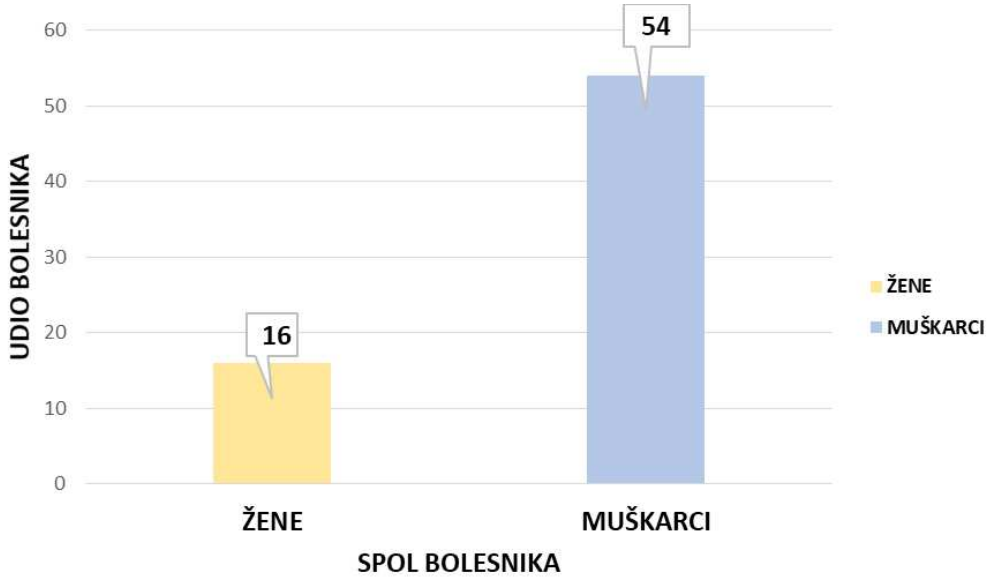
3.4 Test za molekularnu analizu

Prisutnost mutacija gena BRAF i NRAS je određena testom BRAF/NRAS Mutation Test (Basel, Švicarska ROCHE). Ovaj test koristi metodu lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*real-time PCR*). Test može otkriti i identificirati prisutnost mutacija gena BRAF na egzonima 11 i 15 te postojanje mutacija gena NRAS na egzonima 2, 3 i 4. Test je visoko osjetljiv i specifičan te otkriva prisutnost 36 različitih mutacija. Ponovljivost testa je 100% (138).

Prisutnost mutacija se može odrediti u svježem i smrznutom tkivu. Za sve ispitanike analizirane u ovom istraživanju, mutacija je određena u uzorcima tkiva uklopljenima u parafin. Čimbenici koji mogu utjecati na neuspjeh detekcije su starost uzorka, loša fiksacija uzorka i izražena melaninska pigmentiranost. Za uspješno testiranje izuzetno je važan udio stanica melanoma u uzorku koji mora biti visok da bi rezultat bio pouzdan i reprezentativan (139).

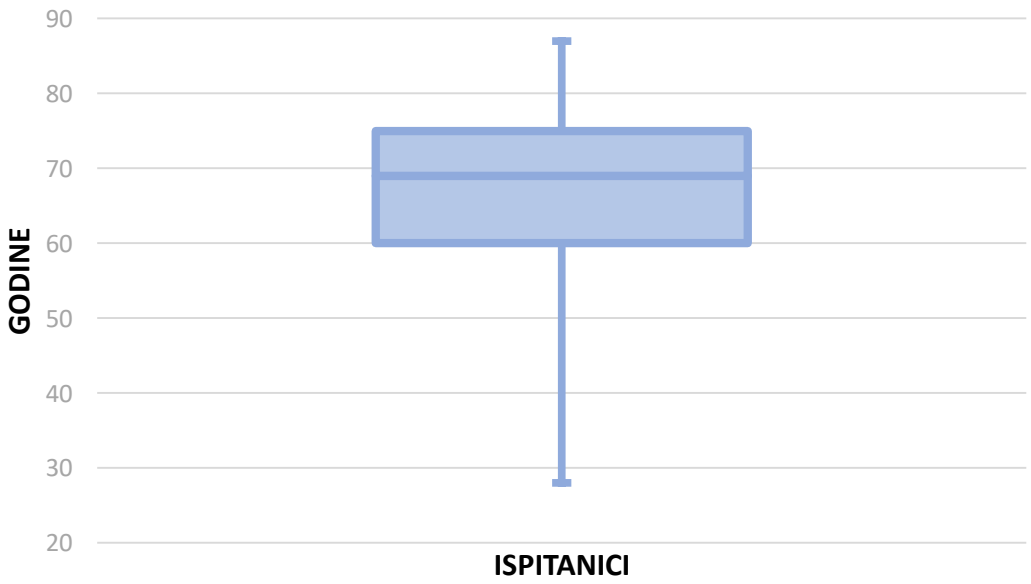
4. REZULTATI

Od ukupnog broja ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem (n=70), broj osoba muškog spola je 54 (77,14%), a broj osoba ženskog spola je 16 (22,86%) (Slika 3).



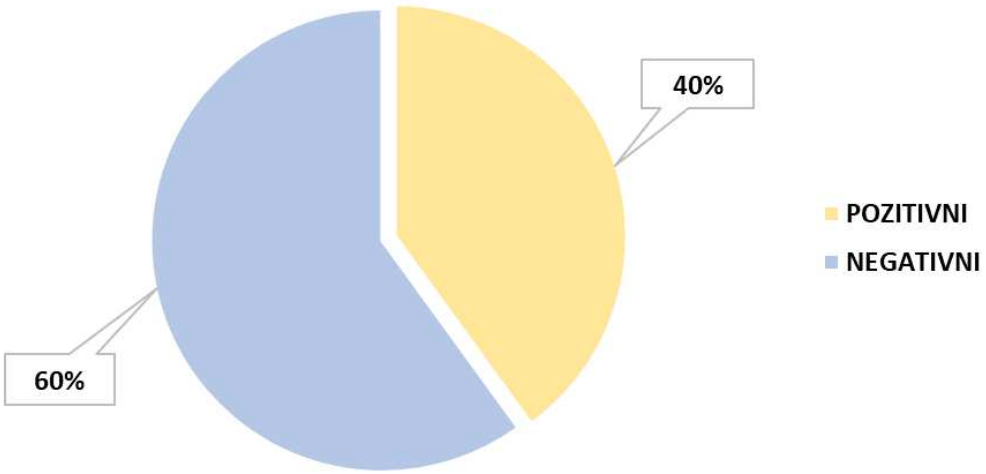
Slika 3. Raspodjela ispitanika prema spolu.

Medijan godina ispitanika s melanomom kože je 69. Najmlađi ispitanik ima 28 godina, a najstariji 85 godina. Gledajući raspodjelu ispitanika prema dobi, 50% ispitanika je između 60. i 75. godine života, 25% ispitanika je između 28. i 59. godine života, a 25% ispitanika je između 75. i 85. godine života (Slika 4).

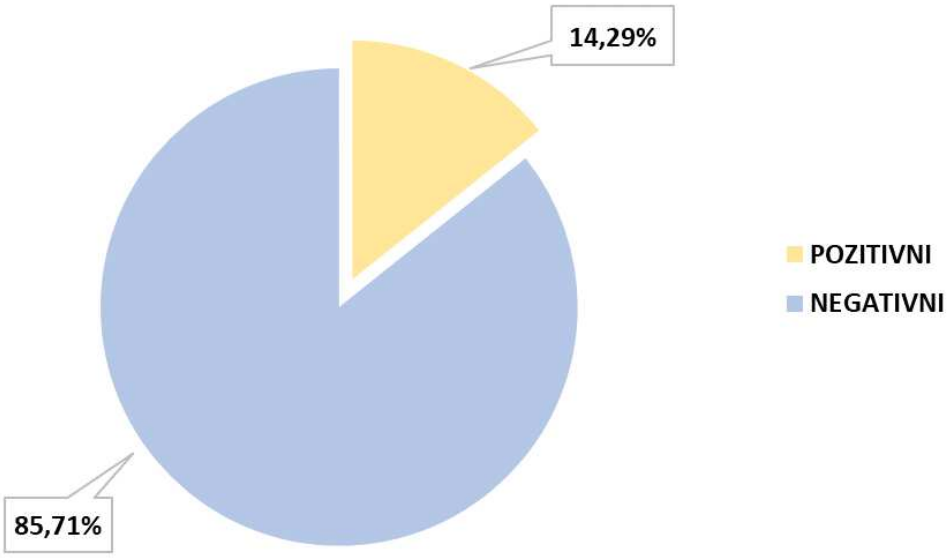


Slika 4. Raspodjela ispitanika prema dobi.

Od ukupnog broja ispitanika (n=70), njih 37 ima pozitivan BRAF/NRAS mutacijski status (52,86%), dok 33 ispitanika ima divlji tip melanoma (47,14%). U jednog ispitanika su prisutne istodobne mutacije gena BRAF i NRAS (1,43%). Pozitivan mutacijski status gena BRAF ima 28 ispitanika (40%), dok 42 ispitanika ima negativan mutacijski status (60%) (Slika 5). Pozitivan mutacijski status gena NRAS ima 10 ispitanika (14,29%), dok 60 ispitanika ima negativan mutacijski status (85,71%) (Slika 6).



Slika 5. Postotak ispitanika s pozitivnim i negativnim nalazom mutacije gena BRAF.



Slika 6. Postotak ispitanika s pozitivnim i negativnim nalazom mutacije gena NRAS.

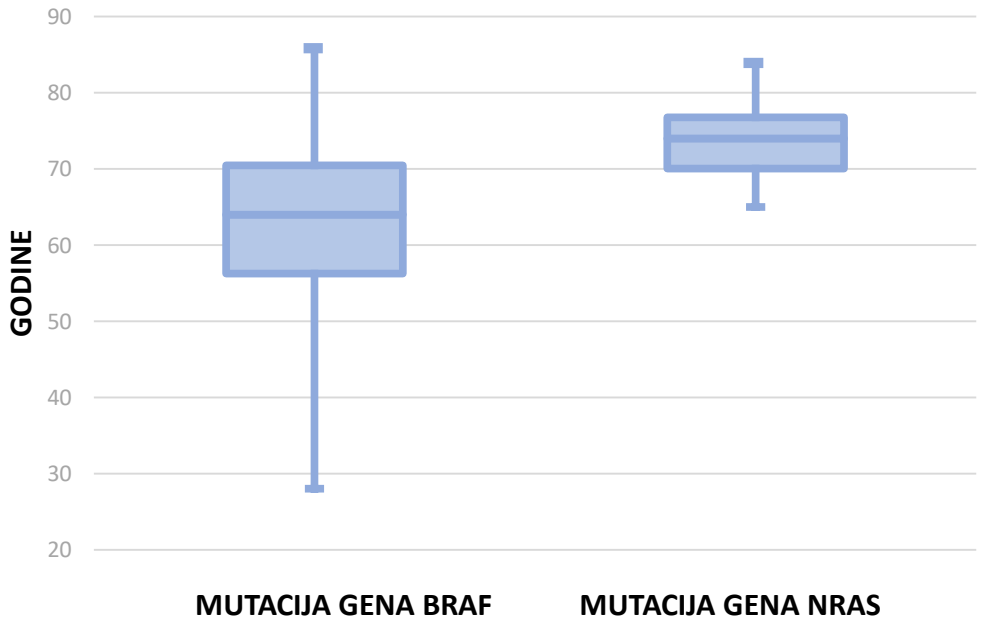
Hi-kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razika između ispitanika s melanomom kože s obzirom na pojavnosti mutacija gena BRAF i NRAS ($\chi 2$ test; P=0,0018; P<0,05 postavljen kao statistički značajan).

U populaciji ispitanika pozitivnih na mutaciju gena BRAF (n=28), broj osoba muškog spola je 18 (64,29%), a broj osoba ženskog spola je 10 (35,71%). U populaciji ispitanika pozitivnih na mutaciju gena NRAS (n=10), broj osoba muškog spola je 8 (80%), a broj osoba ženskog spola je 2 (20%) (Tablica 9).

Tablica 9. Raspodjela ispitanika s mutacijama gena BRAF i NRAS prema spolu.

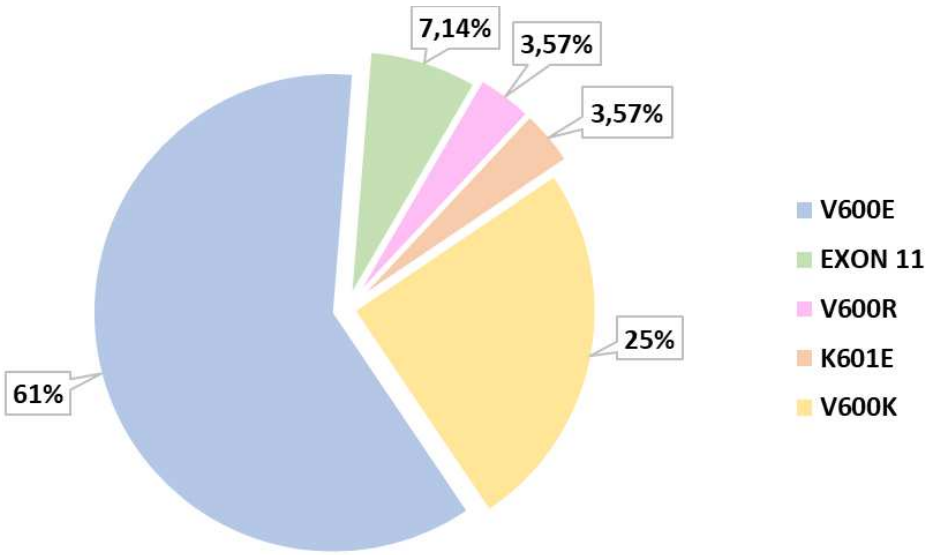
Varijable	Ženski spol	Muški spol
Gen BRAF	35,71%	64,29%
Gen NRAS	20%	80%

Medijan godina ispitanika s mutacijom gena BRAF iznosi 64 (raspon 28-85), dok medijan godina ispitanika s mutacijom gena NRAS iznosi 74 (raspon 65-83). Polovica ispitanika s mutacijom gena BRAF se nalazi između 56. i 71. godine života, dok se polovica ispitanika s mutacijom gena NRAS nalazi između 70. i 77. godine života (Slika 7).



Slika 7. Raspodjela ispitanika s mutacijama gena BRAF i NRAS prema dobi.

Među ispitanicima s mutacijom gena BRAF (n=28), genotip V600E je prisutan u 17 osoba (60,72%), genotip V600K je prisutan u 7 osoba (25%), genotip V600R u jedne osobe (3,57%) te genotip K601E također u jedne osobe (3,57%). Mutacija na egzonu broj 11 je prisutna u dvije osobe (7,14%) (Slika 8). Hi-kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razika između ispitanika s mutacijom gena BRAF s obzirom na genotip mutacije ($\chi 2$ test; P=0,0013; P<0,05 postavljen kao statistički značajan). Svi ispitanici s mutacijom gena NRAS (n=10), imaju Q61x genotip mutacije (100%).



Slika 8. Postotak ispitanika s različitim genotipovima mutacije gena BRAF.

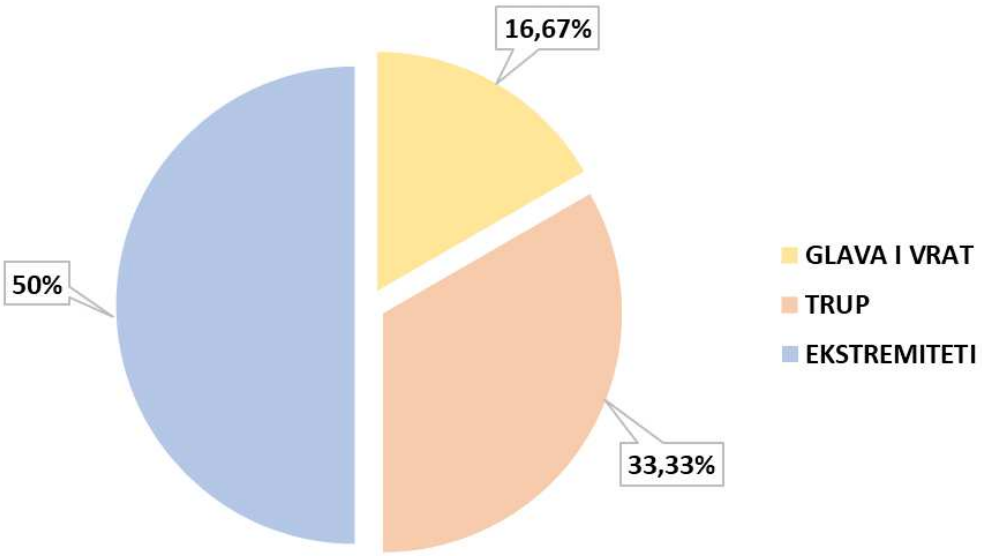
Među ispitanicima s mutacijom gena BRAF (n=28), mutacija je prisutna u uzorku primarnog melanoma u 12 ispitanika (46,15%), a u uzorku metastatskog melanoma u 14 ispitanika (53,85%). Dva ispitanika su isključena zbog nedostupnih podataka. Kod ispitanika s mutacijom gena NRAS (n=10), mutacija je prisutna u uzorku primarnog melanoma u 4 ispitanika (44,44%), dok je u uzorku metastatskog melanoma prisutna u 5 slučajeva (55,56%). Jedan ispitanik je isključen zbog nedostupnih podataka. Među ispitanicima s divljim tipom melanoma (n=33), u 10 slučajeva se radi o uzorku primarnog melanoma (37,04%). dok se u 17 slučajeva radi o uzorku metastatskog melanoma (62,96%). Šest ispitanika je isključeno zbog nedostupnih podataka (Tablica 10). Hi-kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika između pojavnosti mutacija gena BRAF i NRAS i divljeg tipa melanoma s obzirom na uzorkovanje u primarnim i metastatskim lezijama ($\chi 2$ test; P=0,0019; P<0,05 postavljen kao statistički značajan).

Tablica 10. Postotak ispitanika s divljim tipom melanoma i mutacijama gena BRAF i NRAS u primarnim i metastatskim lezijama.

Varijable	Primarna lezija	Metastatska lezija	P vrijednost*
Gen BRAF	46,15%	53,85%	
Gen NRAS	44,44%	55,55%	0,0019
Divlji tip	37,04%	62,96%	

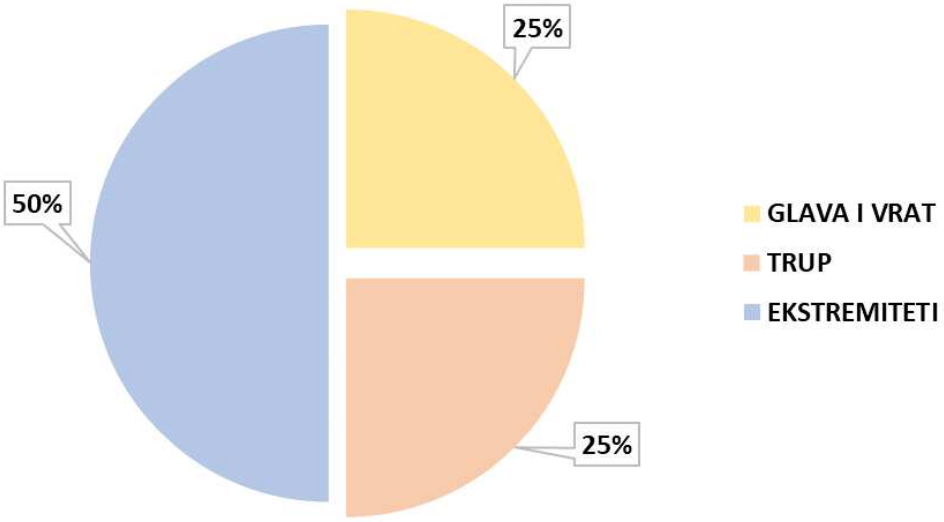
** χ2 test*

Među ispitanicima s mutacijom gena BRAF (n=12), primarno sijelo u 2 ispitanika je glava i vrat (16,67%), u 4 ispitanika je trup (33,33%), u 6 ispitanika su ekstremiteti (50%) (Slika 9).



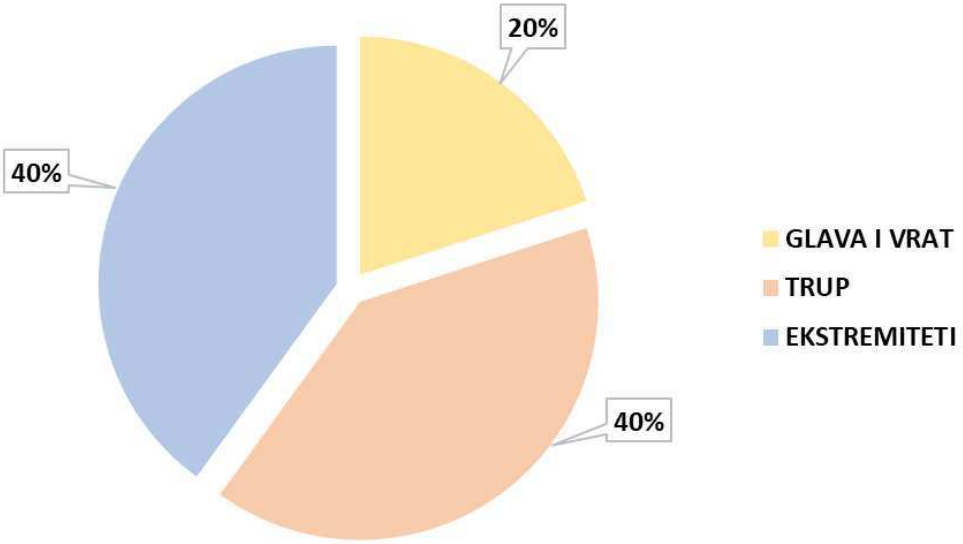
Slika 9. Postotak ispitanika s mutacijom gena BRAF kojima je primarno sijelo melanoma na glavi i vratu, trupu i ekstremitetima.

U ispitanika pozitivnih na mutaciju gena NRAS (n=4), primarno sijelo je u 1 ispitanika glava i vrat (25%), u 1 ispitanika je trup (25%), u 2 ispitanika su ekstremiteti (50%) (Slika 10).



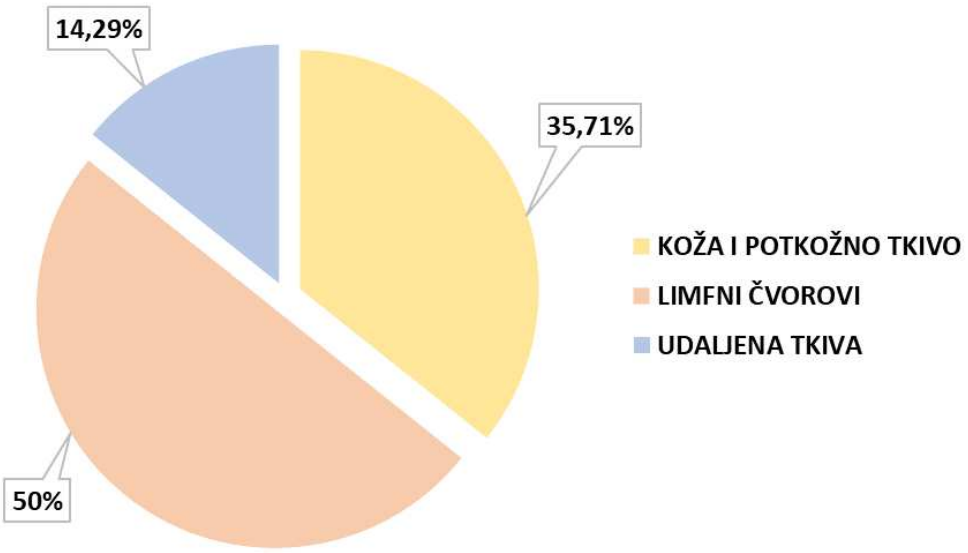
Slika 10. Postotak ispitanika s mutacijom gena NRAS kojima je primarno sijelo melanoma na glavi i vratu, trupu i ekstremitetima.

U ispitanika s divljim tipom melanoma (n=10), primarno sijelo je u 2 ispitanika glava i vrat (20%), u 4 ispitanika trup (40%) te u 4 ispitanika su ekstremiteti (40%) (Slika 11).



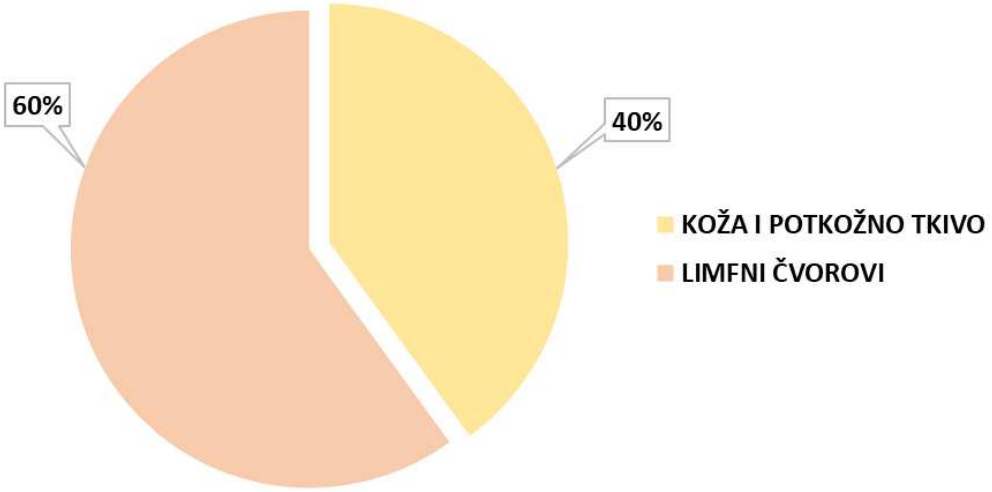
Slika 11. Postotak ispitanika s divljim tipom melanoma kojima je primarno sijelo na glavi i vratu, trupu i ekstremitetima.

Među ispitanicima s mutacijom gena BRAF u metastatskom melanomu (n=14), mjesto uzorkovanja u 5 ispitanika je koža i potkožno tkivo (35,71%), u 7 ispitanika su limfni čvorovi (50%), a u 2 ispitanika je udaljeno tkivo tankog crijeva (14,29%) (Slika 12).



Slika 12. Postotak ispitanika s mutacijom gena BRAF u metastatskom melanomu, kojima je mjesto uzorkovanja u koži i potkožnom tkivu, limfnim čvorovima i udaljenim tkivima.

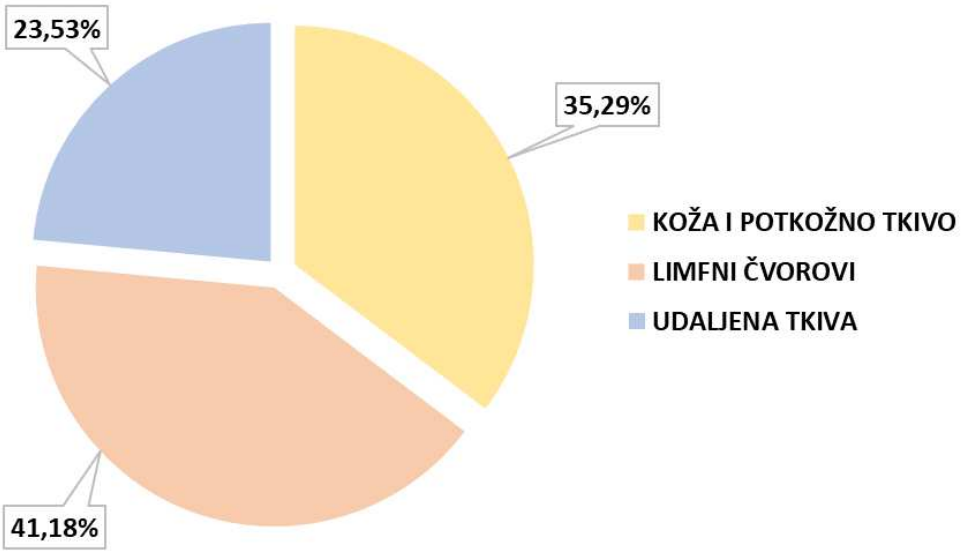
Među ispitanicima s mutacijom gena NRAS u metastatskoj leziji melanoma (n=5), mjesto uzorkovanja u 2 ispitanika je koža i potkožno tkivo (40%), a u 3 ispitanika su limfni čvorovi (60%) (Slika 13).



Slika 13. Postotak ispitanika s mutacijom gena NRAS u metastatskom melanomu, kojima je mjesto uzorkovanja u koži i potkožnom tkivu i limfnim čvorovima.

Među ispitanicima s divljim tipom metastatskog melanoma (n=17), mjesto uzorkovanja u 6 ispitanika je koža i potkožno tkivo (35,29%), u 7 ispitanika su limfni čvorovi (41,18%), a u

4 ispitanika su udaljena tkiva (23,53%) (Slika 14).



Slika 14. Postotak ispitanika s divljim tipom metastatskog melanoma, kojima je mjesto uzorkovanja u koži i potkožnom tkivu, limfnim čvorovima i udaljenim tkivima.

5. RASPRAVA

Melanom čini 4% primarnih zloćudnih tumora kože, ali je odgovoran za oko 80% smrtnih slučajeva uzrokovanih kožnim novotvorinama (140). Karakterizira ga lokalna agresivnost i sklonost ranom limfogenom i/ili hematogenom metastaziranju. Određivanje mutacijskog statusa melanoma kože postaje od iznimne važnosti jer identificira bolesnike koji mogu imati koristi od ciljane terapije (8).

U populaciji ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem postotak osoba muškog spola iznosi 77,14%, a osoba ženskog spola 22,86%. Prema podacima GLOBOCAN registra iz 2018. godine, postotak osoba muškog spola među novodijagnosticiranima iznosi 52,37%, a osoba ženskog spola 47,62% (13). U usporedbi s podacima GLOBOCAN registra, postotak ispitanika muškog spola u ovom istraživanju je veći.

Prema podacima Nacionalnog instituta za tumore SAD-a najveći broj bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze melanoma je između 65. i 74. godine života. Medijan godina prilikom postavljanja dijagnoze iznosi 65 (14). U ovom istraživanju najviše oboljelih se nalazi između 60. i 75. godine života (50%), a medijan godina iznosi 69. Iz toga se može zaključiti da je raspodjela ispitanika prema godinama u ovom radu pomaknuta prema starijoj životnoj dobi.

Carlino i sur. navode da je preživljenje bolesnika s metastatskim melanomom i prisutnom mutacijom gena BRAF jednako preživljenju bolesnika s divljim tipom metastatskog melanoma (141). Različit ishod pokazuje istraživanje Long i suradnika, u kojemu je medijan preživljenja kraći u bolesnika s BRAF mutiranim metastatskim melanomom (142). No prilikom primjene BRAF inhibitora preživljenje bolesnika s mutacijom gena BRAF se znatno produžava. Devitt i sur. navode da su melanomi s mutacijom gena NRAS agresivnije naravi te da je pozitivan NRAS mutacijski status prediktor lošeg ishoda s nižim medijanom preživljenja (143). Zbog toga određivanje BRAF/NRAS mutacijskog statusa u tumorskom tkivu postaje bitan prognostički faktor u oboljelih od melanoma kože.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je postotak ispitanika s pozitivnim BRAF/NRAS mutacijskim statusom viši (52,86%), nego postotak ispitanika s divljim tipom melanoma (47,14%). To potvrđuje prvu hipotezu ovog istraživanja. Heppt i sur. u uzorku 212 ispitanika, također potvrđuju rezultate ovog istraživanja, ali u drugačijem omjeru. Oni navode da postotak ispitanika s pozitivnim BRAF/NRAS mutacijskim statusom iznosi 66,8%, dok postotak ispitanika s divljim tipom melanoma iznosi 33,2% (101).

Prema istraživanju Brose i sur. koje je provedeno u uzorku 35 ispitanika, mutacija gena BRAF je prisutna u 63% slučajeva melanoma kože (144). Neka istraživanja navode nižu pojavnost mutacije gena BRAF, poput onog Jakoba i suradnika, koje obuhvaća 677 ispitanika. Rezultati tog istraživanja pokazuju prisutnost mutacije u 48% oboljelih (145). U ovom

istraživanju postotak ispitanika pozitivnih prilikom testiranja na mutaciju gena BRAF iznosi 40%, što negira drugu hipotezu ovog istraživanja. Također mutacija gena NRAS je prisutna u 14,29% ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem. Viši postotak navode Jakob i suradnici, u čijem je istraživanju mutacija gena NRAS prisutna u 20% ispitanika (145).

Mutacije gena NRAS i BRAF se međusobno isključuju, no postoje rijetki slučajevi kada postoji istodobna mutacija gena u leziji melanoma. Leonardi i sur. navode prisutnost takve pojave u 0,5% oboljelih (146). U ovom istraživanju postotak ispitanika s istodobnom mutacijom gena BRAF i NRAS je trostruko veći nego što navode Leonardi i suradnici (1,43%).

U već navedenom istraživanju Heppta i sur. navodi se ujednačena spolna raspodjela među ispitanicima s mutacijom gena BRAF (101). Chan i sur. u uzorku 114 ispitanika navode drugačiju raspodjelu. U njihovom istraživanju postotak muškaraca s mutacijom gena BRAF je 62,3%, a postotak žena je 37,7% (147). S ovim podacima se podudaraju rezultati ovog istraživanja. Postotak ispitanika muškog spola s pozitivnom mutacijom gena BRAF iznosi 64,29%, a ispitanika ženskog spola iznosi 35,71%. Gledajući spolnu raspodjelu među ispitanicima s mutacijom gena NRAS, u ovom istraživanju 80% ispitanika su osobe muškog spola, a 20% ispitanika su osobe ženskog spola. Uspoređujući rezultate ovog istraživanja s rezultatima istraživanja Ellerhorst i sur. koje obuhvaća 223 ispitanika, proizlazi da je postotak ispitanika ženskog spola s mutacijom gena NRAS u ovom istraživanju dvostruko manji (148).

Bauer i sur. navode da se mutacija gena BRAF javlja u mlađih osoba s dijagnosticiranim melanomom kože (149). U već navedenom istraživanju Ellerhorst i sur. medijan godina ispitanika s mutacijom gena BRAF iznosi 52 (148). U ovom istraživanju medijan godina ispitanika s mutacijom gena BRAF iznosi 64. Iz toga proizlazi da su ispitanici s mutacijom gena BRAF obuhvaćeni ovim istraživanjem stariji od populacije ispitanika obuhvaćenih istraživanjem Ellerhorst i suradnika. Muñoz-Couselo i sur. navode da su ispitanici s mutacijom gena NRAS stariji od 55 godina (150). Ovu tvrdnju potvrđuju Jakob i suradnici, koji navode da je medijan godina ispitanika s mutacijom gena NRAS 59,5 (145). Također ispitanici obuhvaćeni ovim istraživanjem s mutacijom gena NRAS su stariji od 55 godina, ali medijan godina ispitanika iznosi 74. Iz toga proizlazi da je raspodjela ispitanika s mutacijom gena NRAS u ovom istraživanju pomaknuta prema starijoj životnoj dobi.

Najčešći genotip mutacije gena BRAF je V600E, koji se prema Asciertu i sur. javlja u 95% ispitanika s prisutnom mutacijom (151). Cheng i sur. navode nižu učestalost genotipa V600E, koji se javlja u 84,6% ispitanika. Također navode prisutnost genotipa V600K u 7,7% ispitanika, genotipa V600R u 1% ispitanika dok su ostali genotipovi prisutni u manje od 1% ispitanika (152). U populaciji ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem raspodjela među

genotipovima je drugačija. Genotip V600E je prisutan u znatno nižem postotku nego u navedenim istraživanjima (60,72%), dok su genotipovi V600K, V600R i K601 češće zastupljeni (25%, 3,57%, 3,57%). Također mutacija gena BRAF na egzonu 11 je prisutna u 7,14% ispitanika. Taj podatak je višestruko veći nego što je zabilježeno u istraživanju Greavesa i suradnika (0,4%) (153). Posch i sur. navode da se mutacija gena NRAS u 84% slučajeva događa na kodonu 61, gdje aminokiselinu glutamin zamjeni različita aminokiselina (Q61x). U nižim postotcima navode prisutnost mutacije na kodonima 12 i 13 (otprilike 7% i 5% slučajeva) (154). U ovom istraživanju svi ispitanici s mutacijom gena NRAS imaju mutaciju na kodonu 61 (100%).

Shinozaki i sur. navode da je u populaciji 127 ispitanika s mutacijom gena BRAF, učestalost mutacije u primarnim lezijama 43%, dok je učestalost u metastatskim lezijama 57% (155). Slična raspodjela je prisutna i u ovom istraživanju, gdje je mutacija gena BRAF u uzorku primarnog tumora prisutna u 46,15% ispitanika, a u uzorku metastaze u 53,85% ispitanika. No Colombino i sur. navode da je u uzorku 135 ispitanika s mutacijom gena BRAF, mutacija u većem postotku prisutna u uzorku metastatskog melanoma (67,4%) (156). Također navode da su i mutacija gena NRAS i divlji tip melanoma u uzorku 221 ispitanika češće prisutni u metastatskoj leziji melanoma (65,12% i 73,65%) (156). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da su mutacija gena NRAS i divlji tip melanoma češće prisutni u metastatskoj leziji nego u primarnoj leziji, no opet u nižem postotku nego što navode Colombino i suradnici (55,55% i 62,96%).

U ovom istraživanju najčešće primarno sijelo melanoma među ispitanicima s mutacijom gena BRAF su ekstremiteti (50%), zatim trup (33,33%) te glava i vrat (16,67%). Metaanaliza Lee i sur. pokazuje drukčiju raspodjelu. U uzorku 2521 ispitanika s mutacijom gena BRAF primarno sijelo melanoma je najčešće trup, zatim slijede ekstremiteti. Lee i sur. također navode da su glava i vrat najrjeđe primarno sijelo. U uzorku 1972 ispitanika s mutacijom gena NRAS, Lee i sur. navode da su ekstremiteti najčešće primarno sijelo, potom slijede glava i vrat te trup (95). U populaciji ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem najčešće primarno sijelo melanoma s mutacijom gena NRAS su također ekstremiteti (50%), no učestalost melanoma na trupu i glavi i vratu je jednaka (25%). Prema istraživanju Thomas i suradnika, koje obuhvaća 912 ispitanika, primarno sijelo divljeg tipa melanoma su jednako često ekstremiteti i trup, dok je rjeđe glava i vrat (157). Ovo istraživanja pokazuje jednaku raspodjelu primarnog sijela među ispitanicima s divljim tipom melanoma.

Adler i sur. navode da se u uzorku 1955 ispitanika, mutacija gena BRAF u metastatskoj leziji melanoma javlja u 8% ispitanika u koži i potkožnom tkivu, u 67% ispitanika u limfnim

čvorovima, te u 24% ispitanika u udaljenim tkivima (137). Rezultati ovog istraživanja pokazuju 5 puta veći postotak BRAF mutiranih metastatskih melanoma u koži i potkožnom tkivu (35,71%) i niži postotak u udaljenim tkivima (14,29%). Svim ispitanicima s BRAF mutiranim metastatskim melanomom u udaljenim tkivima, mjesto uzorkovanja je tkivo tankog crijeva. Adler i sur. također navode da se NRAS mutirani metastatski melanom u 16% slučajeva pojavljuje u koži i potkožnom tkivu, u 64% slučajeva u limfnim čvorovima, te u 21% slučajeva u udaljenim tkivima. Prema rezultatima njihovog istraživanja, divlji tip metastatskog melanoma se u 22% slučajeva pojavljuje u koži i potkožnom tkivu, u 53% slučajeva u limfnim čvorovima, te u 25% slučajeva u udaljenim tkivima (137). U populaciji ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem nema slučajeva s NRAS mutiranim metastatskim melanomom u udaljenim tkivima, dok je postotak slučajeva s mutacijom u koži i potkožnom tkivu dvostuko veći nego što navode Adler i suradnici (40%). Također uspoređujući rezultate ovog istraživanja, s istraživanjem Adlera i suradnika, postotak ispitanika s divljim tipom metastatskog melanoma i mjestom uzorkovanja u limfnim čvorovima je niži (41,18%), dok je postotak ispitanika s mjestom uzorkovanja u koži i potkožnom tkivu viši (35,29%) nego što su zabilježili Adler i suradnici.

Nedostatci ovog istraživanja su nedostupnost podataka za pojedine ispitanike te retrospektivno prikupljanje podataka iz pismohrana povijesti bolesti. Ovi nedostaci mogu ukazivati na manjkavost prikupljenih podataka. Također ograničenje ovog istraživanja je relativno mali uzorak ispitanika. Za ekstrapolaciju dobivenih rezultata na opću populaciju bolesnika s melanomom kože u budućnosti je potrebno provesti istraživanje na većem uzorku ispitanika.

6. ZAKLJUČAK

1. BRAF/NRAS mutacijski status je pozitivan u 52,86% ispitanika. Postotak ispitanika bez mutacije gena BRAF je veći u odnosu na postotak ispitanika koji imaju mutaciju. Također postotak ispitanika bez mutacije gena NRAS je veći u odnosu na postotak ispitanika koji imaju mutaciju.
2. Melanom kože se u većem postotku javlja u osoba muškog spola, nego u osoba ženskog spola. Medijan godina ispitanika iznosi 69. Najviše ispitanika je između 60. i 75. godine života.
3. U populaciji ispitanika s mutacijom gena BRAF, postotak muškaraca je veći od postotka žena. Najčešći genotip BRAF mutacije je V600E. Među ispitanicima s mutacijom gena NRAS postotak muškaraca je 4 puta veći nego postotak žena. Svi ispitanici imaju mutaciju na kodonu 61.
4. Divlji tip melanoma, kao i mutacije gena BRAF i NRAS, su u većem postotku prisutni u metastatskom melanomu, nego u primarnoj leziji. Primarno sijelo melanoma s mutacijom gena BRAF su najčešće ekstremiteti, zatim trup te glava i vrat. Primarno sijelo melanoma s mutacijom gena NRAS su najčešće ekstremiteti, dok su u jednakom postotku trup i glava i vrat. Primarno sijelo divljeg tipa melanoma su u jednakom postotku trup i ekstremiteti, dok su u manjem postotku glava i vrat. Među ispitanicima s mutacijom gena BRAF u metastatskom melanomu, mjesto uzorkovanja su najčešće limfni čvorovi, zatim koža i potkožno tkivo te udaljena tkiva. Među ispitanicima s mutacijom gena NRAS u metastatskom melanomu, najčešće mjesto uzorkovanja su limfni čvorovi, zatim koža i potkožno tkivo. Među ispitanicima s divljim tipom metastatskog melanoma, mjesto uzorkovanja su najčešće limfni čvorovi, zatim koža i potkožno tkivo te udaljena tkiva.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Intergumentum commune. U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A, ur. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 395-6.
2. Lipozenčić J i sur. Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcija kože. U: Lipozenčić J i sur, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 5-9.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Koža. U: Junqueira LC, Carneiro J, ur. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 369-75.
4. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. Am J Infect Control. 2006;34(10):98-110.
5. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis and therapeutic approaches. Dermatol Ther (Heidelb). 2017;7(1):5-19.
6. Wood GS, Xu YG, Aylward JL, Spiegelman V, Vanness E, Teng JMC i sur. Nonmelanoma Skin Cancers: Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas. U: Wood GS, Xu YG, Aylward JL, Spiegelman V, Vanness E, Teng JMC i sur, ur. Abeloff's Clinical Oncology (Fifth Edition). Philadelphia: Elsevier; 2014. str. 1092-111.
7. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D. Epidemiological trends in skin cancer. Dermatol Pract Concept. 2017;7(2):1-6.
8. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A.Tumori kože. U: Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str 233-7.
9. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fleischer AB, i sur. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. Arch Dermatol. 2010;146(3):283-7.
10. Kostović-Knežević LJ. Treći do osmog tjedna razvoja: embrionalno razdoblje. U: Sadler TW, ur. Langmanova medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga; 2008. str. 72-3.
11. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. Cancer. 1998;83(8):1664-78.
12. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature. 2007;445(7130):843-50.
13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.
14. Cancer statistic facts: Melanoma of the Skin [Internet]. National cancer institute. 2016

[citirano: 06. lipnja 2019]. Dostupno na:https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html
15. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. J Am Acad Dermatol. 1999;40:35-42.
16. Guy GP, Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM, Richardson LC. Vital Signs: Melanoma Incidence and Mortality Trends and Projections-United States, 1982-2030. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015;64(21):591-6.
17. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. EJC Suppl. 2013;11(2):81-91.
18. Weir HK, Marrett LD, Cokkinides V, Barnholtz-Sloan J, Patel P, Tai E, i sur. Melanoma in adolescents and young adults (ages 15-39 years): United States, 1999-2006. J Am Acad Dermatol. 2011;65(5):38-49.
19. Goldenberg A, Vujic I, Sanlorenzo M, Ortiz-Urda S. Melanoma risk perception and prevention behavior among African-Americans: the minority melanoma paradox. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2015;8:423-9.
20. Bradford PT. Skin cancer in skin of color. Dermatol Nurs. 2009;21(4):170-7.
21. Hrvatski zavod za javno zdrastvo, Registar za rak, izvješća (2015) [Internet]. Zagreb; 2016. [citirano: 1 lipnja 2019.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wpcontent/ uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf
22. Špoljar S, Šitum M, Buljan M. Etiopatogeneza melanoma. U: Šitum M, ur. Melanom. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 11-3.
23. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. Br J Dermatol. 2014;170(1):11-9.
24. Frank C, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K. Risk of other Cancers in Families with Melanoma: Novel Familial Links. Sci Rep. 2017;7:42601.
25. Barnhill RL, Roush GC, Titus-Ernstoff L, Ernstoff MS, Duray PH, Kirkwood JM. Comparison of nonfamilial and familial melanoma. Dermatol. 1992;184(1):2-7.
26. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malvehy J, i sur. Update in genetic susceptibility in melanoma. Ann Transl Med. 2015;3(15):210.
27. Green AC, O'Rourke MG. Cutaneous malignant melanoma in association with other skin cancers. J Natl Cancer Inst. 1985;74(5):977-80.
28. Bradford PT, Freedman DM, Goldstein AM, Tucker MA. Increased risk of second primary cancers after a diagnosis of melanoma. Arch Dermatol. 2010;146(3):265-72.
29. Williams ML, Sagebiel RW. Melanoma risk factors and atypical moles. West J Med. 1994;160(4):343-50.

30. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(5):1241-4.
31. Lipozenčić J, Marinović-Kulišić S, Pašić A. Prevencija i rizični čimbenici melanoma. U: Stanec S, Stanec Z i sur, ur. Melanom. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 22-7.
32. Kyrgidis A. Risk factors. U: Argenziano G, Lallas A, Longo C, Moscarellaur E, ur. Cutaneous Melanoma. A Pocket Guide for Diagnosis and Management. Cambridge: Academic Press; 2017. str. 11-25.
33. Fitzpatrick TB. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. Arch Dermatol. 1988;124(6):869-71.
34. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. Int J Cancer. 2010;127(10):2430-45.
35. Robbins HA, Clarke CA, Arron ST, Tatalovich Z, Kahn AR, Hernandez BY, i sur. Melanoma Risk and Survival among Organ Transplant Recipients. J Invest Dermatol. 2015;135(11):2657-65.
36. Olsen CM, Knight LL, Green AC. Risk of melanoma in people with HIV/AIDS in the pre- and post-HAART eras: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. PLoS One. 2014;9(4):e95096.
37. Koh HK, Geller AC, Miller DR, Grossbart TA, Lew RA. Prevention and early detection strategies for melanoma and skin cancer - Current status. Arch Dermatol. 1996;132(4):436-43.
38. Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. Science. 2014;346:945-9.
39. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2018;34(1):13-24.
40. Fears TR, Bird CC, Guerry D, Sagebiel RW, Gail MH, Elder DE, i sur. Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. Cancer Res. 2002;62(14):3992-6.
41. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N Engl J Med. 1999;340(17):1341-8.
42. Rosso S, Zanetti R, Pippione M, Sancho-Garnier H. Parallel risk assesment of melanoma and basal cell carcinoma: skin characteristic and sun exposure. Melanoma Res. 1998;8(6):573-83.
43. Runger TM. Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer-a short review. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1999;15(6):212-6.
44. Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson DV, Coughlin JA.

Sunburns and risk of cutaneous melanoma, does age matter: a comprehensive meta-analysis. Ann Epidemiol. 2008;18(8):614-27
45. Ting W, Schultz K, Cac NN, Peterson M, Walling HW. Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. Int J Dermatol. 2007;46(12):1253-7.
46. Ghiasvand R, Rueegg CS, Weiderpass E, Green AC, Lund E, Veierød MB. Indoor tanning and melanoma risk: Long-term evidence from a prospective population-based cohort study. Am J Epidemiol. 2017;185(3):147-56.
47. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2012;345:e4757.
48. Stern RS, Nichols KT, Väkevä LH. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). The PUVA Follow-Up Study. N Engl J Med. 1997;336(15):1041-5.
49. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Bolesti kože. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, ur. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str 724-7.
50. Tsao H, Olazagasti JM, Cordoro KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, i sur. Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs. J Am Acad Dermatol. 2015;72(4):717-23.
51. Healsmith MF, Bourke JF, Osborne JE. An evaluation of the revised seven-point checklist for the early diagnosis of cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol. 1994;130:48-50.
52. Wagner R.F, Nathanson L. Paraneoplastic syndromes, tumor markers, and other unusual features of malignant melanoma. J Am Acad Dermatol. 1986;14(2):249-56.
53. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. J Invest Dermatol. 2008;128(5):1340-2.
54. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(5):1241-4.
55. Cymerman RM, Shao Y, Wang K, Zhang Y, Murzaku EC, Penn LA, i sur. De novo vs nevus-associated melanomas: Differences in associations with prognostic indicators and survival. J Natl Cancer Inst. 2016;108(10):121.
56. Crowson AN, Magro CM, Sanchez-Carpintero I, Mihm Jr MC. The precursors of malignant melanoma. Recent Results Cancer Res. 2002;160:75-84.
57. McCourt C, Dolan O, Gormley G. Malignant Melanoma: A pictorial review. Ulster Med J. 2014;83(2):103-10.
58. Richard MA, Grob JJ, Avril MF, Delaunay M, Thirion X, Wolkenstein P i sur. Melanoma and tumor thickness: challenges of early diagnosis. Arch Dermatol. 1999;135(3):269-74.

59. Buljan M, Rajacic N, Vurnek Zivkovic M, Blajic I, Kusic Z, Situm M. Epidemiological data on melanoma from the referral centre in Croatia (2002-2007). Coll Anthropol. 2008;2:47-51.
60. Woo WA, Mitchell CD, Wakefield E, Hextall J. The importance of full skin examination in diagnosing cutaneous melanoma. Clin Exp Dermatol. 2017;42(6):674-5.
61. Gaudy-Marqueste C, Wazaefi Y, Bruneu Y, Triller R, Thomas L, Pellacani G, i sur. Ugly duckling sign as a major factor of efficiency in melanoma detection. JAMA Dermatol. 2017;153(4):279-84.
62. Walter FM, Prevost AT, Vasconcelos J, Hall PN, Burrows NP, Morris HC, i sur. Using the 7-point checklist as a diagnostic aid for pigmented skin lesions in general practice: a diagnostic validation study. Br J Gen Pract. 2013;63(610):345-53.
63. Bristow IR, Bowling J. Dermoscopy as a technique for the early identification of foot melanoma. J Foot Ankle Res. 2009;2:14.
64. Russo T, Piccolo V, Lallas A, Argenziano G. Recent advances in dermoscopy. F1000Res. 2016;5.
65. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. Lancet Oncol. 2002;3(3):159-65.
66. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, i sur. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. J Am Acad Dermatol. 2019;80(1):208-50.
67. Lutz K, Hayward V, Joseph M, Wong E, Temple-Oberle C. Current biopsy practices for suspected melanoma: A survey of family physicians in Southwestern Ontario. Plast Surg (Oakv). 2014;22(3):175-8.
68. Pflugfelder A, Weide B, Eigentler TK, Forschner A, Leiter U, Held L, i sur. Incisional biopsy and melanoma prognosis: Facts and controversies. Clin Dermatol. 2010;28(3):316-8.
69. Ng JC, Swain S, Dowling JP, Wolfe R, Simpson P, Kelly JW. The impact of partial biopsy on histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma: experience of an Australian tertiary referral service. Arch Dermatol. 2010;146(3):234-9.
70. Catalano O, Caracò C, Mozzillo N, Siani A. Locoregional spread of cutaneous melanoma: sonography findings. AJR Am J Roentgenol. 2010;194(3):735-45.
71. Holder WD Jr, White RL Jr, Zuger JH, Easton EJ Jr, Greene FL. Effectiveness of positron emission tomography for the detection of melanoma metastases. Ann Surg. 1998;227(5):764-9.
72. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Melanoma of the Skin

[Internet]. College of American Pathologists. 2017 [citirano: 6. lipnja 2019.]. Dostupno na: https://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/cp-skin-melanoma-15protocol.pdf.
73. Busam KJ. Histopatologic diagnosis of melanoma. U: Busam KJ, Gerami P, Scolyer RA, ur. Pathology of Melanocytic Tumors. Philadelphia: Elsevier; 2018. str. 131-9.
74. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. In Vivo. 2014;28(6):1005-11.
75. Singh P, Kim HJ, Schwartz RA. Superficial spreading melanoma: an analysis of 97 702 cases using the SEER database. Melanoma Res. 2016;26(4):395-400.
76. Erkurt MA, Aydogdu I, Kuku I, Kaya E, Basaran Y. Nodular melanoma presenting with rapid progression and widespread metastases: A case report. J Med Case Reports. 2009;3:50.
77. Longo C, Pellacani G. Melanomas. Dermatol Clin. 2016;34(4):411-9.
78. Connolly KL, Nehal KS, Busam KJ. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: contemporary issues in diagnosis and management. Melanoma Manag. 2015;2(2):171-8.
79. Bosbous MW, Dzwierzynski WW, Neuburg M. Lentigo maligna: diagnosis and treatment. Clin Plast Surg. 2010;37(1):35-46.
80. McKenna JK, Florell SR, Goldman GD, Bowen GM. Lentigo maligna/lentigo maligna melanoma: current state of diagnosis and treatment. Dermatol Surg. 2006;32(4):493-504.
81. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. Arch Dermatol. 2009;145(4):427-34.
82. Goydos JS, Shoen SL. Acral Lentiginous Melanoma. Cancer Treat Res. 2016;167:321-9.
83. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg. 1970;172(5):902-8.
84. Bønnelykke-Behrndtz ML, Schmidt H, Christensen IJ, Damsgaard TE, Møller HJ, Bastholt L i sur. Prognostic stratification of ulcerated melanoma: not only the extent matters. Am J Clin Pathol. 2014;142(6):845-56.
85. American joint commitee on cancer. Melanoma of the Skin. U: Amin MB, i sur, ur. AJCC cancer staging manual. Chicago: Springer Nature; 2018. str. 563-81.
86. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, Detmar M, Dadras SS. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. J Cutan Pathol. 2009;36(7):772-80.
87. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. Cancer Immun. 2009;9:3.

88. Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastases. Arch Dermatol. 1987;123(10):1326-30.
89. Ribero S, Gualano MR, Osella-Abate S. Association of histologic regression in primary melanoma with sentinel lymph node status: a systematic review and meta-analysis. JAMA Dermatol. 2015;151:1301-7.
90. Wilson MA, Nathanson KL. Molecular testing in melanoma. Cancer J. 2012;18(2):117-23.
91. Wood K, Luke J. The Biology and Therapeutic Approach to BRAF Mutant Cutaneous Melanoma. AJHO. 2017;13(1):4-10.
92. Augustine CK, Freedman JA, Beasley GM, Tyler DS. Melanoma U: Ginsburg GS, Willard HF, ur. Genomic and Personalized Medicine. Philadelphia: Elsevier; 2013. str. 765-75.
93. Bradish JR, Cheng L. Molecular pathology of malignant melanoma: changing the clinical practice paradigm toward a personalized approach. Hum Pathol. 2014;45(7):1315-26.
94. Stadelmeyer E, Heitzer E, Resel M, Cerroni L, Wolf P, Dandachi N. The BRAF V600K mutation is more frequent than the BRAF V600E mutation in melanoma in situ of lentigo maligna type. J Invest Dermatol. 2014;134(2):548-50.
95. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. Br J Dermatol. 2011;164(4):776-84.
96. Diaz-Flores E, Shannon K. Targeting oncogenic Ras. Genes Dev. 2007;21(16):1989-92.
97. Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, i sur. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(4):666-72.
98. Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA, Bassett RL, Curry JL, Gershenwald JE, i sur. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. Cancer. 2013;119(21):3821-9.
99. Mandalà M, Merelli B, Massi D. Nras in melanoma: targeting the undruggable target. Crit Rev Oncol Hematol. 2014;92(2):107-22.
100. Johnpulle RA, Johnson DB, Sosman JA. Molecular Targeted Therapy Approaches for BRAF Wild-Type Melanoma. Curr Oncol Rep. 2016;18(1):6.
101. Heppt MV, Siepmann T, Engel J, Schubert-Fritschle G, Eckel R, Mirlach L i sur. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. BMC Cancer. 2017;17(1):536.
102. Clark WH Jr. Iz L. Bernardino EA. Mihim MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res. 1969;29(3):705-27.

103. Testori A, Ribero S, Bataille V. Diagnosis and treatment of in-transit melanoma metastases. Eur J Surg Oncol. 2017;43(3):544-60.
104. Thomas JM, Newton-Bishop J, A'Hern R, Coombes G, Timmons M, Evans J, i sur. Excision margins in high-risk malignant melanoma. N Engl J Med. 2004;350(8):757-66.
105. Heaton KM, Sussman JJ, Gershenwald JE, Lee JE, Reintgen DS, Mansfield PF, i sur. Surgical margins and prognostic factors in patients with thick (>4mm) primary melanoma. Ann Surg Oncol. 1998;5(4):322-8.
106. Rogan SA, Kovačić K, Kusić Z. Sentinel lymph node concept and its role in the management of melanoma patients. Acta Clin Croat. 2007;46(2):175-85.
107. Herceg D, Štulhofer Buzina D, Čeović R, Dotlić S, Ilić I, Smuđ Orehovec S, i sur. Croatian Society for Medical Oncology clinical guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with melanoma. Liječ Vjesn. 2016;138:22-9.
108. Strojan P. Role of radiotherapy in melanoma management. Radiol Oncol. 2010;44(1):1-12.
109. Anderson CM, Buzaid AC, Legha SS. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. Oncol (Williston Park). 1995;9(11):1149-58.
110. Sun W, Schuchter LM. Metastatic melanoma. Curr Treat Options Oncol. 2001;2(3):193-202.
111. Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. Curr Treat Options Oncol. 2005,6(3):185-93.
112. Kee D, McArthur G. Immunotherapy of melanoma. Eur J Surg Oncol. 2017;43(3):594-603.
113. Di Trolio R, Simeone E, Di Lorenzo G, Buonerba C, Ascierto PA. The use of interferon in melanoma patients: a systematic review. Cytokine Growth Factor Rev. 2015;26(2):203-12.
114. Tarhini AA, Gogas H, Kirkwood JM. IFN-α in the treatment of melanoma. J Immunol. 2012;189(8):3789-93.
115. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012;12(4):252-64.
116. Byrne EH, Fisher DE. Immune and molecular correlates in melanoma treated with immune checkpoint blockade. Cancer. 2017;123(11):2143-53.
117. Redman JM, Gibney GT, Atkins MB. Advances in immunotherapy for melanoma. BMC Med. 2016;14:20.
118. Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. Hum Vaccin Immunother. 2014;10(11):3111-6.

119. Davies MA, Gershenwald JE. Targeted therapy for melanoma: a primer. Surg Oncol Clin N Am. 2011;20(1):165-80.
120. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, i sur. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011;364(26):2507-16.
121. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M i sur. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med. 2012;367(2):107-14.
122. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. Ther Adv Med Oncol. 2016;8(1):48-56.
123. Svedman FC, Pillas D, Taylor A, Kaur M, Linder R, Hansson J. Stage-specific survival and recurrence in patients with cutaneous malignant melanoma in Europe - a systematic review of the literature. Clin Epidemiol. 2016;8:109-22.
124. Mrazek AA, Chao C. Surviving cutaneous melanoma: a clinical review of follow-up practices, surveillance, and management of recurrence. Surg Clin North Am. 2014;94(5):989-1002.
125. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, i sur. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol. 2001;19(16):3622-34.
126. Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. J Clin Oncol. 2000;18(22):3782-93.
127. Trotter SC, Sroa N, Winkelmann RR, Olencki T, Bechtel M. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. J Clin Aesthet Dermatol. 2013;6(9):18-26.
128. Dummer R, Hauschild A, Guggenheim M, Jost L, Pentheroudakis G. ESMO Guidelines Working Group. Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2010;21(5):194-7.
129. Sjerobabski Masnec I, Crnarić I, Šitum M. Prevencija nastanka melanoma. U: Šitum M, ur. Melanom. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 343-7
130. Diao DY, Lee TK. Sun-protective behaviors in populations at high risk for skin cancer. Psychol Res Behav Manag. 2013;7:9-18.
131. Silva ESD, Tavares R, Paulitsch FDS, Zhang L. Use of sunscreen and risk of melanoma and non-melanoma skin cancer: a systematic review and meta-analysis. Eur J Dermatol. 2018;28(2):186-201.
132. Brady MS1, Oliveria SA, Christos PJ, Berwick M, Coit DG, Katz J i sur. Patterns of

detection in patients with cutaneous melanoma. Cancer. 2000;89(2):342-7.
133. Johnson MM, Leachman SA, Aspinwall LG, Cranmer LD, Curiel-Lewandrowski C, Sondak VK i sur. Skin cancer screening: recommendations for data-driven screening guidelines and a review of the US Preventive Services Task Force controversy. Melanoma Manag. 2017;4(1):13-37.
134. C Badenas, P Aguilera, JA Puig-Butillé, C Carrera, J Malvehy, S Puig. Genetic counselling in melanoma. Dermatol Ther. 2012;25(5):397-402.
135. Australian Institute of Health and Welfare & Australasian Association of Cancer Registries. Cancer survival in Australia, 2001: Part 1: National summary statistics. AIHW cat. no. CAN 13. Canberra: AIHW, 2001.
136. Nola I. Kliničko-patološki čimbenici i značajke staničnog ciklusa u predviđanju ishoda melanoma kože [disertacija]. Zagreb (HR): Sveučilište u Zagrebu; 2005.
137. Adler NR, Wolfe R, Kelly JW, Haydon A, McArthur GA, McLean CA i sur. Tumour mutation status and sites of metastasis in patients with cutaneous melanoma. Br J Cancer. 2017;117(7):1026-35.
138. BRAF-NRAS Mutation Test LSR Specification Sheet [Internet]. Roche Diagnostics. 2017 [citirano: 06. lipnja 2019.]. Dostupno na: https://lifescience.roche.com/content/dam/RMS/lifescience/Documents/PDF/BRAF-NRAS%20Mutation%20Test%20LSR%20Specification%20Sheet_PP-US-11658.pdf
139. Millán-Esteban D, Reyes-García D, García-Casado Z, Bañuls J, López-Guerrero JA, Requena C, i sur. Suitability of melanoma FFPE samples for NGS libraries: time and quality thresholds for downstream molecular tests. Biotechniques. 2018;65(2):79-85.
140. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, i sur. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF mutation in primary melanoma. J Invest Dermatol. 2007;127(4):900-5.
141. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B i sur. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. Br J Cancer. 2014;111(2):292-9.
142. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ i sur. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2011;29(10):1239-46.
143. Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, i sur. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(4):666-72.

144. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, i sur. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res. 2002;62(23):6997-7000.
145. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, i sur. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. Cancer. 2012;118(16):4014-23.
146. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A,. Spandidos DA, McCubrey JA, i sur. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. Int J Oncol. 2018;52(4):1071-80.
147. Chan MM, Haydu LE, Menzies AM, Azer MW, Klein O, Lyle M, i sur. The nature and management of metastatic melanoma after progression on BRAF inhibitors: effects of extended BRAF inhibition. Cancer. 2014;120(20):3142-53.
148. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, i sur. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. Clin Cancer Res. 2011;17(2):229-35.
149. Bauer J, Büttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT, i sur. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(2):345-51.
150. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. Onco Targets Ther. 2017;10:3941-7.
151. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, i sur. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. J Transl Med. 2012;10:85.
152. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. Mod Pathol. 2018;31(1):24-38.
153. Greaves WO, Verma S, Patel KP, Davies MA, Barkoh BA, Galbincea JM, i sur. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. J Mol Diagn. 2013;15(2):220-6.
154. Posch C, Sanlorenzo M, Vujic I, Oses-Prieto JA, Cholewa BD, Kim ST, i sur. Phosphoproteomic Analyses of NRAS(G12) and NRAS(Q61) Mutant Melanocytes Reveal Increased CK2α Kinase Levels in NRAS(Q61) Mutant Cells. J Invest Dermatol. 2016;136(10):2041-8.
155. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. Clin Cancer Res. 2004;10(5):1753-7.
156. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, i sur. BRAF/NRAS

mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. J Clin Oncol. 2012;30(20):2522-9.
157. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Groben PA, Parrish E, Kricker A, i sur. Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. JAMA Oncol. 2015;1(3):359-68.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Melanom kože čini 1,79% ukupne incidencije svih zloćudnih tumora (13). Iako čini samo 4% svih karcinoma kože, on je odgovoran za 80% smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomima kože (140). Cilj ovog istraživanja je odrediti pojavnost mutacija gena BRAF i NRAS u bolesnika oboljelih od melanoma čiji su uzorci tumorskog tkiva analizirani u Kliničkom zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu u periodu od 2017. do 2019. godine.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 70 ispitanika s dijagnosticiranim melanomom kože, kojima je u uzorku tumorskog tkiva provedena molekularna analiza mutacija gena BRAF i NRAS. Podaci su prikupljeni pretraživanjem baze podataka Laboratorija za kliničku i sudsku medicinu i Odjela za patologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju. Svim ispitanicima su prikupljeni i analizirani podaci o spolu, dobi, prisutnosti i genotipu mutacija gena BRAF i NRAS.

Rezultati: Od ukupnog broja ispitanika s melanomom kože (n=70), na muškarce otpada 54 (77,14%), a na žene 16 (22,86%). Medijan godina ispitanika je 69 (raspon 28-87). Najveći broj ispitanika je između 60. i 75. godina (50%). Od ukupnog broja ispitanika njih 28 ima mutaciju gena BRAF (40%), 10 ima mutaciju gena NRAS (14,29%), a 33 ispitanika ima divlji tip melanoma (47,14%). Jedan ispitanik ima istodobno prisutnu i mutaciju gena BRAF i mutaciju gena NRAS (1,43%). Među ispitanicima s mutacijom gena BRAF, genotip V600E je prisutan u 17 osoba (60,72%), genotip V600K je prisutan u 7 osoba (25%), genotip V600R u jedne osobe (3,57%) te genotip K601E u jedne osobe (3,57%). Mutacija na egzonu broj 11 je prisutna u 2 osobe (7,14%). Mutacija gena NRAS na kodonu 61 je prisutna u 10 ispitanika (100%).

Zaključak: U ovom istraživanju melanom kože se 3 puta češće javlja u osoba muškog spola nego u osoba ženskog spola. BRAF/NRAS mutacijski status je pozitivan u više od polovice ispitanika obuhvaćenih ovim istraživanjem. Postotak ispitanika bez mutacije gena BRAF je veći u odnosu na postotak ispitanika koji imaju mutaciju. Također postotak ispitanika bez mutacije gena NRAS je veći u odnosu na postotak ispitanika koji imaju mutaciju. I mutacija gena BRAF i mutacija gena NRAS se češće javljaju u osoba muškog spola, nego u osoba ženskog spola. Najčešći genotip mutacije gena BRAF je V600E. Svi ispitanici s mutacijom gena NRAS imaju mutaciju na kodonu 61.

9. SUMMARY

Objective: Melanoma of the skin accounts for 1.79% of all malignant diseases (13). Although it accounts for only 4% of all skin cancers, it is responsible for 80% of deaths caused by them (140). The aim of this thesis is to determine the occurrence of mutations in BRAF and NRAS genes in patients with melanoma, whose tumor tissue samples were analyzed in the Clinical Institute of Pathology, Cytology and Judicial Medicine in the period from 2017 to 2019.

Subjects and methods: The study included 70 patients with diagnosed melanoma of the skin who were analysed on mutation of BRAF and NRAS genes in the tumor tissue samples. Data was collected by searching the database of the Clinical and Judicial Medicine Laboratory and Department of Pathology of the Clinical Institute of Pathology, Judicial Medicine and Cytology. All patients were collected and analyzed on gender, age, presence and genotype of BRAF and NRAS mutations.

Results: Of the total number of patients analyzed on BRAF and NRAS mutation (n =70), men are 54 (77.14%) and women are 16 (22.86%). The median age of patients is 69 (range 28-87). The analysis showed that most patients are between 60 and 75 years old (50%). Of the total number of patients, 28 has mutation of BRAF gene (40%), 10 has mutation of NRAS gene (14.29%), and 33 has wild type of melanoma (47.14%). One patient has mutation of both BRAF and NRAS gene (1.43%). Among the patients with mutation of BRAF gene, the V600E genotype is present in 17 people (60.72%), V600K genotype is present in 7 (25%), V600R genotype in one person (3.57%) and K601E genotype in one person (3.57%). Mutation in exon 11 is present in 2 people (7.14%). Mutation of NRAS gene at codon 61 is present in 10 subjects (100%).

Conclusion: In this thesis, melanoma appears 3 times more often in males than in females. BRAF/NRAS mutation status is positive in more than half of the patients covered by this thesis. The percentage of patients without mutation of BRAF gene is higher than the percentage of patients with mutation. Also, the percentage of patients without mutation of NRAS gene is higher than the percentage of patients with mutation. Both mutation of BRAF gene and NRAS gene are more common in a males than in females. The most common genotype of BRAF mutation is V600E. All patients with mutation of NRAS gene have a mutation at codon 61.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Maja Pavić

Datum rođenja: 19. studenog 1994.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Adresa: Kroz Smrdečac 3, 21 000 Split, Republika Hrvatska

Email-adresa: majaapavic@yahoo.com

Obrazovanje:

2000.-2008. Osnovna škola „Split 3“, Split

2008.-2012. I. gimnazija, Split

2013.-2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program Medicina

Osobne vještine i osposobljenost:

Aktivno korištenje engleskog i talijanskog jezika

Vozačka dozvola B kategorije