

УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА

др Милица Рајовић

УТИЦАЈ КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИХ
КАРАКТЕРИСТИКА ПРИМАРНОГ МЕЛАНОМА КОЖЕ
И ИМУНОБИОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА
МЕТАСТАТСКИ ИЗМЕЊЕНОГ ЛИМФНОГ ЧВОРА
СТРАЖАРА НА
ТОКИ И СХОД БОЛЕСТИ

Докторска дисертација

Београд, 2022.

Захваљујем се свом ментору проф. др Ненаду Степићу на стручној и професионалној подршци од почетка докторских студија па све до завршетка докторске дисертације.

Највећу захвалност дугујем председнику комисије, проф. др Лидији Кандолф Секуловић, на подршци, поверењу и бескрајном стрпљењу и разумевању, као и на неопходним саветима и непрекидној и несебичној помоћи током свих ових година.

Велику захвалност упућујем и дугујем свом коментору и куми проф. др Љиљани Радосавчев, из Института за нуклеарну медицину Војномедицинске академије, са којом сам урадила прву сквентиграфију лимфних чворова 2006 године и са којом од тада стручно и научно сарађујем и која ми је била незамењив ослонац и иницијатор објављивања радова у стручним часописима.

Захваљујем се стручном тиму Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије, дипл. биохемичару Милени Јовић, др Ненаду Петрову и лабораторијским техничарима на челу са проф. др Снежаном Церовић, на професионално обављеним методама за истраживање.

Захваљујем се доц. др Срђану Николићу из Института за онкологију и радиологију Србије на стручној, колегијалној и пријатељској помоћи током израде докторске дисертације.

Хвала другарици Снежани Корлат без чијег ентузијазма приликом попуњавања података за статистичку обраду не знам када би докторској дисертацији дошао крај.

Хвала другарици Бранкици Митровић на пријатељској помоћи приликом обраде резултата и разумевању за моје неразумевање.

Хвала Милану Перовановићу, вишем радиолошком техничару из Института за нуклеарну медицину Војномедицинске академије на несебичној помоћи око техничке обраде текста.

Хвала асист. др Зорану Букумирићу, из Института за медицинску статистику и информатику, Медицинског факултета Универзитета у Београду, колеги и пријатељу на јасним и прецизним саветима и сугестијама током статистичке обраде резултата.

Хвала проф. др Маријану Новаковићу који је био руководилац научноистраживачког пројекта ВМА из којег је проистекла ова докторска дисертација.

Хвала *Кући штампе Графолик*, Београд.

Посебну захвалност дугујем деци, породици и пријатељима што су били део мог свакодневног оптерећења науком.

Посвећено Јову Рајовићу

САДРЖАЈ

САЖЕТАК.....	9
1. УВОД.....	11
1.1. Меланом коже: дефиниција и класификација	11
1.2. Епидемиологија меланома.....	11
1.3. Класификација клиничких типова меланома коже	12
1.4. Хистопатолошке карактеристике меланома коже	15
1.4.1. Хистопатолошка дијагностика примарног меланома	15
1.4.2. ТНМ класификација меланома	16
1.5. Дијагностичке процедуре код примарног меланома коже и биопсија лимфног чвора стражара	18
1.5.1. Дијагностичке биопсије: Екцизиона (комплетна) и Инцизиона (парцијална) биопсија	18
1.5.2. Биопсија лимфног чвора стражара	19
1.5.2.1. Извођење процедуре биопсије лимфног чвора стражара	20
1.5.2.2. Дијагностички значај биопсије лимфног чвора стражара	21
1.5.2.3. Терапијски значај биопсије лимфног чвора стражара	21
1.5.2.4. Фактори ризика за присуство метастаза у лимфном чвору стражару	21
1.5.2.5. Фактори ризика за појаву метастаза у несентинелским лимфним нодусима	22
1.6. Иmunски одговор у лимфном чвору стражару	22
1.6.1. Иmunски одговор на меланом.....	22
1.6.2. Хистопатолошки параметри имуноског одговора у лимфном чвору.....	25
1.6.2.1. Грађа лимфног чвора	25
1.6.2.2. Иmunски одговор у лимфном чвору стражару	26
1.6.2.3. Однос експресије CD4 и CD8, PD-L1, FOXP3 и IDO у популацији лимфоцита лимфног чвора стражара и корелација са статусом не-сентинелских лимфних чворова и током болести	27
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	31
3.1. Испитаници	31
3.2. Клиничко-патохистолошке карактеристике примарног меланома	32
3.3. Биопсија лимфног чвора стражара и дренажни басени лимфног чвора стражара	34
3.3.1. Биопсија лимфног чвора стражара: техника извођења	35
3.3.2. Хистопатолошка обрада узорка лимфног чвора стражара	35
3.3.3. Скорови оптерећења тумором у лимфном чвору стражару	36
3.3.4. Имунохистохемијско одређивање степена експресије CD4, CD8, FOXP3 и Индоламин-2,3-диоксигеназе.....	37
3.3.5. Имунохистохемијско одређивање експресије CD4 и CD8	37
3.3.6. Имунохистохемијско одређивање експресије CD8	37
3.3.7. Имунохистохемијско одређивање експресије FOXP3.....	38
3.3.8. Имунохистохемијско одређивање експресије IDO	39
3.3.9. Имунохистохемијско одређивање експресије PD-L1	40
3.3.10. Техника извођења комплетне дисекције несентинелских лимфних чворова дренажућег лимфног басена	41
3.4. Статистичка анализа	42

4. РЕЗУЛТАТИ	43
4.1. Дистрибуција по полу	43
4.2. Фактори ризика за степен детекције метастаза у лимфном чвору стражару	44
4.2.1. Бинарна логистика регресија - предиктивни фактори за појаву метастаза у сентинелном лимфном нодусу	48
4.3. Фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима услед комплетне дисекције дренирајућег лимфног басена	49
4.3.1. Статус и оптерећење тумором лимфног чвора стражара и његов прогностички значај за појаву метастаза у не-сентинелским чворовима	51
4.3.2. Корелација параметара имунолошког одговора на тумор у лимфном чвору стражару и статуса несентинелских лимфних чворова	52
4.3.3. Бинарна логистика регресија - предиктивни фактори за појаву метастаза у несентинелном лимфном нодусу	54
4.3.4. Класификациона схема предикције постојања метастаза у не-сентинелском лимфном чвору ...	54
4.4. Анализа тока болести, времена преживљавања и исхода у односу на клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома и статус лимфног чвора стражара	54
4.4.1. Исход болести у односу на пол, старост и локализацију примарног тумора	54
4.4.2. Исход болести у односу на статус лимфног чвора стражара	55
4.4.3. Корелација стопа трогодишњег преживљавања у односу на пол, старост и клиничко патолошке карактеристике примарног тумора и статус лимфног чвора стражара (Табела 26.)	56
4.4.4. Време преживљавања од дијагнозе примарног меланома до појаве метастаза (преживљавање без прогресије, енгл. Progression-free survival, PFS)	57
4.4.5. Преживљавање без удаљених метастаза (енгл. Distant metastasis free survival, DMFS)	61
4.4.6. Време укупног преживљавања у односу на пол и клиничкопатолошке карактеристике примарног меланома	64
4.4.7. Укупно преживљавање у односу на стадијум болести по АЈСС2017 класификацији	67
4.4.8. Укупно преживљавање у односу на прогностичке категорије локализованог меланома	68
5. ДИСКУСИЈА	71
5.1. Степен детекције метастаза у лимфном чвору стражару и временски интервал између ексцизионе биопсије и СЛНБ	71
5.2. Клиничко-патолошке карактеристике испитаника у студији	72
5.3. Лимфосцинтиграфске карактеристике испитаника у студији	74
5.4. Фактори ризика за појаву метастаза у лимфном чвору стражару	74
5.5. Фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима	75
5.6. Параметри оптерећења тумором у лимфном чвору стражару као предиктивни фактор за појаву метастаза у НСЛН	77
5.7. Имунолошки параметри у метстатском лимфном у лимфном чвору стражару као предиктивни фактор за појаву метастаза у НСЛН	78
5.8. Скорирање процена ризика постојања метастаза у НСЛН	78
5.9. Анализа тока болести, времена преживљавања и исхода у односу на клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома, статус лимфног чвора стражара и статус не-сентинелских лимфних чворова	79
ЗАКЉУЧЦИ	83
ЛИТЕРАТУРА	85

др Милица Рајовић

УТИЦАЈ КЛИНИЧКОПАТОЛОШКИХ
КАРАКТЕРИСТИКА ПРИМАРНОГ МЕЛАНОМА КОЖЕ
И ИМУНОБИОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА
МЕТАСТАТСКИ ИЗМЕЊЕНОГ ЛИМФНОГ ЧВОРА
СТРАЖАРА НА
ТОКИ ИСХОД БОЛЕСТИ

САЖЕТАК

Савремена дијагностика меланома подразумева преоперативну детекцију сумњиве промене на кожи дермоскопијом те ексцизиону биопсију уз хистопатолошку анализу која обухвата одређивање параметара за које је доказано да су у корелацији са прогресијом болести. Након постављања хистопатолошке дијагнозе неопходна је евалуација регионалних лимфних басена, ради одређивања стадијума болести. Уколико хистопатолошка слика указује на висок метастатски потенцијал, неопходно је урадити иницијалне дијагностичке процедуре ради провере статуса солидних органа. У иницијалне дијагностичке процедуре убрајају се: клинички и ултразвучни преглед свих регионалних лимфних басена, као и компјутеризована томографија или ПЕТ скенер код високоризичних меланома. Уколико се клиничким и ултразвучним прегледом не уоче потенцијално патолошки измењени лимфни чворови, неопходно је урадити биопсију лимфног чвора стражара ради детекције микрометастаза у лимфном чвору.

Биопсија лимфног чвора стражара је дијагностичко-прогностичка процедура и има незаобилазан значај у планирању даљег лечења. Када се детектује микрометастаза меланома у лимфном чвору стражару до 2017. године била је индикована је комплетна дисекција дренажујућег басена. Међутим, на основу резултата две студије које су објављене 2017. године на значајном броју пацијената из САД и Немачке (студије MSLT II и DECOG), утврђено је да не постоји разлика у преживљавању између пацијената код којих је учињена дисекција и оних код којих није учињена дисекција после налаза метастаза у лимфном чвору стражару, него само редовно ултразвучно праћење лимфног басена и дисекција у случају појаве метастазе. Исте године објављене су студије које указују на значајан ефекат адјувантне имуноterapiје и таргет терапије у III клиничком стадијуму укључујући и оне код којих су метастазе детектоване биопсијом лимфног чвора стражара. На основу ових сазнања, већина европских центара је напустила дисекцију лимфног басена, а увела редовне ултразвучне контроле и адјувантну терапију као стандард у лечењу стадијума III. Ипак, у ситуацији када адјувантна терапија није доступна и узимајући у обзир чињеницу да комплетна дисекција лимфног басена утиче на локалну контролу болести, као и да адјувантна терапија није ефикасна код свих пацијената, било би значајно детектовати групу пацијената код којих би дисекција лимфног басена била и даље корисна, а то је група оних пацијената код којих се у дисекату детектују метастатски измењени не-сентинелски лимфни чворови.

У досадашњим студијама као фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима након дисекције описани су различити хистопатолошки и морфолошки параметри примарног меланома, параметри микросредине лимфног чвора стражара, као и експресија различитих параметара имунског одговора на тумор, али се подаци разликују. У овом истраживању анализирана је корелација клиничкопатолошких карактеристика примарног меланома, статуса лимфног чвора стражара, статуса не-сентинелских лимфних чворова, тока и исхода болести.

1. УВОД

1.1. Меланом коже: дефиниција и класификација

Меланом коже је тумор настао малигном трансформацијом меланоцита. Меланоцити воде порекло од ћелија неуралног гребена нервне кресте и имају ограничену способност деобе. Током развоја фетуса, они мигрирају и диференцирају се унутар епидермиса, као и на друга места која садрже екстра-кожни пигмент, попут очију, можданих овојница, једњака и слузокоже. Према овим карактеристикама разликујемо три под-типа меланома: меланом коже (најчешћи) који потиче од меланоцита у епидермису, меланом слузнице порекла меланоцита који се налазе у слузници и увеални меланом порекла меланоцита који се налазе у очној строми. Фокусовогистраживања био је меланом коже.

У кожи, меланоцити су ћелије смештене у епидерму и њихова главна функција је синтеза и дистрибуција пигмента меланина. Меланоцити синтетишу и процесом цитокрине секреције, предају суседним кератиноцитима пигмент меланин, штитећи их на тај начин од штетног дејства УВ зрачења. Са кератиноцитима које снабдевају меланином формирају епидермно-меланинске функционалне јединице.

1.2. Епидемиологија меланома

Меланом коже је најчешћи подтип меланома, који чини више од 90% случајева меланома [1]. Инциденција меланома расте у популацији становништва беле расе са белом кожом, посебно у регионима где су особе са светлом кожом изложене прекомерном излагању сунцу, што потврђују подаци о учесталости и преваленцији рака коже у Аустралији [1]. У Европи је стопа инциденције око <25 нових случајева меланома на 100.000 становника; у Сједињеним Државама (САД) 30 на 100.000; а у Аустралији, где је стопа инциденције изузетно висока, достиже 60 случајева на 100.000. Последњих година дошло је до драматичног повећања инциденце код људи старијих од 60 година и уопште у свим старосним групама. Криве инциденције указују на то да ће се инциденца наставити да расте у наредним годинама [2,3].

Учесталост меланома расте брже него код других врста канцера. Просечна старост при постављању дијагнозе је 57 година са већом учесталошћу код жена у млађим старосним групама, док се однос мења са померањем старосне границе те је учесталост код старијих мушкараца већа. Процене из САД-а указују да је доживотни ризик од меланома 1 од 56 за жене и 1 од 37 за мушкарце. Евидентно је да су стопе морталитета веће међу мушкарцима него међу женама [4,5], вероватно због закасне дијагнозе болести.

Најчешћи фенотипски фактор ризика је кожа која је склона опекотинама од сунца. [6] Последње деценије интензивно се проучавају генетски фактори те је варијанта гена меланокортин-1 рецептора (MC1R) окарактерисана као једна од најважнијих генетских детерминанти која је везана за настанак меланома. Појединци са великим бројем невуса и они са великим конгениталним, мултиплим и/или атипичним невусима изложени су већем ризику, а овај фенотип је такође генетски детерминисан [7]. Због веће вероватноће да ће се меланом дијагностиковати у овим групама пацијената, неопходне су им редовне контроле, односно клиничко и дермоскопско праћење.

Меланом се у већини случајева јавља на здравој кожи, иако је 25% меланома повезано са већ постојећим невусом, што оправдава двоструку учесталост меланома повезаног са невусом код младих одраслих

и старијих особа. Осим тога, и сам број младежа повезан је са ризиком од развоја меланома, посебно код пацијената код којих је на кожи присутно више од 100 младежа диспластичног изгледа [7].

Генетска компонента је узрок повећаног ризика, иако није главни фактор. Најважнији фактор средине за настанак меланома је излагање УВ зрачењу, нарочито повремено (интермитентно) интензивно излагање сунцу. Већина меланома коже настаје на кожи интермитентно (а не хронично) изложеној сунцу, на местима и код појединаца који су склонији опекотинама од сунца. Највеће стопе се примећују код појединаца са поновљеним интензивним излагањем сунцу. Старост у којој долази до излагања сунцу и/или опекотина такође је важна. Систематски преглед литературе [8] често повезује повремено излагање сунцу у детињству или адолесценцији са повећаним ризиком од меланома. Конкретно, појединци који су доживели више од 5 епизода тешких опекотина од сунца имали су двоструко већи ризик од меланома [9]. Један од најважнијих фактора ризика који се може променити у етиопатогенези меланома свакако је изложеност УВ-Б зрачењу [10]. Задобијање опекотина од сунца у детињству повезано је са већим ризиком, повремена изложеност је повезана са меланомом, а хронична изложеност је повезана са појавом актиничних кератоza и не-меланомским карциномима коже.

Вештачко излагање УВ зрачењу може играти улогу у развоју меланома јер је степен изложености УВ-А зрацима, типичним за соларијум знатно већи од изложености током нормалних активности на отвореном или чак током сунчања. Резултати мета-анализе [11] која је истраживала учесталост меланома након коришћења соларијума указује на 75% повећан ризик код особа млађих од 35 година које су користиле соларијум. Због повећаног ризика од меланома код корисника соларијума, њихова употреба је забрањена у многим државама [12.] Коначно, постоји занимљива повезаност између меланома и коморбидитета. Према најновијим подацима, пацијенти са трансплантатираним органима имају двоструко већи ризик од развоја меланома у поређењу са општом популацијом [13]. Осим тога, пацијенти који имају друге малигне болести коже (карцином базалних ћелија или плочастих ћелија или *mycosis fungoides*) имају већи ризик од развоја меланома.

1.3. Класификација клиничких типова меланома коже

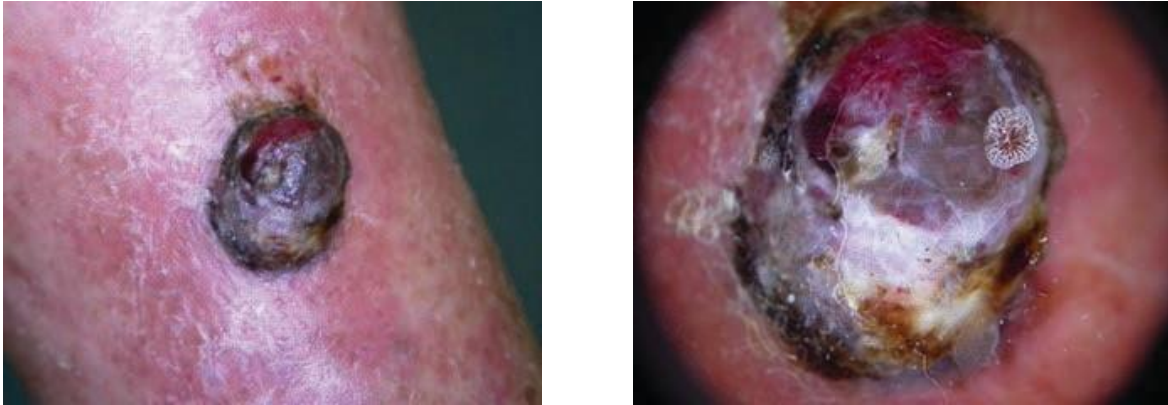
Пре више од 30 година меланом коже је класификован на основу анатомске локализације и хистопатолошке морфологије у подтипове: површинско ширећи меланом, нодуларни меланом, лентиго малигна, акрални лентигозни меланом, као и подтип ретких и неклассификованих меланома [2].

Меланом са површинским ширењем (енгл. *superficial spreading melanoma, SSM*) одликује пацетоидна инфилтрација епидерма меланомским ћелијама и лентигозно ширење дуж базалног слоја (хоризонтална фаза раста). Меланомске ћелије су велике, епителоидног изгледа и обилне цитоплазме. Овај тип меланома се јавља најчешће код млађих особа које имају диспластичне невусе, на подручјима која су интермитентно изложена УВ зрачењу и већом учесталошћу BRAF мутације (Слика 1.).



Слика 1. Клиничка слика и дермоскопија површно ширећег меланома

Нодуларни меланом се одликује брзом туморском прогресијом, са минималним интаепидермалним ширењем. Изнад самог тумора епидерм је стањен или може бити улцерисан. У дерму је присутан чвор или пак мала гнезда туморских ћелија које имају експанзиван образац раста. Ћелије су епителне, али могу бити и вретенасте или може постојати више ћелијских типова [14] (Слика 2). Полипоидни меланом као субтип нодуларног меланома представља агресивнију варијанту у поређењу са нодуларним меланомом којег хистолошки одликују агрегати великих ћелија, чешћа појава улцерације, већа дебљина тумора и већи ризик од развоја метастаза [15,16].



Слика 2. Нодуларни меланом, клиничка слика и дермоскопија

Лентиго малигна меланома хистолошки карактерише лентигозна пролиферација атипичних меланоцита који су полигонални са атипичним једрима у епидерму, али и аднексалним структурама (Слика 3). Уколико дође до појаве нодуса то указује на вертикалну фазу раста и у горњем делу дерма се често налази лимфоцитни инфилтрат са плазма ћелијама и меланофагима (тзв. лентиго малигна меланома) [17]



Слика 3. Лентиго малигна меланома, клиничка слика и дермоскопија

Акрални лентигозни меланом одликује конфлуентна меланоцитна пролиферација дуж епидермо-дермалне границе. Са прогресијом тумора велика јункциона гнезда атипичних меланоцита се могу наћи као и пацетоидно ширење. Овакви тумори су обично улцерисани и карактеришу се нодусом са стромалном реакцијом [18]

Дезмоплазијски-неуротропни меланом је ретка врста инвазивног меланома са инциденцом мањом од 4% свих меланома, коју одликује фаза вертикалног раста вретенастих ћелија са израженом дезмоплазијском, односно, фиброзном стромом [19] Јавља се код старијих особа, после 60. године живота, на глави, врату, горњој половини трупа, али може и на екстремитетима, акралним деловима и слузницама. Клинички, испољава се у виду пигментоване макуле, са или без нодалне компоненте или у виду лезије која подсећа на ожиљак и постепено се повећава без податка о претходној повреди или биопсији на том месту [20]. Дезмопластичан меланом је подељен у два субтипа: "прави" и "мешовити". "Прави" показују значајно мању учес-

талост метастазирања у лимфне чворове и боље петогодишње преживљавање у поређењу са пацијентима са “мешовитим” типом [21].

Невоидни меланом је варијанта која чини мање од 1% свих меланома. Представљају групу меланома које цитоморфолошки личе на меланоцитне невусе, али имају хистолошке карактеристике и биолошко понашање меланома са метастатским потенцијалом. Клинички се могу презентовати као невус са верукозном површином или у виду пигментованог нодуса.

Амеланотични меланом је меланом коме недостаје пигмент и јавља се код 2-8% свих типова. Сви хистопатолошки типови меланома се могу испољити у виду амеланотичне варијанте, мада се чешће виђа код дезмопластичног меланома (око 50%), нодуларног меланома, субунгвалних тумора (око 25%). Клинички, презентује се у виду равне лезије или нодуса ружичасте или нормалне боје коже који се диференцијално дијагностички може заменити са дерматофибромом, базоцелуларним или сквамозелуларним карциномом, али свакако да дермоскопија у том случају олакшава дијагнозу [22].

Верукозни меланом је варијанта која се чешће јавља код жена и претежно локализован на екстремитетима, манифестује у виду хиперкератотичне верукозне лезије који може личити на себороичну кератозу [23].

Меланом у циновском конгениталном невусу обично настаје у невусу који су већи од 20 цм. Јавља се код 2.5%–2.9% пацијената са циновским конгениталним меланоцитним невусом, док пацијенти са средњим и малим се сматра да немају већи ризик за малигну трансформацију. У ретким случајевима, настанак меланома се може јавити и у средњим и малим конгениталним меланоцитним невусима. Малигна трансформација у малим и средњим конгениталним невусима настаје касније, [24] током четврте и пете деценије живота, док у циновским невусима има тенденцију јављања у првој и другој деценији живота.

Спицоидни меланом (Spitz) је субтип меланома који клинички и хистолошки личи на Спицов невус, али је већег промера, поседује асиметрију и неправилну пребојеност, у виду амеланотичне или пигментоване папуле или нодуса. Разликовање ова два клиничка ентитета је некада отежано посебно код млађих особа. У поређењу са Спицовим невусом, код спицоидног меланома постоји блага преминација особа мушког пола и јавља се касније у току живота, око 55 године [25]. Код млађих особа (пре пубертета и особа млађих од 10 година) спицоидни меланом има повољнији ток, мада су описани и смртни исходи [25].

Меланом у плавом невусу јавља се на поглавини, али су описани случајеви појаве лезија и на рукама. Обично настаје из претходног плавог невуса, после 45. године, чешће код мушкараца сем у јако ретким случајевима када настаје *де ново*, без претходног постојања бенигне прекурсорске лезије. Тумор се одликује агресивним понашањем и метастазира код већине пацијената [26].

Меланом балонских ћелија је ретка форма коју одликује вертикална фаза раста и карактерише се нодалном пролиферацијом неопластичних балонских ћелија. Настаје на терену површинско ширећег меланома. Клинички има изглед меканог или чврстог нодуса са полипоидним или папиломатозним ивицама, сивкасте или беличасте боје. У највећој објављеној серији код 57.5% оболелих смртни исход услед развоја метастатске болести забележен је у периоду од 2 месеца до 12 година након иницијалне хируршке терапије [27,28].

1.4. Хистопатолошке карактеристике меланома коже

1.4.1. Хистопатолошка дијагностика примарног меланома

Хистопатолошка дијагностика се заснива на одређивању параметара неопходних за класификацију меланома и одређивање TNM стадијума, као и других параметара који су процењени као прогностички: дебљина тумора, присуство улцерације, микросателитозе, број митоза, ниво инвазије, присуство тумор инфилтришућих лимфоцита, лимфоваскуларне и перинеуралне инвазије и присуство преегзистирајуће промене, невуса у меланому [1,5, 14, 29]

Дебљина меланома по Бреслоу (енгл. *Breslow*)- важан је прогностички параметар и представља основу за поделу на T стадијуме. Дебљина меланома се изражава у милиметрима (мм), са једном децималом, а мерење се обавља од врха гранулозног слоја (*stratum granulosum*) епидерма или дна улцерације (уколико иста постоји) до најдубљег места инвазије.

Улцерација је јединствен и независан прогностички фактор и подразумева одсуство свих слојева епидерма, од рожнатог (*stratum corneum*) до базалне мембране (*stratum basale*), уз евидентну локалну реакцију – фибрин и полиморфонуклеарни леукоцити. Према ранијим студијама и класификацији Америчког здруженог комитета за рак (енгл. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*), улцерација представља кључни параметер који указује на лошију прогнозу (краће време преживљавања) унутар pT (енгл. pT) стадијума. Уколико је присутна, означава се b подстадијумом унутар сваког pT (енгл. pTb) стадијума.

Микросателити представљају метастатска гнезда у дерму и/или поткожном масном ткиву. Према TNM класификацији присуство ових метастаза означава се са N1c (енгл. N1c).

Број митоза изражава се бројем митоза по 1 квадратном милиметру. Бројање митоза почиње од видног поља са највећим бројем митоза (енгл. "hot spot") и наставља се кроз суседна видна поља до укупне површине од 1 мм²

Ниво инвазије по Кларку (енгл. *Clark*) дефинисани је као: I- интраепидермални (енгл. *in situ*) меланом; II - инвазија папиларног дерма без његовог испуњавања и ширења; III: испуњавање и проширивање кроз папиларни дерм; IV - инвазија ретикуларног дерма; V- продор у поткожно масно ткиво и дубље слојеве. У последњој ревизији TNM система, ниво инвазије по Кларку више се не користи ни за b подстадијум у посебним случајевима pT1 меланома без улцерације, али је задржан као параметар са прогностичким значајем.

Присуство интратуморске лимфоцитне инфилтрације (енгл. *Tumor infiltrating lymphocytes, TIL*) у досадашњим анализама и AJCC класификацији повезано је са бољом прогнозом уз мањи ризик од појаве метастаза, те је значајан прогностички фактор. Описује се у хистопатолошком налазу као: одсутна – уколико нема инфилтрације или је ван тумора; као (енгл. non-brisk) где се TIL налази фокално, дуж периферије тумора или унутар тумора; и (енгл. brisk) – TIL се налази дифузно, дуж периферије тумора или унутар тумора.

Васкуларна (лимфоваскуларна) инвазија (енгл. LVI) указује на присуство туморских ћелија у луменима лимфних и крвних судова, односно у простору обложеном ендотелом. Овај параметар корелира са лошијом прогнозом болести.

Перинеурална и/или интранеурална инфилтрација (енгл. PNI) туморским ћелијама је повезана са учесталијим рецидивима.

Регресија код меланома дефинише се одсуством туморских ћелија у инвазивној компоненти, уз појаву лимфоцитног инфилтрата, фиброзе и меланофага. Регресија је општеприхваћен параметар који указује на лошију прогнозу, поготово ако захвата више од 75% инвазивне компоненте. Међутим, постоје студије у којима је регресија показала повезаност са бољом прогнозом.

Анализа односа тумора према ресекционим маргинама битна је за процену адекватности ексцизионе биопсије. Мери се удаљеност дела тумора који је најближи ресекционим рубовима (бочни и дубоки) коришћењем истог мерног инструмента којим се мери дебљина по Бреслоу.

1.4.2. TNM класификација меланома

На основу анализе корелације клиничко-патолошких карактеристика, преживљавања без прогресије и свеукупно преживљавање из велике базе података која обухвата преко 46,000 пацијената из 10 центара широм света за стадијуме I, II и III меланома дијагностикованог од 1998. године, направљена је најновија верзија TNM класификације меланома од стране AJCC и објављена 01. јануара 2018. године [30]. Клиничкопатолошки параметри који су уврштени у ову TNM класификацију за одређивање клиничког стадијума болести су: дебљина тумора по Бреслоу (pT стадијум), присуство улцерације, микросателита, сателитских метастаза као и статус лимфних чворова (N стадијум) и присуство удаљених метастаза (M стадијум).

T класификација примарног меланома коже

T класификација	Дебљина тумора	Додатни прогностички параметри
Tis	-	<i>Melanoma in situ</i> , нема туморске инвазије
Tx	Непознато	Стадијум се не може одредити
T0	нема доказа постојања примарног тумора	-
T1	≤1 мм	а: <0,8 мм без улцерације б: са улцерацијом или дебљина тумора 0.8-1 мм без улцерације
T2	1,01–2,0 мм	а: без улцерације б: са улцерацијом
T3	2,01–4,0 мм	а: без улцерације б: са улцерацијом
T4	>4,0 мм	а: без улцерације б: са улцерацијом

N класификација регионалних лимфних чворова код меланома коже

N класификација	Број лимфних чворова са метастазама	
Nx	Непознат	
N0	хистопатолошки доказано одсуство метастаза	
N1*	1 лимфни чвор или сателитска/ <i>in transit</i> метастаза	а. клинички окултна метастаза, доказана биопсијом лимфног чвора стражара*; N1(сн)** б. метастаза откривена клинички/радиолошки ц. сателитска или <i>in transit</i> метастаза/е без метастаза у регионалним лимфним чворовима

N2	2–3 лимфна чвора или сателитска/ <i>in transit</i> метастаза са једним лимфним чвором	а. клинички окултне метастазе доказане биопсијом лимфног чвора стражара** б. метастазе у 2–3 лимфна чвора од који је бар једна откривена клинички/радиолошки ц. сателитска или <i>in transit</i> метастаза/е са једном метастазом у лимфном чвору (клинички окултном или откривеном клиничким/радиолошким прегледом)
N3	≥4 лимфна чвора (окултна или откривена клинички/ радиолошки) или сателитска/ <i>in transit</i> метастаза са два и више лимфних чворова	а. клинички окултне метастазе доказане биопсијом лимфног чвора стражара** б. метастазе у ≥4 лимфна чвора од којих је бар једна откривена клинички/радиолошки ц. сателитска или <i>in transit</i> метастаза/е са најмање две метастазе у регионалним лимфним чворовима (клинички окултном или откривеном клиничким/ радиолошким прегледом)

* За детекцију микрометастаза неопходно је да бар једна ћелија реагује позитивно имунохемијски;

** N1(сн) уколико је учињена биопсија лимфног чвора стражара, нађен метастатски депозит, а није учињена дисекција лимфног басена;

М класификација удаљених метастаза код меланома коже

М класификација	Тип удаљене метастазе	
M0	Без удаљених метастаза	
M1a	Удаљене метастазе у кожи, поткожном ткиву и мишићу, или лимфним чворовима (ван регионалних)*	M1a нема податка о концентрацији LDH M1a (0) LDH нормалан M1a (1) LDH повишен
M1b	Плућне метастазе са или без M1a метастаза	M1b нема податка о концентрацији LDH M1b (0) LDH нормалан M1b (1) LDH повишен
M1c	Удаљене метастазе друге локализације са или без M1a и M1b локализација	M1c нема податка о концентрацији LDH M1c (0) LDH нормалан M1c (1) LDH повишен
M1d	Удаљене метастазе у централном нервном систему са или без M1a, M1b или M1c локализација метастаза	M1d нема податка о концентрацији LDH M1d (0) LDH нормалан M1d (1) LDH повишен

* Илијачни лимфни чворови такође су класификовани као M1a

Клиничка класификација меланома коже по стадијумима

Клинички стадијум	Примарни тумор (pT)	Метастазе у регионалним лимфним чворовима (N)	Удаљене метастазе (M)
0	<i>In situ</i> тумори Tis	нема N0	нема M0
IA	<0.8 мм без улцерације T1a	нема N0	нема M0
IB	0.8–1 мм без улцерације ≤1 мм са улцерацијом T1b	нема N0	нема M0
	1,0–2,0 мм без улцерације T2a	нема N0	нема M0
IIA	1,01–2,0 са улцерацијом T2b	нема N0	нема M0
	2,01–4,0 мм без улцерације T3a	нема N0	нема M0

Клинички стадијум	Примарни тумор (pT)	Метастазе у регионалним лимфним чворовима(N)	Удаљене метастазе(M)
IIb	2,01–4,0 мм са улцерацијом T3b	нема N0	нема M0
	>4,0 мм без улцерације T4a	нема N0	нема M0
IIc T4b	>4,0 мм са улцерацијом	нема N0	нема M0
IIIa	T1a-b	N1a, N2a	нема M0
IIIb	T0	N1b, N1c	нема M0
	T1a-b, T2a	N1b, N1c, N2b	нема M0
	T2b, T3a	N1a-c, N2a, N2b	нема M0
IIIc	T0	N2b, N2c, N3b, N3c	нема M0
	T1a-b, T2a-b, T3a	N2c, N3a-c	нема M0
	T3b, T4a	Било који N стадијум	нема M0
	T4b	N1a/c, N2a-c	нема M0
IIId	T4b	N3a-c	нема M0
IV	Било који T	Било који N	Удаљене метастазе M1

1.5. Дијагностичке процедуре код примарног меланома коже и биопсија лимфног чвора стражара

Дијагностика меланома коже почиње прегледом суспектне пигментне промене. На основу анамнезе, клиничких правила за рану дијагнозу меланома (ABCDE и EFG) и дермоскопским прегледом, поставља се радна дијагноза суспектне меланоцитне лезије.

За сваку промену суспектну на меланом индикована је хируршка интервенција, односно биопсија, са слањем узорка на хистопатолошку анализу. Хистопатолошка анализа је једина егзактна метода која потврђује или искључује дефинитивну дијагнозу. У зависности од хистопатолошких параметара следе иницијалне дијагностичке процедуре на основу којих се доноси одлука о даљем лечењу: проширена ексцизија (реексцизија), биопсија лимфног чвора стражара и/или терапијска дисекција регионалног лимфног басена као и хируршко лечење или системска терапија удаљених метастаза [31, 32, 33].

1.5.1. Дијагностичке биопсије: ексцизиона (комплетна) и инцизиона (парцијална) биопсија

Први и најважнији корак ка дефинитивној дијагнози лезије на кожи која је клинички и/или дермоскопски сумњива на меланом, јесте биопсија и хистопатолошка анализа узорка.

Ексцизиона (комплетна) биопсија (енгл. excisional biopsy). Ексцизиона биопсија подразумева комплетно исецање промене елиптичним резом којим се захватају сви слојеви коже и део поткожног масног ткива. Маргине ексцизионе биопсије морају бити 1-3 мм од ивице промене, а пратећи линије минималне тензије на кожи, као и правац лимфне дренаже [34, 35, 36]. Најадекватнија хируршка техника за реконструкцију примарног дефекта је директна сатура. Уколико се ивице дефекта не могу ушити директно индикована је трансплантација коже са удаљеног дела тела (супротни екстремитет). Клиничка величина примарног меланома одређује и тип анестезије. Ексцизиона биопсија се у навећем броју случајева изводи у условима локалне инфилтрационе анестезије (ромб анестезије). Локални анестетик се инфилтрише по ободу промене, а према претходно испланираном елипсастом цртежу, субкутано или интрадермално. Чунаст исечак коже

са суспектном променом на средини, обележи се концем на једном крају, конзервира у течном формалину и пошаље на хистопатолошки преглед. Уколико је промена већих димензија и неопходна је трансплантација коже, интервенцију је могуће урадити у условима опште анестезије. У оваквим случајевима промена се ексцидира кружним резом, са истим маргинама по ширини и дубини. У зависности од локације и величине примарног дефекта планира се адекватна дебљина кожног трансплантата (парцијална или пуна дебљина коже). Секундарни дефект након узимања трансплантата пуне дебљине коже (енгл. *Wolfe*) директно се ушије. Давајућа регија кожног трансплантата перцијалне дебљине (енгл. *Thiersch*) се превије вазелинском газом, сувом газом, слојем вате и завојем. Адекватним сукцесивним смањивањем завоја, давајућа регија спонтано епителизира у року од 7-10 дана.

Инцизиона (парцијална) биопсија (енгл. *incisional biopsy*). Оваква биопсија је индикована код промена код којих ексизиона биопсија из одређених разлога није изводљива. Индикација за ову биопсију је клинички и дермоскопски низак степен сумње на меланом, а код пацијената са лошим општим стањем, код пацијената са лезијама великих дијаметара на лицу, табанима или длановима и код пацијената код којих је тумор локализован на функционално/ естетским регијама (капци, нос, усне). Техника ове биопсије се заснима на исечању најсумњивијег дела тумора, пуне дебљине коже и апсолутно је безбедна за пацијента. Примарни дефект се директно ушије.

Након пристизања дефинитивног хистопатолошког извештаја са свим детаљно описаним карактеристикама, неопходно је, у зависности од стадијума, урадити следеће дијагностичке процедуре, а ради одлуке о даљем лечењу. За меланом ниског ризика (*in situ* меланом pTis и меланом стадијума pT1a) нису индиковане специфичне дијагностичке процедуре већ само клинички и дермоскопски преглед целокупне коже. За меланоме средњег ризика, pT1b-pT4a, осим незаобилазног клиничког и дермоскопског прегледа целокупне коже, индиковано је одређивање концентрације туморских маркера на меланом у крви лактат-дехидрогеназе (LDH), протеина S-100 као и ултразвучни преглед свих регионалних лимфних басена (врат, пазуси, препоне), абдомена и мале карлице. За меланоме високог ризика (pT4b), због високог ризика од регионалних и/или удаљених метастаза, осим процедура које су индиковане за меланоме средњег ризика потребно је утврдити постојање удаљених метастаза најчешће применом мултидетекторске компјутеризоване томографије (MDCT) главе, грудног коша, абдомена и карлице или позитронском емисионом томографијом (PET) уз магнетну резонанцу (MP) главе.

1.5.2. Биопсија лимфног чвора стражара

Биопсија лимфног чвора стражара (енгл. *sentinel lymph node biopsy*, СЛНБ) је дијагностичко-прогностичка процедура и добро стандардизована метода којом се одређује стадијум болести. Ово је минимално инвазивна процедура и користи се да прецизира стање у лимфном басену у смислу постојања окултних метастаза (микрометастаза) код пацијената без клинички евидентног присуства болести [35, 36]. Доказано је да ова процедура значајно продужава период без болести (пролонгира ремисију болести), али не утиче на укупно преживљавање. У зависности од хистопатолошког налаза у лимфном чвору стражару, доноси се одлука се о даљем лечењу и праћењу пацијента. Апсолутно је индикована за меланоме средње дебљине по Бреслоу (1-4 мм), али је њена вредност значајна код меланоме тањих од 1 мм и дебелих, (дебљи од 4 мм,) иако су ови пацијенти већ у великом ризику од прогресије болести услед хематогене дисеминације болести. Ова процедура је установљена од стране др Donald-a Lee Morton-a, хирурга онколога и др Alistair-a J. Cochran-a, дерматопатолога. Др Morton је преминуо 2014. године, а до тада је био шеф програма за меланом у John Wayne Институту за рак у Санта Моници у Калифорнији. Др Cochran још увек ради у институту за патологију у Медицинском центру „Ronald Reagan“ Универзитета Калифорнија у Лос Анђелесу. Они су 1991. евалуирали процедуру обележавања лимфног чвора стражара и на тај начин значајно допринели раној дијагнози регионалних метастаза [32,38].

Сам назив „сентинел“ је француског порекла, а од XVI века користио се као термин за војника на стражи. [32]. Лимфни чвор стражар или сентинелни лимфни нодус (СЛН) је по дефиницији први чвор који се налази на путу директне лимфне дренаже од тумора ка регионалном лимфном басену (врат, пазуси, препоне), самим тим и место прве метастазе. Ово је иницијални чвор у који се дренирају ћелије примарног меланома. Сматра се да овај лимфни чвор одражава метастатски статус целог басена, те се његовом биопсијом дефинитивно одређује стадијум болести.

1.5.2.1. Извођење процедуре биопсије лимфног чвора стражара

Биопсија лимфног чвора стражара се изводи у условима опште ендотрахеалне анестезије или, у изузетним случајевима, у условима локалне инфилтационе анестезије, а након сцинтиграфије лимфних чворова регионалних басена. У истом акту се учини и реексцизија сектора коже око постоперативног ожиљка након ексцизионе биопсије примарног меланома, а према препорученој ширини маргина. Након припреме оперативног поља и учињене реексцизије приступи се детекцији претходно на кожи, маркиране пројекције лимфног чвора стражара. Оштро тупом препарацијом се приступи површинској фасцији у нивоу поткожног масног ткива. Сцинтилационом сондом се детектује лимфни чвор стражар који одашиље највећи број импулса (тзв. „врућ чвор“, енгл. *hot*). Уколико се преоперативно користила витална плава метиленска боја, лимфни чвоје је пребојен. Након екстирпације лимфног нодуса, измерени број импулса се забележи на спроводници материјала, а ради упоређивања са осталим лимфним чворовима у истом басену. Уколико се констатује да постоји значајна активност у регији претходно екстирпираниог СЛН, учини се и екстирпација осталих чворова чији сигнали су минимум 10% од сигнала „врућег чвора“. И ови лимфни чворови се такође сматрају „сентинелским“. [39,40]. Чворови се одложе у посуду са формалином и спроведу служби патологије ради дефинитивне патохистолошке анализе. *Ex tempore* анализа лимфног чвора стражара је напуштена метода због немогућности прецизног одређивања оптерећења лимфног чвора тумором могућих лажно негативних налаза.

Индикације за биопсију лимфног чвора стражара према препорукама су:

1. Клинички и ултразвучно неизмењени лимфни чворови дренирајућих басена, без удаљених метастаза (N0, M0)
2. Стадијум pT1b и виши, према класификацији из 2017 године:
 - а. Дебљина тумора већа или једнака 0.8 мм, укључујући и пацијенте са микросателитозом у патохистолошком налазу примарног меланома,
 - б. Дебљина меланома по Бреслоу мања од 0.8 мм у случајевима постојања улцерације и других фактора ризика, уз мултидисциплинарну одлуку и информисање пацијента, јер је ризик од детекције микрометастаза у СЛН мањи од 5% [41]

Контраиндикације за биопсију лимфног чвора стражара су:

1. Клинички, ултразвучно или након пункционе биопсије фином иглом, доказано постојање метастаза у лимфним чворовима дренирајућег басена;
2. Иницијалним дијагностичким процедурама (MDKT, PET) потврђено присуство удаљених метастаза
3. Претходно учињена „широка“ ексцизиона биопсија са маргинама 2 цм и више, као и реконструкција локалним режњевима, због поремећене лимфне дренаже и велике вероватноће да ће метода бити мање специфична, те да постоји могућност обележавања лимфног чвора који није стражар.
4. Лоше опште стање пацијента

1.5.2.2. Дијагностички значај биопсије лимфног чвора стражара

Биопсија лимфног чвора стражара је стандардизована и објективна дијагностичко-прогностичка метода којом се одређује стадијум болести и поставља индикација за даље лечење. Овом процедуром могуће је дијагностиковати клинички неприметне метастазе (непалпабилне и ултразвучно недетектоване метастазе). Резултатима ове процедуре омогућава се пацијенту увид у дефинитиван стадијум болести и предлаже даљи ток лечења. Присуство метастаза у лимфном чвору стражару сврстава пацијента у стадијум III меланома. Патохистолошки параметри метастатски измењеног лимфног чвора стражара имају прогностички значај за појаву метастаза у осталим-несентинелским лимфним чворовима, те се на основу њих доноси одлука о даљемхируршкомлечењукојеподрозумевакомплетнуевакуацијулимфногбасена.ЗаIIIстадијумболести су предвиђене додатне дијагностичке процедуре, а због претпоставке да постоје и удаљене метастазе. Увођењем биопсије лимфног чвора стражара у рутинске дијагностичке процедуре омогућава се раније започињање терапијских процедура. За детекцију метастаза у лимфном чвору стражару, претходно обележеног радиофармаком, користи се и метода аспирационе пункције под контролом ултразвука. Уколико су цитолошким прегледом констатоване туморске ћелије индикована је дисекција лимфног басена, што у пракси скраћује време између две процедуре. [35,36]

1.5.2.3. Терапијски значај биопсије лимфног чвора стражара

Детекција метастаза у регионалним лимфним чворовима (N стадијум) је најважнији прогностички фактор у раним стадијумима меланома. У досадашњим студијама, метастазе су откривене код 20%-50% пацијената са меланомом средње дебљине инвазије (Бреслоу 1-4 мм). Детекција секундарних депозита у регионалним лимфним басенима је важна, јер су ови пацијенти кандидати за терапијску дисекцију лимфних басена и адјувантну терапију према најновијим смерницама. [42]. Процедура биопсије СЛН статистички значајно продужава преживљавање/период без болести (енгл. *disease-free survival*, DFS), али не утиче на укупно преживљавање (енгл. *overall survival*, OS). Коначни резултати студије MSLT-2 (енгл. *Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial*, MSLT) у којој су пацијенти после биопсије лимфног чвора стражара и налаза микрометастаза рандомизовани у две групе (прву, у којој је свим пацијентима учињена евакуација несентинелских лимфних чворова и другу, у којој су саветоване редовне ултразвучне контроле и евакуација после евентуалног локалног рецидива болести), променили су ставове у најновијим водичима за лечење меланома. [41]. Није утврђено да евакуација лимфног басена непосредно после патохистолошке потврде метастазе у лимфном чвору стражару, продужава укупно преживљавање пацијената [41]. Процедура биопсије лимфног чвора стражара остаје стандард за одређивање стадијума болести и селекцију пацијената за адјувантну имунотерапију или таргет терапију [43].

1.5.2.4. Фактори ризика за присуство метастаза у лимфном чвору стражару

У претходним студијама испитивана је корелација између клиничкопатолошких карактеристика примарног меланома и налаза микрометастаза у лимфном чвору стражару и утврђено је да је најважнији предиктивни фактор дебљина тумора по Бреслоу, присуство улцерације, а у неким истраживањима и број митоза, лимфоваскуларна инвазија, регресија и локализација примарног меланома, али су резултати различити у различитим студијама и популацијама пацијената [39,40]. У факторе ризика се убрајају и мушки пол као и број екстирпираних лимфних чворова стражара.

1.5.2.5. Фактори ризика за појаву метастаза у несентинелским лимфним нодусима

У MSLT II студији метастазе у не-сентинелским ЛН су биле заступљене у 11,5% код групе пацијената код којих је урађена комплетна дисекција лимфног бадсена (енгл. Complete lymph node dissection, CLND), а присуство метастаза у несентинелским лимфним нодусима (НСЛН) окарактерисано као јак независни прогностички фактор за прогресију болести.

Фактори ризика за појаву метастаза у НСЛН обухватају клиничке и патохистолошке параметре. Тако је група за меланом Европске организације за истраживање и лечење канцера (енгл. *European Organisation for research and treatment of cancer* –EORTC) показала да пацијенти са субмикрометастазом (≤ 1 мм) у субкапсуларној регији имају степен позитивности не-сентинелских чворова од само 2% [42]. У другим студијама развијани су различити класификациони системи којима се анализирају морфолошки критеријуми у метастатском СЛН:

1. Девар (енгл. *Dewar*) критеријум скала којом се дефинише микроанатомска локализација метастазе (субкапсуларна, паренхимална или комбинована) [42]
2. Ротердам (енгл. *Rotterdam*) критеријум, према максималном дијаметру највећег метастатског фокуса [42, 44]
3. Класификација по Старцу (енгл. *Startz*) према дубини инвазије од унутрашње маргине капсуле СЛН [45, 46]

Најваљиднији и највише прихваћен прогностички фактор је дијаметар нодалне метастазе Ротердам критеријум [42, 47]. Овај параметар био је коришћен за процену ризика и одабир пацијената у клиничким студијама примене адјувантне терапије (дијаметар већи од 1 мм) [48, 49, 50]

У спроведеној метаанализи 54 публиковане студије о учесталости и факторима ризика за појаву метастаза код НСЛН у дисекату, утврђено је да хистопатолошке карактеристике примарног меланома (улцерација, сателитоза и неуротропизам) и оптерећење тумором лимфног чвора стражара, утичу на појаву метастаза у НСЛН. Издвојена су три параметра чије је присуство повезано са одсуством метастаза у несентинелским лимфним чворовима: субкапсуларна локализација метастатског фокуса, дијаметар фокуса мањи од 1 мм и дубина инвазије мања од 0.3 мм. Ова метаанализа недвосмислено указује да пацијенти са ниским оптерећењем тумором у СЛН можда могу избећи CLND [33].

Недавно су Мурали (Murali) и сарадници предложили нови скоринг систем за предвиђање ризика од појаве метастаза у НСЛН. (енгл. *non-sentinel node risk score*, N-SNORE) [48]. Дефинисане параметре за N-SNORE су сачињавали: пол (женски 0, мушки 1), регресија у примарном меланому (одсутна 0, присутна 1), број захваћених лимфних чворова стражара ($<50\%$: 0, $>50\%$: 1), перинодална инвазија (одсутна 0, присутна 1), као и оптерећење тумором СЛН (максимални дијаметар највећег депозита, >0.50 мм: 0; 0.51–2.0 мм: 1; 2.01–10 мм: 2; >10 мм: 3). Користећи клиничке и патолошке параметре N-SNORE је био израчунаван за сваког пацијента и максималан скор је био 11 [49, 50].

1.6. Имушки одговор у лимфном чвору стражару

1.6.1. Имушки одговор на меланом

Ћелије меланома имају посебан имуногени профил и пружају одговарајући модел за истраживање антитуморског одговора, а напредак у овим истраживањима довео је до открића нових циљних молекула за развојефикасних терапеутских стратегија у лечењу канцера. Имуногеност тумора означава способност тумора да изазове адаптивне имунолошке одговоре који могу спречити његов раст, а ћелије меланома се сматрају високо

имуногенима. Неколико клиничких аспеката подржава ову теорију: делимична или потпуна регресија примарних меланома, депигментациона подручја унутар тумора или понекад депигментациони прстен ('хало') око примарних меланома или кожных метастаза као и развој витилига попут депигментације код пацијената са меланомом, који је у корелацији са добром прогнозом болести [51, 52]. Такође хистопатолошки параметри говоре у прилог доказа имуногености примарног меланома који често садржи велику количину имунолошких ћелија (различите подгрупе Т ћелија, дендритичке ћелије, макрофаге, неутрофиле, мастоците, Б лимфоците), што може одражавати континуирану међусобну комуникацију између домаћина и тумора. [53].

Међусобни односи ћелија меланома са другим ћелијама туморског микроокружења значајно утичу на биологију тумора и његову пролиферацију, диференцијацију и прогресију [14,51]. Присуство густих лимфоцита који инфилтрирају тумор (ТИЛ) повезано је са добром прогнозом [54]. Анализа популација и подскупина имунолошких ћелија које формирају ТИЛ и њихова интеракција са туморским ћелијама довела је до развоја антитела против инхибитора имунолошких контролних тачака, са изузетним клиничким резултатима/исходом. Бројна истраживања доказала су везу између смањене активности имунског система и пролиферације ћелија меланома, док су друга показала да је варијабилност антигена значајан фактор за имунолошки надзор и прогресију меланома [55].

Досадашња истраживања су показала да имуногеност овог тумора, потиче од великог броја мутација у тумору. Ћелије меланома могу створити до више од сто мутација по мегабази, па носе велико мутационо оптерећење у односу на друге малигне популације, а те мутације доприносе стварању нових епитопа [56] важних за започињање и одржавање имунског одговора. Многе од ових мутација изазване су ултравиолетни зрачењем.

Ефикасан имунолошки одговор против меланома захтева брзу и неспецифичну фазу која активира урођени имунски одговор пре специфичне адаптивне стимулације имунолошког система. Обе фазе изазивају апоптозу ћелија меланома путем цитотоксичности посредоване Т-ћелијама, па је ефикасност и Т-ћелија и сигнала покренутих Т-ћелијским рецептором (енгл. *T-cell receptor*, TCR) кључна за контролу раста ћелија меланома. Ово је доказано или на моделима меланома миша који су подвргнути наглom повећању туморског оптерећења након што су исцрпљене CD8⁺ ћелије, или код пацијената чији је одговор на лечење директно повезан са густином ТИЛ-а у близини туморских ћелија [57, 58].

Имунски одговор на меланом је процес заснован на:

- а) неспецифичној раној фази која покреће урођени имунски одговор посредован макрофагима, гранулоцитима, дендритичним ћелијама (енгл. *dendritic cells*, DC) и ћелијама убицама (енгл. *natural killer cells*, NK). NK ћелије препознају и нападају ћелије меланома које смањено експримирају молекуле класе I комплекса главне хистокомпатибилности (енгл. *major histocompatibility complex*, МНС) са већом ефикасношћу од Т-ћелија. Штавише, NK ћелије могу индиректно допринети имунолошком надзору појачавањем секреције цитокина унутар туморске средине или индуковањем сазревања дендритичних ћелија са последичним адаптивним имунским одговором. Зреле дендритичне ћелије уравнотежују ефикасност имунолошког одговора и способност Т-ћелија да спроведу цитотоксични ефекат. Они физиолошки циркулишу у периферној крви и мигрирају у лимфне чворове где наилазе на наивне или меморијске Т ћелије. Зреле дендритичне ћелије индукују ко-стимулацију путем CD40, CD80, CD86 и OXS40L док циркулишу по периферији регулишући урођени и адаптивни анти-меланомски имунски одговор [59].
- б) касној функционалној фази адаптивног имунског одговора са диференцијацијом ефекторских CD4⁺ и CD8⁺ Т-ћелија (Teff ендегеном производњом интерферона- γ (IFN- γ) и развојем директне цитотоксичности на тумор. Ефикасност и CD4⁺ и CD8⁺ ћелија за модулацију адаптивног имунолошког одговора углавном зависи од специфичности TCR сигнализације. Ефекторске Т ћелије играју кључну улогу током ћелијски посредованог имунитета путем TCR-МНС интеракција које покрећу секрецију

IFN- γ и фактор некрозе тумора- α (енгл. *Tumor necrosis factor*, TNF- α). Индукција адаптивног имунског одговора у меланому резултује брзом инфилтрацијом Т-ћелија, чија активација доводи до апоптозе ћелија меланом путем директне цитотоксичности ослобађањем перфорина и гранзима праћених новом дифузијом антигена унутар туморског слоја. Ови узастопни догађаји омогућавају развој више циклуса имунског одговора у тумору који изнова започиње и одржава се [60].

Током канцерогенезе меланома (меланомогенеза) и пролиферација ћелија и апоптоза су повезане са имунолошким уређивањем (енгл. *immune editing*). Имунолошко уређивање (енгл. *immune editing*) је динамичан процес који је укључен у колонизацију удаљених ткива ћелијама меланома. Покреће га хронична стимулација имунолошког система и развој стратегија малигних ћелија за сузбијање имунолошки посредованог антигенског препознавања. Овај процес укључује следеће фазе:

- а) *Елиминацију ћелија меланома* засновану на цитотоксичном одговору од стране NK и DC, Т-ћелија, као и Б-ћелија било у туморском микроокружењу или у периферним ткивима.
- б) *Стање равнотеже* која је продужена фазу током које је пролиферација и метастазирање туморских ћелија под контролом. Равнотежну фазу, стога, углавном карактерише „мировање“ током којег се или пролиферација или експанзија ћелија меланома у равнотежује адаптивним имунолошким одговором. У том контексту, Т-ћелије су главни играчи укључени у активирање равнотежне фазе, иако варијанте туморских ћелија прогресивно губе велике молекуле класе I и II MHC, чиме се ослобађају релевантне количине антигена. У овом процесу Т-ћелије имају главну улогу, а механизми исцрпљивања Т-ћелијског имунског одговора доводе до губитка имунског надзора, диференцијације ћелија меланома које избегавају имунски одговор и тиме до преласка у следећу фазу, одговорну за прогресију болести.
- ц) *Избегавање имунолошког надзора и функционално исцрпљивање имунолошког система* јесу резултат хроничног излагања антигенима ћелија меланома, због чега долази до повећане експресије инхибиторних рецептора на ћелијама имунског система као резултат негативне повратне спрете. Туморско микроокружење меланома је богато макрофагима везаним за тумор (TAMs), регулаторним Т ћелијама (Treg) и супресорским ћелијама порекла мијелоидне лозе (MDSC) који заправо супримирају функцију цитотоксичних Т-ћелија. Ћелије меланома такође избегавају имунолошки одговор прекомерном производњом негативних модулатора имунолошких ћелија, као што су аденозин, фактор некрозе тумора- β (TNF- β), васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) и индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO) [61, 62, 63]

Меланом успева да избегава имунски одговор домаћина, јер су туморски антигени најчешће слаби имуногени (хемијски се мало разликују од нормалних сопствених антигена). Неефикасно препознавање антигена је први догађај који је користан ћелијама меланома за избегавање имунског одговора и настаје због неефикасних механизма за обраду антигена које прогресивно инхибирају способност CD8⁺ Т-ћелија да препознају обрађене циљне антигене туморских ћелија. Штавише, ефикасност цитотоксичности Т-ћелија захтева одговарајућу презентацију антигена од зрелих DC чија активност, ко-стимулација и презентација антигена, критично индукују функционални имунитет.

Такође, меланом развија механизме са циљем да избегне имунски одговор: престаје да испољава туморске антигене, престаје да експримира MHC I молекуле и има способност продукције супресорских молекула (на пр. TGF- β , IDO). Друге популације, укључујући MDSC и Т регулаторне ћелије (Treg), такође учествују у неравнотежи између имунолошке активације, супресије и толеранције. Регрутовање и стимулација MDSC се јавља због повећане биорасположивости растворљивих фактора као што су азотни оксид (NO), реактивне врсте кисеоника (ROS), TGF- β и аргиназа (ARG)-1 које ослобађају ове ћелије и промовишу инхибицију анти-туморске активности Т-ћелија и NK ћелија. Осим тога, Treg инхибирају имунолошки систем прекомерном производњом TGF- β , IL-10 и IDO која умањује активност CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита

и NK ћелија. Међу овим цитокинима, IDO индукује катаболизам триптофана и производњу кинуренина, чиме промовише диференцијацију и активацију Foxp3 гена Treg и инхибира активност ефекторских Т ћелија [61, 64].

Други функционални механизам који потенцијално утиче на активност Т-ћелија против меланома укључују дефектну експресију инхибитора имунских контролних тачака, као и њихову способност унутрашњег везивања за лиганде. Исцрпљене Т-ћелије експримирају инхибиторне површинске рецепторе као што су CTLA-4, PD-1, BTLA4, CD160, LAG-3, TIM-3 и VISTA. CTLA-4 и PD-1 инхибирају имунски одговор. Даља инхибиторна улога ових рецептора укључује смањење производње IL-2, IFN-g и TNF-a, као и транскрипцију унутарћелијских сигнала који доводе до абнормалне активности цикллина, након чега следи прекид ћелијског циклуса. [58].

1.6.2. Хистопатолошки параметри имунског одговора у лимфном чвору

1.6.2.1. Грађа лимфног чвора

Лимфни чвор је мали нодуларни агрегат састављен од бројних лимфоцита, који има и доводне и одводне лимфне судове. Он представља филтер за целокупну телесну лимфу. Осим филтрирања лимфе овде се врши функција уклањања ткивно насталих антигена, пролиферација лимфоцита и плазмоцита и стварање имуноглубулина. У њему започиње специфични имунски одговор. На пресеку лимфног чвора разликују се две основне зоне: кортекс, и медула. *Кортекс*, у периферном делу састоји се од густог лимфатичног ткива. Површни део кортекса садржи лимфне фоликуле различитог дијаметра и варијабилног састава, зависно од одбрамбене функције ткива, старости јединке и разних функционалних стања. Паракортекс (дубоки део кортекса) представља прелазну зону између површинског фоликуларног дела кортекса и медуле. У присуству антигена паракортекс се знатно прошири у правцу медуле услед хиперплазије Т лимфоцита. Захваљујући богатој снабдевености посткапиларних венула, ово је место уласка свих лимфоцита (Т и Б) из крви у лимфни чвор. После интеракције са антигеном, Т лимфоцити остају у паракортексу, са даљим развојем у активирани Т лимфоците, док Б лимфоцити мигрирају из паракортекса у површни слој кортекса, формирајући тамо лимфне чвориће у којима се у активној фази имунског одговора развијају герминативна стедишта. Према томе, субкапсуларни фоликуларни део кортекса је зона састављена од Б лимфоцита. Збијени слој зрелих Б лимфоцита у виду капе оријентисан је према маргиналном синусу тј. улазној лимфи. На тај начин паракортекс је област непрекидне активности ћелија: уласка, изласка, интеракције са антигеном, целуларне интеракције Т и Б лимфоцита и макрофага. Појава крупних ћелија у овој зони настаје у фази бластне трансформације Т лимфоцита тј. целуларног имунског одговора. *Медула* (паренхимски, средишњи део лимфног чвора), састављена од медуларних гредица (целуларних путања), богате су малим лимфоцитима, а има и слободних макрофага, плазмоцита, мастоцита, а понекад и гранулоцита и од медуларних синуса, неправилних вијугавих простора ограничених капсулом и везивно-преградним системима са једне стране и фоликулима и медуларним гредицама са друге стране. Из кортекса лимфоцити мигрирају у медулу, а из медуле преко еферентних лимфних судова напуштају лимфни чвор и улазе преко система великих лимфних судова у крвоток. Из крви поново улазе у састав лимфног чвора и рециркулација се понавља. Захваљујући присуству независних развојних зона Т и Б лимфоцита лимфни чвор је одговоран како за целуларни тако и за хуморални имуни одговор. У целуларном имунском одговору, у лимфном чвору настаје у току прве недеље убрзана миграција Т лимфоцита преко посткапиларних венула у паракотрекс, где долази у контакт са антигеном до индуције бластне трансформације, са нагомилавањем Т лимфоцита разних фаза зрелости и ширења ове зоне. Један део ових ћелија мигрира даље у синусе медуле одакле преко еферентних лимфних судова улазе у састав крви као Т меморијске ћелије.

1.6.2.2. Иmunски одговор у лимфном чвору стражару

Иmunски одговор започиње интеракцијом контролних тачака имунолошког система антиген презентујућих ћелија (АРС) и Т лимфоцита. У идеалној ситуацији, ћелије које представљају антиген доводе до активације ефекторских меморијских Т-ћелија у лимфним чворовима које посредују у антитуморским ефектима на месту тумора, производећи нове антигене из уништених туморских ћелија и стварајући циклус имуности на тумор. Након препознавања антигена који представља антиген презентујуће ћелија (АРС), Т-ћелијама је потребно неколико сигнала за потпуну активацију. Први сигнал зависи од антигена и представљен је МНС I или МНС II у комплексу са представљеним пептидом, везујући се за рецептор Т-ћелија (TCR). Недовољно представљен антиген на АРС не може активирати Т-ћелије и изазвати имунолошко непознавање.

Молекули ћелијске адхезије одговорни су за одржавање везе између две ћелије и омогућавају активирање што већег броја TCR-а на Т-ћелији. Код метастатске болести примећена је разноликост TCR-а између различитих места која могу имати различиту клиничку еволуцију, објашњена избором Т-ћелија усмерених против различитих туморских антигена или против различитих епитопа из истог антигена.

Други сигнал активације захтева специфичну интеракцију између рецептора Т-ћелија из њихових лиганда и АРС-а (из породице CD28/B7), и независан је од антигена. Постоје два типа ових рецептора: костимулатори или коинхибитори. Многи лиганди се могу везати за више рецептора, сваког типа. Међусобна интеракција између костимулаторних рецептора и њиховог лиганда у потпуности активира Т-ћелије и индукује производњу Т-ћелија специфичних за тумор.

У нормалним условима, рецептори ко-инхибитора програмиране ћелијске смрти-1 (PD-1), цитотоксични антиген Т лимфоцита-4 (CTLA-4), атенуатор Би Т лимфоцита (BTLA) и имуноглобулин Т-ћелија и домен муцина-3 (TIM-3), познати као „молекули имунолошке контролне тачке“, и њихови лиганди -односно програмирани лиганд смрти 1 (PD-L1) или PD-L2, CD80 или CD86, посредник уласка херпесвируса (HVEM) и галектин 9, инхибирају Т ћелијске активности и укључени су у одржавање самотолеранције и модулирање интензитета и трајања имунолошког одговора. Активирање инхибиторних контролних тачака имунолошког система ћелијама рака штити их од имунолошког напада и омогућава им даљу пролиферацију.

Интеракција АРС Т ћелија може бити посредована и члановима породице фактора туморске некрозе (TNF) и њиховим рецепторима, растворљивим цитокинима из микро окружења (TGF- β , IL-1, IL-10, IL-12, IL-18) и имуно инхибиторним молекулама, метаболичким ензимима који лишавају лимфоците неопходних аминокиселина као што је индолеамин 2,3 диоксигеназа (IDO) [62]. Кроз међусобне интеракције имунских ћелија преко костимулаторних и коинхибиторних сигнала имунски систем може контролисати пролиферацију малигних ћелија, али с друге стране, може ити одговоран за прогресију тумора.

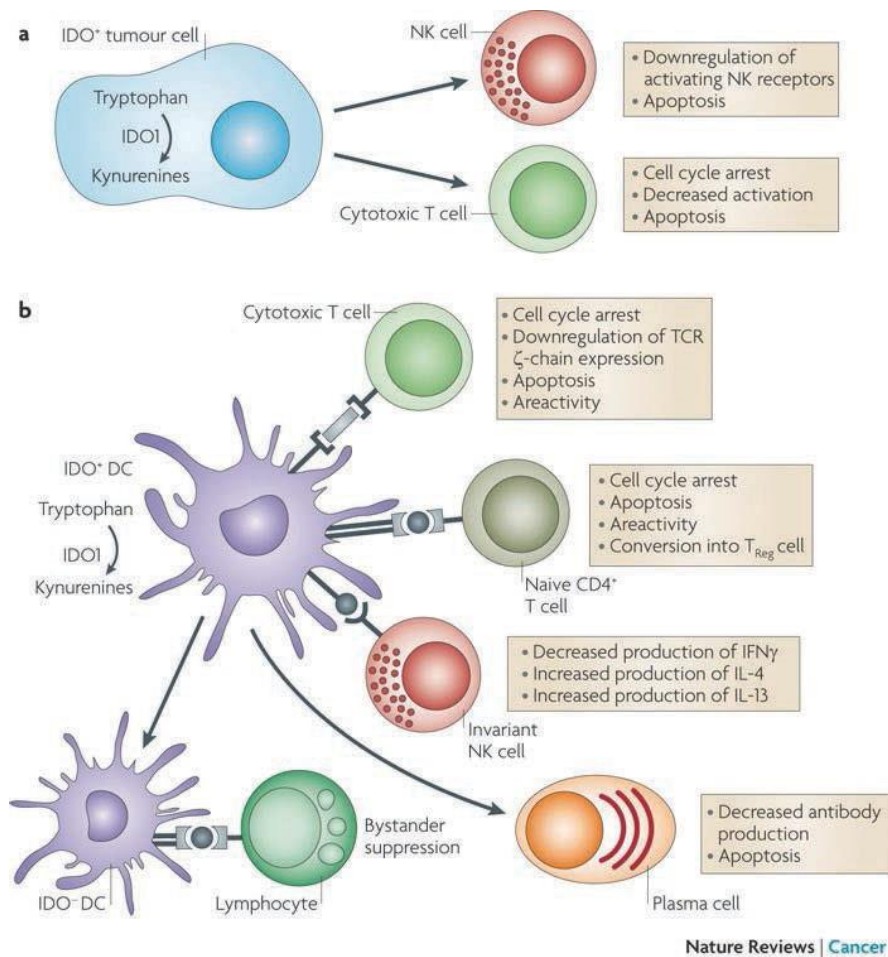
На основу описане имунске реакције на тумор која се одвија у лимфном чвору стражару истраживани су конкретни фактори имунске средине који могу бити значајни за прогресију болести. У мало-бројним досадашњим студијама показано је да микросредина у лимфном чвору стражару показује присуство супресорских Т ћелија и толерогених дендритичних ћелија, а њихов број и концентрација се повећава према стадијуму болести. Експресија FOXP3+ (forkhead box P3) ћелија (Т регулаторних ћелија) и имуно-супресивног ензима IDO (индолеамин 2,3 деоксигеназе), кога продукују ћелије меланома, одговорна је за усмеравање Т ћелијског имуног одговора ка толеранцији, а не имунском одговору на тумор, чиме доприноси прогресији болести.

1.6.2.3. Однос експресије CD4 и CD8, PD-L1, FOXP3 и IDO у популацији лимфоцита лимфног чвора стражара и корелација са статусом не-сентинелских лимфних чворова и током болести

У неколико претходно наведених студија параметри имунолошког одговора у лимфном чвору стражару идентификовани су као прогностички за токи исход болести [62].

Степен инфлукса CD4+ и CD8+ Т лимфоцита у лимфни чвор стражар и њихов однос, повезан је у претходним студијама са током и исходом болести код пацијената са меланомом. У студији Какаванда и сар. која је обухватила 60 узорака анализирана је експресија CD3, CD4, CD8, FOXP3, PD-1 и PD-L1 коришћењем имунохистохемијских бојења у серијским пресецима. Резултати су упоређивани са клиничко-патолошким карактеристикама и исходом болести. Позитивна корелација између периода без прогресије и укупног преживљавања је имала статистичку значајност у смислу броја CD4+ тумор инфилтришућих лимфоцита ($p < 0,01$) као и броја CD8+ тумор инфилтришућих лимфоцита ($p < 0,01$). Такође је постојала корелација између количине FOXP3 у метастатском СЛН која је била повезана са краћим преживљавањем без прогресије ($p < 0,0011$) и краћим укупним преживљавањем ($p < 0,0014$) [65]. Такође је уочена негативна корелација између броја перитуморских PD-L1+ лимфоцита и тока болести. Туморска PD-L1 експресија је била присутна код 43% испитаника, али није имала корелацију са исходом. Ова студија указује да подтипови Т ћелија у метастатском лимфном чвору стражару могу представљати прогностички фактор за токи исход болести. У једној студији из 2015. године показано је да пацијенти са метастазом меланома у лимфном чвору стражару који су подвргнути CLND имају стопу петогодишњег преживљавања од 39-70%, у зависности од броја захваћених лимфних нодуса, оптерећења тумором сентинелног лимфног нодуса, присуства или одсуства улцерације код примарног тумора и дебљине примарног тумора. Циљ студије је био да дефинише и окарактерише субпопулацију лимфоцита у СЛН која је удружена са метастатским ћелијама и анализира њихову везу са исходом болести и одреди PD-L1 експресију која би била основ за разматрање примене адјувантних anti-PD-1/PD-L1 инхибитора. Истраживање је показало да карактеризација Т ћелија у метастатском СЛН може предвидети исход болести [66].

У другим студијама експресија индолеамин 2,3 деоксигеназе (IDO) у лимфном чвору стражару показала се као независни фактор прогнозе. IDO је имуносупресивни интрацелуларни ензим чија је експресија физиолошка у ембрионалном стадијуму. Доказана је његова нормална експресија у ткивима: плаценте, плућа, женских полних органа и зрелим дендритичним ћелијама. Повишена експресија IDO-а је примећена у појединим патолошким стањима као што су вирусне инфекције и тумори. Продукција IDO-а од стране антиген-презентујућих ћелија и тумора један је од главних механизма избегавања имуноског одговора код меланома и његова је експресија независни прогностички фактор за одређивање ризика појаве метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима. Показан је значајан негативни ефекат IDO експресије у лимфном чвору стражару на период без болести ($p = 0,015$) и укупно преживљавање ($p = 0,010$). Висока IDO експресија била је повезана са значајном учесталашћу FOXP3+ ћелија код незахваћених LN ($p = 0,016$). Присуство IDO експресије у СЛН није било повезано са повећаном фреквенцијом циркулаторних Т ћелија (Tregs), али је било значајно повезано са експресијом CTLA-4 имунохибиторног молекула на регулаторним Т ћелијама ($p = 0,019$). После CD3:CD28 стимулације, мононуклеарне ћелије из периферне крви пацијената са високом IDO експресијом, показале су смањену продукцију интерферона- γ (IFN- γ) ($p = 0,025$). Аутори су указали на то да испитивање IDO експресије у СЛН чворовима код пацијената са меланомом може бити веома користан маркер да би се унапред идентификовали пацијенти са мање повољном прогнозом у I и II стадијуму болести [65].



Слика 4. Улога индолеамин деоксигеназе у супресији имунског одговора на меланом

Осим експресије IDO, повећана експресија FOXP3⁺ на ћелијама лимфног чвора стражара и однос CD4 и CD8 лимфоцита били су у позитивној корелацији са током болести у смислу дужег периода без болести и укупног преживљавања. У ретроспективној студији код 100 узорак лимфних чворова стражара узоркованих од 60 пацијената са меланомом, анализирана је експресија OX40⁺ активираних Т-лимфоцита, FOXP3⁺ регулаторних Т ћелија, DC-LAMP⁺ (дендритичне ћелије - лизозомални мембрански рецептор), зреле дендритске ћелије (DCs) и CD123⁺ плазмацитоидне DCs. Вредности свих ћелијских типова у СЛН су упоређивани са онима из комплетног дисеката (не-сентинелски LN) (n=37), анализирани и упоређивани у односу на клиничкопатолошке параметре и исход болести. У СЛН чворовима је доказана повећана активност свих наведених типова ћелија у поређењу са не-сентинелским LN. У метастатски измењеним лимфним чворовима стражарима показан је виши ниво експресије OX40⁺ у поређењу са метастатски неизмењеним чворовима. Такође, метастатски измењени лимфни чворови стражари имали су високу експресију FOXP3⁺ ћелија што је повезано са скраћеним периодом без болести и укупним преживљавањем, док ниво експресије није био од значаја код пацијената са негативним СЛН. [63].

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу података изнетих у уводу постављене су следеће радне хипотезе:

1. Клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома коже, имунохистопатолошке карактеристике у метастатски измењеном лимфном чвору стражару и статус у осталим не-сентинелским лимфним чворовима у дренирајућем басену корелирају са током и исходом болести.
2. Одређене карактеристике примарног меланома и истраживани параметри метастатски измењеног лимфног чвора стражара су значајни прогностички фактори за статус у не-сентинелским лимфним чворовима и на основу њих се може предвидети даљи ток болести и неопходност комплетне лимфно-дисекције дренажног басена, односно избегавање исте.

У сврху провере радне хипотезе постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Утврдити степен детекције, сензитивност, специфичност и тачност методе обележавања лимфног чвора стражара ⁹⁹m технецијум-наноколоидом у откривању присуства микрометастаза у нашој популацији и присуства микрометастаза на основу укупног броја процедура и добијених позитивних, тачно и лажно негативних налаза.
2. Испитати корелацију клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома у односу на присуство микрометастаза у лимфном чвору стражару.
3. Испитати клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома, морфолошке карактеристике и локалну експресију FOXP3, IDO, CD4 и CD8 рецептора метастатски измењеног стражарског лимфног чвора као предикторе постојања метастаза у осталим лимфним чворовима дренирајућег басена.
4. Испитати корелацију клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома и имунохистопатолошких карактеристика метастатског лимфног чвора стражара у односу на присуство метастаза у осталим лимфним чворовима дренирајућег басена после комплетне дисекције
5. Дефинисати класификациону схему која би могла да укаже на постојање метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима на основу клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома и имунохистопатолошких карактеристика метастатског лимфног чвора стражара
6. Испитати корелацију између клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома и имунохистопатолошких карактеристика метастатског лимфног чвора стражара са током болести, дефинисаном стопом релапса болести, стопом прогресије, периодом без релапса болести, као и стопама трогодишњег и укупног преживљавања.

3. МАТЕРИЈАЛИМЕТОДЕ

3.1. Испитаници

У истраживање је било укључено 410 пацијената лечених у Клиници за пластичну хирургију и опекотине Војномедицинске академије у периоду од 2011. до 2017 године, којима је учињена биопсија лимфног чвора стражара. Индикације за биопсију лимфног чвора стражара су биле: клинички и ултразвучно неизмењени лимфни чворови регионалних басена (N0, M0), као и стадијум pT1b и виши, према класификацији из 2017 године (дебљина тумора $\geq 0,8$ мм, укључујући и пацијенте са микросателитозом у патохистолошком налазу примарног меланома и дебљина меланома по Бреслову $< 0,8$ мм у случају постојања улцерације и/или митоза. Ток болести и преживљавање праћени су до априла 2021. године (1-117 месеци, медијана 33 месеца). Код свих пацијената скинтиграфија лимфних чворова је учињена у Институту за нуклеарну медицину ВМА, а сви лимфни чворови стражари су анализирани у Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије. Код 4 пацијента лимфни чвор стражар није интраоперативно детектован, тј. није екстирпирани и послат на патохистолошку анализу, тако да је коначан број који је ушао у статистичку обраду 406 пацијената, код којих је екстирпирано укупно 666 лимфних чворова стражара. После пристизања патохистолошког налаза метастатски измењеног лимфног чвора стражара, према смерницама за лечење меланома, индикована је комплетна дисекција лимфног басена која је учињена код 81 пацијента. Од укупног броја пацијената, 235 (53,7%) је било мушког пола, а 175 (42,7%) женског пола. Просечна старост испитаника је била 57 година (од 13 до 89 година старости).

Табела 1. Узрасти по испитаника

Пол	Број (%)
Мушки	235 (57.3%)
Женски	175 (42.7%)
Укупно	410
Узраст	
Средња вредност (\pm СД)	54 (± 15.7)
Медијана (мин-мах)	15 (13-89)

3.2. Клиничко-патохистолошке карактеристике примарног меланома

Клиничко-патохистолошке карактеристике примарног меланома приказане су у Табели 2. Најчешћа локализација примарног меланома била је на труп, код 172 (42%) пацијената. Најчешћи клиничко-патохистолошки тип меланома је суперфицијално ширећи меланом потврђен код 282 (68,8%) пацијента.

Табела 2. Клиничкопатохистолошке карактеристике примарног меланома

<i>Локализација примарног тумора</i>	
Глава и врат	67 (16,3%)
Горњи екстремитети	63 (15,4%)
Труп	172 (42%)
Доњи екстремитети	108 (26,3%)
Акрални	24 (5,9%)
Не-акрални	386 (94,1%)
Труп	172 (42%)
Не-труп	238 (58%)
Укупно	410 (100%)
<i>Клиничко-патохистолошки тип</i>	
Суперфицијално ширећи меланом	282 (68,8%)
Нодуларни меланом	104 (25,4%)
ЛМм	(1%)
АЛМ	11 (2,7%)
Остали	9 (2,2%)
Нодуларни	101 (24,6%)
Не-нодуларни	309 (75,4%)
Укупно	410 (100%)

Патохистолошки параметри примарног меланома обухватали су: мерење дебљине меланома по Бреслоу; туморски раст (хоризонтални или вертикални раст); морфологију туморских ћелија (вретенасте, епителоидне, невоидне, мешовите); меланински пигмент (присутан/одсутан); присуство улцерације (присутна/одсутна); митотску активност туморских ћелија (број митоза/мм²); тумор инфилтришући леукоцити (уочени/нису уочени, инфилтрат нон-бриск, фокално, дуж периферије тумора или унутар самог тумора или бриск, дифузно дуж периферије тумора или унутар самог тумора); регресија (уочена/није уочена); лимфоваскуларна инвазија (LVI) (уочена/није уочена); неуроваскуларна инвазија (уочена/није уочена); микросателитске метастазе (уочене/нису уочене); преегзистирајућа промена – невус (присутна/није присутна).

У Табели 3. наведене су хистопатолошке карактеристике примарног тумора. У зависности од дебљине тумора по Бреслоу, испитаници су подељени у три категорије. Најзаступљенија категорија је била дебљина меланома између 1 мм и 4 мм, у 193 (47,1%) случаја. Примарних меланома тањих од 0,8 мм, било је укупно 79 (19,3%).

Од осталих параметара издвајали су се: присуство улцерације (63,7%), вертикални раст туморских ћелија (78,9%), туморска грађа епителоидним ћелијама (53,0%), оскудан меланински пигмент (52,9%), митотска активност 1-5 митоза по мм квадратном (60,1%), нон-бриск тумор инфилтришући леукоцити (77,8%). Регресија промене није уочена код 83,9%, лимфоваскуларна инвазија није уочена код 91,7%, а перинеурална инвазија није уочена код 96,4%, микросателитоза није уочена код 98,3%, а невус као преегзистирајућа промена је верификована код само 7,6% испитаника.

Табела 3. Патохистолошки параметри примарног тумора

Бреслоу медијана	1,99 (0,07 до 25,00) мм
Бреслоу категорије	
< 1мм	102 (24,9%)
1-4мм	193 (47,1%)
>4мм	115 (28,0%)
Укупно	410
Туморски раст	
Хоризонтални, пацетоидни, лентигинозни	38 (21,1%)
Вертикални	142 (78,9%)
Укупно	180
Морфологија туморких ћелија	
Вретенасте	44 (19,1%)
Епителоидне	122 (53,0%)
невоидне	24 (10,4%)
мешовите	40 (17,4%)
укупно	230
Меланински пигмент	
Нема	5 (2,5%)
Оскудан	108 (52,9%)
Изражен	91 (44,6%)
Укупно	204
Улцерација	
Одсутна	149 (36,3%)
Присутна	261 (63,7%)
Укупно	410
Митотска активност	
0 митоза	72 (17,6%)
1 до 5	247 (60,1%)
6 и више	89 (21,8%)
Укупно	408
Инфламаторни инфилтрат (TIL)	
Нема	6 (2,8%)
<i>Non-brisk</i>	165 (77,8%)
<i>Brisk</i>	41 (19,3%)
Укупно	212
Регресија промене	
Није уочена	344 (83,9%)
Уочена	66 (16,1%)
Укупно	410
Лимфоваскуларна инвазија	
Није уочена	376 (91,7%)
Уочена	34 (8,3%)
Укупно	410
Перинеурална инвазија	
Није уочена	396 (96,6%)
Уочена	14 (3,4%)
Укупно	410
Микросателити	
Нису уочени	403 (98,3%)
Уочени	7 (1,7%)
Укупно	410
Преегзистирајућа промена – невус	
Нема	379 (92,4%)
Има	31 (7,6%)
Укупно	410

3.3. Биопсија лимфног чвора стражара и дренажни басени лимфног чвора стражара

Биопсија лимфног чвора стражара и реексцизија сектора коже око ожиљка у рађене су у једном акту а након ексцизионе биопсије примарног меланома. У табели 4. је приказано време (дани и недеље) од датума ексцизионе биопсије примарног меланома до датума када су учињени реексцизија сектора коже око ожиљка и биопсија лимфног чвора стражара у једном акту. У зависности од периода између две хируршке процедуре, пацијенти су подељени у три групе. У првој групи њих 167 (40,9%) су пацијенти код којих је биопсија лимфног чвора стражара учињена у периоду до 6 недеља, у другој групи 185 (45,4%) пацијената код којих је биопсија учињена у периоду од 6 до 12 недеља и у трећој групи 57 (13,9%) пацијената код којих је биопсија учињена 12 недеља након ексцизионе биопсије примарног меланома.

Табела 4. Параметри биопсије лимфног чвора стражара код испитаника

Време до СЛНБ (дани)	
Средња вредност (\pm СД)	55.03 (\pm 31.2)
Медијана (мин-мах)	48.0 (6-253)
Време до СЛНБ (недеље)	
< 6	167 (40.7%)
од 6 до 12	185 (45.4%)
>12	57 (13.9%)
Плава боја (укупно)	
Да	83 (20.2%)
Не	327 (79.8%)
Број СЛН басена	
1	340 (82,9%)
2 и више	70 (17,1%)
Локализација СЛН дренажних басена	
Врат	80 (19,5%)
Пазух	(50,0%)
Препона	125 (30,5%)
Број ексцизионих лимфних чворова стражара	
1	242 (59,0%)
>1	164 (40,0%)
укупно	406
Неуспешна интервенција	4 (1,0%)

Од укупног броја пацијената код њих 83 (20,2%) је истовремено са сцинтиграфијом лимфни чвор обележаван виталном плавом бојом. Од овог укупног броја, интраоперативно је констатован лимфни чвор стражар који је био плаво пребојен у 62 случаја, а код 21 пацијента се лимфни чвор стражар није пребојио плавом бојом. За 4 пацијента код којих лимфни чвор стражар није интраоперативно детектован нема података да ли се осим обележавања радиофармаком користила и витална плава боја. Ова 4 пацијента код два дренажни басен је био на врату, а код преостала 2 у аксилама. Ова 4 пацијента су проглашена као неуспешна интервенција биопсије лимфног чвора стражара и искључена су из даљег истраживања.

Лимфни чвор стражар је детектован у једном дренажном басену код 340 пацијената, а у два или више код 70 пацијената. Код пацијената са више дренажних басена, за истраживање смо узимали лимфни чвор из басена у коме се сцинтиграфски прво детектовао лимфни чвор стражар. Број и локализација дренажних басена приказани су у Табели 4. Код 70 (17,1%) пацијената је лимфоцинтиграфијом идентификовано два или више лимфних басена, док је најчешћи дренажни лимфни басен био аксиларни.

3.3.1. Биопсија лимфног чвора стражара: техника извођења

Код свих 410 испитаника учињена је сцинтиграфија лимфних чворова, а потом реекцизија сектора коже и екстирпација лимфног чвора стражара у једном акту према препорукама Европског удружења за нуклеарну медицину (EANM) и Европске организације за истраживање и третман канцера (EORTC) из 2009. године [67]. Преоперативна лимфосцинтиграфија извођена је коришћењем двоглаве гама камере Adac-Vertex, а након интрадермалне апликације радиофармака техницијумом 99m обележеног наноколоида (Nanocis®) активности 15 MBq и волумена 01 ml. Радиофармак је убризгаван танком иглом од 26G на три до четири места на 1 cm од ожиљка интрадермално у околну кожу, зависно од локализације постоперативног ожиљка након екцизије примарног меланома. Динамска студија учињена је прикупљањем 7-10 једноминутних кадрова главом камере постављеном изнад места апликације. Рани и одложени статички сцинтиграми рађени су прикупљањем петоминутних кадрова („фрејмова“) над регионалним басенима дренаже билатерално, све до визуелизације једног или више сентинелног лимфног чвора. Пројекција локације сентинелног лимфног чвора маркирана је скариффикатом на кожи, након провере из ортогоналних положаја. Интраоперативна детекција сентинелног лимфног чвора извођена је преносивом гама сондом марке *Europrobe* (Gammadata Instrument AB, Упсала, Шведска). Сцинтиграфија је извођена дан раније у односу на хируршку интервенцију биопсије лимфног чвора стражара. Сви пацијенти су подвргнути преоперативној припреми и прегледу анестезиолога, а хируршка интервенција се обављала у условима опште анестезије. Након припреме оперативног поља и приступања субкутаном ткиву лимфног басена идентификован је лимфни чвор изнад којег сонда региструје највећу брзину бројања импулса, а екстирпирани су и остали чворови над којима је детектовано више од 10% оствареног максималног броја импулса [68, 69]. На основу лимфосцинтиграфије процењивана је локализација и број дренирајућих басена (један, два или више), као и број сцинтиграфски приказаних СЛН који су уз време (у данима) протекло од иницијалне биопсије до реекцизије и детекције СЛН испитивани као параметри предикције постојања метастаза.

Код 164 (40,0%) испитаника екстирпирано је више од једног лимфног чвора стражара, а код свих 410 пацијената укупно је екстирпирано 666 лимфних чворова стражара, од којих су 84 пацијента имала позитиван један или више лимфни чвор стражар. У анализу резултата укључен је један метастатски лимфни чвор по пацијенту, а за репрезентативан лимфни чвор узиман је онај са највећим туморским оптерећењем.

3.3.2. Хистопатолошка обрада узорка лимфног чвора стражара

Сви екстирпирани лимфни чворови са припадајућим структурама масног ткива су спроведени на рутинску патохистолошку обраду, те постављани у парафинске калупе. На учињеним патохистолошким пресецима према препорукама EORTC/EANM учињено је стандардно бојење на хематоксилин/еозин, као и имунохистохемијска анализа НМВ45 и Melan-A [46,70].

Табела 5. Патохистолошка анализа лимфног чвора стражара

Лимфни чвор стражар	
Негативан	322 (78,5)
Позитиван	84 (20,5%)
Укупно	406

Патохистолошке карактеристике лимфног чвора стражара додатно су анализирани проценом морфолошких критеријума метастатског СЛН одређивањем: микроанатомске локализације метастазе, максималног дијаметра највећег метастатског фокуса, те максимална површина метастазе као и дубине инвазије метастазе тј. удаљености метастатског фокуса од капсуле лимфног чвора [71].

3.3.3. Скорови оптерећења тумором у лимфном чвору стражару

Микроанатомска локализација (Dewar критеријум/класификација)

Метастатски депозити у сваком СЛН нодусу класификовани су као субкапсуларни (ограничен на субкапсуларни синус), мешовити (субкапсуларна и паренхимска метастаза), паренхимални (у потпуности у паракортикалној регији или паренхиму), мултифокални (мултипли ситни депозити) као и субтотални (свака метастаза већа од 5 мм и сваки лимфни нодус са екстракапсуларним ширењем). Субтотални депозити су заправо екстензивни, тј. макрометастазе. Мерење микроанатомске локализације је учињено код 82 испитаника, из техничких разлога није учињено код свих 84. [44].

Табела 6. Dewar класификација/локализација

Локализација	Број (%)
Субкапсуларно	34 (41,5%)
Мешовито	18 (22,0%)
Паренхимално	2 (2,4%)
Мултифокално	13 (15,9%)
Субтотално	15 (18,3%)
Укупно	82
Субкапсуларно	34 (41,5%)
Мешовито + паренхимално	20 (24,4%)
Мултифокално + субтотално	28 (34,1%)
Субкапсуларно	34 (41,5)
Остало	48 (58,5%)

Највећи дијаметар највећег метастатског фокуса (Rotterdam класификација) је означен као апсолутни број у милиметрима, изводи се линеарним мерењем максималног дијаметра највећег метастатског фокуса, односно сабирањем свих максималних дијаметара свих депозита у једном чвору.

Табела 7. Rotterdam класификација/критеријум изражен у мм

Дијаметар метастатског депозита у СЛН	Број (%)
<0,1 мм	9 (11,7%)
0,2 - 1,0 мм	19 (24,7%)
=>1,0 мм	49 (63,6%)
Укупно	77
<1,0 мм	28 (36,3%)
>=1,0 мм	49 (63,7%)

Удаљеност метастатског депозита од капсуле (Starz класификација), користи се за одређивање дубине инвазије метастатског фокуса од унутрашње ивице нодалне капсуле. Категорише се као SI (<0,30мм), SII (0,31-1,0мм) или SIII (>1,0мм). [72]

Табела 8. Дубина инвазије метастатског фокуса у односу на капсулу (Starz класификација, С-класификација)

Дубина инвазије метастатског фокуса	Број (%)
<0,30 мм	25 (56,8%)
0,31-1,00 мм	10 (22,7%)
=>1 мм	9 (20,5%)
Укупно	44
<0,30 мм	25 (56,8%)
>0,31 мм	43,2%

3.3.4. Имунохистохемијско одређивање степена експресије CD4, CD8, FOXP3 и Индоламин-2,3-диоксигеназе

Ткивни узорци биопсије лимфних чворова меланома су фиксирани 5% пуферисаним неутралним формалином, дехидрирани, просветљени и прожети парафином у апарату за аутоматску фиксацију ткивних узорака АСП 300 Леица и укалупљени у парафин. Парафински калупи су исечени на аутоматском ротационом микротому Leica PM2135 на резове дебљине 4 μ . Резове су ухваћени на Суперфрост+ предметна стакла.

3.3.5. Имунохистохемијско одређивање експресије CD4 и CD8

Демаскирање епитопа је урађено у раствору за демаскирање епитопа pH 9.0 (Agilent DAKO кат. бр.К8004) у микроталасној пећници. За имунохистохемијску анализу је као примарно антители коришћено моноклонско, мишје, анти хумано анти CD4 антители (Agilent DAKO кат. Бр.ИР649, клон 4Б12 РТУ) а као систем за визуелизацију EnVision Flex+, Mouse, High pH (DAKO Autostainer/Autostainer Plus), HRP, Mouse (Agilent DAKO Бр.К8012). [73].

3.3.6. Имунохистохемијско одређивање експресије CD8

Демаскирање епитопа је урађено у раствору за демаскирање епитопа pH 9.0 (Agilent DAKO кат. бр.К8004) у микроталасној пећници. За имунохистохемијску анализу је као примарно антители коришћено моноклонско, мишје, анти хумано анти CD8 антители (Agilent DAKO кат. Бр.ИР623, клон С8/144В, RTU) а као систем за визуелизацију EnVision Flex+, HRP, Rb/Mo, High pH (DAKO Autostainer/Autostainer Plus) (Agilent DAKO Бр.К8010).

Позитивном реакцијом је сматрана мембранска реакција на лимфоцитима.

Скорирани су број перитуморских CD4 и CD8 позитивних Т лимфоцита у зони од 1 мм x 20 μ перитуморски на граници између тумора и паренхима лимфног чвора и интратуморски у зони од 1 мм x 20 μ интратуморски у оквиру метастатског депозита. [73].

У Табели 9. приказана је експресија CD4 и CD8 у биоптату лимфног чвора стражара.

Табела 9. Експресија CD4 и CD8

Експресија CD4 и CD8	Број (%)
Перитуморска експресија CD4	
0-10	7 (21,2%)
10-50	12 (36,4%)
>50	14 (42,4%)
Укупно	33
Перитуморска експресија CD4	
0-50	18 (54,5%)
>50	13 (39,4%)
2	2 (6,1%)
Интрагуморска експресија CD4	
0-10	12 (36,4%)
>10	21 (63,6%)
Перитуморска експресија CD8	
0-10	6 (18,2%)
>10	27 (81,8%)
Укупно	33
Интрагуморска експресија CD8	
0-10	12 (36,4%)
>10	21 (63,6%)

3.3.7. Имунохистохемијско одређивање експресије FOXP3

Демаскирање епитопа је урађено у раствору за демаскирање епитопа pH 9.0 (Agilent DAKO кат.бр.К8004) у микроталасној пећници. За имунохистохемијску анализу је као примарно антители коришћено моноклонско, мишје, анти-хумано анти-FOXP3 антители (Invitrogen кат. Бр. 700914 клон 5Х10/118 у разблажењу 1:20), а као систем за визуелизацију EnVision FLEX,HRP, Rb/Mo, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Agilent DAKO Br.К8010).

Позитивном имунохистохемијском реакцијом сматрана је нуклеарна реакција у Treg и цитоплазматска или нуклеарна у туморским ћелијама. Квантификација експресије је урађена према следећим параметрима:

- а. Према интензитету реакције резултати су скорирани семиквантитативно од 0-3+ на следећи начин: 0-негативна реакција, 1+ слаба реакција, 2+ умерена реакција и 3+ интензивна.
- б. Према проценту позитивних ћелија резултати су вредновани као: 0 (нема позитивних ћелија); 1 (1%–5% ћелија позитивних); 2 (6%–10% ћелија позитивних); 3 (11%–20% ћелија позитивних); 4 (21%–40% ћелија позитивних) [73].

У Табели 10. приказана је експресија FoxP3 у биоптату лимфног чвора стражара.

Табела 10. Експресија FoxP3

Експресија FoxP3	Број (%)
<i>FoxP3 интензитет реакције</i>	
Нема реакције	10 (30,3%)
Веома слаба реакција	9 (27,3%)
Умерена реакција	8 (24,2%)
Интензивна реакција	6 (18,2%)
Укупно	33
<i>FoxP3 интензитет реакције</i>	
Нема реакције	19 (57,6%)
Има реакције	14 (42,4%)
<i>FoxP3 удео позитивних ћелија</i>	
Нема позитивних ћелија	10(30,3%)
1-5%	8 (24,2%)
6-10%	8 (24,2%)
11-20%	58 (12,1%)
21-40%	3 (9,1%)
<i>FoxP3 удео позитивних ћелија</i>	
До5%	10 (30,3%)
>5%	23 (69,7%)
<i>FoxP3 присутност</i>	
Нема	11 (33,3%)
Перитуморски	5(12,1%)
Интратуморски	18 (54,5%)

3.3.8. Имунохистохемијско одређивање експресије IDO

Демаскирање епитопа је урађено у раствору за демаскирање епитопа пХ 6.1 (Agilent DAKO кат. бр.К8005) у микроталасној пећници. За имунохистохемијску анализу је као примарно антители коришћено моноклонско, мишје, анти хумано анти IDO антители (Invitrogen кат. Бр, 14-9750-82 клон V1NC3IDO у разблажењу 1:500) а као систем за визуелизацију EnVision FLEX,HRP, Rb/Mo, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus)(AgilentDAKOBр.К8010).

Позитивном имунохистохемијском реакцијом сматрана је цитоплазматска реакција. Квантификација експресије IDO и у антиген презентујућим и у туморским ћелијама је скорирана семиквантитативно од 0-3+ на следећи начин: 0-негативна реакција, 1+ слаба реакција, 2+ умерена реакција и 3+ интензивна. Према проценту позитивних ћелија резултати су вредновани као: 0 (нема позитивних ћелија); 1 (1%–50% ћелија позитивних); 2 (>50% позитивних ћелија).[65].

Табела 11.

Експресија IDO	Број (%)
<i>IDO интензитет реакције</i>	
Нема реакције	14 (42,4%)
Веома слаба реакција	14 (42,4%)
Умерена реакција	4 (12,1%)
Интензивна реакција	1 (3,0%)
Укупно	33 (100%)
<i>IDO интензитет реакције</i>	
нема реакције	14 (42,4%)
има реакције	19 (57,6%)
<i>IDO удео позитивних ћелија</i>	
Нема реакције	14 (42,4%)
Веома слаба реакција	14 (42,4%)
Умерена реакција	5 (15,2%)
<i>IDO удео позитивних ћелија</i>	
Нема реакције	14 (42,4%)
Има реакције	19 (57,6%)

3.3.9. Имунохистохемијско одређивање експресије PD-L1

Демаскирање епитопа је урађено у раствору за демаскирање епитопа pH 6.1 (Agilent DAKO кат. бр.К8005) у микроталасној пећници. За имунохистохемијску анализу је као примарно антители коришћено моноклонско, мишје, анти хумано анти PD-L1 антители (Agilent DAKO кат. Бр.М3653, klon 22С3 u razblaženju 1:50) а као систем за визуелизацију EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus), HRP, Mouse (Agilent DAKO Br.К8012) (65).

Позитивном имунохистохемијском реакцијом сматрана је делимична или комплетна обојеност цитоплазме и/или ћелијске мембране. Квантификација експресије PD-L1 је урађена према интензитету реакције резултати су скорирано семиквантитативно од 0-3+ на следећи начин: 0-негативна реакција, 1+ слаба реакција, 2+ умерена реакција и 3+ интензивна. Према проценту позитивних туморских ћелија резултати су вредновани као: 0 (нема позитивних ћелија); 1 (1%–50% ћелија позитивних); 2 (>50 % позитивних ћелија).

Табела 12.

Експресија PD-L1	Број (%)
<i>Реакција PD-L1</i>	
Негативна реакција	22 (66,7%)
Слаба реакција	7 (21,2%)
Умерена реакција	4 (12,1%)
Укупно	33
<i>Експресија PD-L1</i>	
Нема реакције	22 (66,7%)
Има реакције	11 (33,3%)
<i>Интензитет бојења</i>	
Нема позитивних ћелија	22 (66,7%)
1%-50% позитивних ћелија	8 (24,2%)
>50% позитивних ћелија	3 (9,1%)
<i>Интензитет бојења</i>	
Нема позитивних ћелија	22 (66,7%)
Има позитивних ћелија	11 (33,3%)

3.3.10. Техника извођења комплетне дисекције несентинелских лимфних чворова дренажућег лимфног басена

Комплетно уклањање несентинелских лимфних чворова је извођено у условима опште ендотрахеалне анестезије код 84 пацијената код којих је детектован метастатски измењен лимфни чвор стражар. Након припреме преоперативног поља учини се инцизија на кожи, а према претходном цртежу стерилним кожным перманентним маркером. У зависности од дренажућег басена, пацијент се позиционира на леђа или на бок. У пазушној јами дисекција је подразумевала евакуацију лимфних чворова сва три нивоа (спрата), доњег (I), средњег (II) и горњег (III). Дисекцијом пазушне јаме уклањано је најмање 6 лимфних чворова I и II, док су чворови III спрата уклањани уколико су клинички захваћени. Код наших испитаника немамо податке о броју пацијената којима су уклоњени лимфни чворови из III нивоа. Код дисекције несентинелских лимфних чворова препонске регије, уклањани су сви површни и дубоки лимфни чворови у границама феморалног троугла. Најмањи број евакуисаних лимфних чворова у препони је био 4. Дисекције лимфних чворова на врату подразумевале су тоталну паротидектомију, и функционалну радикалну дисекцију врата (од I до V нивоа, са минимумом 7 уклоњених чворова). Дисекције врата су извођене од стране максилофацијалних хирурга.

У свакодневној клиничкој пракси, сваки НСЛН се испитује једном хемотоксилин-еозин секцијом. Стога се претпоставља да недостатак опсежнијег имунохистохемијског бојења вишеструких секција за НСЛН резултира ниским приносом позитивних НСЛН (око 20%).

3.4. Статистичка анализа

У истраживању су коришћене методе дескриптивне статистике, t-тест и χ^2 -квадрат тест за поређење фреквенција, логистичка регресија за предикцију исхода, Kaplan-Meier-ова крива преживљавања и log-rank тест за поређење између испитиваних група. Униваријантна и мултиваријантна логистичка регресија су приказане на основу присуства метастаза (да/не), у СЛН и НСЛН као бинарног исхода са *odds ratio* који представља величину ефекта у интервалу поузданости од 95% у моделу коваријата. Ниво статистичке сигнификантности подразумевао је вредности $p < 0,05$. Број болесника са позитивним СЛН којима је урађена CLND премашио је очекивани (минимални) број довољан за величину узорка и број одређиваних предиктора на нивоу значајности од 0,05. Статистичка обрада података је рађена програмом SPSS (верзија 20.0).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Дистрибуција по полу

Од 410 пацијената 235 (57%) је мушког пола, а 175 (43%) женског пола. Примарни меланом је код пацијената мушког пола најзаступљенији на трупу (47,7%), а код женског пола на доњим екстремитетима (36%). Такође је уочено да се код мушкараца примарни меланом дупло чешће јавља у регији главе и врата него код жена. У односу на остале клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора, није било статистички значајне разлике међу половима (Табела 13.). Медијана дебљине тумора по Бреслоу код мушкараца је била 2.2 мм, а код жена 1.8 мм, али без статистичке значајности ($p=0.3$). Није било статистичке разлике међу половима у односу на друге анализиране параметре.

Табела 13. Клиничко-патолошки параметри у односу на пол

Опис	Мушки пол	Женски пол	Укупно	П
Укупан број испитаника	235 (57%)	175 (43%)	410 (100%)	
Локализација примарног тумора	47 (20%) 112 (47,7%)	20 (11,4%) 60 (34,3)	67 (16,3%) 172 (42%)	0.001
Глава и врат	31 (13,2%)	32 (18,3%)	63 (15,4%)	
Труп	45 (19,1%)	63 (36,0%)	108 (26,3%)	
Горњи екстремитети	235 (57%)	175 (43%)	410	
Доњи екстремитети				
Укупно				
Локализација примарног тумора (категорије)				0.001
Труп	112 (47,7%)	60 (34,3%)	172 (42%)	
Не- труп	123 (52,3%)	115 (65,7%)	235 (42,7%)	
Клиничко-патолошки тип				0,468
Површноширећи	162 (68,9%)	120 (68,6%)	282 (68,8%)	
Нодуларни	62 (26,4%)	42 (24,0%)	104 (25,4%)	
Остали	11 (4,7%)	13 (7,4%)	24 (5,9%)	
Нодуларни	62 (26,4%)	39 (22,3%)	101 (24,6%)	0,341
Не-нодуларни	173 (73,6%)	136 (77,7%)	309 (75,4%)	
Дебљина тумора по Бреслоу (групе)				0,62
<1 мм	58 (24,7%)	44 (25,1%)	102 (24,9%)	
Од 1 до 4 мм	108 (46,0%)	85 (48,6%)	193 (47,1%)	
>4 мм	69 (29,4%)	46 (26,3%)	115 (28,0%)	
Дебљина тумора по Бреслоу (медијана)	2,2 (0,7-23)	1,8 (0,2-25)	1,9 (0,7-25)	0,3
Улцерација				0,184
Да	156 (66,4%)	105 (60,0%)	261 (63,7)	
Не	79 (33,6%)	70 (40,0%)	149 (36,3%)	
Број митоза				0,445
Нема	39 (16,6%)	33 (19,1%)	72 (17,6%)	
Од 1 до 5	143 (60,9%)	104 (60,1%)	247 (60,5%)	
6 и више	53 (22,6%)	36 (20,8%)	89 (21,8%)	
Укупно	235	173	408	

Опис	Мушки пол	Женски пол	Укупно	П
Број митоза (медијана)	3 (0-48)	2 (0-30)	2 (0-48)	0,504
Лимфоваскуларна инвазија				
Да	17 (7,2%)	17 (9,7%)	34 (8,3%)	0,368
Не	218 (92,8%)	158 (90,3%)	376 (91,7%)	
Укупно	235	175	410	
Перинеурална инвазија				
Да	6 (2,6%)	8 (4,6%)	14 (3,49%)	0,266
Не	229 (97,4%)	167 (95,4%)	396 (96,6%)	
Укупно	235	175	410	
Тумор инфилтришући лимфоцити				
Нема	5 (3,9%)	1 (1,2%)	6 (2,8%)	0,6
Brisk	24 (18,9%)	17 (20,0%)	41 (19,3%)	
Non-brisk	98 (77,2%)	67 (78,8%)	165 (77,8%)	
Укупно	127	85	212	
Тумор инфилтришући лимфоцити (категорије)				
Има	120 (96,0%)	88 (98,9%)	208	0,404
Нема	5 (4,0%)	1 (1,1%)	6	
Укупно	125	89	214	
Тип ћелија				
Вретенасте	26 (19,8%)	18 (18,2%)	44 (19,1%)	0,138
Епителоидне	63 (48,1%)	59 (59,6%)	122 (53%)	
Невоидне	13 (9,9%)	11 (11,1%)	24 (10,4%)	
Мешовите	29 (22,1%)	11 (11,1%)	40 (17,4%)	
Регресија				
Није уочена	196 (83%)	148 (85%)	344 (83,9%)	0,75
Уочена	39 (17%)	27 (15%)	66 (16,1%)	
Микросателитоза				
Нема	17 (7,2%)	173 (98,9%)	403 (98,3%)	0,704
Има	218 (92,8%)	2 (1,1%)	7 (1,7%)	
Преегзистирајућа промена невус	17 (7,2%)	14 (8,0%)	31 (7,6%)	0,772
Има	218 (92,8%)	161 (92,0%)	379 (92,4%)	
Пигмент у примарном тумору				
Нема	4 (3,5%)	1 (1,1%)	5 (2,5%)	0,676
Оскудан/умерен	60 (52,6%)	48 (53,3%)	108 (52,9%)	
Изражен	50 (43,9%)	41 (45,6%)	91 (44,6%)	
Укупно	114	90	204	
Тип ћелијског раста				
Хоризонтални, паџетоидни и лентиринозни	19 (17,9%)	19 (25,7%)	38	0,210
Вертикални	87 (82,1%)	55 (74,3%)	142	
Укупно	106	74	180	

4.2. Фактори ризика за степен детекције метастаза у лимфном чвору стражару

Табела 14. Степен детекције метастаза у СЛН

Статус лимфног чвора стражара			
Негативан	Позитиван	Неуспешан	Укупно
322 (79,3%)	84 (20,7%)	4 (1%)	410

У периоду од 2010. године до 2019. године, дијагноза меланома са индикацијом за биопсију лимфног чвора стражара постављена је код 451 пацијената, 21 пацијент наставио је лечење у другим установама, код 16 пацијената процедура није изведена због година старости, коморбидитета и повремених недостатака радиофармака. Од 414 пацијената код којих је спроведена процедура, код 4 пацијента лимфни чвор стражар није детектован на лимфосцинтиграфији и код ових пацијената биопсија није могла бити учињена, а код 4 пацијената лимфни чвор стражар није нађен интраоперативно, те је стопа детекције лимфног чвора стражара била 98.1%.

Од укупног броја пацијената код којих је детектован лимфни чвор стражар ($n=406$) код њих 20,7% ($n=84$) је детектована метастаза у лимфном чвору стражару. Укупан број пацијената који су имали негативан један (или више од једног) лимфни чвор стражар био је 324. Код 118 (36,4%) екстирпирано је више од једног лимфног чвора стражара. Од укупног броја пацијената који су након биопсије лимфног чвора стражара остали у II клиничком стадијуму, код њих 54 (16,6%) је у периоду праћења констатована прогресија болести. Код 18 је прогресија евидентирана у дренажном басену (III клинички стадијум), па је стопа лажно негативних лимфних чворова била 5.6%, па је тачност методе била 95.57%, а сензитивност методе 82.35%.

Појава метастаза у лимфном чвору стражару била је чешћа код пацијената мушког пола, док није било статистички значајне разлике у узрасту између групе пацијената са налазом метастаза у лимфном чвору стражару и пацијената код којих лимфни чвор стражар није било метастатски измењен. У групи пацијената са површинско ширећим клиничким типом меланома, њих 74,5% није имало метастатски измењен лимфни чвор стражар, а 14,3% имало позитиван лимфни чвор стражар, за разлику од групе пацијената са нодуларним меланомом код којих је 38,3% имало позитиван лимфни чвор стражар. Постоји статистички високо значајна разлика у стопи појаве метастаза у лимфном чвору стражару код пацијената са нодуларним клиничкопатолошким типом примарног меланома у односу на суперфицијално ширећи клиничко патолошки тип меланома ($p<0,001$), као и у односу на све остале типове (ненодуларне) меланома ($p<0,001$). Високу статистичку значајност за појаву метастаза у лимфном чвору стражару је имао патохистолошки параметар дебљина меланома по Бреслоу, медијана 4,35 мм ($p<0,001$). Пацијенти са примарним меланомом код којег је измерена дебљина по Бреслоу била већа од 4 мм, имали су у 40,35% метастазе у лимфном чвору стражару, за разлику од пацијената који су имали дебљину меланома мању од 4 мм. ($p<0,001$). Пацијенти са констатованом улцерацијом у примарном меланому су имали у 25,2% случајева позитиван лимфни чвор стражар, док су пацијенти без улцерације у 87,2% имали негативан лимфни чвор стражар, а у 12,8% позитиван лимфни чвор стражар. Присуство улцерације у примарном меланому указује на дупло већу могућност за појаву метастаза у лимфном чвору стражару ($p<0,05$).

Статистички значај броја митоза у примарном меланому је доказан код пацијената са бројем митоза преко 6 по квадратном милиметру, који су код 32,2% случајева имали метастазу у лимфном чвору стражару, за разлику од пацијената са бројем митоза до 5 по квадратном милиметру, код којих су се у дупло мањем проценту (16,3%), појавиле метастазе у лимфном чвору стражару.

Није било статистички значајне разлике у односу присуства регресије и типова ћелија које граде примарни меланом. Пацијенти са примарним меланомима без пигмента у 40% случајева развију метастазе у лимфном чвору стражару ($p<0,05$).

Присуство тумор инфилтришућих лимфоцита и микросателита у примарном меланому указују на чешћу појаву метастаза у лимфном чвору стражару ($p<0,05$). Присуство лимфоваскуларне инвазије у примарном меланому указује на висок ризик од појаве метастаза у лимфном чвору стражару ($p<0,001$), док присуство перинеуралне инвазије такође има статистички значај ($p<0,05$).

Табела 15. Клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома и статус лимфног чвора стражара

Опис	СЛН негативан	СЛН позитиван	Укупно	P
Мушки	176 (54,7%)	58 (69%)	234	0,017
Женски	146 (45,3%)	26 (31,0%)	172	
Укупно			406	
Узраст медијана	57 (14-89)	55 (13-84)	172	0,6
<i>Хистопатолошки тип примарног меланома</i> Суперфицијално ширећи	240 (74,5%)	40 (47,6%)	280 (69,0%)	0,001
Нодуларни	63 (19,6%)	39 (46,4%)	102 (25,1%)	
Остали	19 (5,9%)	5 (6,0%)	24 (5,9%)	
<i>Хистопатолошки тип - категорије</i> Не-нодуларни	261 (81,1%)	46 (54,8%)	307 (75,6%)	0,001
Нодуларни	61 (18,9%)	38 (45,2%)	99 (24,4%)	
<i>Дебљина тумора по Бреслоу (медијана)</i>	1,53 (0,7-25)	4,35 (0,40-22)	1,97 (0,07-25)	0,001
<i>Дебљина тумора по Бреслоу (категирије)</i> <1 мм	93 (28,9%)	9 (10,7%)	102 (25,1%)	0,001
1-4 мм	161 (50,0%)	29 (34,5%)	190 (46,8%)	
>4 мм	68 (21,1%)	46 (54,8%)	114 (28,1%)	
<i>Присуство улцерација</i> Нема	129 (40,1%)	19 (22,6%)	148 (36,5%)	0,003
Има	193 (59,9%)	65 (77,4%)	258 (63,5%)	
Број митоза медијана	2 (0-30)	4 (0-21)	2 (0-30)	0,01
Број митоза Нема	57 (17,8%)	15 (18,1%)	72 (17,8%)	0,046
Од 1 до 5	205 (63,9%)	40 (48,2%)	245 (60,6%)	
6 и више	59 (18,4%)	28 (33,7%)	87 (21,5%)	
Укупно	321	83	404	
<i>Регресија</i> Није уочена	266 (82,6%)	74 (88,1%)	340 (83,7%)	0,225
Уочена	56 (17,4%)	10 (11,9%)	66 (16,3%)	
<i>Тип ћелија</i> Вретенасте	36 (20,1%)	8 (15,7%)	44 (19,1%)	0,642
Епителоидне	91 (50,7%)	31 (60,8%)	122 (53,0%)	
Невоидне	20 (11,2%)	4 (7,8%)	24 (10,4%)	
Мешовите	32 (17,9%)	8 (15,7%)	40 (17,4%)	
Укупно	179	51	230	
<i>Пигмент у примарном тумору</i> Нема	3 (1,9%)	2 (4,7%)	5 (2,5%)	0,026
Оскудан/умерен	80 (49,7%)	28 (65,1%)	108 (52,9%)	
Изражен	78 (48,4%)	13 (30,2%)	91 (44,6%)	
Укупно	161	43	204	

Опис	СЛН негативан	СЛН позитиван	Укупно	P
<i>Тип ћелијског раста</i> Хоризонтални, пацетоидни и лентигинозни	30 (21,0%)	8 (21,6%)	38 (21,1%)	0,932
Вертикални	113 (79,0%)	29 (78,4%)	142 (78,9%)	
Укупно	143	37	180	
<i>Тумор инфилтришући леукоцити</i> Нема	2 (1,2%)	4 (9,3%)	6 (2,8%)	0,032
Нонбриск	134 (79,3%)	31 (72,1%)	165 (77,8%)	
Бриск	33 (19,5%)	8 (18,6%)	41 (19,3%)	
Укупно	169	43	212	
<i>Микросателити</i> Нема	320 (99,4%)	80 (95,2%)	400 (98,5%)	0,018
Има	2 (0,6%)	4 (4,8%)	6 (1,5%)	
Укупно	322	84	406	
<i>Лимфоваскуларна инвазија</i> Нема	303 (94,1%)	69 (82,1%)	372 (91,6%)	0,001
Има	19 (5,9%)	15 (17,9%)	34 (8,4%)	
Укупно	322	84	406	
<i>Перинеурална инвазија</i> Нема	314 (97,5%)	78 (92,9%)	392 (96,6%)	0,048
Има	8 (2,5%)	6 (7,1%)	14 (3,4%)	
Укупно	322	84	406	
<i>Преегзистирајућа промена невус</i> Нема	301 (93,5%)	74 (88,1%)	375 (92,4%)	0,098
Има	21 (6,5%)	10 (11,9)	31 (7,6%)	
Укупно	322	84	406	

У табели 16 приказане су добијене статистичке вредности односа локализације примарног меланома и статуса лимфног чвора стражара. У односу на локализацију примарног меланома уочено је да су метастазе у лимфном чвору стражару статистички значајно чешће детектоване код акралних меланома (Табела 16.).

Табела 16. Локализација примарног тумора и статус лимфног чвора стражара

Опис	СЛН негативан	СЛН позитиван	Укупно	П
Глава и врат	47 (14,6%)	18 (21,4%)	65 (16,0%)	0,184
Горњи екстремитети	54 (16,8%)	8 (9,5)	62 (15,3%)	
Труп	138 (42,9%)	33 (39,3%)	171 (42,1%)	
Доњи екстремитети	83 (25,8%)	25 (29,8%)	108 (26,6%)	0,315
Глава и врат	47 (14,6%)	18 (21,4%)	65 (16,0%)	
Труп	138 (42,9%)	33 (39,3%)	171 (42,1%)	
Екстремитети	137 (42,5%)	33 (39,3%)	170 (41,9%)	0,002
Неакрални	309 (96,0%)	73 (86,9%)	382 (94,1%)	
Акрални	13 (4,0%)	11 (13,1%)	24 (5,9%)	

У табели 17 описан је статус лимфног чвора и време до биопсије, локализација лимфних басена и број ектирпираних лимфних чворова.

Испитивана је корелација времена од ексцизије примарног меланома до биопсије лимфног чвора стражара, затим корелација између локализације лимфних басена и броја ектирпираних лимфних чворова као и статуса лимфних чворова стражара.

Није било значајне статистичке разлике у детекцији метастаза у лимфном чвору стражару у односу на време од ексцизионе биопсије примарног меланома до биопсије лимфног чвора стражара. Статистичка значајност је показана код пацијената код којих је ектирпирано више лимфних чворова стражара у односу на пацијенте са једним ектирпираним лимфним чвором стражаром ($p < 0,005$).

Табела 17. Статус лимфног чвора и време до биопсије, локализација лимфних басена и број ектирпираних лимфних чворова

Опис	СЛН негативан	СЛН позитиван	Укупно	П
Време до СЛНБ дани, медијана	48 (6–185)	48 (13–253)	48 (6–253)	0,901
Време до СЛНБ недеље				
До 6 недеља	127 (39,4%)	38 (45,2%)	165 (40,6%)	0,890
Од 6 до 12 недеља	156 (48,4%)	30 (35,7%)	186 (45,8%)	
Преко 12 недеља	39 (12,1%)	16 (19,0%)	55 (13,5%)	
Примена плаве боје				
Није примењена	260 (80,7%)	63 (75,0%)	323 (79,6%)	0,245
Примењена	62 (19,3%)	21 (25,0%)	83 (20,4%)	
Број СЛН басена				
1	266 (82,6%)	71 (84,5%)	337 (83,0%)	0,677
2 и више	56 (17,4%)	13 (15,5%)	69 (17,0%)	
Локализација СЛН басена				
Врат	62 (19,3%)	16 (19,0%)	78 (19,2%)	0,232
Аксила	167 (51,9%)	36 (42,9%)	203 (50,0%)	
Ингвинум	93 (28,9%)	32 (38,1%)	125 (30,8%)	
Број ектирпираних СЛН				
1	206 (64,0%)	36 (42,9%)	242 (59,6%)	0,001
Више од 1	116 (36,0%)	48 (57,1%)	164 (40,4%)	

4.2.1. Бинарна логистика регресија - предиктивни фактори за појаву метастаза у сентинелном лимфном нодусу

Униваријантном логистичком регресијом тестирали смо бројне варијабле које се односе на клиничко-патолошке карактеристике. Сигнификатну повезаност са исходом – постојање метастаза у СЛН утврдили смо за пол, хистопатолошки тип нодуларног меланома, дебљину примарног меланома по Бреслоу, присуство улцерација, број митоза, постојање микросателита, лимфоваскуларну инвазију и акралну локализацију примарног меланома. На основу модела мултиваријантне логистичке регресије као сигнификатне предикторе позитивног СЛН идентификовали смо пол, нодуларни патохистолошки тип, лимфоваскуларну инвазију као и акралну локализацију. Због малог броја исхода од интереса и мултиколинеарности са лимфоваскуларном инвазијом, перинеурална инвазија није била укључена у мултиваријантни модел. Дебљина тумора по Бреслоу због придруженог утицаја осталих фактора била је на граници сигнификантности ($p = 0.057$) (табела 18.).

Табла 18. Сигнификантни предиктори позитивног СЛН на основу униваријантне и мултиваријантне логистичке регресије

Вариабла	p value	Odds ratio	95% CI
<i>Униваријантна анализа</i>			
Пол	0.018	0.540	0.324-0.902
Нодуларни меланом	0.000	3.535	2.118-5.899
Дебљина по Бреслоу	0.000	1.163	1.092-1.240
Улцерација	0.004	2.287	1.309-3.994
Број митоза	0.052	1.474	0.996-2.180
Микросателити	0.017	8.000	1.440-44.452
Лимфоваскуларна инвазија	0.001	3.467	1.678-7.163
Акрална локализација	0.003	3.582	1.542-8.317
<i>Мултиваријантна анализа</i>			
Пол	0.019	0.509	0.289-0.897
Нодуларни меланом	0.002	2.590	1.432-4.685
Дебљина по Бреслоу	0.057	1.073	0.998-1.153
Лимфоваскуларна инвазија	0.003	3.423	1.518-7.718
Акрална локализација	0.008	3.585	1.397-9.197

4.3. Фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима услед комплетне дисекције дренажућег лимфног басена

Одукупно 410 испитаника, код 81 је учињена комплетна дисекција не-сентинелских лимфних чворова. Међу не-сентинелским лимфним чворовима код 26 (32,1%) пацијената су рутинском патохистолошком анализом идентификоване метастазе.

У табели 19 приказани су параметри који су истраживани као фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским чворовима. Утврђено је да нема статистичке значајности у налазу не-сентинелских лимфних чворова у односу на пол, узраст, локализацију примарног тумора, хистопатолошки тип, присуство улцерације и број митоза. Медијана дебљине тумора по Бреслоу била је 4.8 мм код налаза метастатски измењених не-сентинелских лимфних чворова, а 4.2 мм код пацијената код којих није било метастатски измењених не-сентинелских лимфних чворова, али ова разлика није била статистички значајна већ на нивоу тренда ($p=0.079$). Такође, налаз метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима био је чешћи код меланома на преегзистирајућем неувусу (23.1% vs.. 7.3%, $p<0.05$), и на граници значајности код тумора са вретенастим/невоидним и мешовитим типом ћелија (42.8% vs.. 37.1%, $p=0.052$). Није уочена статистичка разлика у осталим анализираним клиничкопатолошким параметрима (Табела 19).

Табела 19. Фактори ризика за појаву метастатски измењених не-сентинелских лимфних чворова

НСЛН	Негативан	Позитиван	Укупно	Р
Испитаници	55 (67,9%)	26 (32,1%)	81	
<i>Пол</i>				
Мушки	37 (67,3%)	20 (76,9%)	57 (70,4%)	0,375
Женски	18 (32,7%)	6 (23,1%)	24 (29,6%)	
<i>Старост (медијана)</i>	54,07 година (од 18 до 80 година)	52,92 година (од 13 до 84)		0,761
<i>Локализација примарног меланома</i>				
Глава и врат	11 (20,0%)	5 (19,2%)	16 (19,8%)	0,675
Труп	24 (43,6%)	9 (34,6%)	33 (40,7%)	
Екстремитети	20 (30,6%)	12 (46,2%)	32 (39,5%)	
<i>Акрални</i>	6 (10,9%)	5 (19,2%)	11 (13,6)	0,318
Не акрални	49 (89,1%)	21 (80,8%)	70 (86,4%)	
<i>Хистопатолошки тип примарног меланома</i>	30 (54,5%)	9 (34,6%)	39 (48,1%)	0,121
<i>Суперфицијално ширећи</i>				
Нодуларни	23 (41,8%)	14 (53,8%)	37 (45,7%)	
Остали	2 (3,6%)	3 (11,5%)	5 (6,2%)	
Нодуларни	23 (41,8%)	14 (53,8%)	37 (45,7)	0,310
Не-нодуларни	32 (58,2%)	12 (46,2%)	44 (54,3%)	
<i>Дебљина тумора по Бреслоу (медијана)</i>	4,1 (од 0,40 до 22)	4,8 (од 1,85 до 16)		0,079
<i>Дебљина тумора по Бреслоу</i>				
< 1 мм	9 (16,4%)	0 (0%)	9 (11,1%)	0,399
Од 1 до 4 мм	18 (32,7%)	12 (46,2%)	30 (37%)	
> 4 мм	28 (50,9%)	14 (53,8%)	42 (51,9%)	
<i>Улцерација</i>				
Нема	14 (25,5%)	6 (23,1%)	20 (24,7%)	0,817
Има	41 (74,5%)	20 (76,9%)	61 (75,3%)	
<i>Број митоза (медијана)</i>	3 (од 0 до 21)	4 (од 0 до 17)		0,653
<i>Број митоза (категије)</i>				
Нема	12 (22,2%)	3 (11,5%)	15 (18,8%)	0,844
Од 1 до 5	23 (42,6%)	17 (65,4%)	40 (50%)	
6 и више	19 (35,2%)	6 (23,1%)	25 (31,3%)	
<i>Регресија</i>				
Није уочена	47 (85,5%)	24 (92,3%)	71 (87,7%)	0,488
Уочена	8 (14,5%)	2 (7,7%)	10 (12,3%)	
<i>Тип ћелија</i>				
Епителоидне	22 (62,9%)	8 (57,1%)	30 (61,2%)	0,052
Вретенасте/невоидне/мешовите	13 (37,1%)	6 (42,8%)	19 (38,8%)	
<i>Пигмент у примарном тумору</i>				
Нема	2 (6,9%)	0 (0%)	2 (4,9%)	0,520
Оскудан / умерен	16 (55,2%)	9 (75,0%)	25 (61%)	
Изражен	11 (37,9%)	3 (25%)	14 (34,1%)	

НСЛН	Негативан	Позитиван	Укупно	Р
<i>Пелијски раст</i> Хоризонтални, пацетоидни и лентиринозни	8 (27,06%)	0 (0%)	8 (22,2%)	0,309
Вертикални	21 (72,4%)	7 (100%)	28 (77,8%)	
<i>Тумор инфилтришући леукоцити</i> Нема	1 (2,9%)	2 (16,7%)	3 (6,5%)	0,162
Има	33 (97,1%)	10 (83,3%)	43 (93,5%)	
<i>Лимфоваскуларна инвазија</i> Нема	46 (83,6%)	20 (76,9%)	66 (81,5%)	0,544
Има	9 (16,4%)	6 (23,1%)	15 (18,5%)	
<i>Перинеурална инвазија</i> Нема	50 (90,9%)	25 (96,2%)	75 (92,6%)	0,658
Има	5 (9,1%)	1 (3,8%)	6 (7,4%)	
<i>Преگزистирајућа промена-невус</i> Нема	51 (92,7%)	20 (76,9%)	71 (87,7%)	0,044
Има	4 (7,3%)	6 (23,1%)	10 (12,3%)	

4.3.1. Статус и оптерећење тумором лимфног чвора стражара и његов прогно- стички значај за појаву метастаза у не-сентинелским чворовима

Табела 20. Корелација статуса несентинелских лимфних чворова и статуса лимфног чвора стражара

НСЛН	Негативан	Позитиван	Укупно	Р
Испитаници	55 (67,9%)	26 (32,1%)	81	
Време до СЛНБ (дани) медијана				
	49 (13-196)	42 (19-253)		0,341
Време до СЛНБ (недеље)				
Доб недеља	22 (40%)	14 (53,8%)	36 (44,4%)	0,252
Прекоб недеља	33 (60%)	12 (46,2%)	45 (55,6%)	
Број СЛНБ басена				
1	46 (83,6%)	24 (92,3%)	70 (86,4%)	0,489
2 и више	9 (16,4%)	2 (7,7%)	11 (13,6%)	
Локација СЛН басена				
Врат	8 (14,5%)	6 (23,1%)	14 (17,3%)	0,212
Аксила	28 (50,9%)	8 (30,8%)	36 (44,4%)	
Ингвинум	19 (34,5%)	12 (46,2%)	31 (38,3%)	
Број лимфних чворова стражара				
1	25 (45,5%)	10 (38,5%)	35 (43,2%)	0,553
Више од 1	30 (54,5%)	16 (61,5%)	46 (56,8%)	

У табели 20. су приказани подаци о повезаности временског периода између ексцизионе биопсије примарног тумора и биопсије лимфног чвора стражара. Није уочена разлика у броју дана од датума ексцизионе биопсије до датума биопсије лимфног чвора стражара, медијана код позитивних не-сентинелских лимфних чворова је 42 дана, а код негативних 49 дана. Није уочена значајна статистичка разлика појаве позитивних не-сентинелских лимфних чворова у односу на временске групе по недељама. Најзаступљенији позитиван не-сентинелски басен био је ингвинални, 12 (46%) од свих позитивних не-сентинелских басена.

Према досадашњим студијама, на статус не-сентинелског лимфног чвора утицало је туморско оптерећење лимфног чвора стражара (енгл. *tumor burden*) дефинисано различитим параметрима (табела 21).

Табела 21. Оптерећење СЛН тумором (енгл. *tumor burden*) и статус несентинелских лимфних чворова

НСЛН	Негативан	Позитиван	Укупно	P
Локализација метастатског фокуса у СЛН (по Девару, енгл. <i>Dewar</i>)				
Субкапсуларно	25 (51%)	6 (23,1%)	31 (41,3%)	0,009
Мешавито + паренхимално	14 (28,6%)	6 (23,1%)	20 (26,7%)	
Мултифокално + субтотално	10 (20,4%)	14 (53,8%)	24 (32%)	
Девар категорије				
Субкапсуларно	25 (51%)	6 (23,1%)	31 (41,3%)	0,019
Остало	24 (49,0%)	20 (76,9%)	44 (58,7%)	
УКУПНО	49	26	75	
Дијаметар највећег метастатског фокуса у СЛН (Ротердам, енгл. <i>Rotterdam</i>)				
<0,1 мм	8 (17,4%)	1 (4,2%)	9 (12,9%)	0,011
Од 0,2 до 0,9 мм	14 (30,4%)	3 (12,5%)	17 (24,3)	
Једнако и веће од 1 мм	24 (52,2%)	20 (83,3%)	44 (62,9%)	
Ротердам категорије				
< 1 мм	22 (47,8%)	4 (16,7%)	26 (37,1%)	0,010
Једнако и веће од 1 мм	24 (52,2%)	20 (83,3%)	44 (62,9%)	
УКУПНО	46	24	70	
Удаљеност метастатског депозита од капсуле (Старц, енгл. <i>Startz</i>)				
<0,30 мм	14 (56,0%)	9 (56,3%)	23 (56,1%)	0,964
Од 0,31 до 0,9 мм	6 (24,0%)	4 (25,0%)	10 (24,4%)	
Једнако и веће од 1 мм	5 (20,0%)	3 (18,8)	8 (19,5%)	
Старц категорије				
<0,30 мм	14 (56,0%)	9 (56,3%)	23 (56,1%)	0,987
>0,30 мм	11 (44%)	7 (43,8%)	18 (43,9%)	

У табели 21 приказана је корелација параметара оптерећења лимфног чвора стражара тумором, са присуством метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима. Утврђено је да је 76.9% пацијената са налазом метастазе у не-сентинелским лимфним чворовима имало мултифокалну и субтоталну микроанатомску локализацију метастатског депозита, према Деваровом критеријуму, а свега 26.9% субкапсуларну, за разлику од пацијената са негативним не-сентинелским лимфним чворовима где је поједнак број имао субкапсуларну и мултифокалну/субтоталну локализацију депозита, а ова разлика била је статистички значајна ($p < 0.05$). Осим тога, дијаметар метастазе већи од 1 мм (Ротердам критеријум) значајно чешће је констатована код пацијената са метастазама у не-сентинелском лимфном чвору (83.3% vs. 52.2%, $p < 0.05$). Удаљеност од капсуле по Старцу (мања или већа од 0.3 мм) није била предиктор за налаз метастазе у не-сентинелском лимфном чвору (Табела 21).

4.3.2. Корелација параметара имунолошког одговора на тумор у лимфном чвору стражару и статуса не-сентинелских лимфних чворова

У току истраживања испитивана је експресија молекула имунског одговора на тумор у лимфном чвору стражару, експримираних на лимфоцитима – CD4, CD8, FoxP3, IDO и PD-L1. Анализа имунолошких параметара указала је на то да је интратуморска експресија CD4 на лимфоцитима повезана са налазом метастатског депозита у не-сентинелским чворовима. Висока интратуморска експресија CD4 нађена је код

86,7% пацијената са позитивним не-сентинелским чворовима за разлику од негативних где је висока интра-туморска експресија CD4 нађена код 43,8% ($p=0,013$). Такође, постоји тренд високе интра-туморске експресије CD8 код пацијената код којих је нађена метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима ($p=0,081$). И експресија IDO-а била је чешћа код пацијената код којих је постојала метастаза у не-сентинелским чворовима 73,3% vs 43,8%, ($p=0,095$). Није било разлике у експресији FoxP3 и PD-L1 молекула у лимфном чвору стражару између група пацијената са и без метастаза у не-сентинелским чворовима.

Табела 22. Испитивани имунолошки параметри у метастатском лимфном чвору стражару

НСЛН	Негативан	Позитиван	Укупно	П
FOXP3 интезитет реакције				
Нема реакције	4 (25,0%)	4 (26,7%)	8 (25,8%)	0,951
Веома слаба реакција	5 (31,3%)	4 (26,7%)	9 (29,0%)	
Умерена реакција	4 (25,0%)	4 (26,7%)	8 (25,8%)	
Интензивна реакција	3 (18,8%)	3 (20,0%)	6 (19,4%)	
FOXP3 интезитет реакције категорије				
Нема и веома слаба реакција	9 (56,3%)	8 (53,3%)	17 (54,8%)	0,870
Има реакције	7 (43,8%)	7 (46,7%)	14 (45,2%)	
FOXP3 удео позитивних ћелија				
Нема позитивних ћелија	4 (25,0%)	4 (26,7%)	8 (25,8%)	1,0
Од 5% до 40% позитивних ћелија	12 (75,0%)	11 (73,3%)	23 (74,2%)	
FOXP3 присутност				
Перитуморски	4 (25,0%)	0 (0%)	4 (12,9%)	0,09
Интра-туморски	8 (50,0%)	10 (66,7%)	18 (58,1%)	
УКУПНО	16	15	31	
Експресија CD4				
CD4 перитуморски				
Од 0 до 50	9 (56,3%)	7 (48,7%)	16 (51,6%)	0,462
> 50	5 (31,3%)	8 (53,3%)	13 (41,9%)	
CD4 интра-туморски				
Од 0 до 10	9 (56,3%)	2 (13,3%)	11 (35,5%)	0,013
> 10	7 (43,8%)	13 (86,7%)	20 (64,5%)	
Експресија CD8				
CD8 перитуморски				
Од 0 до 10	3 (18,8%)	2 (13,3%)	5 (16,1%)	1,0
> 10	13 (81,3%)	13 (86,7%)	26 (83,9%)	
CD8 интра-туморски				
Од 0 до 10	8 (50,0%)	3 (20,0%)	11 (35,5%)	0,081
> 10	8 (50,0%)	12 (80,0%)	20 (64,5%)	
Експресија IDO 2,3 деоксигеназе				
IDO интезитет реакције				
Нема реакције	9 (56,3%)	4 (26,7%)	13 (41,9%)	0,095
Има реакције	7 (43,8%)	11 (73,3%)	18 (58,1%)	
IDO удео позитивних ћелија				
Нема реакције	9 (56,3%)	4 (26,7%)	13 (41,9%)	0,095
Има реакције	7 (43,8%)	11 (73,3%)	18 (58,1%)	
Експресија PD-L1 антитела у метастази СЛН				
Нема реакције	12 (75,0%)	9 (60,0%)	21 (67,7%)	0,458
Има реакције	4 (25,0%)	6 (40,0%)	10 (32,3%)	
Интезитет бојења PD-L1 антитела				
Нема позитивних ћелија	12 (75,0%)	9 (60,0%)	21 (37,7%)	0,458
Има позитивних ћелија	4 (25,0%)	6 (40,0%)	10 (32,3%)	

4.3.3. Бинарна логистика регресија - предиктивни фактори за појаву метастаза у несентинелном лимфном нодусу

Од фактора који су према униваријантној логистичкој регресији били сигнификантно повезани са статусом НСЛН формирали смо мултиваријантни модел у који смо укључили и дебљину тумора по Бреслоу иако та варијабла према вредностима p није била сигнификантни предиктор, већ само на нивоу тренда. На основу резултата мултиваријантног модела само је пречник највећег метастатског фокуса по Ротердаму био сигнификантни предиктор за појаву метастаза у НСЛН (табела 23). Због неповољног односа броја исхода и потенцијалних предиктора, испитиване имунолошке параметре није било могуће укључити у мултиваријантни модел.

Табела 23. Сигнификантни предиктори позитивног НСЛН на основу униваријантне и мултиваријантне логистичке регресије

Вариабла	P value	Odds ratio	95% CI
<i>Униваријантна анализа</i>			
Девар локализација	0.023	3.472	1.190-10.128
Ротердам критеријум	0.014	4.583	1.354-15.516
Дебљина по Бреслоу	0.290	1.061	0.951-1.182
<i>Мултиваријантна анализа</i>			
Девар локализација	0.071	3.032	0.908-10.126
Ротердам критеријум	0.028	4.138	1.161-14.745
Дебљина по Бреслоу	0.294	1.067	0.945-1.206

4.3.4. Класификациона схема предикције постојања метастаза у не-сентинелском лимфном чвору

Због нумеричког ограничења броја доступних испитаника са исходима од интереса и вредностима потенцијалних предиктора није било могуће дефинисати класификациону схему која указује на постојање метастазе у не-сентинелском лимфном чвору. Доступни литературни подаци публиковани у часописима где су рађене сличне схеме имали су преко десет пута већи узорак. Имајући све то у виду нисмо могли да постигнемо задати циљ. Услед малог узорка и велике стандардне грешке добијени резултати не би могли да представљају популацију из које потичу.

4.4. Анализа тока болести, времена преживљавања и исхода у односу на клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома и статус лимфног чвора стражара

Осим корелације клиничко-патолошких карактеристика према полу и у односу на статус лимфног чвора стражара и не-сентинелских лимфних чворова, учињена је анализа тока и исхода болести, као и времена преживљавања.

4.4.1. Исход болести у односу на пол, старост и локализацију примарног тумора

Одукупног броја пацијената (410) њих 44 (10,7%) је преминуло, од тога је било 70,5% пацијената мушког пола, узраста од 13-89 година (медијана 58,5%), а код 36,4% преминулих је локализација примарног тумора била на трупу.

Табела 24. Исход болести у односу на пол, старост и локализацију примарног тумора

	Жив	Преминуо	р
Укупно оболелих	366 (89.3%)	44 (10.7%)	-
Пол			
Женски	162 (44.3%)	13 (29.5%)	0,062
Мушки	204 (55.7%)	31 (70.5%)	
Старост медијана (године)	57 (14–85)	58,5 (13–89)	0,048
Локализација примарног тумора			
глава и врат	56 (15,3%)	11 (25,0%)	0,368
горњи екстремитети	58 (15,8%)	5 (11,4%)	
Труп	156 (42,6)	16 (36,4%)	
доњи екстремитети	96 (26,2%)	12 (27,3%)	

4.4.2. Исход болести у односу на статус лимфног чвора стражара

Доказана је статистички значајна разлика у исходу болести код пацијената са метастатски измењеним лимфним чвором стражаром у односу на оне са негативним лимфним чвором стражаром ($p < 0,001$). Број преминулих од укупног броја позитивних и негативних лимфних чворова стражара је већи код позитивних којих је било 21/84 (25%) vs. 23/322 (7,12%), $p < 0,001$.

Није уочена статистичка значајност у односу на време до биопсије лимфног чвора стражара и исход болести, као ни у односу на број и локацију дренажних басена и број екстирпираних лимфних чворова стражара.

Табела 25. Исход болести у односу на статус лимфног чвора стражара

	Жив	Преминуо	Укупно	р
Укупно оболелих	366 (89.3%)	44 (10.7%)	410	-
СЛН статус				
СЛН статус	63 (17,4%)	21 (47,7%)	406	0,001
Позитиван	299 (82,6%)	23 (52,3%)		
Време до СЛНБ				
Доб недеља	144 (39,3%)	23 (52,3%)	167 (40,7%)	0,089
Од 6 до 12 недеља	169 (46,2%)	17 (38,6%)	186 (45,4%)	
Преко 12 недеља	53 (14,5%)	4 (9,1%)	57 (13,9%)	
Број СЛН басена				
1	303 (82,8%)	37 (84,1%)	340 (82,9%)	0,828
2 и више	63 (17,2%)	7 (15,9%)	70 (17,1%)	
Локација СЛН басена				
Врат	67 (18,3%)	13 (29,5%)	80 (19,5%)	0,205
Аксила	186 (50,8%)	19 (43,2%)	205 (50,0%)	
Ингвинум	113 (30,9%)	12 (27,3%)	125 (30,5%)	
Број СЛН				
1	220 (60,8%)	22 (50,0%)	242 (59,6%)	0,169
Више од 1	142 (39,2%)	22 (50,0%)	164 (40,4%)	

4.4.3. Корелација стопа трогодишњег преживљавања у односу на пол, старост и клиничко патолошке карактеристике примарног тумора и статус лимфног чвора стражара (Табела 26.)

Стопа трогодишњег преживљавања је виша код женског пола, код пацијената са ненодуларним примарним меланомом и код пацијената чија је дебљина меланома по Бреслоу била мања од 4 мм ($p < 0,001$). Затим, стопа трогодишњег преживљавања је на нивоу статистичког тренда била већа код пацијената са бројем митоза у примарном мелному до 5 по квадратном мм, 5 vs. 2 ($p = 0,078$).

Укупно 95,6% пацијената са негативним лимфним чвором стражаром преживели су три године, за разлику од пацијената са метастатски измењеним лимфним чвором стражаром, који у 16,6% случајева преживе три године ($p < 0,001$). Уколико је, међутим, дијаметар метастатског депозита који је био мањи од 1 мм 92,8% пацијената је преживело три године ($p = 0,09$).

У односу на експресију испитиваних имунолошких параметара у лимфном чвору стражару (FoxP3, CD4, CD8, IDO, PDL-1) није било статистички значајне разлике у стопама трогодишњег преживљавања ($N = 33$).

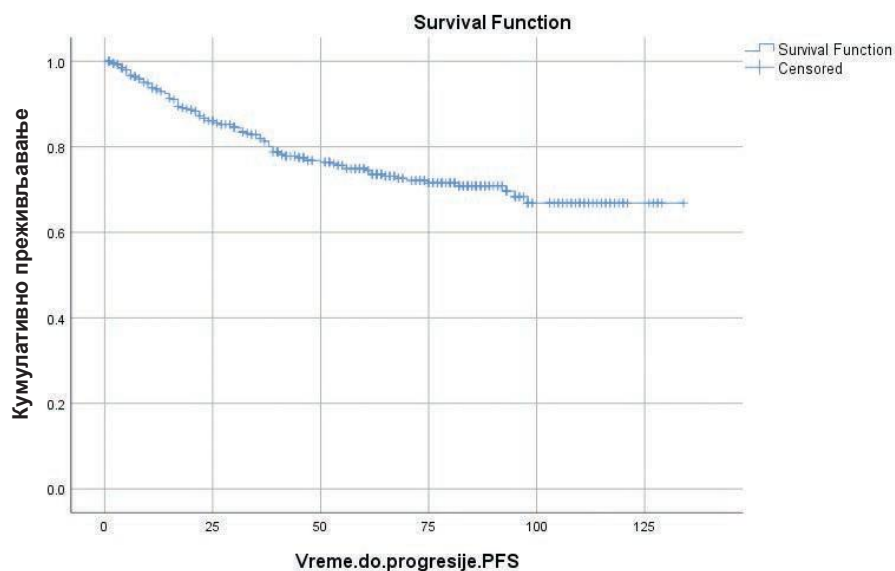
Табела 26. Стопа трогодишњег преживљавања пацијената у односу на пол, старост и клиничко патолошке карактеристике примарног тумора и статус лимфног чвора стражара

Трогодишње преживљавање	Жив	Преминуо	Укупно	П
Укупно оболелих	382 (93,2%)	28 (6,8)	410 (100%)	-
Пол				
Мушки	213 (55,8%)	22 (78,6%)	235 (57,3%)	0,018
Женски	169 (44,2%)	6 (21,4%)	175 (42,7%)	
Старост медијана (године)	56,5 (13-89)	59,0 (24-79)	57 (13-89)	0,208
ПХ тим примарног меланом				
ССМ	270 (70,7%)	12 (42,9%)	282 (68,8%)	0,006
НМ	90 (23,6%)	14 (50,0%)	104 (25,4%)	
ЛМм+АЛМ+остало	22 (5,8%)	2 (7,1%)	24 (5,9)	
ПХ примарног меланома – категорије				
Ненодуларни	295 (77,2%)	14 (50,0%)	309 (75,4%)	0,001
Нодуларни	87 (22,8%)	14 (50,0%)	101 (24,6%)	
Бреслоу категорије				
< од 1 мм	101 (26,4%)	1 (3,6%)	102 (24,9%)	0,000
Од 1 мм до 4 мм	185 (48,4%)	8 (28,6%)	193 (47,1%)	
> од 4 мм	96 (25,1%)	19 (67,9%)	115 (28,0%)	
Бреслоу медијана (мм)	1,8 (0,07–25)	4,9 (0,80–23)	1,99 (0,7-25)	0,000
Присуство улцерација на примарном меланому				
Не	144 (37,7%)	5 (17,9%)	149 (36,3%)	0,035
Да	238 (62,3%)	23 (82,1%)	261 (63,7%)	
Број митоза – категорије				
Нема	67 (17,6%)	5 (17,9%)	72 (17,6%)	0,062
Од 1–5	236 (62,1%)	11 (39,3%)	247 (60,5%)	
6 и више	77 (20,3%)	12 (42,9%)	89 (21,8%)	

Трогодишње преживљавање	Жив	Преминуо	Укупно	П
Број митоза медијана	2 (од 0–48)	5 (од 0–28)		0,078
Статус метастазе у лимфном чвору стражару				
Негативан	308 (81,5%)	14 (50,0%)	322 (79,3%)	0,000
Позитиван	70 (18,5%)	14 (50,0%)	84 (20,7%)	
Rotterdam критеријум				
<0,1 мм	9 (13,8%)	0 (0%)	9 (11,7%)	0,099
Од 0,2–1 мм	17 (26,2%)	2 (16,7%)	19 (24,7%)	
>1 мм	39 (60,0%)	10 (83,3%)	49 (63,6%)	

4.4.4. Време преживљавања од дијагнозе примарног меланома до појаве метастаза (преживљавање без прогресије, енгл. *progression-free survival, PFS*)

Од 410 пацијената, прогресија је забележена код 98 оболелих (23,9%), а 312 пацијената је цензурирано (76,1%). Имајући у виду да у појединим групама, није било више од 50% исхода, медијана преживљавања није достигнута, те је приказана процењена аритметичка средина преживљавања са 95% интервалом поверења.



Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења	
		Доња граница	Горња граница
102.4	2.733	97.1	107.8

Графикон 1. Преживљавање без прогресије болести (енгл. *progression-free survival, PFS*) у целокупној популацији испитаника

Табела 27. Време преживљавање без прогресије болести у односу на поли клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора

	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) (df)	P
			Доња граница	Горња граница		
Пол						
Мушки	93,2	3,6	86,2	100,2	14,660(1)	0,013
Женски	109,5	3,8	102,1	116,9		
Старост						
До 40 година	113.6	4.9	103.9	123.3	0,049	
41-60 година	98.0	4.0	90.2	105.9		
61 и више	88.2	3.9	80.4	95.9		
Локализација примарног тумора						
Глава и врат	83,544	6,772	70,272	96,817	10,905(3)	0,012
Горњи екстремитети	117,372	5,414	106,761	127,983		
Труп	101,556	3,731	94,243	108,869		
Доњи екстремитети	95,758	5,313	85,345	106,170		
Бреслоу (средња вредност)						
< 1 мм	119.4	2.6	114.3	124.5	79.721(2)	0.000
1-4 мм	108.1	3.8	100.7	115.5		
> 4 мм	66.3	5.5	55.7	77.1		
Присуство улцерација на примарном меланому						
Не	108,955	4,164	100,794	117,116	4,550(1)	0,033
Да	94,103	3,295	87,646	100,561		
Број митоза						
Нема	94,404	7,055	80,576	108,233	40,465(2)	<0,001
Од 1-5	109,586	2,723	104,250	114,922		
6 и више	63,129	5,006	53,318	72,941		
Регресија						
Није уочена	99,853	3,107	93,762	105,943	3,663(1)	0,056
Уочена	110,213	5,126	100,167	120,259		
Тумор инфилтришући лимфоцити						
Нема	40,400	6,416	27,824	52,976	7,668(1)	0,006
Има	102,558	3,329	96,033	109,084		
Пигмент у примарном тумору						
Нема	37,000	7,658	21,991	52,009	13,306(2)	0,001
Оскудан и умерен	99,203	4,747	89,899	108,506		
Изражен	109,766	4,528	100,891	118,641		
Микросателити						
Не	103,741	2,728	98,393	109,088	14,884(1)	<0,001
Да	42,429	10,408	22,028	62,829		
Лимфоваскуларна инвазија						
Не	103,940	2,823	98,407	109,472	4,633(1)	0,031
Да	83,377	9,690	64,386	102,369		
Перинеурална инвазија						
Не	103,369	2,755	97,969	108,770	5,624(1)	0,018
Да	62,400	14,462	34,055	90,745		

Медијана преживљавања без прогресије болести била је 102.4 ± 2.733 недеље (95% CI 97.1-107.8) (Графикон 1). Време преживљавања до појаве метастаза, тј. до прогресије било је дуже код женског пола, код пацијената са примарним меланомом локализованим на горњим екстремитетима и трупу, затим код примарних меланома који нису имали улцерацију, као и код оних који су имали до 5 митоза по квадратном

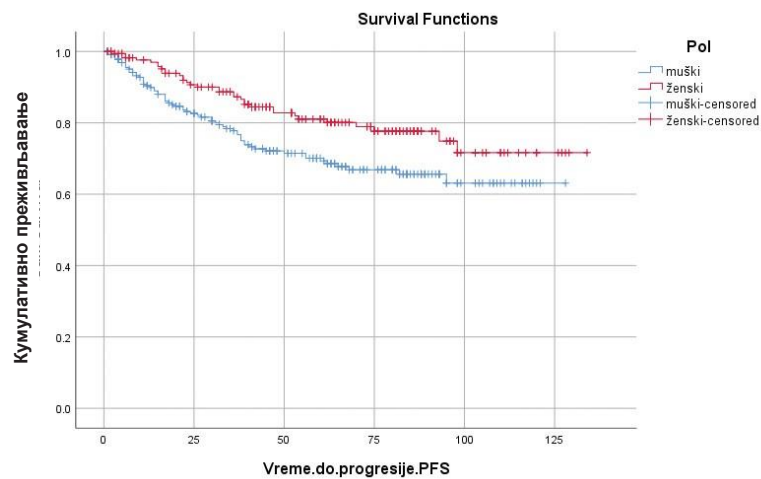
милиметру (Табела 27, Графикон 2 и 3). Такође је уочено да је време до прогресије дуже код пацијената код којих је констатовано присуство тумор инфилтришућих леукоцита, као и израженог пигмента у примарном меланому, као и код оних код којих није уочена лимфоваскуларна и перинеурална инвазија ($p < 0,005$) (Табела 27). Пацијенти код којих је уочена регресија постоји тренд дужег преживљавања без прогресије болести ($p = 0,056$). Добијени подаци указују на то да је код пацијената са констатованим микросателитима у примарном меланому преживљавање значајно краће ($p < 0,001$) (103,7 недеља vs 42,4 недеље ($p < 0,001$)). Није било статистички значајне разлике у времену до прогресије болести у односу на тип ћелија у тумору као и да ли је уочен преегзистирајући невус ($p > 0,05$) (Табела 27).

Табела 28. Време преживљавања без прогресије у односу на статус лимфног чвора стражара

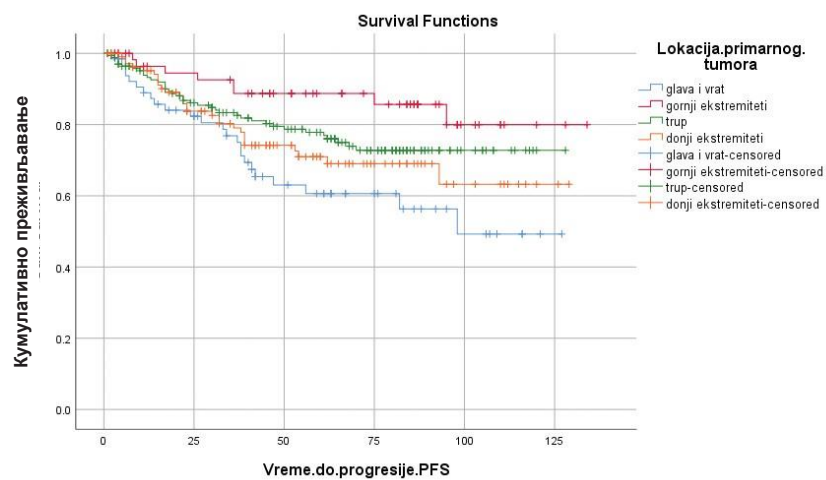
	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) (df)	P
			Доња граница	Горња граница		
Број СЛН						
1	109,730	3,210	103,439	116,021	11,818(1)	0,001
>1	84,253	4,132	76,155	92,351		
Време до СЛНБ (недеље)						
<6	97.4	4.082	89.379	105.382	0.152(2)	0.972
6-12	102.4	3.911	94.767	110.099		
>12	99.1	7.145	85.136	113.145		
Локализација СЛН						
Врат	80,851	6,519	68,074	93,628	14,660(2)	0,001
Аксила	112,164	3,321	105,656	118,672		
Ингвинум	93,643	5,030	83,783	103,502		
Локализација метастазе у СЛН (Dewar)						
Субкапсуларно	47,836	7,294	33,539	62,133	1,040(2)	0,595
Мешовито + паренхимално	62,874	11,705	39,932	85,815		
Мултифокално + субтотално	70,149	10,443	49,680	90,618		
Дијаметар метастазе у СЛН (Rotterdam)						
<0,1 мм	87,750	15,367	57,631	117,869	1,897(2)	0,387
0,2-1,0 мм	53,999	9,446	35,485	72,512		
=>1,0 мм	62,531	7,891	47,064	77,998		

Истраживање и обрада статуса лимфног чвора стражара подразумевало је број лимфних чворова стражара који су екстирпирани, локализацију дренажног басена, локализацију метастатског депозита у лимфном чвору, као и дијаметар највећег метастатског депозита у лимфном чвору (енгл. *tumor burden*).

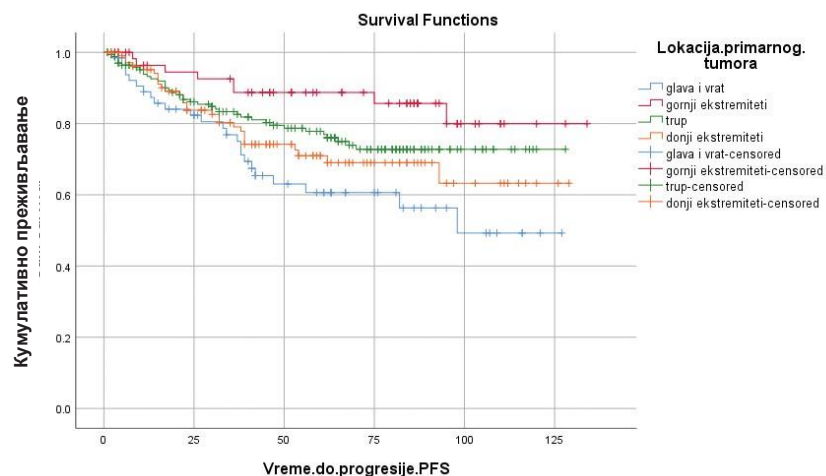
Добијени подаци указују на то да је време без прогресије болести било краће код пацијената који су имали више од једног екстирпираниог метастатски измењеног лимфног чвора као и код локализације лимфног чвора стражара на врату (Табела 28, графикон 4). Није било статистички значајне разлике у времену до прогресије болести у односу на локализацију метастаза у лимфном чвору стражару по Dewar-у и дијаметру метастатског фокуса у лимфном чвору стражару по Rotterdam-у.



Графикон 2. Преживљавање без прогресије код пацијената са меланомом и пол

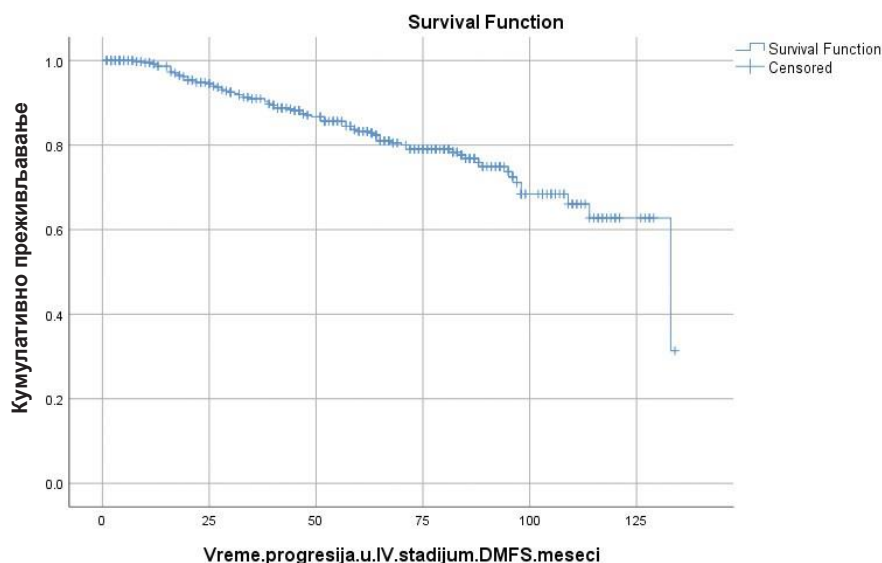


Графикон 3. Преживљавање без прогресије болести код пацијената са меланомом и локализација примарног тумора



Графикон 4. Преживљавање без прогресије болести и локализација СЛН басена

4.4.5. Преживљавање без удаљених метастаза (енгл, *Distant metastasis free survival, DMFS*)



Време (недеље), медијана	Стандардна грешка	95% интервал поверења	
		Доња граница	Горња граница
133,000	13,529	106,482	159,518

Графикон 5. Преживљавање без удаљених метастаза у укупној популацији пацијената

Медијана преживљавања без удаљених метастаза била је 133 недеље (33 месеца) $\pm 13,529$ (95% CI 106,482 до 159,518) (Графикон 5.). У табели 29. су приказани резултати времена преживљавања у недељама до појаве удаљених метастаза. Уочено је да је преживљавање било дуже код особа женског пола, локализације примарног меланома на горњим екстремитетима, код површно ширећег меланома, код дебљине меланома по Бреслоу мање од 4 мм, код одсуства улцерације и броја митоза до 5 по квадратном милиметру, те код присуства тумор инфилтришућих леукоцита у примарном меланому. Резултати указују на краће преживљавање код пацијената који у примарном меланому немају уочен пигмент, односно дуже преживљавање код оних који имају изражен пигмент ($p < 0,05$). Није показана статистички значајна разлика између група у осталим анализираним параметрима (присуство регресије, перинеуралне и лимфоваскуларне инвазије).

Табела 29. Време преживљавања до удаљених метастаза у односу на пол и клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора

	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) (df) Chi-square (dF)	p
			Доња граница	Горња граница		
Пол						
Мушки	99,134	3,274	92,717	105,551	8,291 (1)	0,004
Женски	117,014	3,263	110,618	123,410		
Старост (године)						
<40	118.841	4.424	110.170	127.512	5.752(2)	0.056
41-60	102.797	3.729	95.489	110.105		
>61	103.664	4.319	95.198	112.129		

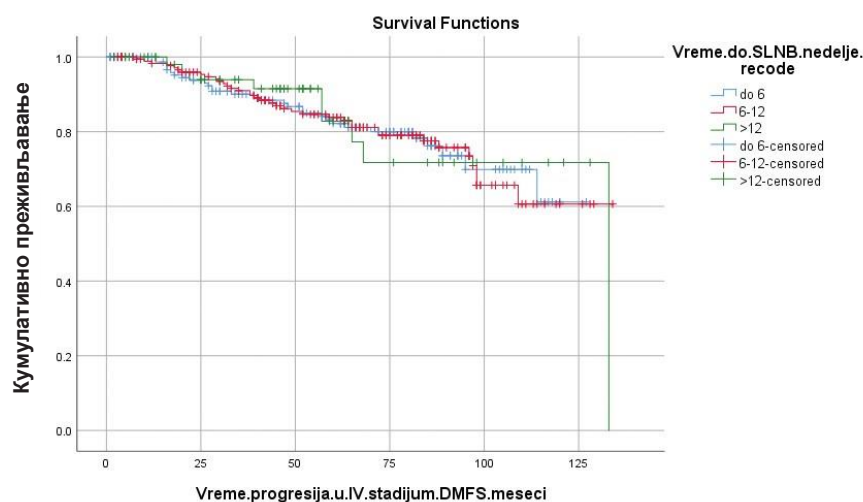
	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) (df) Chi-square (dF)	p
			Доња граница	Горња граница		
Глава и врат	92,782	5,847	81,321	104,242	10,251	0,017
Горњи екстремитети	121,379	4,845	111,884	130,875		
Труп	107,333	3,600	100,278	114,389		
Доњи екстремитети	105,182	5,272	94,850	115,515		
ПХ тип примарног меланома						
ССМ	115,062	2,731	109,709	120,415	29,104(2)	<0,001
НМ	80,596	4,844	71,103	90,090		
ЛМм+АЛМ+остало	98,169	7,324	83,814	112,524		
Ненодуларни	114,658	2,615	109,533	119,738	28,897(1)	<0,001
Нодуларни	80,506	4,853	70,995	90,018		
Бреслоу категорије						
< 1 мм	120,853	2,235	116,474	125,233	59,335(2)	<0,001
Од 1 до 4 мм	114,699	3,346	108,140	121,257		
> 4 мм	79,556	5,027	69,704	89,408		
Улцерације						
Не	116,844	3,576	109,835	123,852	7,307(1)	0,007
Да	99,614	3,098	93,542	105,687		
Број митоза						
Нема	102,729	6,210	90,557	114,901	30,199(2)	<0,001
Од 1 до 5	113,111	2,492	108,228	117,995		
6 и више	77,762	4,523	68,898	86,626		
Регресија						
Није уочена	107,188	2,852	101,598	112,778	1,822(1)	0,177
Уочена	112,489	4,640	103,395	121,584		
Тумор инфилтришући лимфоцити						
Нема	60,400	15,634	29,756	91,044	16,601(1)	<0,001
Има	113,661	3,019	107,743	119,579		
Пигмент у примарном тумору						
Нема	67,000	14,114	39,337	94,663	9,142(2)	0,010
Оскудан и умерен	108,359	3,896	100,723	115,996		
Изражен	116,611	4,753	107,295	125,928		
Микросателити						
Не	109,920	2,529	104,962	114,877	20,018(1)	<0,001
Да	59,571	6,844	46,158	72,985		
Лимфоваскуларна инвазија						
Не	109,822	2,599	104,728	114,915	2,574(1)	0,109
Да	95,168	8,572	78,367	111,969		
Перинеурална инвазија						
Не	109,235	2,542	104,523	114,217	0,933(1)	0,334
Да	9,0450	12,153	66,631	114,269		
Преегзистирајућа промена – невус						
Нема	108,792	2,684	103,532	114,052	0,023(1)	0,880
Има	106,913	6,521	94,131	119,694		

У Табели 30 приказани су резултати упоређивања статуса лимфног чвора стражара и преживљавања до удаљених метастаза. Уочена је статистички значајно дуже преживљавање код пацијената који су имали једанекстирпиран метастатски измењен лимфни чвор стражар. Дуже преживљавање је констатовано и код пацијената који су имали један дренажни лимфни басен у односу на оне који су имали два или више. Такође је уочено да је време преживљавања дуже код пацијената са локализацијом лимфног чвора стражара у

аксиларној регији што се подудара са дужим трогодишњим преживљавањем код пацијената који су имали примарни меланом на горњим екстремитетима. Време преживљавања до удаљених метастаза је на нивоу статистичког тренда било дуђе код пацијената са субкапсуларном локализацијом метастазе у лимфном чвору стражару. Није уочена статистичка значајност у дужини преживљавања до удаљених метастаза у односу на време између ексцизије примарног меланома и биопсије лимфног чвора стражара (Графикон 6).

Табела 30. Време преживљавања до удаљених метастаза у односу на статус лимфног чвора стражара

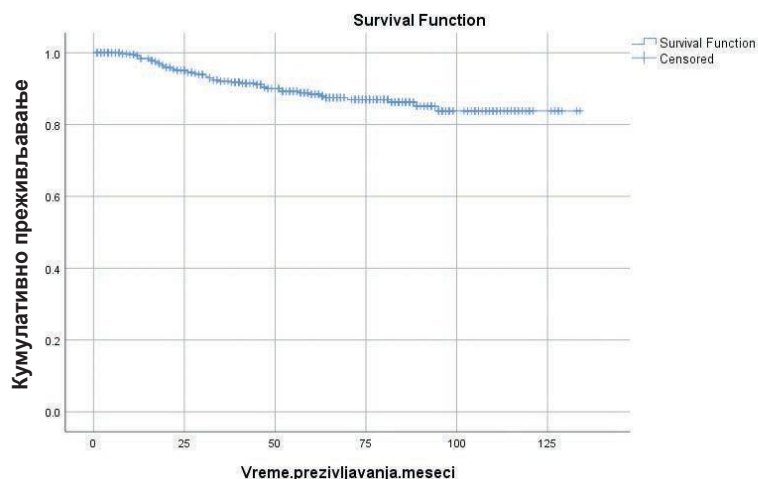
	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) (df)	P
			Доња граница	Горња граница		
Број СЛН						
1	113,621	3,052	107,638	119,603	8,190 (1)	0,004
>1	100,542	4,613	91,500	109,584		
Број СЛН басена						
1	109,212	2,683	103,954	114,469	0,210 (1)	0,647
2 и више	90,017	4,321	81,547	98,486		
Време до СЛНБ (недеље)						
до 6	104,221	3,638	97,090	111,352	0,096 (2)	0,963
6-12	107,988	3,686	100,764	115,212		
>12	109,859	7,730	94,707	125,010		
Локализација СЛН						
Врат	90,656	5,527	79,823	101,489	12,073 (2)	0,002
Аксила	115,677	3,240	109,325	122,028		
Ингвинум	106,566	4,778	97,202	115,930		
Локализација метастазе у СЛН (Dewar)						
Субкапсуларно	63,153	6,952	49,526	76,779	3,181 (2)	0,204
Мешовито + паренхимално	89,189	8,468	72,591	105,787		
Мултифокално + Субтотално	82,413	9,061	64,654	100,173		
Субкапсуларно	63,153	6,952	49,526	76,779	2,961 (1)	0,085
Остало	86,439	6,740	73,229	99,649		
Дијаметар метастазе у СЛН (Rotterdam)						
<0,1 мм	103,219	10,537	82,567	123,871	2,383 (2)	0,304
0,2–1,0 мм	72,923	7,923	57,393	88,452		
=>1,0 мм	77,229	6,885	63,734	90,724		



Графикон 6. Време до СЛН и преживљавање до удаљених метастаза

4.4.6. Време укупног преживљавања у односу на пол и клиничкопатолошке карактеристике примарног меланома

Медијана укупног преживљавања износила је $119,630 \pm 2,036$ недеља (95% CI 115,639 до 123,622) (графикон 7). Укупно преживљавање пацијената било је значајно дуже код женског пола са SSM и другим облицима ненодуларног меланома уколико је дебљина по Бреслоу била мања од 4 мм, са одсутном улцерацијом и бројем митоза до 5 по милиметру квадратном, као и код пацијената којима је констатовано присуство тумор инфилтришућих лимфоцита и изражен пигмент у примарном тумору, а одсутна лимфоваскуларна и перинеурална инвазија као и микросателити (Табела 29, Графикони 8 и 9). Није било статистички значајне разлике у односу на локализацију примарног меланома и присуство преегзистирајуће промене невууса (Табела 31).



Време (недеље), медијана	Стандардна грешка	95% интервал поверења	
		Доња граница	Горња граница
119,630	2,036	115,639	123,622

Графикон 7. Укупно преживљавање у укупној популацији пацијената

Табела 31. Укупно преживљавање и клиничкопатолошке карактеристике примарног тумора

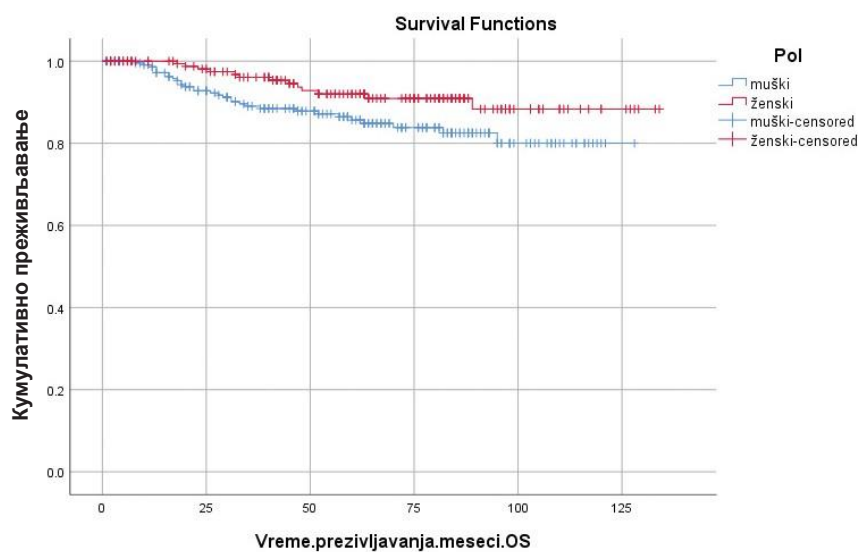
	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) Chi-square (df)	p	
			Доња граница	Горња граница			
Пол							
Мушки		111,135	2,790	105,666	116,603	4,374 (1)	0,036
Женски		124,258	2,607	119,149	129,367		
Старост (године)							
<40		123,278	3,862	115,708	130,848	1,326 (2)	0,515
41-60		113,284	3,011	107,382	119,186		
>61		117,242	3,376	110,625	123,859		
Локализација примарног тумора							
Глава и врат		106,756	5,431	96,112	117,401	3,285 (3)	0,350
Горњи екстремитети		123,529	4,473	114,763	132,296		
Труп		116,666	2,681	111,411	121,921		
Доњи екстремитети		117,285	4,265	108,926	125,644		
Клиничкопатолошки тип примарног меланома							
SSM		124,331	2,030	120,352	128,309	18,908 (2)	<0,001
НМ		92,875	4,647	83,786	101,984		
ЛМм+АЛМ+остало		104,587	6,482	91,882	17,292		

Ненодуларни	123,774	2,005	119,845	127,703	18,691 (1)	<0,001
Нодуларни	92,796	4,660	83,663	101,929		
Бреслоу категорије						
< од 1 мм	122,887	1,771	119,416	126,357	40,393 (2)	<0,001
од 1 мм–4 мм	124,877	2,443	120,089	129,664		
> 4 мм	96,195	5,101	86,198	106,192		
Улцерација						
Не	125,823	2,651	120,626	131,019	5,861 (1)	0,015
Да	110,386	2,578	105,333	115,440		
Број митоза						
Нема	116,709	5,273	106,373	127,045	14,647 (2)	0,001
од 1–5	119,097	2,013	115,153	123,042		
6 и више	88,808	4,277	80,425	97,191		
Регресија						
Није уочена	118,716	2,335	114,140	123,292	0,653 (1)	0,419
Уочена	119,125	3,821	111,636	126,614		
Тумор инфилтришући лимфоцити						
Нема	80,000	18,371	43,993	116,007	4,653 (1)	0,031
Има	121,058	2,460	116,237	125,880		
Пигмент у примарном тумору						
Нема	67,000	11,524	44,413	89,587	6,301 (2)	0,403
Оскудан и умерен	115,542	3,361	108,955	122,130		
Изражен	125,232	3,061	119,233	131,230		
Микросателити						
Не	119,683	2,051	115,662	123,704	0,053 (1)	0,817
Да	80,857	6,613	67,896	93,819		
Лимфоваскуларна инвазија						
Не	120,372	2,089	116,277	124,466	1,872 (1)	0,171
Да	107,764	7,754	92,566	122,961		
Перинеурална инвазија						
Не	119,801	2,063	115,757	123,846	0,377 (1)	0,539
Да	99,400	11,139	77,567	121,233		
Преегзистирајућа промена – невус						
Нема	119,782	2,075	115,716	123,848	0,251 (1)	0,616
Има	118,289	5,072	108,348	128,231		

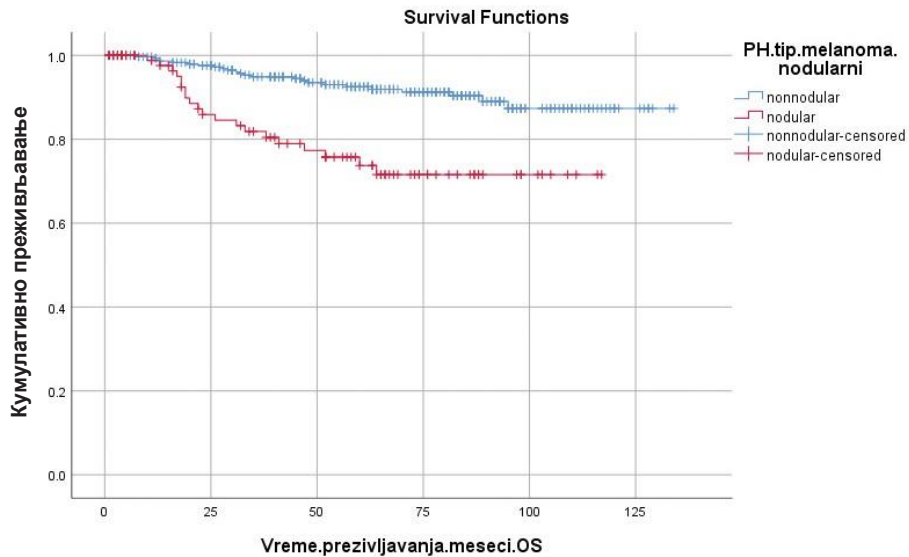
У односу на статус лимфног чвора укупно преживљавање било је дуже код пацијената са једним екстирпираним лимфним чвором стражаром у односу на пацијенте са више екстирпираних лимфних чворова стражара. Није било статистички значајне разлике у односу на број дренажних басена, локализацију басена, те локализацију као и дијаметар метастатског депозита у лимфном чвору стражару. Време од патохистолошке дијагнозе примарног меланома до биопсије лимфног чвора стражара није утицало на укупно преживљавање пацијената (Табела 32).

Табела 32. Време укупног преживљавања и статус лимфног чвора стражара

	Време (недеље)	Стандардна грешка	95% интервал поверења		Log-rank (Mantle-Cox) (df)	p
			Доња граница	Горња граница		
Број СЛН						
1	122,050	2,408	117,330	126,770	2,759 (1)	0,097
>1	115,547	3,430	108,825	122,270		
Број СЛН басена						
1	119,834	2,177	115,566	124,101	0,003 (1)	0,954
2 и више	97,465	3,696	90,221	104,710		
Време до СЛНБ (недеље)						
До 6	109,245	3,396	102,590	115,901	3,044 (2)	0,218
Од 6-12	122,637	2,611	117,519	127,754		
>12	122,688	5,003	112,881	132,494		
Локализација СЛН басена						
Врат	106,442	5,116	96,413	116,470	3,373 (2)	0,185
Аксила	122,094	2,581	117,035	127,153		
Ингвинум	119,652	3,666	112,467	126,836		
Локализација метастазе у СЛН (Dewar)						
Субкапсуларно	72,446	6,880	58,962	85,930	5,564 (2)	0,062
Мешовито + паренхимално	115,765	5,079	105,810	125,720		
Мултифокално + субтотално	92,287	9,163	74,327	110,247		
Субкапсуларно	72,446	6,880	58,962	85,930	2,178 (1)	0,140
Остало	103,478	6,609	90,523	116,432		
Дијаметар метастазе у СЛН (Rotterdam)						
<0,1 мм	103,219	10,537	82,567	123,871	0,756 (2)	0,685
0,2–1,0 мм	83,875	7,440	69,293	98,457		
=>1,0 мм	95,376	7,304	81,061	109,692		



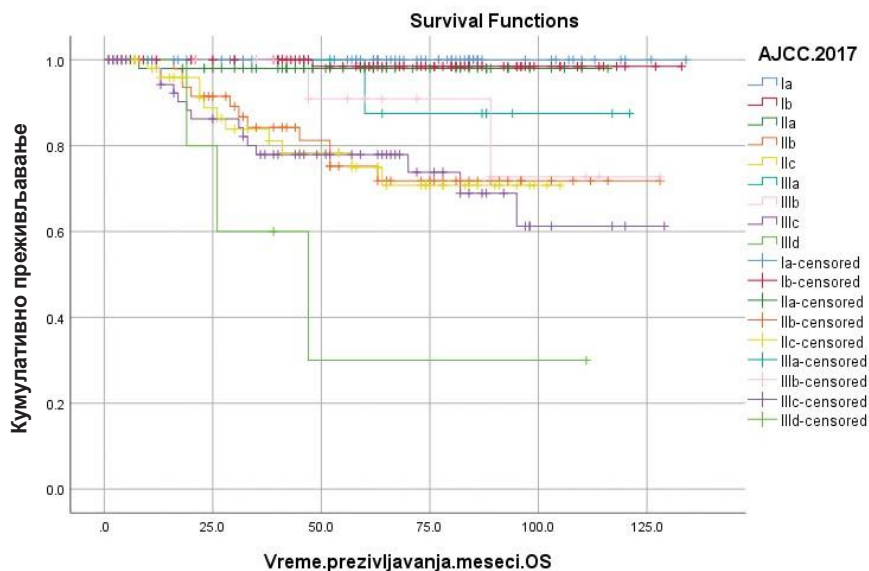
Графикон 8. Укупно преживљавање и пол пацијената



Графикон 9. Укупно преживљавање и клиничко-патолошки тип меланом, нодуларни vs. не-нодуларни меланом

4.4.7. Укупно преживљавање у односу на стадијум болести по АЈСС 2017 класификацији

Укупно преживљавање је било у корелацији са клиничким стадијумом на дијагнози, али имајући у виду медијану времена праћења од 33 месеца, није постигнуто више од 50% исхода, па медијана преживљавања није могла бити приказана, већ аритметичка средина, осим за стадијум IIIД (47 недеља, 95% CI 19-47). Средње време преживљавања за Ib стадијум је било 131,7 недеља, за IIc је било 84,5 недеља, а за IIIд 56,4 недеља (Графикон 10). Разлике у преживљавању биле су статистички високо значајне према *log-rank* тесту.



AJCC 2017	Број (N)	Број смртних исхода	Цензорисани (N)	Процент преживљавања	Средње време преживљавања (недеље)*	95% CI
Ia	67	0	67	100.0%	134	134,0–134,0
Ib	89	1	88	98.9%	131,7	129,1–134,4
IIa	56	1	55	98.2%	113,8	109,6–118,0
IIb	52	11	41	78.8%	102,3	89,2–115,4
IIc	56	11	45	80.4%	84,5	74,0–94,9
IIIa	10	1	9	90.0%	113,4	99,4–127,3
IIIb	14	2	12	85.7%	113,5	95,9–131,1
IIIc	61	14	47	77.0%	98,1	84,5–111,6
IIId	5	3	2	40.0%	56,4	20,3–92,5
Ukupno	410	44	366	89.3%	119,6	115,6–123,6

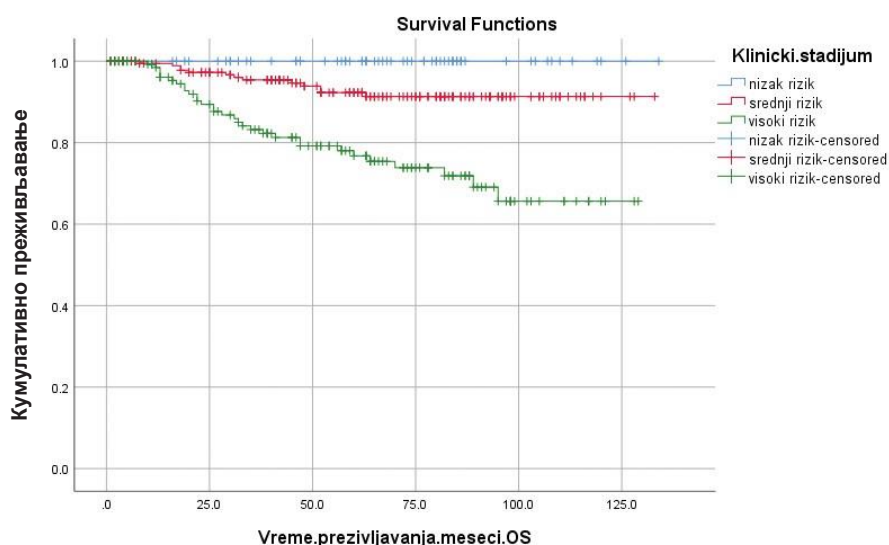
*Приказана је аритметичка средина јер медијана преживљавања није достигнута (осим за стадијум IIID).

	Chi-Square	Df	Sig.
LogRank (Mantel-Cox)	62.302	8	.000

Графикон 10. Укупно преживљавање и клинички стадијум болести на дијагнози

4.4.7. Укупно преживљавање у односу на прогностичке категорије локализованог меланом

У односу на прогнозу болести, локализовани инвазивни меланом стадијума IA има низак ризик за рецидив и прогресију болести, меланоми средњег ризика су стадијума IBIIA, а меланом у стадијуму IIB и IIC имају висок ризик за рецидив. У популацији пацијената из овог истраживања сви пацијенти са стадијумом IA били су живи након завршеног периода праћења, док је 93.4% пацијената са средњим ризиком и свега 78.6% пацијената са високоризичним меланомом било живо. Разлике у преживљавању биле су статистички високо значајне према *log-rank* тесту.



Клинички.стадијум	N	Број смртних исхода	Цензорисани (N)	Процент смртних исхода	Средње време преживљавања (недеље)*	95% CI
низак ризик	67	0	67	100.0%	134,000	134,0-134,0
средњи ризик	198	13	185	93.4%	124,606	120,2-128,9
високи ризик	145	31	114	78.6%	100,839	92,4-109,3
Укупно	410	44	366	89.3%	119,630	115,6-123,6

	Chi-Square	Df	Sig.
LogRank (Mantel-Cox)	32.812	2	.000

Графикон 11. Укупно преживљавање и прогностичке категорије примарног меланома

5. ДИСКУСИЈА

Хируршко лечење меланома у последњим деценијама обележиле су знатно селективније хируршке методе и развој много ефикаснијих системских облика лечења. У хируршком лечењу примарног меланома, ресекционе маргине су током година смањиване, а уместо елективне лимфонододисекције од деведесетих година прошлог века уведена је селективна лимфонододисекција, односно биопсија лимфног чвора стражара [74]. Имплементацијом биопсије лимфног чвора стражара (енгл. *sentinel lymph node biopsy*, СЛНБ) омогућено је прецизно одређивање клиничког стадијума. Овако одређен клинички стадијум пружа могућности за процену прогнозе болести као и за селекцију болесника који могу избећи комплетну дисекцију лимфног басена са последичним смањењем морбидитета. [75]

Посебан допринос савременој стратегији дала су истраживања везана за факторе ризика као и за прогностичке и предиктивне факторе за детекцију метастаза у лимфном чвору стражару и у несентинелским лимфним чворовима, што је био циљ и овог истраживања [76,77].

5.1. Степен детекције метастаза у лимфном чвору стражару и временски интервал између екцизионе биопсије и СЛНБ

Степен детекције СЛН у нашој групи испитаника (99.0%), специфичност методе (94.6%) као и налаз метастатског захватања СЛН (20.7%) у складу је са резултатима других студија [78, 79, 80, 81].

Временски интервал између екцизионе биопсије и биопсије сентинелског лимфног нодуса није јасно прецизиран, али је препоручен интервал до 6 недеља [82]. Према резултатима MSLT-1 (енгл. *multicenter selective lymphadenectomy trial-1*) која је обухватала 2483 пацијента, у којој је упоређиван проценат позитивних СЛН у зависности од тога да ли је биопсија СЛН рађена у периоду краћем или дужем од 30 дана, метастатске промене у СЛН су откривене у већем проценту у групи болесника где је СЛНБ рађена више од 30 дана након иницијане биопсије (30% vs 17.4%), али без утицаја на ток и исход болести [82].

У нашем истраживању, просечно време до СЛНБ је износило 55 дана. Статистички није утврђена повезаност између учесталости позитивних СЛН, тока и исхода болести са једне и периода (мање од 6, између 6 и 12 недеља и више од 12 недеља) до СЛНБ са друге стране, што наводе и други аутори [83, 84, 85]. Међутим наши резултати говоре у прилог томе да пацијенти којима је биопсија СЛН учињена након 12 недеља, имају процентуално највећи број позитивних лимфних чворова, што је описано и другим студијама [82, 86]. Такође се време дуже од 6 недеља између биопсије СЛН и комплетне лимфонододисекције повезује са већом стопом детекције метастаза у несентинелским лимфним чворовима, што није био случај у овом истраживању [86].

Метода двоструког обележавања у складу са препорукама протокола EANM извођена је у раном периоду успостављања ове процедуре и достизања пика криве учења у нашој установи у укупно 83 (20,2%) болесника. У овом истраживању није показана разлика у стопи интраоперативне детекције СЛН између групе пацијената са двоструким обележавањем и групе у којој је витална плава боја изостављена из процедуре ($p > 0,05$). Ови резултати су у складу са објављеним резултатима који сугеришу да плава боја није имала додатни утицај на детекцију лимфног чвора стражара и да се може безбедно изоставити из стандардизоване процедуре [87, 88]. Упркос позитивној сцинтиграфској визуелизацији СЛН гама камером, интраоперативном гама сондом код 4 (0,9%) пацијента није детектован СЛН. Дренажни лимфни басени су код 2 пацијента били на врату, а код преостала два у пазушној јами. Код одређеног броја пацијената је сцинтиграфијом детектовано више од једног

СЛН, те је код 40% пацијената и интраоперативно детектовано и екстирпирано више од једног СЛН, просечно 1,6 чворова по пацијенту, што се уклапа са резултатима истраживања других аутора, у којима су екстирпирани и остали чворови стражари који су емитовали више од 10% импулса у односу на уклоњени чвор који најјаче везује радиофармак и одашиље најјачи сигнал које бележи ручна сонда *Gama probe* [90].

5.2. Клиничко-патолошке карактеристике испитаника у студији

У ово десетогодишње истраживање (2010.-2020. године), укључено је 410 пацијената, 235 (57,3%) мушког пола и 175 (42,7%) женског пола, од којих је њих 92 (22,4%) било млађе од 40 година. У претходним студијама у популацији млађој од 40 година било више откривених меланома код особа женског пола, што је разлика у односу на наше истраживање [91, 92].

Најзаступљенији клиничкопатолошки тип меланома је био површно ширећи тип и то код 68,8% испитаника. У једној студији је показано да је код великог броја површно ширећег меланома хистопатолошки уочена преегзистирајућа промена, тј. невус [91]. У нашој студији је преегзистирајућа промена уочена код 31 (7,6%) испитаника, а код њих 20 (69%) је хистопатолошки тип меланома био SSM, што се поклапа са подацима из поменуто студије [92].

Код 63,7% наших испитаника уочена је улцерација у примарном меланому, а њих 160 (39%) су били старији од 60 година. Улцерација је чешће била испољена код старијих пацијената што је у складу са наводима из литературе према којем је улцерација у примарном меланому била присутна у 61,25% пацијената старијих од 60 година [93].

У нашој популацији испитаника код 60% је број митоза у примарном меланому износио од 1-5 по квадратном мм, док је број митоза већи од 6/мм² чешћи код пацијената мушког пола (59%) у односу на женски пол, што је слично као у другим студијама [94]. Анализом тумор инфилтришућих лимфоцита (ТИЛ), односно њиховог присуства у примарном меланому у 97% случајева, потврђена је њихова велика улога у прогнози тока и исхода болести [54].

Средња дебљина примарног меланома по Бреслоу износила је 1,97 мм (0,07–25 мм). Код 114 пацијената (28,1%) дебљина је била већа од 4 мм, а свега 102 (25,1%) је било тање од 1 мм. Поређење дебљине по Бреслоу са вредностима из ретроспективне студије из 2017. године на 869 пацијената [95] говори у прилог томе да су се наши испитаници касније јављали лекару и започињали хируршко лечење. У студији из 2017. године просечна дебљина по Бреслоу била је 1,2 мм, у 36,4% случајева тумор био тањи од 1 мм, а само у у 10,6% случајева дебљи од 4 мм [95].

Код наших испитаника регресија у примарном меланому је уочена у 16,1% случајева, што се поклапа са подацима из других студија који указују на то да се код 10-35% од свих меланома констатује присуство регресије [96]. Литературни подаци о корелацији између регресије примарног меланома, локализације и дебљине по Бреслоу и присуства улцерације, указују да су меланоми са регресијом били претежно на трупу ($p=0,006$), значајно тањи ($p<0,0000$) и ређе улцерисани ($p=0,003$) него тумори без регресије. [97].

Хистопатолошка грађа примарног меланома се разликовала и по типу ћелија. Заступљене су биле вретенасте, епителоидне, невоидне и мештовите. Најзаступљеније ћелије од којих је грађен примарни меланом биле су епителоидне (53%) као и код других аутора. Амеланотичних меланома у нашој студији је било 2,5%, као и у другим студијама које наводе заступљеност мању од 5% [98].

Меланоми се разликују и према преобладајућој фази раста у којој се тумор налази (радијални *vs.* вертикални раст) [99]. Површинско ширећи меланом и нодуларни меланом испољавају различит тип раста. Радијални тип раста карактеристичан је за површно ширећи, а одсутан у нодуларном меланому, и веома је значајан за класификацију. Према линеарном моделу прогресије малигни меланоцити се шире радијално да

би се касније инвазија одвијала вертикалним растом који се дефинише као фокална формација дермалног нодула у радијалној фази раста. [53,54]. У нашем истраживању је вертикална фаза раста била заступљена код 78,9% примарних меланома, без статистичког значаја у односу на пол и старост пацијената. За разлику од наших резултата, студија која је истраживала брзину и начин раста туморских ћелија, наводи приближно 45% примарних меланома у радијалној фази раста; свега 10% у вертикалној фази раста, а који су окарактерисани као нодуларни или амеланотични меланоми, док преосталих 45% имају радијану фазу раста са туморским чвором који је у вертикалној фази раста [100]. Ове разлике такође упућују на каснију дијагнозу меланома у нашој популацији. Према студији Бети и сарадника није постојала сигнификантна разлика у типу ћелијског раста у односу на пола и старост болесника, што су показали и наши резултати [100]. Исти аутори наводе сигнификантну повезаност вертикалне фазе раста површно ширећег меланома са дебљином меланома и бројем митоза по мм² као независним фактором повезаним са прогнозом болесника [100]. У нашој студији је код меланома са вертикалном фазом раста дебљина по Бреслоу између 1 мм и 4 мм била најзаступљенија, као и број митоза између 1-5 по мм², док је више од 50% свих површно ширећих меланома имало истовремено вертикалну фазу раста и присуство митоза што је у складу са резултатима претходно наведене студије [101].

У нашој групи испитаника локализација примарног меланома била је најчесталија на трупку, код 172 (42,0%) пацијента, а најређа на горњим екстремитетима, код 16,3% испитаника. Претходни подаци о локализацији примарног тумора као фактору ризика за појаву регионалних метастаза заправо пружају опречне закључке [102]. Од навода о сигнификатној повезаности трупа као локализације примарног меланома и СЛН метастаза [103] до података о бољој прогнози, сигнификатно нижој позитивности СЛН и тенденцији тањег примарног тумора код меланома горњих екстремитета [104]. Ове разлике се могу делимично објаснити чињеницом да пацијенти раније уочавају промену јер је доступнија прегледу, те се и раније јављају лекару [104].

Многобројне студије су посебну пажњу посветиле истраживању степена детекције СЛН код пацијената са примарним меланомом у регији главе и врата. Показано је да због сложености лимфног басена у регији врата постоји повећан ризик за неуспешну интраоперативну детекцију СЛН [105]. У истраживању де Роса и сарадника, на основу анализе 3442 пацијента из 32 студије показано је да је степен детекције СЛН 95,2% за меланоме главе и врата, те да је повећана стопа лажно негативних СЛН (медијана 20,4%) у поређењу са другим локализацијама примарног меланома. Метастатски измењен СЛН нађен је у 15% случајева док је медијана дебљине по Бреслоу била 2,53 мм [104]. У нашем истраживању било је укупно 67 (16%) пацијената са примарним меланомом у регији главе и врата, од којих код 2 пацијента није интраоперативно детектован СЛН, те је степен детекције био 97%. Од укупног броја који је статистички обрађен (N=65) код 16 (24,5%) пацијената СЛН је био метастатски измењен, медијана дебљине по Бреслоу била је 2,36 мм, док је код само 5 пацијената (10,2%) добијен лажно негативан налаз, што указује на бољу тачност и сензитивност методе детекције СЛН у односу на горе поменути студију.

Акрални меланом показује значајне разлике у односу на друге клиничке типове, с обзиром на биолошке, генетске и клиничко-патолошке аспекте. У нашој студији, акрална локализација била је снажан предиктор за појаву метастаза у, што је највероватније уско повезано са дебљином акралних меланома (медијана дебљине по Бреслоу је била 3,0 мм према 1,8 мм за неакралне меланоме) као што је показано и у претходним студијама [105, 106].

5.3. Лимфосцинтиграфске карактеристике испитаника у студији

Лимфосцинтиграфски је дренажа према једном лимфном басену детектована у 84,5% испитаника. Мултипла дренажа према два и више басена углавом је била присутна код пацијената са меланомом у регији група. Од њих 58, само се у четири случаја (6.8%) примарни меланом дренирао према три лимфна басена. Није уочена сигнификантна корелација између позитивности СЛН и броја дренажних басена. Иако у литератури постоје подаци о мултиплој лимфној дренази као независном предиктору статуса лимфног чвора стражара СЛН и тока болести [107] наши резултати су у складу са другим студијама које налазе сигнификантну везу између броја дренажних басена и позитивности СЛН [108, 109]

Укупан број екстирпираних лимфних нодуса у нашој групи испитаника износио је 666, од тога по један СЛН код 242 (60%) оболела, а два и више нодуса у преосталих 40% случајева. Број СЛН уклоњених током операције био корелацији са позитивношћу СЛН ($p=0.001$). За разлику од студије Бертолија и сарадника из 2019. године, [110] којом је утврђена статистички значајна повезаност броја позитивних СЛН са метастатским захватањем не-сентинелских лимфних нодуса, то овим истраживањем није показано.

5.4. Фактори ризика за појаву метастаза у лимфном чвору стражару

У нашем истраживању метастазе су нађене су код 20,7% (84/406) пацијената, а сигнификатна повезаност са позитивним СЛН показана је за пол, хистопатолошки тип примарног меланома, дебљину меланома по Бреслоу, присуство улцерације, број митоза, присуство пигмента, тумор инфилтришућих лимфоцита, лимфоваскуларне инвазије, микросателита и перинеуралне инвазије.

Мушки пол је био значајно чешће удружен са позитивним СЛН у односу на женски пол. У нашој групи испитаника, од укупног броја пацијената (25,4%) са примарним меланомом тањим од 1 мм, метастазе су биле присутне двостуко чешће код мушкараца него код жена (14% vs. 7%). Супротно томе неким истраживањима показано да је код танких меланома позитиван СЛН био чешћи код женског пола [111].

Дебљина меланома по Бреслоу је свакако до сада најчешће идентификован предиктивни фактор за појаву метастаза у лимфном чвору стражару, што се поклапа са резултатима других студија, које позитиван СЛН и дебљину меланома >4 мм означавају као факторе подједнако високог ризика за лошу прогнозу тока и исхода болести [112].

Медијана броја митоза у нашем истраживању је била $4/\text{мм}^2$ код позитивних СЛН односно $2/\text{мм}^2$ код негативних СЛН. Други аутори нису издвојили број митоза као независни предиктивни фактор за појаву метастаза у СЛН код меланома дебљих од 1 мм, док се код тањих једино уочава корелација са дебљином по Бреслоу, али не и са појавом метастаза у СЛН [112, 113, 114].

У нашој студији присуство тумор инфилтришућих лимфоцита и микросателита у примарном меланому било је сигнификантно повезано са статусом лимфног чвора стражара ($p<0,05$). Истраживање Азимија и сар. из 2012. [115] коришћењем МИА (меланом инхибиторна активност) система бодовања показало је да је присуство тумор инфилтришућих лимфоцита (ТИЛ) у примарном меланому било обрнуто повезано са позитивношћу СЛН, и означено је као независни фактор повезан са преживљавањем без болести (DFS). [116]. Све ово указује на то да је присуство ТИЛ одражава израженији имунски одговор домаћина на тумор и стога је повезано са бољом прогнозом, током и исходом болести. Мета-анализом 41 објављене студије о ТИЛ у меланому показано је да је присуство ТИЛ било значајно повезано са побољшаним укупним преживљавањем (OS) [117].

У нашем истраживању присуство лимфоваскуларне инвазије у примарном меланому било је на нивоу високе статистичке значајности ($p<0,001$), док је добијена вредност за перинеуралну инвазију на граници статистичке значајности ($p=0.048$).

Присуство улцерације у примарном меланому је значајан предиктивни фактор за појаву метастаза у СЛН [118] што је потврђено и у нашем истраживању. У неким студијама је доказано да је присуство улцерације код пацијената са лажно негативним СЛН било у корелацији са прогресијом болести и да ови пацијенти имају већи ризик за рецидив у односу на оне који немају улцерацију, иако је СЛН негативан [119]. У нашем истраживању, 11 од 18 пацијената са лажно негативним СЛН имало је улцерисан примарни меланом, али то није било статистички значајно у односу на укупну групу пацијената.

Присуство метастаза у СЛН доказано је у 20.7 % (84/406) испитаника. Мерено према Ротердам критеријуму метастатски депозит већи од 1 мм нађен у 63,3% случајева. Депозит мањи од 0,1 мм је карактерисан као субмикрометастаза који према наводима аутора [47,48] може указивати на бољу прогнозу болести био је заступљен код 11,6% испитаника.

Методом бинарне логистичке регресије испитали смо бројне клиничко-патолошке факторе који су могли бити предиктори за присуство метастазе у СЛН. Према униваријатној анализи, идентификовани су дебљина меланома по Бреслоу, мушки пол, хистолошки тип нодуларног меланома, присуство улцерација и акралну локализацију као значајне предикторе метастатског захватања лимфног чвора стражара ($p < 0,05$), у складу са резултатима других аутора. [120].

Дијагноза нодуларног меланома је била у корелацији са појавом метастаза у СЛН, повећавајући 3.87 пута вероватноћу за позитиван СЛН ($OR = 3,87, 2,22-6,73, CI = 95\%$). Ови налази су у складу са подацима Хо-молака и сар. [40] и Бертолија и сар. [121] који такође наводе повећан ризик од метастаза у лимфном чвору стражару код пацијената са примарним нодуларним меланомом. Међутим, мултиваријантном анализом ова се повезаност губи, вероватно због утицаја придруженог фактора дебљине тумора по Бреслоу, која је била већа код нодуларних меланома.

Код трећине позитивних СЛН у примарном меланому је било више од 6 митоза по квадратном милиметру, али није било разлике између мушког и женског пола у процентима заступљености више од 6 митоза, иако неке студије указују на већи митотски индекс код мушког пола [122].

5.5. Фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима

До 2017. године комплетна дисекција дренажујућег басена била је индикована код свих пацијената са метастатски измењеним СЛН. Међутим, три значајна, рандомизована контролисана испитивања - Мултицентрична селективна студија лимфаденектомије I (MSLT-I), Испитивање селективне лимфаденектомије Немачке дерматоонколошке групе (DeCOG-SLT) и Мултицентрична селективна студија лимфаденектомије II (MSLT-II) анализирале су реevalуирале утицај и улогу комплетне лимфонододисекције дренажног басена након позитивног СЛН. [41]. MSLT I студија је потврдила улогу биопсије СЛН у одређивању прогнозе код пацијената са меланомом, те побољшану регионалну контролу болести. СЛНБ не продужава укупно преживљавање, али продужава преживљавање без болести, поготово код пацијената са меланомима средње дебљине по Бреслоу. У другим два проспективним студијама DeCOG-SLT и MSLT II, процењивано је да ли комплетна лимфонододисекција након детектованог позитивног СЛН продужава преживљавање пацијената са меланомом. Утврђено је да не постоји разлика у преживљавању између пацијената код којих је учињена дисекција и оних код којих није учињена дисекција. На основу ових резултата, после детекције метастазе у лимфном чвору стражару, индиковани су редовни ултразвучни прегледи лимфних басена, а дисекција је индикована само у случају појаве евидентних метастаза клиничким и ултразвучним прегледом. Исте године публиковане су студије које указују на значајан ефекат адјувантне имуноterapiје и таргет терапије у стадијуму III укључујући и оне код којих су метастазе детектоване коришћењем СЛНБ. На основу ових

сазнања, већина европских центара је напустила дисекцију дренажног лимфног басена, а увела редовне ултразвучне контроле и адјувантну терапију као стандард у лечењу III клиничког стадијума. Ипак, у ситуацији када адјувантна терапија није доступна, и узимајући у обзир чињеницу да комплетна дисекција лимфног басена утиче на локалну контролу болести, као и да адјувантна терапија није ефикасна код свих пацијената, било би значајно детектовати групу пацијената код којих би дисекција лимфног басена била и даље корисна, а то је група оних пацијената код којих се у дисекату детектују метастатски измењени не-сентинелски лимфни чворови, што је и један од главних циљева овог истраживања. Идентификовање фактора ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима допринело би одабиру најбоље терапијске опције након идентификовања метастазе у сентинелском лимфном чвору биопсијом и омогућило избегавање ове процедуре код пацијената са ниским ризиком. Лимфни чворови који заостају у дренажном басену након СЛНБ названи су у свим истраживањима не-сентинелски лимфни чворови (НСЛН). Резултатима бројних истраживања о утицају клиничко-патолошких параметара примарног меланома, као и имуноморфолошких параметара у СЛН на појаву метастаза НСЛН, изведени су многобројни закључци и у клиничку праксу уведени предиктивни фактори као даље смернице за одлуку о лечењу [41].

У досадашњим студијама као фактори ризика за појаву метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима након дисекције тестирани су различити хистопатолошки и морфолошки параметри примарног меланома, параметри микросредине лимфног чвора стражара, као и експресија различитих параметара имунског одговора на тумор, али се подаци разликују. Нашим истраживањем, анализирана је корелација клиничкопатолошких карактеристика примарног меланома, статуса лимфног чвора стражара, статуса не-сентинелских лимфних чворова, тока и исхода болести.

Комплетна дисекција дренирајућег басена учињена је у 81 од 84 болесника са позитивним СЛН. У 33,1% (n=26) случајева су идентификоване метастазе у НСЛН што је нешто више од 8%-27%, као што наводе други аутори, али треба имати у виду да су поменуте студије рађене на далеко већем броју болесника и да је у нашем истраживању било знатно више меланома дебљих од 4 мм и са присутном улцерацијом [110, 125, 126, 127, 128]. Студијом *Фариес* и сар. из 2017. године [129] у истраживању у које је било укључено скоро 2000 пацијената са меланомом средње дебљине по Бреслоу (1,2 до 3,5 мм), метастатски захваћени несентинелски лимфни чворови нађени су у 11,5% случајева те су представљали фактор ризика за прогресију болести. Други аутори наводе податке о нешто вишем проценту позитивних несентинелских лимфних чворова. Комплетна дисекција дренажног басена, односно несентинелских лимфних чворова омогућавала је прецизно одређивање стадијума болести код 12%-25% пацијената којима су детектоване метастазе у несентинелским лимфним чворовима, утичући на промену N стадијума код 19% пацијената, док је само у 5%-6% мењала клинички стадијум према АЈСС класификацији. [130,131].

У нашој студији 44% (n=37) испитаника је имало више од једног екстирпираниог СЛН, од којих је код 26,2% (n=22) имало више од једног позитивног СЛН, а позитиван НСЛН нађен је код 72,7% (16/22) случајева. Код више од половине (n=13) ових болесника је каснијим праћењем утврђена прогресија болести. Постоје студије које показују да пацијенти са више позитивних лимфних чворова стражара имају већи ризик да су и несентинелски лимфни чворови позитивни у поређењу са пацијентима који имају само један позитиван СЛН [133]. Такође је утврђено је да пацијенти са једним позитивним СЛН имају боље преживљавање од пацијената са вишеструким позитивним чворовима ($p < 0,012$).

Иако је учесталост позитивних НСЛН већа код пацијената са више од једног позитивног СЛН, комплетна лимфонододисекција неће побољшати преживљавање без болести [123]. Насупрот томе, само једна ретроспективна студија открила је да је лимфонододисекција повезан са побољшаним специфичним преживљавањем [124].

У нашем истраживању утврђена је статистички значајна повезаност између меланома на преегзистирајућем невусу и метастаза у НСЛН. Тип ћелија које граде примарни меланом такође је био значајно повезан

на позитивним НСЛН. Медијана дебљине тумора по Бреслоу била је већа код пацијената са местама у НСЛН у односу на оне без метастаза у НСЛН (4.8 мм vs. 4.2 мм) Ова разлика није била статистички значајна већ на нивоу тренда ($p=0.079$). Утврђено је да нема статистичке значајности у статусу не-сентинелских лимфних чворова у односу на пол, узраст, локализацију примарног тумора, хистопатолошки тип, присуство улцерације и број митоза. Позитиван НСЛН је у нашој групи болесника био најчешћи у болесника код којих је учињена комплетна лимфонододисекција ингвиналног басена, идентификован код 12 (46%) од свих позитивних несентинелских басена. У другим студијама ова корелација није испитивана.

Такође није било статистички значајне разлике између позитивности НСЛН у односу на временски интервал ексцизионе биопсије и СЛНБ. У нашој студији је код 51 пацијента СЛНБ учињена након више од 12 недеља, позитиван СЛН је нађен у 12 (23,5%), а позитиван НСЛН у 4 (33,3%) случаја. Студијом *Рихтиг и сар.* из 2020. године нађена је позитивност НСЛН мања од 9,1% у групи пацијената где је време између ексцизионе биопсије и СЛНБ краће од 43 дана, да би у свих пацијената ($n=22$) био нађен позитиван НСЛН ако је временски интервал између две процедуре био већи од 80 дана. Аутори су сходно наведеном разматрали оптимални период између ове две процедуре [125].

5.6. Параметри оптерећења тумором у лимфном чвору стражару као предиктивни фактор за појаву метастаза у НСЛН

Према досадашњим студијама, на статус НСЛН утицало је туморско оптерећење СЛН дефинисано са неколико различитих параметара: одређивање прецизне локализације, мерење дијаметра и удаљеност од капсуле метастатског фокуса.

Нашим истраживањем добијена је сигнификантна повезаност микроанатомске локализације метастазе у СЛН и позитивности НСЛН ($p=0.019$). Наиме, позитиван СЛН постојао је само код 23.1% случајева субкапсуларне локализације што је у складу са литературним подацима. [132]. Дијаметар метастазе већи од 1 мм, такође је био у позитивној корелацији са присуством метастаза у НСЛН, док дубина инвазије, односно, удаљеност од капсуле није била значајан предиктор за појаву метастазе у НСЛН као што наводе и други аутори [132]. Студијом ван Акои и сарадника (2006) указано је да се суб-микрометастаза (дијаметар мањи од 0,1 мм по Ротердам класификацији) у СЛН, може третирати као негативан СЛН, односно "не-III клинички стадијум". На овај начин могу се селектовати пацијенти којима даље хируршко лечење неће продужити ни период без болести ни укупно преживљавање, па им се комплетна лимфонододисекција не препоручује [133].

У неким од других студија, показано је да дубина инвазије има бољу предиктивну вредност за додатне метастазе у лимфним чворовима него класификације на основу пречника метастазе [44], што није био случај у овом истраживању.

Пре десет година објављено је и истраживање поређења 3 микроморфометријске класификације позитивног СЛН на појаву метастаза у несентинелским лимфним чворовима. [72]. Упореджени су параметри дубине инвазије, величине метастазе и локације метастазе. Ови параметри су међусобно комбиновани и разврставани у категорије, а у циљу процене повољности за петогодишње преживљавање. Доказано је да је петогодишње преживљавање у категорији најповољнијег пречника било 100% у поређењу са 83% у категорији локализације, потребно је напоменути да пацијенти са само перенхимском локализацијом нису били укључени. Ова студија показује да пацијенти са само једним позитивним СЛН и пречником или дубином инвазије до 0,4мм могу бити поштеђени комплетне дисекције несентинелских лимфних чворова. [134].

Упоредживање или комбиновање резултата из различитих извора 3 микроморфометријске класификације је тешко јер су већина студија ретроспективне и тичу се малог броја пацијената. Осим тога коришћени су различити протоколи патохистолошког прегледа СЛН. Број секција и нивои на којима су пресечени делови

в СЛН разликовали су се међу истраживачима. Неки истраживачи су користили бојење хематоксилином и еозином, а други су додали имунохистохемијско бојење и на сентинел чворове и на несентинелске лимфне чворове. Мерење дубине или пречника инвазије у случају вишеструких туморских лезија или лезија које су веома удаљене је описано као компликовано [124]. Недостатак ове студије је то што поступно сечење и имунохистохемијско бојење није урађено на чворовима узетим из узорка дисекције. Ово је можда изазвало потцењивање броја додатних укључених чворова. Такође, неуспех пронаћи додатну болест у другим чворовима не значи нужно да је одсутна и проналажење додатне болести не мора нужно да значи да је ово клинички релевантно.

5.7. Имунолошки параметри у метстатском лимфном у лимфном чвору стражару као предиктивни фактор за појаву метастаза у НСЛН

У овом истраживању испитивана је и експресија молекула имунског одговора на тумор у лимфном чвору стражару, експримираних на лимфоцитима – CD4, CD8, FoxP3, IDO и PD-L1. У студији колега из Аустралије из 2015. године, откривено је да присуство високих интратуморалних CD4+ помоћних Т ћелија и CD8+ цитотоксичних Т ћелија у позитивном СЛН утиче на дуже преживљавање без рецидива и на укупно преживљавање. Прекомерна експресија FOXP3+ регулаторних Т ћелија у метстатском СЛН инхибира функцију инфилтришућих помоћних CD4+ лимфоцита и CD8+ цитотоксичних лимфоцита и корелила са краћим временом без релапса и краћим укупним преживљавањем. Експресија PD-L1 у метстатском СЛН указује на оправданост примене примене адјувантне терапије инхибиторима анти-PD-L1 у IIIА клиничком стадијуму [73].

Користећи непараметарску анализу, пацијенти са позитивном експресијом тумора PD-L1 имали су већи дијаметар метастатског фокуса тумора у СЛН ($p=0,005$), што је случај и у нашем истраживању где је код 64% испитаника дијаметар био већи од 1 мм. У истом истраживању није било статистичке значајности између интензитета експресије PD-L1 и пола, узраста, броја позитивних СЛН, дебљине по Бреслоу и улцерације у примарном меланому.

У нашем истраживању анализа имунолошких параметара указала је на то да је интратуморска експресија CD4 на лимфоцитима повезана са налазом метастатског депозита у не-сентинелским чворовима. Висока интратуморска експресија CD4 нађена је код 86,7% пацијената са позитивним не-сентинелским чворовима за разлику од негативних где је висока интратуморска експресија CD4 нађена код 43,8% ($p=0,013$). Такође, постоји тренд високе интратуморске експресије CD8 код пацијената код којих је нађена метастаза у не-сентинелским лимфним чворовима ($p=0,081$). И експресија IDO-а била је чешћа код пацијената код којих је постојала метастаза у не-сентинелским чворовима 73,3% vs. 43,8%, ($p=0,095$). Пацијенти који имају експресију тј позитивне реакције на CD4, CD8 и IDO, чешће имају метастатски измењене не-сентинелске чворове.

Није било разлике у експресији FoxP3 и PD-L1 молекула у лимфном чвору стражару између група пацијената са и без метастаза у не-сентинелским чворовима.

5.8. Скорирање процена ризика постојања метастаза у НСЛН

Murali и коаутори (2010) су на основу свог истраживања код 309 пацијената са позитивним СЛН одредили N-SNORE (енгл. *non-sentinel node risk score*) скор којим се може проценити ризик од појаве метастаза у НСЛН, а на основу претходно познатих клиничкопатолошких параметара примарног меланома и параметара

метастатски измењеног СЛН. Скор је одређен на основу пет компоненти следећим системом бодовања: пол пацијената (женско 0, мушко 1), присуство регресије у примарном меланому (одсутна 0, присутна 2), проценат позитивних СЛН (<50%: 0; >50%: 2) присуство перинодалне лимфне инвазије (одсутна 0, присутна 3), максимални промер највећег депозита (<0.50 мм: 0; .051-2.0 мм: 1; 2.01-10 мм: 2; >10 мм: 3). Скор максимално може имати вредност 11. [49] Након ове публикације, Сацгер и сар. 14 анализирали су N-SNORE код 180 СЛН позитивних пацијената. Њихови резултати су били у складу са онима Муралија и сар. Студијом *Vevers и сар.* презентован је нешто измењени N-SNORE систем бодовања, али је за ограничење ове студије представљало одсуство испитаника са перинодалном лимфном инвазијом (3 од 11 поена) што би могло умањити предиктивну вредност наведеног скорa.

У ретроспективној студији *Feldmann и сар.* показано је да измењени N-SNORE јасно корелира са повећаним ризиком за налаз позитивних не-сентинелских лимфних чворова ($p < 0.025$), иако је коефицијент контингенције показао само умерену корелацију (0.322). Ови резултати показали су да је N-SNORE веома користан за процену ризика појаве метастаза у несентинелским чворовима односно селекцију пацијената са ниским ризиком.

Један од циљева овог истраживања био је да се према узору на N-SNORE и друге скорове дефинише класификациона схема која указује на постојање метастазе у не-сентинелском лимфном чвору. Међутим, због нумеричког ограничења броја доступних испитаника са исходима од интереса и вредностима потенцијалних предиктора то није било могуће. Услед малог узорка и велике стандардне грешке добијени резултати не би могли да представљају популацију из које потичу.

5.9. Анализа тока болести, времена преживљавања и исхода у односу на клиничко-патолошке карактеристике примарног меланома, статус лимфног чвора стражара и статус не-сентинелских лимфних чворова

Укупно преживљавање (енгл. *overall survival, OS*). У нашој студији медијана укупног преживљавања износила је $119,630 \pm 2,036$ недеља (95% CI, 115,639 до 123,622). Према АЈСС бази података за стадирање меланома, петогодишње и десетогодишње стопе преживљавања биле су 97% и 93%, за T1aN0M0 и 53% и 39% за меланоме T4bN0M0. Петогодишње преживљавање стадијума III било је 78%, 59% и 40% за стадијум IIIA, IIIB и IIIC меланома. У случају удаљених метастаза, једногодишње преживљавање за стадијум IV је било 62% за M1a, 53% за M1b и 33% за M1c меланоме. Поред тога, укупно преживљавање пацијената у стадијуму IV разликовало се у зависности од места метастаза. Пацијенти са метастазама у ЦНС-у су имали најлошију прогнозу, неколико пута лошију него пацијенти са метастазама на плућима. У једној студији спроведеној у Шведској, стопе петогодишњег преживљавања износиле су 91,4% за стадијум I, 61,8% за стадијум II, 56,9% за стадијум III и 24,6% за стадијум IV.

У нашем истраживању током периода праћења (медијана 33 месеца) средње време преживљавања износило је 134 недеље за стадијум IA, 84.49 недеља за стадијум IIC, док су за стадијуме IIIA, IIIB, IIIC, биле 113,3; 113.5, 98,1 и свега 56,4 недеље за стадијум IIID. Укупно је било 13,4% пацијената који су прогредирали у IV клинички стадијум, а више од 50% ових пацијената имали су детектоване метастазе у лимфном чвору стражару. Са друге стране, скоро половина пацијената код којих је СЛН био негативан, развило је удаљене метастазе, услед хематогене, а не лимфогене дисеминације.

Међусобно комбиновање параметара микроморфометријске класификације позитивног СЛН и клиничко патолошких карактеристика примарног меланома било је предмет бројних студија, које су имале за циљ идентификовање предиктора тока и исхода болести. Примарни меланом дебљи од 2 мм, присуство улцерације,

више од једног лимфног чвора стражара, највећи метастатски фокус > 1 мм или локација фокуса мултифокално/паренхимско, број позитивних СЛН, идентификовани су као најснажнији предиктори тока и исхода болести [136].

Резултати ове студије су у великој мери у складу са претходно објављеном литературом. У овом истраживању учињена је анализа тока и исхода болести у односу на клиничко-патолошке параметре и статус у метастатски измењеном лимфном чвору стражару, као и односу на статус у не-сентинелским лимфним чворовима. Од укупног броја испитаника у нашој студији (N=410), 10,7% је преминуло, од тога је било 70,5% пацијената мушког пола узраста од 13 до 89 година, а код трећине пацијената локализација примарног тумора била је на трупу. У једној студији спроведеној у Шпанији уочено је да упркос већој учесталости међу женама, стопа смртности је већа код мушкараца. Такође се наводи да је меланом код мушкараца у овој групи био чешћи на трупу и дијагностикован у каснијој доби што се подудара са нашим истраживањем [137]. У другим студијама показано је да су меланоми на трупу, горњим и доњим удовима повезани са нешто бољим прогнозама у поређењу са меланомима у регији главе и врата [138]. У нашем истраживању није показало као статистички значајна разлика у преживљавању у односу на локализацију примарног меланома. Код 15% пацијента примарни меланом био на горњим екстремитетима, од тога је код 11% (N=7) СЛН био позитиван, а само један пацијент је имао прогресију болести, и време преживљавања му је тренутно дуже од 5 година.

Слично налазима других истраживања и у нашој групи испитаника, укупно преживљавање пацијената било је значајно дуже код женског пола са површно ширећим меланомом и другим облицима ненодуларног меланома уколико је дебљина по Бреслоу била мања од 4 мм, са одсутном улцерацијом и бројем митоза до 5 по милиметру квадратном, као и код пацијената којима је констатовано присуство тумор инфилтришућих лимфоцита и изражен пигмент у примарном тумору, а одсутна лимфоваскуларна и перинеурална инвазија као и микросателити. Код пацијената код којих је забележен смртни исход, код њих 80% примарни меланом имао је улцерацију [139, 140, 141, 142].

Одсуство или присуство пигмента у примарном меланому је један од прогностичких фактора за боље преживљавање. У овом истраживању присуство пигмента било је у позитивној корелацији са дужином преживљавања. Ови подаци се уклапају у ранија истраживања према којима је ризик од смртог исхода био већи за амеланотични или хипомеланотични меланом него за пигментовани меланом (однос ризика, 1,5; 95% интервал поузданости, 1,1-2,1) [143].

Код наших испитаника лимфоваскуларна инвазија (ЛВИ) у примарном меланому уочена је код 8% оболелих (N=33), а њих 42% имало је позитиван СЛН. Код испитаника код којих лимфоваскуларна инвазија није уочена у примарном меланому, смо у 18% случајева је утврђен позитиван СЛН. У неким студијама је показано да присуство ЛВИ у примарном меланому може играти значајну прогностичку улогу код прогресије у III клинички стадијум и укупног преживљавања. [143]. Логично је претпоставити да би присуство ЛВИ било предиктивни фактор за налаз метастаза у СЛН, али у нашој студији се ЛВИ не може са сигурношћу издвојити као независни предиктивни фактор за процену укупног преживљавања.

Након прве карактеризације тумор инфилтришућих лимфоцита код примарног меланома од стране Кларка 1969. године, многобројне студије су потврдиле да је инфилтрација лимфоцита у позитивној корелацији са джим преживљавањем [139]. У нашем истраживању је уочено да је време до прогресије дуже код пацијената код којих је констатовано присуство тумор инфилтришућих лимфоцита ($p < 0,005$), као и време до појаве удаљених метастаза ($p < 0,001$), али нема статистичке значајности кодукупног преживљавања ($p < 0,031$).

У нашој студији доказана је статистички значајна разлика у исходу болести код пацијената са метастатски измењеним лимфним чвором стражаром у односу на оне са негативним лимфним чвором стражаром ($p < 0,001$), али није уочена статистичка значајност у односу на време до биопсије СЛН и исход болести. Нема много литературе која указује на максимални дозвољени временски интервал до извођења биопсије лимфног чвора стражара. У две велике проспективне студије били су укључени максимални временски интерва-

ли као критеријуми, MSLT I са максимално дозвољеним временским интервалом до биопсије од 12 недеља и SUNBELT, где је максимални дозвољени временски интервал био 90 дана (13 недеља). У овој и другим студијама није доказана разлика у преживљавању без рецидива (PFS) и укупном преживљавању (OS) и временског интервала до биопсије СЛН [144].

Укупно преживљавање било је дуже код пацијената са једним екстирпираним лимфним чвором стражаром у односу на пацијенте са више екстирпираних лимфних чворова стражара. Није било статистички значајне разлике ни у односу на број дренажних басена, локализацију басена, те локализацију као и дијаметар метастатског депозита у лимфном чвору стражару. Време од патохистолошке дијагнозе примарног меланома до биопсије лимфног чвора стражара није утицало на укупно преживљавање пацијената.

Прогноза пацијената са позитивним СЛН зависи од многих фактора, тј. може се предвидети на основу карактеристика као што су величина и место метастазе у СЛН. Једна од мултиваријантних анализа преживљавања везаног за меланом, MSS (енгл. *melanoma specific survival*) идентификовала је пет значајних фактора повезаних са лошијом прогнозом: мушки пол ($P=0,036$), нодуларни меланом ($P=0,001$), локализацију на трупцу ($P=0,0001$), туморско оптерећење у лимфном чвору стражару веће од 1,0 мм ($p=0,022$), и метастатски измењени несентинелски лимфни чворови ($p=0,004$). Такође, ова прелиминарна истраживачка ретроспективна студија показала је да пигментација унутар СН корелира са повећаним оптерећењем тумором чвора стражара [143].

Стопа трогодишњег преживљавања у нашој студији била је већа код женског пола, код пацијената са не-нодуларним примарним меланомом и код пацијената чија је дебљина меланома по Бреслоу била мања од 4 мм ($p<0,001$) и са бројем митоза у примарном меланому до 5 по квадратном милиметру ($p=0,078$). Пацијенти са негативним лимфним чвором стражаром у 95,6% имају трогодишње преживљавање, за разлику од пацијената са метастатски измењеним лимфним чвором стражаром, који у 16,6% случајева преживе три године ($p<0,001$), указујући на то да је биопсија лимфног чвора стражара значајна процедура у процени прогнозе болести. Укупно 92,8% пацијената са метастатским лимфним чвором стражаром и дијаметром највећег метастатског депозита који је био мањи од 1 мм, доживело је три године ($p=0,09$). У студији (COMBI-AD trial) у којој су испитаници подељени у три групе у односу на дијаметар метастатског депозита и третирани онколошком терапијом, показано је да 70% пацијената који су били у IIIA стадијуму, са метастатским дијаметром мањим од 2 мм, плацебо-третирани, нису имали релапс болести наредне три године [145,146, 147].

Преживљавање без прогресије болести, PFS, (енгл. *progression free survival*). Прогресија болести забележена је код 98 оболелих (23,9%). Медијана преживљавања без прогресије болести била је 102.4 ± 2.733 недеље (95% CI 97.1-107.8). Имајући у виду да у појединим групама, није било више од 50% исхода, медијана преживљавања није достигнута, те је приказана процењена аритметичка средина преживљавања са 95% интервалом поверења. Време преживљавања од дијагнозе примарног меланома до појаве метастаза, PFS, је истраживано у односу на пол, клиничко патолошке карактеристике примарног тумора и статус лимфног чвора стражара. Преживљавање без прогресије болести било је дуже код женског пола, код пацијената са примарним меланомом локализованим на горњим екстремитетима и трупцу, затим код примарних меланома који нису имали улцерацију, као и код оних који су имали до 5 митоза по квадратном милиметру. Такође је уочено да је време до прогресије дуже код пацијената код којих је констатовано присуство тумор инфилтришућих леукоцита, као и израженог пигмента у примарном меланому који указује на добро диферентован меланом, као и код оних код којих није уочена лимфоваскуларна и перинеурална инвазија ($p<0,005$). Пацијенти код којих је уочена регресија постоји тренд дужег преживљавања без прогресије болести ($p=0,056$). Добијени подаци указују на то да је код пацијената са констатованим микросателитима у примарном меланому преживљавање значајно краће ($p<0,001$) (103,7 недеља vs. 42,4 недеље ($p<0,001$)). Није било статистички значајне разлике у времену до прогресије болести у односу на тип ћелија у тумору као и да ли је уочен преегзистирајући невус, ($p>0,05$). Истраживање и обрада статуса лимфног чвора стражара подразумевало је број лимфних чворова стражара који су екстирпирани, локализацију дренажног басена, локализацију метастатског депозита у лимфном чвору, као и дијаметар

највећег метастатског депозита у лимфном чвору (енгл. *tumor burden*). Добијени подаци указују на то да је време без прогресије болести било краће код пацијената који су имали више од једног екстирпираног лимфног чвора као и код локализације лимфног чвора стражара на врату. Није било статистички значајне разлике у времену до прогресије болести у односу на локализацију метастаза у лимфном чвору стражару по Девару и дијаметру метастатског фокуса у лимфном чвору стражару по Ротердаму.

Од 2003. до 2018. године, FDA је одобрила 12 нових лекова за лечење узнапредовалог меланома, који су значајно продужили време преживљавања ових пацијената, а стопе одговора на новодоступне терапије крећу се од 12% до 60% [148]. Како у Србији ове нове терапеутске опције у стадијуму III нису доступне, примена терапије није могла да утиче на исход болести.

Преживљавање без удаљених метастаза DMFS (*distant metastasis-free survival*). Да би се проценио ефекат лечења на исход болести код сваког пацијента, већина студија користи преживљавање без прогресије (PFS) као примарни критеријум и преживљавање без удаљених метастаза (DMFS) као секундарни циљ. Трендови DMFS-а блиско прате трендове PFS-а, при чему већина пацијената има релапс на висцералним, а не на регионалним местима. [149]. У нашем истраживању је 17,3% свих испитаника развило метастазе на удаљеним органима. Упоредијивана је дужина преживљавања до удаљених метастаза у компарацији са клиничко-патолошким параметрима. Уочено је да је преживљавање било дуже код особа женског пола, код локализације примарног меланома на горњим екстремитетима, код површно ширећег типа, код дебљине меланома по Бреслоу мањој од 4 мм, код одсуства улцерације и броја митоза до 5/мм², те код присуства тумор инфилтришућих леукоцита у примарном меланому, као и код пацијената који су у примарном меланому имали изражен пигмент.

Према подацима из MSLT-II студије 9% пацијената је развило је удаљене метастазе, што је значајно мање него у нашем истраживању, и указује на каснију дијагнозу меланома у нашој популацији. Ипак, медијана преживљавања без удаљених метастаза у нашем истраживању је била 133 недеље (2,5 године), без обзира на позитивност СЛН и учињену лимфонодисекцију, што је слично као у горе поменутој студији где је време до удаљених метастаза било око две године.

У овом истраживању упоређиван је статус СЛН и DMFS и уочено је статистички значајно дуже преживљавање код пацијената који су имали један екстирпиран метастатски измењен СЛН. Слично је показано у једној студији где су меланомима са мањим бројем позитивних лимфних чворова били ређе удружени с релапсима него меланомима са вишеструким метастазама у лимфним чворовима ($p=0,05$). Пацијенти са вишеструким метастазама у лимфним чворовима ($p=0,01$), већим присуством митоза ($p=0,005$) и улцерацијом ($p=0,02$) имали су лошији PFS и DMFS [150].

Дуже преживљавање је констатовано и код пацијената који су имали један дренажни лимфни басен у односу на оне који су имали два или више. Такође је уочено да је време преживљавања дуже код пацијената са локализацијом лимфног чвора стражара у аксиларној регији што се уклапа са дужим трогодишњим преживљавањем код пацијената који су имали примарни меланом на горњим екстремитетима. Меланомима на горњим екстремитетима имају и мању дебљину по Бреслоу, што свакако утиче и на време преживљавања без удаљених метастаза. Није уочена статистичка значајност у дужини преживљавања до удаљених метастаза у односу на време између ексцизије примарног меланома и биопсије лимфног чвора стражара. У односу на експресију испитиваних имунолошких параметара у лимфном чвору стражару (FoxP3, CD4, CD8, IDO, PDL-1) није било статистички значајне разлике у стопама трогодишњег преживљавања, верованто због мале величине узорка $N=33$).

ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата, изведени су следећи закључци:

1. Стопа детекције лимфног чвора стражара била је 99,02%, лажно негативних је било 18 (5.6%), па је специфичност методе износила 82.35%.
2. Нема разлике у стопи детекције између групе пацијената са двоструким мапирањем (n=89) и групе у којој је плава боја је изостављена из процедуре (p>0,05).
3. Нема разлике у стопи детекције позитивних и лажно негативних лимфних чворова стражара у односу на време одексизионе биопсије добиопсије лимфног чвора стражара.
4. Пацијенти са нодуларним клиничкопатолошким типом меланома имају значајно већу стопу појаве метастаза у лимфном чвору стражару у односу на друге клиничко патолошке типове.
5. Нодуларни меланом, дебљина тумора веће од 4 мм по Бреслоу, присуство улцерације, микросателита, лимфоваскуларне инвазије и број митоза $\geq 6/\text{мм}^2$ су у позитивној корелацији са детекцијом метастаза у лимфном чвору стражару.
6. Није уочена корелација између клиничкопатолошких параметара примарног меланома и појаве позитивних несентинелских лимфних чворова
7. Дијаметар метастатског фокуса већи од 1 мм, мултифокална и субтотална локализација метастатског депозита у лимфном чвору стражару је предиктивни фактор за појаву позитивних несентинелских лимфних чворова
8. Интратуморска експресија CD4, CD8 и IDO чешћа је код пацијената са позитивним несентинелским лимфним чворовима
9. Исход болести зависи од позитивности лимфног чвора стражара, али не зависи од времена од ексизионе биопсије до биопсије лимфног чвора стражара
10. Време до прогресије је дуже код пацијената код којих је констатовано присуство тумор инфилтришућих лимфоцита, изражен пигмент и регресија у примарном меланому
11. Преживљавање без удаљених метастаза било је дуже код пацијената са дебљином по Бреслоу мањом од 4 мм, без улцерације, а са присуством тумор инфилтришућих лимфоцита у примарном меланому.
12. Укупно време преживљавања било је дуже код особа женског пола, са нодуларним меланомом, код тумора мање дебљине, без улцерације, са присуством тумор инфилтришућих лимфоцита, већим присуством пигмента и мањим бројем митоза.
13. Пацијенти са једним екстирпираним позитивним лимфним чвором стражаром и имали су дуже укупно преживљавање.
14. Клинички стадијум на дијагнози, добијен комбинацијом параметара примарног тумора (дебљина, улцерација) и статуса лимфних чворова (ТНМ класификација) је у правилној корелацији са укупним преживљавањем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont AM; European Dermatology Forum; European Association of Dermato-Oncology; European Organization of Research and Treatment of Cancer. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur J Cancer*. 2012 Oct;48(15):2375-90. doi: 10.1016/j.ejca.2012.06.013. Epub 2012 Sep 13. PMID: 22981501.
2. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, et al. Evidence-based and interdisciplinary consensus-based German guidelines: systemic medical treatment of melanoma in the adjuvant and palliative setting. *Melanoma Res* 2008;18(2):152-60.
3. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol*. 2016 Jun;136(6):1161-1171. doi: 10.1016/j.jid.2016.01.035. Epub 2016 Feb 20. PMID: 26902923.
4. Saiag P, Bosquet L, Guillot B, Verola O, Avril MF, Bailly C, Cupissol D, Dalac S, Danino A, Dréno B, Grob JJ, Leccia MT, Renaud-Vilmer C, Négrier S; Société Française de Dermatologie. Management of adult patients with cutaneous melanoma without distant metastasis. 2005 update of the French Standards, Options and Recommendations guidelines. Summary report. *Eur J Dermatol*. 2007 Jul-Aug;17(4):325-31. doi: 10.1684/ejd.2007.0209. Epub 2007 Jun 1. PMID: 17540641.
5. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U; ESMO Guidelines Committee. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26 Suppl 5:v126-32. doi: 10.1093/annonc/mdv297. PMID: 26314774.
6. Merkel EA, Gerami P. Malignant melanoma of sun-protected sites: a review of clinical, histological, and molecular features. *Lab Invest*. 2017 Jun;97(6):630-635. doi: 10.1038/labinvest.2016.147. Epub 2017 Jan 16. PMID: 28092366.
7. Smith DM. The Melanocortin 1 receptor and its influence on naevi and melanoma in dark-skinned phenotypes. *Australas J Dermatol*. 2019 Aug;60(3):192-199. doi: 10.1111/ajd.12982. Epub 2018 Dec 25. PMID: 30585306.
8. Lopes FCPS, Sleiman MG, Sebastian K, Bogucka R, Jacobs EA, Adamson AS. UV Exposure and the Risk of Cutaneous Melanoma in Skin of Color: A Systematic Review. *JAMA Dermatol*. 2021 Feb 1;157(2):213-219. doi: 10.1001/jamadermatol.2020.4616. PMID: 33325988.
9. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018 Jan;34(1):13-24. doi: 10.1111/phpp.12329. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28703311; PMCID: PMC5760354.
10. Lea CS, Scotto JA, Buffler PA, Fine J, Barnhill RL, Berwick M. Ambient UVB and melanoma risk in the United States: a case-control analysis. *Ann Epidemiol*. 2007 Jun;17(6):447-53. doi: 10.1016/j.annepidem.2007.01.030. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17395487.
11. An S, Kim K, Moon S, Ko KP, Kim I, Lee JE, Park SK. Indoor Tanning and the Risk of Overall and Early-Onset Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 25;13(23):5940. doi: 10.3390/cancers13235940. PMID: 34885049; PMCID: PMC8656707.
12. Calzavara-Pinton PG, Arisi M, Wolf P. Sunbeds and carcinogenesis: the need for new regulations and restrictions in Europe from the Euromelanoma perspective. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Mar;33 Suppl 2:104-109. doi: 10.1111/jdv.15314. PMID: 30811688.

13. González-Cruz C, Ferrándiz-Pulido C, García-Patos Briones V. Melanoma in Solid Organ Transplant Recipients. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. 2021 Mar;112(3):216-224. English, Spanish. doi: 10.1016/j.ad.2020.11.005. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33197437.
14. Clark WH Jr, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol*. 1986 May;17(5):443-50. doi: 10.1016/s0046-8177(86)80032-6. PMID: 3699806.
15. Mancini EA, Balch CM, Murad TM, Soong SJ. Polypoid melanoma, a virulent variant of the nodular growth pattern. *Am J Clin Pathol*. 1981 Jun;75(6):810-5. doi: 10.1093/ajcp/75.6.810. PMID: 7258141.
16. Rongioletti F, Smoller BR. Unusual histological variants of cutaneous malignant melanoma with some clinical and possible prognostic correlations. *J Cutan Pathol*. 2005 Oct;32(9):589-603. doi: 10.1111/j.0303-6987.2005.00418.x. PMID: 16176296.
17. Weyers W, Euler M, Diaz-Cascajo C, Schill WB, Bonczkowitz M. Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):288-99. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19990715)86:2<288::aid-cncr13>3.0.co;2-s. PMID: 10421265.
18. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol*. 2000 Aug;143(2):275-80. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03651.x. PMID: 10951133.
19. Nicolson NG, Han D. Desmoplastic melanoma. *J Surg Oncol*. 2019 Jan;119(2):208-215. doi: 10.1002/jso.25317. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30481377.
20. Pavri SN, Clune J, Ariyan S, Narayan D. Malignant Melanoma: Beyond the Basics. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Aug;138(2):330e-340e. doi: 10.1097/PRS.0000000000002367. PMID: 27465194.
21. Barnhill RL, Gupta K. Unusual variants of malignant melanoma. *Clin Dermatol*. 2009 Nov-Dec;27(6):564-87. doi: 10.1016/j.clindermatol.2008.09.015. PMID: 19880044.
22. Pizzichetta MA, Talamini R, Stanganelli I, Puddu P, Bono R, Argenziano G, Veronesi A, Trevisan G, Rabinovitz H, Soyer HP. Amelanotic/hypomelanotic melanoma: clinical and dermoscopic features. *Br J Dermatol*. 2004 Jun;150(6):1117-24. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05928.x. PMID: 15214897.
23. Kuehnl-Petzoldt C, Berger H, Wiebelt H. Verrucous-keratotic variations of malignant melanoma: a clinicopathological study. *Am J Dermatopathol*. 1982 Oct;4(5):403-10. PMID: 7149193.
24. Yélamos O, Arva NC, Obregon R, Yazdan P, Wagner A, Guitart J, Gerami P. A comparative study of proliferative nodules and lethal melanomas in congenital nevi from children. *Am J Surg Pathol*. 2015 Mar;39(3):405-15. doi: 10.1097/PAS.0000000000000351. PMID: 25517953.
25. Raghavan SS, Peternel S, Mully TW, North JP, Pincus LB, LeBoit PE, McCalmont TH, Bastian BC, Yeh I. Spitz melanoma is a distinct subset of spitzoid melanoma. *Mod Pathol*. 2020 Jun;33(6):1122-1134. doi: 10.1038/s41379-019-0445-z. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31900433; PMCID: PMC7286778.
26. Borgenvik TL, Karlsvik TM, Ray S, Fawzy M, James N. Bluenevus-like and bluenevus-associated melanoma: a comprehensive review of the literature. *ANZ J Surg*. 2017 May;87(5):345-349. doi: 10.1111/ans.13946. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28318130.
27. Perniciaro C. Dermatopathologic variants of malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*. 1997 Mar;72(3):273-9. doi: 10.4065/72.3.273. PMID: 9070205.
28. Kao GF, Helwig EB, Graham JH. Balloon cell malignant melanoma of the skin. A clinicopathologic study of 34 cases with histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural observations. *Cancer*. 1992 Jun 15;69(12):2942-52. doi: 10.1002/1097-0142(19920615)69:12<2942::aid-cncr2820691213>3.0.co;2-0. PMID: 1591688.
29. Weyers W, Euler M, Diaz-Cascajo C, Schill WB, Bonczkowitz M. Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):288-99. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19990715)86:2<288::aid-cncr13>3.0.co;2-s. PMID: 10421265.

30. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018 Aug;18(8):775-784. doi: 10.1080/14737140.2018.1489246. PMID: 29923435; PMCID: PMC7652033.
31. Testori A, Soteldo J, Powell B, Sales F, Borgognoni L, Rutkowski P, Lejeune F, van Leeuwen P, Eggermont A. Surgical management of melanoma: an EORTC Melanoma Group survey. *Ecancermedicalscience.* 2013 Mar 28;7:294. doi: 10.3332/ecancer.2013.294. PMID: 23589724; PMCID: PMC3622410. Cochran, A. J. (2015). Molecular enhancement of sentinel node evaluation. *Journal of Translational Medicine*, 13(Suppl 1), K4. doi:10.1186/1479-5876-13-s1-k4
32. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag Lj, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992 Apr;127(4):392-9. doi: 10.1001/archsurg.1992.01420040034005. PMID: 1558490.
33. Nagaraja V, Eslick GD. Is complete lymph node dissection after a positive sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma always necessary? A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2013 Jul;39(7):669-80. doi: 10.1016/j.ejso.2013.02.022. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23571104.
34. Roberts AA, Cochran AJ. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients: current and future trends. *J Surg Oncol.* 2004 Mar;85(3):152-61. doi: 10.1002/jso.20028. PMID: 14991887.
35. Voit CA, van Akkooi AJ, Schäfer-Hesterberg G, Sterry W, Eggermont AM. Multimodality approach to the sentinel node: an algorithm for the use of presentinel lymph node biopsy ultrasound (after lymphoscintigraphy) in conjunction with presentinel lymph node biopsy fine needle aspiration cytology. *Melanoma Res.* 2011 Oct;21(5):450-6. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283485f27. PMID: 21673603.
36. Šijan G, Kozarski J, Stepić N, Milojević S, Stefanović D, Tatomirović Ž, Jauković L, Vesanović S, Rajović M. Validity of ultrasound-guided aspiration needle biopsy in the diagnosis of micrometastases in sentinel lymph nodes in patients with cutaneous melanoma. *Vojnosanit Pregl.* 2016 Oct;73(10):934-40. doi: 10.2298/VSP150227042S. PMID: 29328105.
37. Holt JB, Sanguenza OP, Levine EA, Shen P, Bergman S, Geisinger KR, Creager AJ. Nodal melanocytic nevi in sentinel lymph nodes. Correlation with melanoma-associated cutaneous nevi. *Am J Clin Pathol.* 2004 Jan;121(1):58-63. doi: 10.1309/Y5QA-D623-MYA2-1PUY. PMID: 14750241.
38. Cochran, A. J. (2015). Molecular enhancement of sentinel node evaluation. *Journal of Translational Medicine*, 13(Suppl 1), K4. doi:10.1186/1479-5876-13-s1-k4
39. Jaukovic L, Rajović M, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, Stepic N, Mijuskovic Z, Petrov N, Ajdinovic B. Time to Procedure, Nuclear Imaging and Clinicopathological Characteristics as Predictive Factors for Sentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma: A Single-Center Analysis. *Ann Plast Surg.* 2018 Jul;81(1):80-86. doi: 10.1097/SAP.0000000000001465. PMID: 29762449.
40. Homolak D, Šitum M, Čupić H. Clinico-pathological features of patients with melanoma and positive sentinel lymph node biopsy: a single institution experience. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2015;23(2):122-9. PMID: 26228823.
41. Bello DM, Faries MB. The Landmark Series: MSLT-1, MSLT-2 and DeCOG (Management of Lymph Nodes). *Ann Surg Oncol.* 2020 Jan;27(1):15-21. doi: 10.1245/s10434-019-07830-w.
42. Van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Mitra A, Newton-Bishop JA, Cook M, van der Ploeg IM, Nieweg OE, van den Hout MF, van Leeuwen PA, Voit CA, Cataldo F, Testori A, Robert C, Hoekstra HJ, Verhoef C, Spatz A, Eggermont AM. Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 1;29(16):2206-14. doi: 10.1200/JCO.2010.31.6760. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21519012

43. Saiag P, Bosquet L, Guillot B, Verola O, Avril MF, Bailly C, Cupissol D, Dalac S, Danino A, Dréno B, Grob JJ, Leccia MT, Renaud-Vilmer C, Négrier S; Société Française de Dermatologie. Management of adult patients with cutaneous melanoma without distant metastasis. 2005 update of the French Standards, Options and Recommendations guidelines. Summary report. *Eur J Dermatol.* 2007 Jul-Aug;17(4):325-31. doi: 10.1684/ejd.2007.0209. Epub 2007 Jun 1. PMID: 17540641.
44. Dewar D, Newell B, Green MA, Topping AP, Powell BW, Cook MG. The microanatomic location of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. *J Clin Oncol.* 2004 Aug 15;22(16):3345-9. doi: 10.1200/JCO.2004.12.177. PMID: 15310779.
45. Starz H, Siedlecki K, Balda BR. Sentinel lymphonodectomy and s-classification: a successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2004;11:162S-168S.
46. Fink AM, Weihsengruber F, Spangl B, Feichtinger H, Lilgenau N, Rappersberger K, Jurecka W, Steiner A. S-classification of sentinel lymph node biopsy predicts the results of complete regionallymph node dissection. *Melanoma Res.* 2005 Aug;15(4):267-71. doi: 10.1097/00008390-200508000-00006. PMID: 16034304.
47. Van Akkooi AC, Nowecki ZI, Voit C, Schäfer-Hesterberg G, Michej W, de Wilt JH, Rutkowski P, Verhoef C, Eggermont AM. Sentinel node tumor burden according to the Rotterdam criteria is the most important prognostic factor for survival in melanoma patients: a multicenter study in 388 patients with positive sentinel nodes. *Ann Surg.* 2008 Dec;248(6):949-55. doi: 10.1097/SLA.0b013e31818fefe0. PMID: 19092339.
48. Murali R, Desilva C, Thompson JF, Scolyer RA. Non-Sentinel Node Risk Score (N-SNORE): a scoring system for accurately stratifying risk of non-sentinel node positivity in patients with cutaneous melanoma with positive sentinel lymph nodes. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 10;28(29):4441-9. doi: 10.1200/JCO.2010.30.9567. Epub 2010 Sep 7. PMID: 20823419.
49. Feldman R, Fink AM, Jurecka W, Rappersberger K, Steiner A. Accuracy of the non-sentinel node risk score (N-SNORE) in patients with cutaneous melanoma and positive sentinel lymph nodes: a retrospective study. *Eur J Surg Oncol.* 2014 Jan;40(1):73-6. doi: 10.1016/j.ejso.2013.08.022. Epub 2013 Sep 12.
50. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer NH, Berking C, Sunderkötter C, Kaatz M, Schatton K, Lehmann P, Vogt T, Ulrich J, Herbst R, Gehring W, Simon JC, Keim U, Verver D, Martus P, Garbe C; German Dermatologic
51. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 Oct;24(5):879-97. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00880.x. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21707960; PMCID: PMC3395885.
52. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969 Mar;29(3):705-27. PMID: 5773814.
53. Murray CA, Leong WL, McCready DR, Ghazarian DM. Histopathological patterns of melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *J Clin Pathol.* 2004 Jan;57(1):64-7. doi: 10.1136/jcp.57.1.64. PMID: 14693838; PMCID: PMC1770187.
54. Schatton T, Scolyer RA, Thompson JF, Mihm MC Jr. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol Biol.* 2014;1102:287-324. doi: 10.1007/978-1-62703-727-3_16. PMID: 24258985.
55. Zheng R, Shu S. Immune response to cancer and its regulation in regional lymph nodes. *J Surg Oncol.* 2011 May 1;103(6):550-4. doi: 10.1002/jso.21692. PMID: 21480248.
56. Fey M F. Molecular biology of cancer. In: *Textbook of medical oncology*, Cavali F, Hansen HH, Kaye SB, eds., Taylor Francis, Third edition 2004; 1-33.

57. Molodtsov AK, Khatwani N, Vella JL, Lewis KA, Zhao Y, Han J, Sullivan DE, Searles TG, Preiss NK, Shabaneh TB, Zhang P, Hawkes AR, Malik BT, Kolling FW 4th, Usherwood EJ, Wong SL, Phillips JD, Shirai K, Angeles CV, Yan S, Curiel TJ, Huang YH, Cheng C, Turk MJ. Resident memory CD8+ T cells in regional lymph nodes mediate immunity to metastatic melanoma. *Immunity*. 2021 Sep 14;54(9):2117-2132.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2021.08.019. PMID: 34525340; PMCID: PMC9015193.
58. Salmi S, Lin A, Hirschovits-Gerz B, Valkonen M, Aaltonen N, Sironen R, Siiskonen H, Pasonen-Seppänen S. The role of FoxP3+ regulatory T cells and IDO+ immune and tumor cells in malignant melanoma - an immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2021 May 29;21(1):641. doi: 10.1186/s12885-021-08385-4. PMID: 34051744; PMCID: PMC8164759.
59. Grotz TE, Mansfield AS, Jakub JW, Markovic SN. Regional lymphatic immunity in melanoma. *Melanoma Res*. 2012 Feb;22(1):9-18. doi: 10.1097/CMR.0b013e32834e1f33. PMID: 22082957.
60. Ko JS. The Immunology of Melanoma. *Clin Lab Med*. 2017 Sep;37(3):449-471. doi: 10.1016/j.cll.2017.06.001. PMID: 28802495.
61. Wang Q, Liu D, Song P, Zou MH. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015 Jun 1;20(7):1116-43. doi: 10.2741/4363. PMID: 25961549; PMCID: PMC4911177.
62. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*. 2015 Dec 15;3:51. doi: 10.1186/s40425-015-0094-9. PMID: 26674411; PMCID: PMC4678703.
63. Cioplea M, Nichita L, Georgescu D, Sticlaru L, Cioroianu A, Nedelcu R, Turcu G, Rauta A, Mogodici C, Zurac S, Popp C. FOXP3 in Melanoma with Regression: Between Tumoral Expression and Regulatory T Cell Upregulation. *J Immunol Res*. 2020 Oct 23;2020:5416843. doi: 10.1155/2020/5416843. PMID: 33274240; PMCID: PMC7683174.
64. Rosenbaum SR, Knecht M, Mollae M, Zhong Z, Erkes DA, McCue PA, Chervoneva I, Berger AC, Lo JA, Fisher DE, Gershenwald JE, Davies MA, Purwin TJ, Aplin AE. FOXD3 Regulates VISTA Expression in Melanoma. *Cell Rep*. 2020 Jan 14;30(2):510-524.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.036. PMID: 31940493; PMCID: PMC6995351.
65. Ryan M, Crow J, Kahmke R, Fisher SR, Su Z, Lee WT. FoxP3 and indoleamine 2,3-dioxygenase immunoreactivity in sentinel nodes from melanoma patients. *Am J Otolaryngol*. 2014 Nov-Dec;35(6):689-94. doi: 10.1016/j.amjoto.2014.08.009. Epub 2014 Aug 23.
66. Claessens N, Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Quatresooz P. Immunohistochemical detection of incipient melanoma micrometastases. Relationship with sentinel lymph node involvement. *Melanoma Res*. 2005 Apr;15(2):107-10. doi: 10.1097/00008390-200504000-00004. PMID: 15846143.
67. Bluemel C, Herrmann K, Giammarile F, Nieweg OE, Dubreuil J, Testori A, Audisio RA, Zoras O, Lassmann M, Chakera AH, Uren R, Chondrogiannis S, Colletti PM, Rubello D. EANM practice guidelines for lymphoscintigraphy and sentinel lymph node biopsy in melanoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Oct;42(11):1750-1766. doi: 10.1007/s00259-015-3135-1. Epub 2015 Jul 25. PMID: 26205952.
68. Kroon HM, Lowe L, Wong S et al (2007) What is a sentinel node? Re-evaluating the 10% rule for sentinel lymph node biopsy in melanoma. *J Surg Oncol* 95:623-628 31.
69. Murphy AD, Britten A, Powell B (2014) Hot or not? The 10% rule in sentinel lymph node biopsy for malignant melanoma revisited. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:316-319

70. Chakera AH, Hesse B, Burak Z, Ballinger JR, Britten A, Caracò C, Cochran AJ, Cook MG, Drzewiecki KT, Essner R, Even-Sapir E, Eggermont AM, Stopar TG, Ingvar C, Mihm MC Jr, McCarthy SW, Mozzillo N, Nieweg OE, Scolyer RA, Starz H, Thompson JF, Trifirò G, Viale G, Vidal-Sicart S, Uren R, Waddington W, Chiti A, Spatz A, Testori A; European Association of Nuclear Medicine-European Organisation for Research and. EANM-EORTC general recommendations for sentinel node diagnostics in melanoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009 Oct;36(10):1713-42. doi: 10.1007/s00259-009-1228-4. PMID: 19714329.
71. Egger ME, Bower MR, Czyszczon IA, Farghaly H, Noyes RD, Reintgen DS, Martin RC 2nd, Scoggins CR, Stromberg AJ, McMasters KM. Comparison of sentinel lymph node micrometastatic tumor burden measurements in melanoma. *J Am Coll Surg*. 2014 Apr;218(4):519-28. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.12.014. Epub 2013 Dec 21. PMID: 24491245.
72. Van der Ploeg IM, Kroon BB, Antonini N, Valdés Olmos RA, Nieweg OE. Comparison of three micromorphometric pathology classifications of melanoma metastases in the sentinel node. *Ann Surg*. 2009 Aug;250(2):301-4. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181b1735b. PMID: 19638903.
73. Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, Burke H, Yearley JH, Thompson JF et al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol*. 2015 Dec;28(12):1535-44. doi: 10.1038/modpathol.2015.110. Epub 2015 Sep 25.
74. Hauschild A, Rosien F, Lischner S. Surgical standards in the primary care of melanoma patients. *Onkologie*. 2003 Jun;26(3):218-22. doi: 10.1159/000071616. PMID: 12845205.
75. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2014 Mar 1;383(9919):816-27. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60802-8. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24054424.
76. Hojabr Kakavand 1 2, Ricardo E Vilain 1 3, James S Wilmott 1 2, Hazel Burke 1, Jennifer H Yearley 4, John F Thompson 1 2, Peter Hersey 1 2 5, Georgina V Long 1 2, Richard A Scolyer 1 2 3 Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol*. 2015 Dec;28(12):1535-44. doi: 10.1038/modpathol.2015.110. Epub 2015 Sep 25.
77. Kunte C, Geimer T, Baumert J, Konz B, Volkenandt M, Flaig M, Ruzicka T, Berking C, Schmid-Wendtner MH. Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2010 Aug;20(4):330-7. doi: 10.1097/CMR.0b013e32833ba9ff. PMID: 20526218.
78. Van der Ploeg IM, Madu MF, van der Hage JA et al: Blue dye can be safely omitted in most sentinel node procedures for melanoma. *Melanoma Res* 2016;26(5):464-468.
79. Rajović M, Jaukovic L, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, Petrov N, Mijuskovic Z, Stepic N, Nikolic Z. Regional lymph node metastases in cutaneous melanoma: a single-center analysis from southeast europe. *Scand J Surg*. 2021 Dec;110(4):498-503. doi: 10.1177/1457496921992936. Epub 2021 Feb 14. PMID: 33586532.
80. Belhocine TZ, Scott AM, Even-Sapir E, Urbain JL, Essner R. Role of nuclear medicine in the management of cutaneous malignant melanoma. *J Nucl Med*. 2006 Jun;47(6):957-67. PMID: 16741305.
81. Alonso O, Martínez M, Delgado L, De León A, De Boni D, Lago G, Garcés M, Fontes F, Espasandín J, Priario J. Staging of regional lymph nodes in melanoma patients by means of 99mTc-MIBI scintigraphy. *J Nucl Med*. 2003 Oct;44(10):1561-5. PMID: 14530467.
82. Nelson DW, Stern S, Elashoff DE, Elashoff R, Thompson JF, Mozzillo N, Nieweg OE, Hoekstra HJ, Cochran AJ, Faries MB. Impact of Time Between Diagnosis and CLHB on Outcomes in Cutaneous Melanoma. *J Am Coll Surg*. 2017 Aug;225(2):302-311. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2017.05.013. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28668274; PMCID: PMC5553862.

83. Jaukovic L, Rajović M, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, Stepic N, Mijuskovic Z, Petrov N, Ajdinovic B. Time to Procedure, Nuclear Imaging and Clinicopathological Characteristics as Predictive Factors for Sentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma: A Single-Center Analysis. *Ann Plast Surg.* 2018 Jul;81(1):80-86. doi: 10.1097/SAP.0000000000001465. PMID: 29762449.
84. Oude Ophuis CM, Verhoef C, Rutkowski P, Powell BW, van der Hage JA, van Leeuwen PA, Voit CA, Testori A, Robert C, Hoekstra HJ, Grünhagen D, Eggermont AM, van Akkooi AC. The interval between primary melanoma excision and sentinel node biopsy is not associated with survival in sentinel node positive patients - An EORTC Melanoma Group study. *Eur J Surg Oncol.* 2016 Dec;42(12):1906-1913. doi: 10.1016/j.ejso.2016.05.012. Epub 2016 May 27. PMID: 27266406.
85. Richtig G, Richtig E, Neiss AN, Quehenberger F, Gmainer DG, Kamolz LP, Lumenta DB. Does the time interval between sentinel lymph node biopsy and completion lymph node dissection affect outcome in malignant melanoma? A retrospective cohort study. *Int J Surg.* 2020 Mar;75:160-164. doi: 10.1016/j.ijso.2020.01.146. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32036082.
86. Rutkowski P, Szydłowski K, Nowecki ZI, Sałamacha M, Goryń T, Mitreǵa-Korab B, Pieńkowski A, Dziewirski W, Zdzienicki M. The long-term results and prognostic significance of cutaneous melanoma surgery using sentinel node biopsy with triple technique. *World J Surg Oncol.* 2015 Oct 13;13:299. doi: 10.1186/s12957-015-0701-8. PMID: 26462471; PMCID: PMC4603583.
87. Van der Ploeg IM, Madu MF, van der Hage JA, Wouters MW, Klop WM, van der Hiel B, van de Wiel BA, van Akkooi AJ. Blue dye can be safely omitted in most sentinel node procedures for melanoma. *Melanoma Res.* 2016 Oct;26(5):464-8. doi: 10.1097/CMR.0000000000000271. PMID: 27232099.
88. Jaukovic L, Rajović M, Kandolf Sekulovic L, Radulovic M, Stepic N, Mijuskovic Z, Petrov N, Ajdinovic B. Time to Procedure, Nuclear Imaging and Clinicopathological Characteristics as Predictive Factors for Sentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma: A Single-Center Analysis. *Ann Plast Surg.* 2018 Jul;81(1):80-86. doi: 10.1097/SAP.0000000000001465. PMID: 29762449.
89. Kadlub N, Trost O, Dalac S, Berriolo A, Ponelle T, Malka G, Danino A. Vers une meilleure sélectivité dans la technique de prélèvement du ganglion sentinelle: étude prospective [Evaluation of a method to reduce the number of sentinel nodes removed in melanoma patients: prospective study]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2007 Feb;52(1):24-7. French. doi: 10.1016/j.anplas.2006.09.001. Epub 2006 Nov 28. PMID: 17126981.
90. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 2014 Nov-Dec;28(6):1005-11. PMID: 25398793.
91. Longo C, Pellacani G. Melanomas. *Dermatol Clin.* 2016 Oct;34(4):411-419. doi: 10.1016/j.det.2016.05.004. PMID: 27692447.
92. Egger ME, Gilbert JE, Burton AL, McMasters KM, Callender GG, Quillo AR, Brown RE, St Hill CR, Hagendoorn L, Martin RC 2nd, Stromberg AJ, Scoggins CR. Lymphovascular invasion as a prognostic factor in melanoma. *Am Surg.* 2011 Aug;77(8):992-7. PMID: 21944512.
93. Purim KSM, Bonetti JPC, Silva JYF, Marques LB, Pinto MCS, Ribeiro LC. Characteristics of melanoma in the elderly. *Rev Col Bras Cir.* 2020 Jun 15;47:e20202441. Portuguese, English. doi: 10.1590/0100-6991e-20202441. PMID: 32555965.
94. Shen S, Wolfe R, McLean CA, Haskett M, Kelly JW. Characteristics and associations of high-mitotic-rate melanoma. *JAMA Dermatol.* 2014 Oct;150(10):1048-55. doi: 10.1001/jamadermatol.2014.635. PMID: 25142970. doi: 10.1016/j.jaad.2018.01.030. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29408526.
95. Stiegel E, Xiong D, Ya J, Funchain P, Isakov R, Gastman B, Vij A. Prognostic value of sentinel lymph node biopsy according to Breslow thickness for cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2018 May;78(5):942-948. doi: 10.1016/j.jaad.2018.01.030. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29408526.

96. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. Regresión en el melanoma: problemas en su definición e implicación pronóstica [Problems in defining melanoma regression and prognostic implication]. *Actas Dermosifiliogr.* 2009 Nov;100(9):759-66. Spanish. PMID: 19889297.
97. Liskay G, Orosz Z, Péley G, Csuka O, Plótár V, Sinkovics I, Bánfalvi T, Fejős Z, Gilde K, Kásler M. Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2005 Dec;15(6):509-13. doi: 10.1097/00008390-200512000-00005. PMID: 16314736.
98. Panda S, Dash S, Besra K, Samantaray S, Pathy PC, Rout N. Clinicopathological study of malignant melanoma in a regional cancer center. *Indian J Cancer.* 2018 Jul-Sep;55(3):292-296. doi: 10.4103/ijc.IJC_612_17. PMID: 30693897.
99. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Oct;125(10):1295-306. doi: 10.5858/2001-125-1295-Mm. PMID: 11570904.
100. Laga AC, Murphy GF. Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Dec;134(12):1750-7. doi: 10.5858/2009-0394-RAR.1. PMID: 21128771.
101. Betti R, Agape E, Vergani R, Moneghini L, Cerri A. An observational study regarding the rate of growth in vertical and radial growth phase superficial spreading melanomas. *Oncol Lett.* 2016 Sep;12(3):2099-2102. doi: 10.3892/ol.2016.4813. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27602146; PMCID: PMC4998523.
102. Wada M, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Hagihara A, Furue M, Uchi H. Acral lentiginous melanoma versus other melanoma: A single-center analysis in Japan. *J Dermatol.* 2017 Aug;44(8):932-938. doi: 10.1111/1346-8138.13834. Epub 2017 Mar 24. PMID: 28342269.
103. White RL Jr, Ayers GD, Stell VH, Ding S, Gershenwald JE, Salo JC, Pockaj BA, Essner R, Faries M, Charney KJ, Avisar E, Hauschild A, Egberts F, Averbook BJ, Garberoglio CA, Vetto JT, Ross MI, Chu D, Trisal V, Hoekstra H, Whitman E, Wanebo HJ, Debonis D, Vezeridis M, Chevinsky A, Kashani-Sabet M, Shyr Y, Berry L, Zhao Z, Soong SJ, Leong SP; Sentinel Lymph Node Working Group. Factors predictive of the status of sentinel lymph nodes in melanoma patients from a large multicenter database. *Ann Surg Oncol.* 2011 Dec;18(13):3593-600. doi: 10.1245/s10434-011-1826-9. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21647761; PMCID: PMC3461951.
104. Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stromberg AJ, Hagendoorn L, Martin RC 2nd, McMasters KM. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. *Am J Surg.* 2011 Dec;202(6):659-64; discussion 664-5. doi: 10.1016/j.amjsurg.2011.06.048. PMID: 22137134.
105. De Rosa N, Lyman GH, Silbermins D, Valsecchi ME, Pruitt SK, Tyler DM, Lee WT. Sentinel node biopsy for head and neck melanoma: a systematic review. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Sep;145(3):375-82. doi: 10.1177/0194599811408554. Epub 2011 May 3. PMID: 21540313.
106. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol.* 2000 Aug;143(2):275-80. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03651.x. PMID: 10951133.
107. Porter GA, Ross MI, Berman RS, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE. Significance of multiple nodal basin drainage in truncal melanoma patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol.* 2000 May;7(4):256-61. doi: 10.1007/s10434-000-0256-x. PMID: 10819364.
108. Navalkisoor S, Bailey PS, Quigley AM, Hall M, Buscombe JR. Sentinel node studies in truncal melanoma: does an increased number of draining basins correlate with an increased risk of lymph metastasis? *Cancer Imaging.* 2012 Aug 10;12(1):279-82. doi: 10.1102/1470-7330.2012.0032. PMID: 22935212; PMCID: PMC3458783.

109. Ahmadzadehfar H, Hinz T, Wierzbicki A, Höller T, Habibi E, Wenzel J, Muckle M, Biersack HJ, Essler M, Schmid-Wendtner M. Significance of multiple nodal basin drainage in patients with truncal melanoma. *QJ Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Sep;60(3):274-9. Epub 2014 May 21. PMID: 24844255.
110. Bertolli E, Franke V, Calsavara VF, de Macedo MP, Pinto CAL, van Houdt WJ, Wouters MWJM, Duprat Neto JP, van Akkooi ACJ. Validation of a Nomogram for Non-sentinel Node Positivity in Melanoma Patients, and Its Clinical Implications: A Brazilian-Dutch Study. *Ann Surg Oncol*. 2019 Feb;26(2):395-405. doi: 10.1245/s10434-018-7038-9. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30456681.
111. Sinnamon AJ, Neuwirth MG, Yalamanchi P, Gimotty P, Elder DE, Xu X, Kelz RR, Roses RE, Chu EY, Ming ME, Fraker DL, Karakousis GC. Association Between Patient Age and Lymph Node Positivity in Thin Melanoma. *JAMA Dermatol*. 2017 Sep 1;153(9):866-873. doi: 10.1001/jamadermatol.2017.2497. PMID: 28724122; PMCID: PMC5710422.
112. Freeman SR, Gibbs BB, Brodland DG, Zitelli JA. Prognostic value of sentinel lymph node biopsy compared with that of Breslow thickness: implications for informed consent in patients with invasive melanoma. *Dermatol Surg*. 2013 Dec;39(12):1800-12. doi: 10.1111/dsu.12351. Epub 2013 Nov 10. PMID: 24299573.
113. Speijers MJ, Bastiaannet E, Sloot S, Suurmeijer AJ, Hoekstra HJ. Tumor mitotic rate added to the equation: melanoma prognostic factors changed? : a single-institution database study on the prognostic value of tumor mitotic rate for sentinel lymph node status and survival of cutaneous melanoma patients. *Ann Surg Oncol*. 2015 Sep;22(9):2978-87. doi: 10.1245/s10434-014-4349-3. Epub 2015 Jan 21. PMID: 256055 Kirkland EB, Zitelli JA. Mitotic rate for thin melanomas: should a single mitotic figure warrant a sentinel lymph node biopsy? *Dermatol Surg*. 2014 Sep;40(9):937-45. doi: 10.1097/01.DSS.0000452619.94264.ff. PMID: 25072127.14.
114. Wat H, Senthilselvan A, Salopek TG. A retrospective, multicenter analysis of the predictive value of mitotic rate for sentinel lymph node (СЛН) positivity in thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Jan;74(1):94-101. doi: 10.1016/j.jaad.2015.09.014. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26542815.
115. Maibach F, Sadozai H, Seyed Jafari SM, Hunger RE, Schenk M. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Front Immunol*. 2020 Sep 10;11:2105. doi: 10.3389/fimmu.2020.02105. PMID: 33013886; PMCID: PMC7511547.
116. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 20;30(21):2678-83. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8539. Epub 2012 Jun 18. PMID: 22711850.
117. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, Li C, Wang Y, Xue Y, Song X, Li H, Li G. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019 Apr 3;8(7):1593806. doi: 10.1080/2162402X.2019.1593806. PMID: 31143514; PMCID: PMC6527267.
118. de Vries M, Speijers MJ, Bastiaannet E, Plukker JT, Brouwers AH, van Ginkel RJ, Suurmeijer AJ, Hoekstra HJ. Long-term follow-up reveals that ulceration and sentinel lymph node status are the strongest predictors for survival in patients with primary cutaneous melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Aug;37(8):681-7. doi: 10.1016/j.ejso.2011.05.003. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21636244.
119. Panasiti V, Devirgilli V, Curzio M, Roberti V, Gobbi S, Rossi M, Bottoni U, Clerico R, Scuderi N, Calvieri S. Predictive factors for false negative sentinel lymph node in melanoma patients. *Dermatol Surg*. 2010 Oct;36(10):1521-8. doi: 10.1111/j.1524-4725.2010.01676.x. PMID: 20698871.
120. Cadili A, Dabbs K. Predictors of sentinel lymph node metastasis in melanoma. *Can J Surg*. 2010 Feb;53(1):32-6. PMID: 20100410; PMCID: PMC2810014.

121. Bertolli E, de Macedo MP, Pinto CA, Damascena AS, Molina AS, Ueno PS, Duprat Neto JP. Evaluation of melanoma features and their relationship with nodal disease: the importance of the pathological report. *Tumori*. 2015 Sep-Oct;101(5):501-5. doi: 10.5301/tj.5000298. Epub 2015 May 12. PMID: 25983100.
122. Farahi JM, Fazzari M, Braunberger T, Caravaglio JV, Kretowicz A, Wells K, Dellavalle RP, Norris D, Alkousakis T. Gender differences in melanoma prognostic factors. *Dermatol Online J*. 2018 Apr 15;24(4):13030/qt1gs163n8. PMID: 29905998.
123. Persa OD, Knuever J, Mauch C, Schlaak M. Complete lymph node dissection or observation in melanoma patients with multiple positive sentinel lymph nodes: A single-center retrospective analysis. *J Dermatol*. 2018 Oct;45(10):1191-1194. doi: 10.1111/1346-8138.14577. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30095864.
124. Lee DY, Lau BJ, Huynh KT, Flaherty DC, Lee JH, Stern SL, O'Day SJ, Foshag Lj, Faries MB. Impact of Completion Lymph Node Dissection on Patients with Positive Sentinel Lymph Node Biopsy in Melanoma. *J Am Coll Surg*. 2016 Jul;223(1):9-18. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2016.01.045. Epub 2016 Jan 29. PMID: 27236435; PMCID: PMC4925269.
125. Richtig, G.; Richtig, E.; Neiss, A.N.; Quehenberger, F.; Gmainer, D.G.; Kamolz, L.P.; Lumenta, D.B. (2020). Does the time interval between sentinel lymph node biopsy and completion lymph node dissection affect outcome in malignant melanoma? A retrospective cohort study. *International Journal of Surgery*, 75(), 160–164. doi:10.1016/j.ijssu.2020.01.146
126. Leung AM, Morton DL, Ozao-Choy J, Hari DM, Shin-Sim M, Difronzo AL, Faries MB. Staging of regional lymph nodes in melanoma: a case for including nonsentinel lymph node positivity in the American Joint Committee on Cancer staging system. *JAMA Surg*. 2013 Sep;148(9):879-84. doi:10.1001/jamasurg.2013.3044. PMID: 23903435; PMCID: PMC3854002.
127. Rutkowski P, Szydłowski K, Nowecki ZI, Sałamacha M, Goryń T, Mitrega-Korab B, Pieńkowski A, Dziewirski W, Zdzienicki M. The long-term results and prognostic significance of cutaneous melanoma surgery using sentinel node biopsy with triple technique. *World J Surg Oncol*. 2015 Oct 13;13:299. doi: 10.1186/s12957-015-0701-8. PMID: 26462471; PMCID: PMC4603583.
128. Cochran AJ, Wen DR, Huang RR, Wang HJ, Elashoff R, Morton DL. Prediction of metastatic melanoma in nonsentinel nodes and clinical outcome based on the primary melanoma and the sentinel node. *Mod Pathol*. 2004 Jul;17(7):747-55. doi: 10.1038/modpathol.3800117. PMID: 15098011.
129. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, Jahkola T, Bowles TL, Testori A, Beitsch PD, Hoekstra HJ, Moncrieff M, Ingvar C, Wouters MWJM, Sabel MS, Levine EA, Agnese D, Henderson M, Dummer R, Rossi CR, Neves RI, Trocha SD, Wright F, Byrd DR, Matter M, Hsueh E, MacKenzie-Ross A, Johnson DB, Terheyden P, Berger AC, Huston TL, Wayne JD, Smithers BM, Neuman HB, Schneebaum S, Gershenwald JE, Ariyan CE, Desai DC, Jacobs L, McMasters KM, Gesierich A, Hersey P, Bines SD, Kane JM, Barth RJ, McKinnon G, Farma JM, Schultz E, Vidal-Sicart S, Hofer RA, Lewis JM, Scheri R, Kelley MC, Nieweg OE, Noyes RD, Hoon DSB, Wang HJ, Elashoff DA, Elashoff RM. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 Jun 8;376(23):2211-2222. doi: 10.1056/NEJMoa1613210. PMID: 28591523; PMCID: PMC5548388.
130. Verver D, van Klaveren D, Franke V, van Akkooi ACJ, Rutkowski P, Keilholz U, Eggermont AMM, Nijsten T, Grünhagen D, Verhoef C. Development and validation of a nomogram to predict recurrence and melanoma-specific mortality in patients with negative sentinel lymph nodes. *Br J Surg*. 2019 Feb;106(3):217-225. doi: 10.1002/bjs.10995. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30307046; PMCID: PMC6585628.

131. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19917835; PMCID: PMC2793035.
132. Murray CA, Leong WL, McCready DR, Ghazarian DM. Histopathological patterns of melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *J Clin Pathol*. 2004 Jan;57(1):64-7. doi: 10.1136/jcp.57.1.64. PMID: 14693838; PMCID: PMC1770187.
133. van Akkooi AC, de Wilt JH, Verhoef C, Schmitz PI, van Geel AN, Eggermont AM, Kliffen M. Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Ann Oncol*. 2006 Oct;17(10):1578-85. doi: 10.1093/annonc/mdl176. Epub 2006 Sep 12. PMID: 16968875.
134. Persa OD, Knuever J, Mauch C, Schlaak M. Complete lymph node dissection or observation in melanoma patients with multiple positive sentinel lymph nodes: A single-center retrospective analysis. *J Dermatol*. 2018 Oct;45(10):1191-1194. doi: 10.1111/1346-8138.14577. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30095864.
135. Starz H, Siedlecki K, Balda BR. Sentinel lymphonodectomy and s-classification: a successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2004 Mar;11(3 Suppl):162S-8S. doi: 10.1007/BF02523622. PMID: 15023745.
136. Palve J, Ylitalo L, Luukkaala T, Jernman J, Korhonen N. Sentinel node tumor burden in prediction of prognosis in melanoma patients. *Clin Exp Metastasis*. 2020 Apr;37(2):365-376. doi: 10.1007/s10585-020-10028-0. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32076905; PMCID: PMC7138780.
137. Gutiérrez-González E, López-Abente G, Aragonés N, Pollán M, Pastor-Barriuso R, Sánchez MJ, Pérez-Gómez B. Trends in mortality from cutaneous malignant melanoma in Spain (1982-2016): sex-specific age-cohort-period effects. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Aug;33(8):1522-1528. doi: 10.1111/jdv.15565. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30868690.
138. Lim Y, Lee J, Lee DY. Is the survival rate for acral melanoma actually worse than other cutaneous melanomas? *J Dermatol*. 2020 Mar;47(3):251-256. doi: 10.1111/1346-8138.15201. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31889335.
139. Maibach F, Sadozai H, Seyed Jafari SM, Hunger RE, Schenk M. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Front Immunol*. 2020 Sep 10;11:2105. doi: 10.3389/fimmu.2020.02105. PMID: 33013886; PMCID: PMC7511547.
140. Mishra K, Barnhill RL, Paddock LE, Fine JA, Berwick M. Histopathologic variables differentially affect melanoma survival by age at diagnosis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019 Jul;32(4):593-600. doi: 10.1111/pcmr.12770. Epub 2019 Feb 16. PMID: 30706692.
141. Wee E, Wolfe R, Mclean C, Kelly JW, Pan Y. Clinically amelanotic or hypomelanotic melanoma: Anatomic distribution, risk factors, and survival. *J Am Acad Dermatol*. 2018 Oct;79(4):645-651.e4. doi: 10.1016/j.jaad.2018.04.045. PMID: 30241625.
142. Tas F, Erturk K. Histological lymphovascular invasion is associated with nodal involvement, recurrence, and survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Int J Dermatol*. 2017 Feb;56(2):166-170. doi: 10.1111/ijd.13405. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27778319.
143. van Lanschot CG, Koljenović S, Grunhagen D, Verhoef C, van Akkooi AC. Pigmentation in the sentinel node correlates with increased sentinel node tumor burden in melanoma patients. *Melanoma Res*. 2014 Jun;24(3):261-6. doi: 10.1097/CMR.000000000000061. PMID: 24608184.

144. Oude Ophuis CM, Verhoef C, Rutkowski P, Powell BW, van der Hage JA, van Leeuwen PA, Voit CA, Testori A, Robert C, Hoekstra HJ, Grünhagen D, Eggermont AM, van Akkooi AC. The interval between primary melanoma excision and sentinel node biopsy is not associated with survival in sentinel node positive patients - An EORTC Melanoma Group study. *Eur J Surg Oncol*. 2016 Dec;42(12):1906-1913. doi: 10.1016/j.ejso.2016.05.012. Epub 2016 May 27. PMID: 27266406.
145. Satzger I, Leiter U, Gräger N, Keim U, Garbe C, Gutzmer R. Melanoma-specific survival in patients with positive sentinel lymph nodes: Relevance of sentinel tumor burden. *Eur J Cancer*. 2019 Dec;123:83-91. doi: 10.1016/j.ejca.2019.07.004. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31677550.
146. Zager JS, Gastman BR, Leachman S, Gonzalez RC, Fleming MD, Ferris LK, Ho J, Miller AR, Cook RW, Covington KR, Meldi-Plasseraud K, Middlebrook B, Kaminester LH, Greisinger A, Estrada SI, Pariser DM, Cranmer LD, Messina JL, Vetto JT, Wayne JD, Delman KA, Lawson DH, Gerami P. Performance of a prognostic 31-gene expression profile in an independent cohort of 523 cutaneous melanoma patients. *BMC Cancer*. 2018 Feb 5;18(1):130. doi: 10.1186/s12885-018-4016-3. PMID: 29402264; PMCID: PMC5800282.
147. Dummer R, Brase JC, Garrett J, Campbell CD, Gasal E, Squires M, Gusenleitner D, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, Flaherty K, Larkin J, Robert C, Kefford R, Kirkwood JM, Hauschild A, Schadendorf D, Long GV. Adjuvant dabrafenib plus trametinib versus placebo in patients with resected, BRAFV600-mutant, stage III melanoma (COMBI-AD): exploratory biomarker analyses from a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Mar;21(3):358-372. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30062-0. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32007138.
148. Sheth M, Ko J. Exploring the relationship between Overall Survival (OS), Progression Free Survival (PFS) and Objective Response Rate (ORR) in patients with advanced melanoma. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;26:100272. doi: 10.1016/j.ctarc.2020.100272. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33338851.
149. Amabile S, Rocuzzo G, Pala V, Tonella L, Rubatto M, Merli M, Fava P, Ribero S, Fierro MT, Queirolo P, Quagliano P. Clinical Significance of Distant Metastasis-Free Survival (DMFS) in Melanoma: A Narrative Review from Adjuvant Clinical Trials. *J Clin Med*. 2021 Nov 23;10(23):5475. doi: 10.3390/jcm10235475. PMID: 34884176; PMCID: PMC8658595.
150. Sars C, Gillgren P, Schultz I, Lindqvist EK. Risk Factors for Complications and Long-Term Outcomes Following Completion Lymph Node Dissection for Cutaneous Melanoma: A Retrospective Cohort Study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2020 Aug;73(8):1540-1546. doi: 10.1016/j.bjps.2020.02.038. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32467082.

