

**УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ СА СЕДИШТЕМ У КОСОВСКОЈ
МИТРОВИЦИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Асист. др Татјана Радевић

**МУТАЦИЈЕ У BRAF, NRAS И SKIT ГЕНУ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА
МЕТАСТАТСКИМ МЕЛАНОМОМ И ЊИХОВА ПОВЕЗАНОСТ СА
КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ КАРАКТЕРИСТИКАМА, ФАКТОРИМА
РИЗИКА И ТОКОМ БОЛЕСТИ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Косовска Митровица, 2017. год.

Огромну захвалност гуђујем свом ментору, проф. др Лидији Канголф Секуловић, на великој подрици, поверењу и губоком разумевању, као и веома корисним савешћима и константној помоћи током свих ових година.

Велику захвалност уђуђујем проф. др Звонку Маћићу, из Института за медицинска истраживања, Војномедицинске академије, на изузетној сарадњи, стручним и корисним идејама.

Захваљујем се проф. др Жељку Миђушковићу, на стручној и пријатељској помоћи током израде докторске дисертације.

Хвала дил. биохемичару Стеви Јованђићу, из Института за медицинска истраживања, Војномедицинске академије, без чијеј ентузијазма, напорној рада и пријатељске подрике овај рад не би био могућ.

Хвала асист. др Зорану Букумирићу, из Института за Медицинску статистику и информатику, Медицинској факултету у Београду, колеги и пријатељу на подрици, помоћи и суђесћјама током статистичке обраде резултата

Захвалност гуђујем својим колегама и особљу Клинике за кожне и полне болести Војномедицинске академије, на великом разумевању током израде докторске дисертације.

Посебну захвалност гуђујем породици и пријатељима на сирћељу, константној подрици и несебичној помоћи током свих ових година.

*Мојој Сари и Данилу
и дивним родитељима
за разумевање и подршку*

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1. Епидемиологија меланома.....	2
2.2. Етиопатогенеза.....	3
2.3. Клиничко-патолошка класификација меланома.....	8
2.3.1. Површинско ширећи меланом.....	8
2.3.2. Нодуларни меланом.....	9
2.3.3. Лентиго малигна меланома.....	10
2.3.4. Акрални лентигинозни меланом.....	11
2.4. Хистопатолошке карактеристике меланома.....	12
2.4.1. Хистолошки типови меланома.....	14
2.4.2. Ретке варијанте меланома.....	18
2.4.3. Хистопатолошка анализа примарног меланома.....	21
2.5. TNM КЛАСИФИКАЦИЈА МЕЛАНОМА.....	24
2.6. КЛИНИЧКЕ МАНИФЕСТАЦИЈЕ МЕТАСТАТСКОГ МЕЛАНОМА.....	25
2.6.1. Локализација метастаза.....	26
2.6.2. Фактори ризика за метастазе у примарном меланому.....	27
2.7. ГЕНЕТСКЕ АЛТЕРАЦИЈЕ У МЕТАСТАТСКОМ МЕЛАНОМУ.....	28
2.7.1. MAPK сигнални пут у метастатском меланому.....	28
2.7.2. Мутације у BRAF гену.....	29
2.7.3. Мутације у NRAS гену.....	30
2.7.4. Мутације у C-KIT гену.....	31
2.7.5. Структура и компоненте MAPK сигналног пута.....	32
2.8. ТЕРАПИЈА МЕЛАНОМА.....	36
2.8.1. Хирургија меланома.....	37
2.8.2. Адјувантна терапија меланома.....	38
2.8.3. Хемиотерапија меланома.....	39
2.8.4. Таргет терапија метастатског меланома.....	40
2.8.5. Имунотерапија.....	42
2.9. Клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора и повезаност са мутационим статусом.....	45

3. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	49
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	50
4.1. Подаци о пацијентима и анализираним узорцима	50
4.1.1. Упитник за пацијенте оболеле од меланома.....	54
4.2. Патохистолошка обрада ткива.....	54
4.3. Детекција мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену	55
4.3.1. Изолација ДНК.....	55
4.3.2. Детекција мутација у BRAF, NRAS и C-KIT генима	57
4.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	63
5. РЕЗУЛТАТИ.....	64
5.1. Демографске и клиничкопатолошке карактеристике испитаника и BRAF статус	64
5.1.1. Полна и старосна структура испитаника	65
5.2. Фактори ризика код оболелих од метастатског меланома са BRAF мутацијом.	66
5.3. Симптоми тумора и BRAF статус	74
5.4. Клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора и BRAF статус	76
5.4.1. Локализација примарног тумора.....	76
5.4.2. Хистолошки тип примарног тумора.....	79
5.4.3. Дебљина тумора по Бреслоу.....	81
5.4.4. Улцерација примарног тумора	82
5.4.5. Број митоза.....	83
5.4.6. Број патолошки измењених лимфних чворова	84
5.4.7. Иницијални клинички стадијум на дијагнози.....	84
5.4.8. Дистрибуција испитаника према подстадијуму метастатске болести IV стадијума	85
5.4.9. Локализација удаљених метастаза	87
5.4.10. Дистрибуција испитаника према броју захваћених органа.....	88
5.4.11. Дистрибуција испитаника према вредностима LDH код испитиваних група	90
5.5. АНАЛИЗА ТОКА БОЛЕСТИ И BRAF МУТАЦИОНИ СТАТУС	91
5.5.1. Време од дијагнозе до првих удаљених метастаза	91
5.5.2. Време од III до IV стадијума	93
5.5.3. Време од IV стадијума до последњег контакта са пацијентом	94

5.5.4.	Укупно преживљавање испитаника	95
5.5.5.	Једногодишње и двогодишње преживљавање пацијената са метастатским меланомом	96
5.6.	Демографске и клиничкопатолошке карактеристике NRAS испитаника	96
5.6.1.	Фактори ризика код оболелих од метастатског меланома са NRAS мутацијом	97
5.6.2.	Клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора и NRAS мутација	99
5.6.3.	Анализа тока болести и NRAS мутациони статус	103
5.7.	Демографске и клиничко-патолошке карактеристике BRAF/NRAS позитивних и BRAF/NRAS негативних испитаника	107
5.7.1.	Анализа преживљавања BRAF/NRAS испитаника	110
5.8.	Терапијски ефекат хемиотерапије и иновативне терапије	114
6.	ДИСКУСИЈА	120
6.1.	Детекција мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастатским меланомом	121
6.2.	Демографске и клиничке карактеристике пацијената на основу BRAF мутационог статуса	122
6.3.	Демографске и клиничке карактеристике пацијената на основу NRAS мутационог статуса	132
6.4.	Анализа преживљавања BRAF и NRAS испитаника	134
6.5.	Одговор на терапију	136
7.	ЗАКЉУЧЦИ	139
8.	ЛИТЕРАТУРА	140

1. УВОД

Меланом је болест великог друштвено-економског значаја са порастом инциденце у свету која драматично расте последњих деценија, те чини 3-7% на годишњем нивоу. Меланом је малигни тумор меланоцита, ћелија које продукују пигмент меланин. Доминантно захвата кожу, али може захватити и друге структуре у којима се налазе меланоцити као што су структуре ока, лептоменинге, унутрашње уво и мукозе. Може настати из већ постојећег невуса или у 70-80% случајева де ново, на потпуно не измењеној кожи [1–4].

Најчешће се јавља код особа кавкаске расе а повезан је са одређеним фенотипским карактеристикама: плава или плава или црвена коса, са пегамма и светлом кожом која не тамни. Код жена се најчешће јавља на потколеницама, а код мушкараца на трупу.

С обзиром да се ради о веома агресивном типу тумора, најчешће метастазира у лимфне чворове, плућа, јетру, кости и централни нервни систем [5]. Молекуларна анализа мутација у BRAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), NRAS (*NRAS proto-oncogene, GTPase*) и C-KIT (*KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*) гену код оболелих од метастатског меланома су предмет бројних истраживања последњих година. Њихово присуство упоређивано је са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика, током болести и одговором на терапију инхибиторима ових гена или применом имунотерапије. За пацијенте са метастатским меланомом детекција мутација у BRAF гену представља облигаторну дијагностичку процедуру.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Епидемиологија меланома

Меланом коже је потенцијално најопаснији тип тумора који чини 3-5% свих тумора коже и узрочник је у више у 90% смртних случајева у односу на друге туморе коже, који припадају групи немеланомских карцинома [6–11].

Инциденца меланома у свету драматично расте последњих неколико деценија, те чини 3-7% на годишњем нивоу стим да се очекује да ће се инциденца додатно удвостручити током наредне две деценије [12]. Компаративни подаци IARC (енгл. *International Agency for Research on Cancer*) о инциденци меланома на подручју пет континента у периоду 1998–2002 године указују на разлике у инциденци широм света где је она највећа у Квинсленду у Аустралији и износи 55.8 мушкараца и 41.1 жена /100000 становника, а најнижа у Белорусији 2.7 мушкараца и 3.5 жена и Србији 3.8 мушкараца и 4.8 жена /100000 становника [13].

Најновији подаци говоре у прилог стопи инциденце која је још увек највећа у Аустралији и Новом Зеланду где један од 14 мушкараца и једна од 23 жене развије меланом током живота, а најмања у земљама Далеког Истока. У Европи, она је највећа у Скандинавији (више од 15 на 100000), наспрам Јужне Европе где инциденца износи (више од 5 на 100000) [14,15].

Ово се може објаснити разликама у фототипу коже и разликама у ставовима експозиције сунцу у Северним и Јужним деловима Европе. Инциденца меланома у Србији према подацима Института за јавно здравље „Милан Јовановић Батут“ износи 5/100000 WSR (енгл. *world standardized rate*), а према најновијим подацима IARC и Globocan пројекта из 2012. године износи 7.4 код жена и 11.2/100000 код мушкараца. Подаци о епидемиологији меланома у Јужној и Југоисточној Европи уочавају разлике које се само делом могу приписати географским и етничким карактеристикама. У 2008. години светска стандардизована инциденца (WSI) у Албанији је износила 1.9 за мушкарце, за жене 1.7 у Грчкој 2.5 за мушкарце и 2.0 за жене, у Хрватској 8.3 за мушкарце, а 7.3 за жене, док у централној Србији износи 5.3 за мушкарце и 4.0 за жене [16,17] .

Иако се разлике између различитих делова Јужне, односно Југоисточне Европе и Медитеранског региона могу објаснити климатским условима и излагању сунцу, сматра се да је најочљивија разлика између земаља југоисточне Европе, последица непотпуног пријављивања, као и касно откривање меланома у различитим регионима као и различитих нивоа превенције у овим земљама.

Епидемиолошке студије указују да постоје разлике између мушкараца и жена, те је у Европи забележено да се чешће јавља код жена млађих од 44 године, а код старијих особа чешћи је међу мушкарцима, док је код становника Аустралије и САД чешћи код мушкараца [18–21].

Стопа морталитета је према најновијим подацима релативно стабилна од 1990. године за разлику од инциденце која показује повећање последње 2 до 3 деценије. Неподударности између инциденце и морталитета у Централној Европи, САД и Аустралији указују на рану детекцију пре свега танких, мање инвазивних меланома који имају свакако бољу прогнозу [22,23].

Такође на стабилну стопу морталитета као могући узроци утичу и превентивни прегледи коже, откривање танких меланома, биолошки мање агресивних тумора са ниским или клинички безначајним метастатским ризиком [22].

Стопа морталитета од меланома са старашћу се повећава што се објашњава појавом дебљих меланома код старијих особа, различитог биолошког понашања, измењене одбрамбене способности домаћина, појава нодуларног типа меланома, који су локализовани на глави и врату и дијагностиковани у касном стадијуму болести [24].

Преживљавање болесника старијих од 60 година значано је краће од оног код млађих болесника [25]. За разлику од инциденце, преживљавање жена са меланомом широм света је дуже у поређењу са мушкарцима.

2.2. Етиопатогенеза

Меланом настаје као последица интеракције генетске предиспозиције појединца и фактора околине у којој живи. За настанак кутаног меланома од изузетне важности представљају фактори ризика, међу којима су најзначајнији:

УВ зрачење је један од водећих узрочника у настанку не само меланома већ и осталих немеланомских карцинома коже којима припадају базоцелуларни и планоцелуларни, посебно код високо ризичног дела популације. УВ зрачење оштећује структуре коже доводећи до опекотина, пигментације, старења коже и појаве карцинома коже. У једној студији је показано да је 65-90% свих меланома узроковано изложеношћу УВ зрачењем [26,27].

Количина УВ зрачења која доспева на површину земље зависи од неколико фактора. Један од њих је сигурно озонски омотач који има протективну улогу јер апсорбује УВ зрачење. Његово оштећење од 1% корелира са повећањем стопе морталитета меланома за 2%, односно оштећење за 10% је узрок појаве 4500 нових меланома и 300000 нових немеланомских карцинома коже [28,29].

Табела 1: Фактори ризика за настанак меланома*

Фактори ризика за меланом	Релативни ризик
Генетски фактори:	
1. Породична анамнеза	35-70x
Невуси:	
1. Мултипли бенигни невуси (>100)	11x
2. Мултипли атипични невуси	11x
Претходна обољења:	
1. Претходни меланом	8.5x
2. Претходни немеланомски карцином коже	2.9x
Имуносупресија	
1. Трансплатација	3x
2. AIDS	1.5x
Фенотипске карактеристике	
1. Фототип коже I	1.7x
2. Присуство пега	2.5x
3. Плава боја очију	1.6x
4. Плава или црвена боја косе	2.4x
Експозиција УВ зрачењу	
1. Опекотине у детињству	2.5x

*према *Thompson и сар.* [30]

Други фактор који утиче на количину УВ зрака који доспевају на површину земље је доба дана и годишње доба, с обзиром да је инсолација највећа у току летњих месеци и у периоду од 10-17 часова. Треба напоменути да снег, песак и метал

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код њацијенаца са метастазиским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

могу рефлектовати 90% док морска вода рефлектује око 15% УВ радијације [28]. На основу ових сазнања засноване су и препоруке за заштиту од ултравиолетног зрачења које указују на мере заштите у смислу избегавања непотребног излагања сунчевим зрацима у периоду највеће инсолације, мере механичке заштите и коришћење препарата са високим фактором који штите од УВА и УВБ спектра светлости.

УВ зрачење има кључну улогу у патогенези тумора коже, а самим тим и меланома доводећи до оштећења ДНК. Нема директног налаза циклопиримидинских димера, али постоји доказ репликације са грешкама услед УВ индукованог оштећења ДНК која може довести до мутација у BRAF гену, имуносупресије, оксидативног стреса и инфламаторног одговора и сви имају значајну улогу у настанку карцинома коже [31]. Такође, УВ зрачење доводи до мутација у p53 супресорном гену који је укључен у процес репарације ДНК или апоптозе ћелија са значајним оштећењем ДНК. Уколико су p53 гени мутирани, онемогућен је процес опоравка ДНК и као резултат тога настаје дисрегулација апоптозе, неконтролисана експанзија мутираних ћелија и настанак карцинома коже [32].

Епидемиолошке студије указују да је периодично, интензивно излагање сунцу током одмора, (посебно за време периода детињства и адолесценције) много важније у настанку меланома него дуготрајно, континуирано излагање које је одговорно поред осталих фактора за настанак немеланомских карцинома коже (базоцелуларног и планоцелуларног) [21,33].

Након акутног интермитентног излагања коже интензивној радијацији настају опекотине које представљају инфламаторне реакције и сматрају се важним предиктором меланома [34–38].

Пређашња историја о опекотинама служи као сурогат мера интермитентног, интензивног излагања сунцу. Појава меланома код одраслих је уско повезана са фреквенцијом појаве опекотина од сунца у детињству. Појава пет или више опекотина пре 18.године удвостручује шансу за настанак меланома током одраслог доба [39]. У метаанализи 57 досадашњих студија доказано је да су интермитентно излагање сунчевим зрацима и опекотине несумњиво фактори ризика неколико деценија пре развоја меланома [34]. Анализа 2 проспективне кохортне студије жена и мушкараца, као и друге студије указале су на везу између опекотина и настанка

меланома на трупу код мушкараца у односу на друге делове тела (глава, врат и екстремитети). У прилог овоме иде чињеница да је труп најизложенији део тела сунчевом зрачењу, односно епизодама краткотрајног и интензивног зрачења са настанком опекотима наспрам групе која није имала опекотине на трупу или је имала на другим деловима тела [40–42].

Још једна важна чињеница је да је протеклих деценија промењен тренд одевања који је условио већу инциденцу меланома на трупу код мушкараца у односу на друга специфична места, док је код жена чешћи на потколеницама.

Осим природног извора зрачења и артефицијални извори УВ зрачења као што је фототерапија која се користи у лечењу многих дерматолошких обољења уз помоћ УВБ лампи које емитују УВБ радијацију или ПУВА терапије за коју се користе фотосензибилизатори и УВА светлост такође могу довести до настанка карцинома коже [43]. Стерн и сарадници су на основу студија спроведених у Европи и Америци указали на повећану инциденцу меланома и немеланомских карцинома коже код пацијената који су третирани ПУВА терапијом и да је ризик дозно и временски зависан. Велике кохортне студије су откриле да су пацијенти који су били на ПУВА терапији и 25 година након престанка коришћења још увек подложни настанку карцинома коже, те је неопходно њихово праћење [44].

Употреба УВ лампи које се користе у соларијумима, а емитују УВА спектар зрачења и око 5% УВБ су такође одговорне за настанак меланома и других карцинома [45–47]. Утврђено је да је ризик за настанак меланома повећан за 75% код особа које су соларијум користиле први пут пре 35. године живота, као и да свако излагање у соларијуму повећава вероватноћу за добијање меланома за 1.8% [48].

Међународна агенција за истраживање рака (IARC) их је на основу података о штетности сунчевог и ултраљубичастог зрачења означила као значајне факторе у настанку меланома коже, а од 2009. године су уређаји који емитују УВ зраке класификовани у карциногене 1. групе те су у многим земљама апсолутно забрањени за коришћење особама млађим од 18. година [49].

Имајући у виду да УВ зрачење појачава пигментацију коже, на фотоекстонираним деловима коже као што су лице, горњи део трупа, рамена и шаке јављају се пигментне макуле, светлобраон боје, дијаметра преко 5 mm, са ирегуларним ивицама које се називају соларни лентиго и сведоче о степену

оштећења коже, те се такође убрајају у факторе ризика који су повезани са настанком меланома и могу се користити за идентификацију особа са повећаним ризиком за настанак меланома коже. У студији случајева и контрола (енгл. *case-control*) рађеној у Француској на 125 пацијената, али потврђено и у студијама у Италији и Аустралији уочена је висока преваленца мултиплих соларних лентига на труп и раменима код пацијената са меланомом коже у односу на меланоме на другим регијама и статистички сигнификантна удруженост са поновљеним опекотинама пре 28. године живота што указује на потенцијалну топографску везу између претходних опекотина, настанка соларног лентига и меланома коже [50–52].

Фенотипске карактеристике. Особе светле пути, пре свега особе са фототипом коже I и II (особе које имају врло светлу или светлу кожу, које на сунцу увек поцрвене и никад или минимално потамне), плаве или риђокосе, светле боје очију (плаве или зелене) имају фенотипске карактеристике које су повезане са повећаним ризиком за настанак меланома. Црвенокосе особе најчешће имају пеге и плаве очи, док тамнопуте имају браон очи и веома ретко пеге. Меланин свакако има протективну улогу, те се меланом ређе јавља код особа са фототипом V и VI [53]. У ретроспективној анализи код 256 млађих одраслих особа показано је да пацијенти са плавом и зеленом бојом очију обољевају од меланома у млађем животном узрасту [54], док старије особе оболеле од меланома најчешће имају црну и браон боју очију [55].

Повећан ризик за настанак меланома представљају и број невуса, обичних и диспластичних за које је потврђено да представљају важан независан фактор ризика. Ризик за особе са већим бројем невуса преко 100 до 120 је седмоструко већи у поређењу са особама које имају до 15 невуса. Такође, особе са 5 диспластичних невуса имају шестоструко већи ризик у односу на особе без диспластичних невуса. Када се ради о постојању солитарног диспластичног невуса ризик за настанак меланома је двоструко већи [56]. С друге стране, код особа које имају конгениталне невусе који су потенцијални прекурсори меланома, ниво ризика варира у односу на величину саме лезије. Ризик за настанак меланома код великих конгениталних невуса (већих од 20 cm у дијаметру), износи 5-10%.

Породична појава меланома је већ добро познати фактор ризика и јавља у 10-15% свих пацијената. Постојање меланома код једног првостепеног рођака утростручује ризик, док појава код три или више првостепених рођака повећава

ризик на 35-70%. Пацијенти са фамилијарном појавом меланома имају ранију појаву и мултипле, примарне меланоме, као и атипичне невусе [57,58,59]. Најчешћи гени који су повезани са фамилијарним обликом меланома су CDKN2A и CDK [60].

Лична анамнеза о меланому: претходна појава меланома повећава ризик за настанак другог примарног меланома у 5-15%. Код пацијената са мултиплим примарним меланомима, приближно половина има појаву другог меланома у близини региона претходно насталог меланома и код скоро половине пацијената је то у пар првих година након иницијалне дијагнозе.

За настанак меланома код трансплантираних пацијената, пацијената са лимфомима и синдрома стечене имнодефицијенције (AIDS) имуносупресија је забележена као фактор ризика за меланом, код којих је скоро петоструко повећана инциденца и код којих је укупно преживљавање лошије. Недавно су Бревер (Brewer) и сарадници анализирали велику групу од 638 трансплантираних пацијената код којих је дијагностиковано 724 меланома. Ова студија је показала да је укупно преживљавање било значајно лошије код трансплантираних пацијената са меланомом него очекивано преживљавање у контролним групама, без обзира на дебљину по Бреслоу и нивоу по Кларку [61].

2.3. Клиничко-патолошка класификација меланома

Меланом је пре више од четрдесет година подељен у 4 субтипа који се разликују клинички, хистопатолошки, а последњих година захваљујући иновативној технологији зна се да имају и различите геномске алтерације. Најчешће клиничке варијанте меланома су:

2.3.1. Површинско ширећи меланом

Површинско ширећи меланом (енгл. *Superficial spreading melanoma-SSM*) који представља најчешћу клиничко-хистолошку варијанту меланома јавља се код особа беле расе у преко 70% случајева [62]. Клинички се испољава у виду макуле неправилних ивица где је присутна различита пребојеност у виду црне, браон, сиве, црвене боје, плаве боје или постоје неколико боја истовремено (Слика бр 1). Ова клиничка презентација се поклапа са хоризонталном фазом раста, док у случају вертикалне фазе раста, површина може бити папиломатозна или улцерозна. Овај тип

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT геном код пацијената са метастазиским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

меланома може настати на било којој анатомској локализацији, али је код мушкараца чешћа појава на кожи трупа, док је код жена на потколеницама. Ово указује да повремено, али и хронично излагање УВ зрачењу може бити иницијални догађај у настанку меланома.

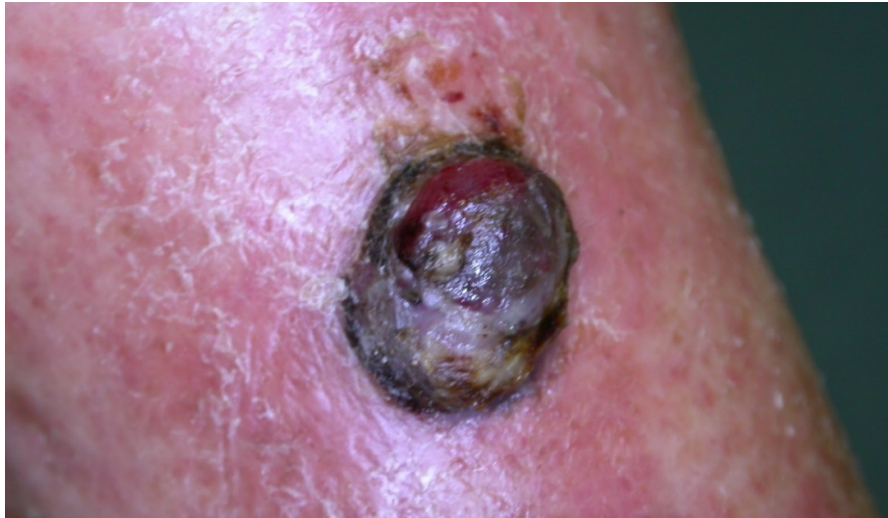


Слика 1. Површинско ширећи меланом, Бреслоу 2,85 mm, без улцерације, pT3a.
(љубазношћу проф. др Маријана Новаковића)

2.3.2. Нодуларни меланом

Нодуларни меланом (енгл. *Nodular melanoma* - NM) чини 15-30% свих меланома који се јавља подједнако код оба пола, између 40-50 године живота [63]. Најчешће се локализује на глави, врату и трупу. Еволуција овог типа тумора је кратка, од неколико месеци до 2 године до постављања дијагнозе. Клинички се карактерише у виду чворића, јасно ограниченог, који брзо расте, тамније пребојен, са или без улцерације (Слика 2). У 5% случајева овакав тумор може бити и амеланотичан, што може довести до погрешне дијагнозе у смислу хемангиома, базоцелуларног карцинома или пиогеног гранулома.

Полипоидни меланом је агресиван субтип нодуларног меланома [64,65] који се у поређењу са нодуларним меланомом одликује већом дебљином тумора, чешћим присуством улцерација, обично се јавља код особа млађе животне доби и има већи ризик за настанак метастаза. Хистолошки га одликују агрегати меланомских ћелија, већег волумена изнад површине коже [66].



Слика 2. Нодуларни меланом, Бреслоу 4,8 mm, са улцерацијом, pT4b
(љубазношћу проф. др Жељка Мијушковића)

2.3.3. Лентиго малигна меланома

Лентиго малигна меланома (енгл. *Lentigo maligna melanoma* - LMM) је субтип који се јавља у 5-15% свих меланома. Настаје на кожи која је хронично оштећена УВ зрачењем у пределу носа и образа, ушних шкољки и поглавине, код особа старије животне доби између 7. и 8. деценије живота. Ова анатомска локализација указује да кумулативни ефекат УВ радијације имају круцијалну улогу у настанку овог типа тумора. Клинички се испољава у виду спорорастуће макуле различитог облика, ирегуларне браон пигментације, величине од 3-6 mm, некада и већег промера (Слика 3). Прекурсорска лезија инвазивног лентиго малигна меланома је лентиго малигна (LM), односно, *in situ* меланом чија је еволуција дуготрајна и коју одликује хоризонтална фаза раста 15 до 30 година, али временом може доћи до трансформације у инвазивни тип тумора. Појава тамне пребојености, присуство нодуса и/или инфилтрација указује на прогресију лентиго малигна у лентиго малигна меланома. Према подацима из литературе, стопа прогресије LM у LMM варира од 5-50% [67].



Слика 3. Лентиго малигна меланом, Бреслоу 0,54 mm без улцерације, 0 митоза/mm², pT1a. (љубазношћу проф. др Жељка Мијушковића)

2.3.4. Акрални лентигозни меланом

Акрални лентигозни меланом (енгл. *Acral lentiginous melanoma* - ALM) је најређи тип тумора који се јавља код особа кавкаске расе, у 2-8% случајева, али је најчешћи форма код црнаца (60-72%) и народа Азијског порекла (29-46%). Чешћи је код мушкараца после 60. године живота и локализује се на акралним деловима, укључујући дланове, табане и субунгвално подручје. Локализација на длановима и табанима не подразумева да се ради о акралној форми, већ могу бити и SSM или NM. Почетна лезија је у виду неправилно пигментисане макуле са нејасним ивицама, које могу достићи величину и по неколико сантиметара и са могућим формирањем нодуларне компоненте [68]. У појединим случајевима има верукозну површину што може бити разлог касно постављене дијагнозе у виду плантарних верука.

Субунгвални меланом сматра се варијантом ALM, који настаје из нокатног матрикса, најчешће палца, у виду лонгитудиналне пигментације нокатног набора и околне коже, са или без дистрофије и елевације нокатне плоче (Хачкинсонов знак).

2.4. Хистопатолошке карактеристике меланома

Морфолошки спектар меланома се може описати на основу карактеристика, које се односе пре свега на микроанатомску локализацију туморских ћелија, њихову архитектуралну организацију и изглед туморских ћелија [69].

1. Меланомске ћелије у кожи могу се наћи интраепидермално, дермално, субкутанно или у меком ткиву.

2. Распоред и густина малигних меланоцита одређују образац њихове инвазије. У епидерму он може бити пацетоидни (појединачни или меланоцити у малим групама присутни кроз целу дебљину епидерма), лентигозни (ексцесивна пролиферација појединачних меланоцита дуж зоне базалне мембране), или као акумулација ћелија у виду ирегуларних гнезда, како у епидерму тако и у дерму, или туморски агрегати, односно нодуларни образац раста у дерму или субкутану.

3. Неуобичајене архитектуралне алтерације коже захваћене меланомом у виду папиломатозне, верукозне и полипоидне конфигурације или алтерације туморске строге у миксоидну, дезмопластичну, чак и са остеоидном и хондроидном метаплазијом.

4. Најчешће морфолошке варијанте малигних меланоцита су епителоидне и вретенасте ћелије. Ређе форме малигних ћелија су дендритичке, сличне неусним ћелијама, анапластичне, циновске, изгледа печатног прстена и рабдоидне.

Меланом има своју микроскопски препознатљиву микроеволуцију на основу које се може проценити степен његове агресивности и стадијум болести.

Цитоморфологија и функционална активност туморских ћелија се разликују од неусних ћелија и меланоцита. Основна морфолошка разлика је у карактеристикама једра. Код малигних меланоцита једра могу бити слична неусним, као код невоидних или минимално девијантних меланома, али показују изразитију пролиферативну активност (Ki67 реактивност) [70]. Најчешће њихова једра су ирегуларних контура, већа од једара кератиноцита, са проминентним еозинофилним нуклеолусима и некада видљивим митотским фигурама. Продукција меланинског пигмента може бити одсутна или ирегуларна па се у цитоплазми може видети

ретенција велике количине пигмента или је он присутан у форми финих прашинастих гранула а некада у трагу или одсутан [71]. Док је код диспластичних невуса и *border line* пигментних лезија очувана ткивна контрола од стране епидерма и дерма код меланома је она нарушена.

Иницијална *in situ* фаза туморске прогресије меланома у епидерму значи припрему трансформисаних меланоцита за преживљавање ван епидерма. Морфолошки се ова фаза препознаје као дисфункција епидермално/меланоцитне јединице када однос кератиноцита према меланоцитима расте (нормално је тај однос 1:5 до 1:36 у корист кератиноцита) [72]. Туморски меланоцити преузимају ову контролу и стичу способност инвазије кроз епидерм (лентигозни, пецетоидни, “*nesting*” или хибридни). Развија се и цитолошка дисплазија и атипичност меланоцита, долази до промене ћелијског циклуса и регулације апоптозе меланоцита и репрограмирања ћелија у ангиогени фенотип [73]. У развијеној *in situ* фази може се уочити активација и умножавање васкуларних простора у горњем дерму што сигнализира ремоделирање дерма у туморску строму и претећу инвазију кроз базалну мембрану епидерма. Временом инвазија малигних меланоцита кроз епидерм узрокује “епидермну потрошњу” – скраћење и нестајање епидермних пречки и тањење епидерма [74]. Све док су туморски меланоцити зависни од кератиноцитних фактора раста и у стању контактне инхибиције одржаваће се његова радијална фаза раста [75].

Вертикална фаза раста меланома почиње са стицањем контактне дезинхибиције меланоцита која у исто време значи и стицање метастатског потенцијала а морфолошки се уочава некохезивност туморских ћелија.

Морфолошке промене испод епидермне базалне мембране у форми ремоделирања екстрацелуларног матрикса дерма и успостављање неоваскуларизације индиректно указују на независност туморских ћелија од ткивне контроле дерма и потребу да се на серији пресека тражи микроинвазивни меланом. Док код диспластичних невуса континуирана ламеларна фиброплазија представља морфолошки показатељ ткивне контроле диспластичних меланоцита, изражена фиброза код дезмопластичних меланома сугерира бољу прогнозу и мању учесталост нодалних метастаза [76]. Промене интеракције малигних меланоцита са кератиноцитима, дермалним фибробластима и крвним судовима повезане су са стицањем њиховог миграторног и инвазивног фенотипа [77]. Изменом организације

свог цитоскелета и начина контакта са екстрацелуларним матриксом малигни меланоцити стичу способност преживљавања и пролиферације и ван епидермне микрооколине [73]. Појава експанзивног нодуса који пенетрира кроз базалну мембрану епидерма и формира дермални нодус туморских ћелија већи од највећег нодуса у граничној зони епидерма представља рану вертикалну фазу раста меланома. Тада се већина туморских ћелија још увек држи у групи а ретке ћелије се одвајају од ње јер почиње њихова миграција у дерм. Овакав изглед указује на успостављену туморску фазу раста меланома [75].

Познато је да су меланоми високо имуногени тумори. Субепидермна акумулација тумор инфилтришућих лимфоцита (енгл. tumor-infiltrating lymphocytes - TIL) је највећа у раној фази микроеволуције меланома, а са његовом даљом еволуцијом опада. Светла и тамна страна туморске инфламације уопште проучавају се код различитих тумора и код меланома. Феномен стварања ожиљка на месту тумора је теоријски прихватљив. Регресије меланома је познат феномен који морфолошки има три фазе:

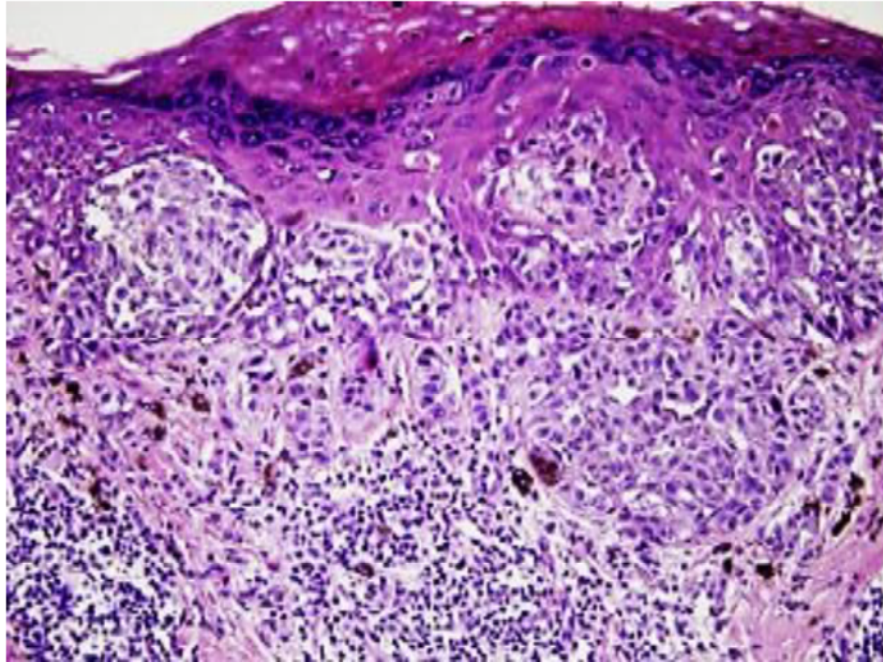
У раној фази појављују се углавном Т лимфоцити и макрофаги који окружују део тумора. У интермедијарној фази број туморских ћелија у папиларном дерму и епидерму изнад њега се смањује и у потпуности замењује лимфоцитима, меланофагама и фиброзом. Некротични меланоцити се могу видети као мала еозинофилна телашца (енгл. *Civatte bodies*). У касној фази регресије виде се већа поља фиброзе а некада долази и до комплетне регресије меланома. Фиброза праћена повећаном васкуларизацијом и меланизацијом замењује дерм а епидерм постаје атрофичан [78]. Истраживања феномена инфламације и регресије меланома приказују контрадикторне резултате [79]. Међутим, позната је појава метастаза меланома након комплетне регресије пигментне лезије коже [80].

2.4.1. Хистолошки типови меланома

Површинско ширећи меланом (енгл. *Superficial spreading melanoma*) одликују појединачне или ћелије у мањим групама у епидерму односно, карактерише га пацетоидна инфилтрација епидерма меланомским ћелијама и лентиринозно ширење дуж базалног слоја (хоризонталана фаза раста). Меланомске ћелије су велике, епителоидног изгледа и обилне цитоплазме окружени лимфоцитним инфилтратом. Вертикална фаза раста се карактерише видљивим митозама туморских ћелија и

ирегуларним гнездима меланоцита у дермису који могу бити окружени лимфоцитним инфилтратом [81].

Овај тип меланома се јавља најчешће код млађих особа које имају диспластичне невусе, на подручјима која су интермитентно изложена УВ зрачењу и већом учесталости BRAF мутације [82–84].

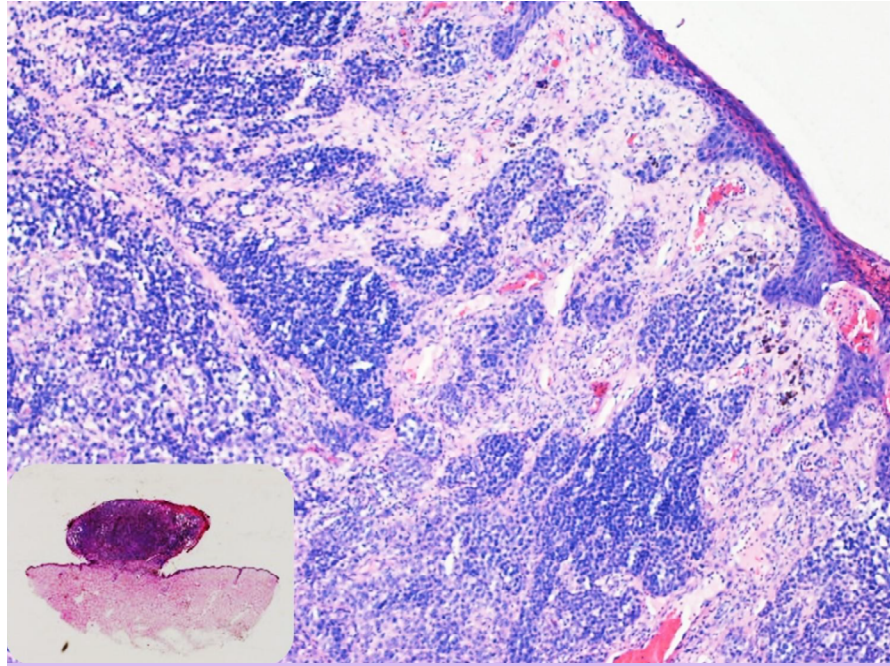


Слика 4. Површинско ширећи меланом у вертикалној фази раста (HE, 100x). У епидерму и горњем дерму се налазе ирегуларна крупна гнезда малигних меланоцита без меланинског пигмента у цитоплазми. У дерму око њих је присутан *non-brisk* мононуклеарни инфламаторни инфилтрат мањи број меланофага. (љубазношћу др Лидије Золатаревски)

Нодуларни меланом се одликује брзом туморском прогресијом. Изнад самог тумора епидерм је истањен или може бити улцерисан. Инвазија меланомских ћелија може бити присутна у епидерму у мањем степену, али нема типичног интаепидермалног ширења. У дерму је присутан чвор или пак мала гнезда туморских ћелија које имају експанзиван образац раста. Ћелије су најчешће епителоидне, али могу бити и вретенасте или може постојати више ћелијских типова [85].

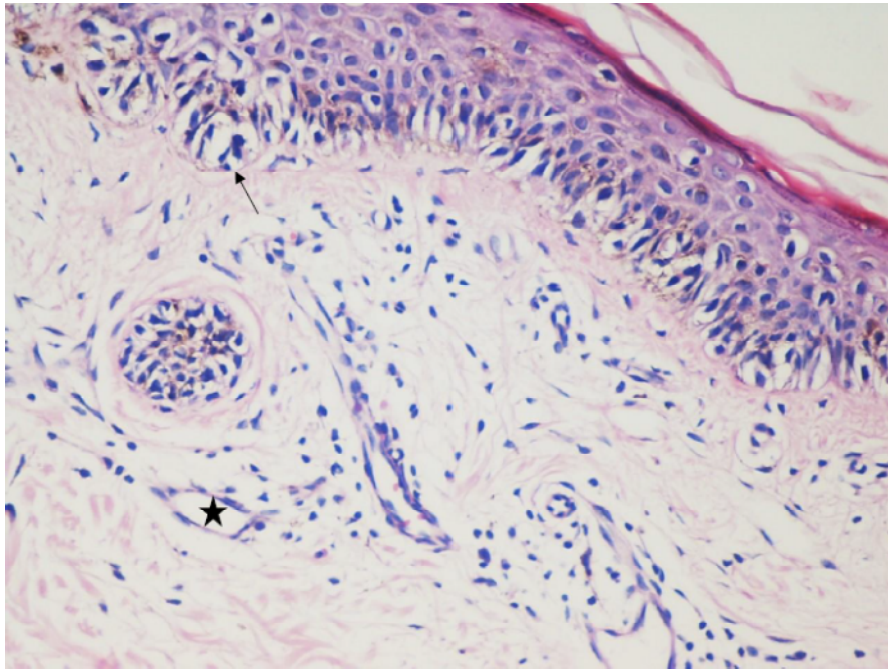
Полијоидни меланом се различито дефинише у литератури као варијанта нодуларног меланома, педункуларна и сесилна егзофитична лезија која хистолошки

може да има карактеристике свих класичних типова меланома које имају сличну инциденцу и биолошки потенцијал [86]. Полипоидни меланом као подтип нодуларног меланома представља агресивнију варијанту у поређењу са нодуларним меланомом. Њега хистолошки одликују агрегати великих ћелија, чешћа појава улцерације, већа дебљина тумора и могућности метастазирања [64–66].



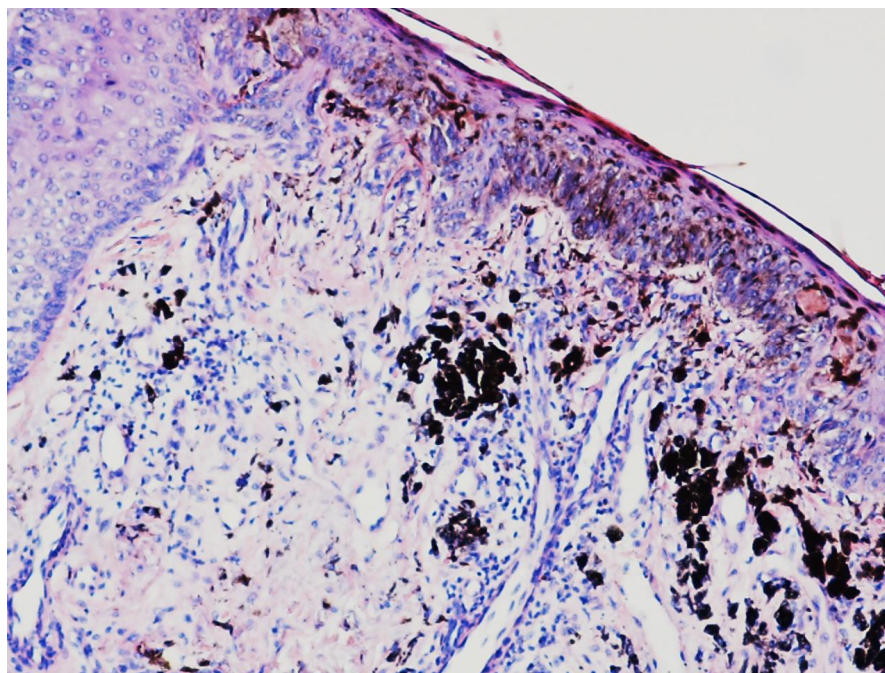
Слика 5. Нодуларни/полипоидни меланом (HE, 50x). Цео дерм је испуњен ирегуларним накупинама мономорфне популације малигнух меланоцита. У инсерту је исечак слајда који показује полипоидну/нодуларну архитектуру меланома. (љубазношћу др Лидије Золатаревски)

Лентигино малигна меланом карактеристично настаје на фотоекспонираним деловима коже код старијих. Хистолошки га карактерише споро прогресивна лентигинозна пролиферација атипичних меланоцита који су полигонални са атипичним једрима у епидерму, али и аднексалним структурама. Уколико дође до појаве нодуса то указује на вертикалну фазу раста. У горњем делу дерма се често налази лимфоцитни инфилтрат са плазма ћелијама и меланофагима и наглашена еластоза [67,87].



Слика 6. Лентиго малигна меланом (HE, 100x). У базалном слоју епидерма присутна је хиперпролиферација вретенастих, атипичних ћелија са светлом цитоплазмом у којој се виде грануле меланинског пигмента (стрелица). У дерму су активирани (дилатирани, елонгирани и лако умножени) крвни судови (звездица), око којих се налази оскудан мононуклеаран инфилтрат. (љубазношћу др Лидије Золатаревски)

Акрални лентигинозни меланом одликује конфлуентна меланоцитна пролиферација дуж епидермодермалне границе. Са прогресијом тумора могу се наћи велика гранична гнезда атипичних меланоцита као и њихово пацетоидно ширење. Овакви тумори су обично улцерисани и карактеришу се развијеним дермалним нодусом са васкуларном и стромалном реакцијом [88,89].



Слика 7. Микроинвазивни акрални лентигозни меланом (HE, 100x). У базалним слојевима епидерма хиперпролиферација атипичних меланоцита са доста меланинског пигмента у цитоплазми. На више места је нарушен континуитет базалне мембране. Кроз епидерм и у горњем дерму се види евакуација веће количине меланинског пигмента. Крвни судови у дерму су дилатирани и елонгирани и око њих се налази мали број мононуклеарних ћелија инфламације. (љубазношћу др Лидије Золатаревски)

2.4.2. Ретке варијанте меланома

Дезмопластични меланом (енгл. *Desmoplastic melanoma* – DM) 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 [90,91]. Забележено је да се јавља код старијих особа, после 60. године живота, на глави, врату, горњој половини трупа, али може и на екстремитетима, акралним деловима и слузницама [92,93]. Хистолошко обележје су слабо диферентоване, вретенасте ћелије са различитим степеном густине и цитолошке атипичности које богато окружују склеротична колагена влакна, и управо због веће густине колагених влакана личи на ожиљак. 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 [94]. Дезмопластичан меланом је подељен у два субтипа: “прави” и “мешовити”. “Прави” DM показују значајно мању учесталост метастазирања у лимфне чворове и боље петогодишње преживљавање у поређењу са пацијентима са “мешовитим” типом DM [93,95]. Поједини аутори сматрају да DM има већу склоност ка локалном рецидиву и ређе метастазира у регионалне лимфне чворове у односу друге субтипове. [93,96].

Невоидни меланом је варијанта која чини мање од 1% свих меланома. Представљају групу меланома који цитоморфолошки личе на меланоцитне невусе, али имају хистолошке карактеристике и биолошко понашање меланома са метастатским потенцијалом. Хистолошки их одликује минимална епидермална меланоцитна пролиферација са дискретном или одсутном пацетоидном интраепидермалним ширењем меланоцита. Клинички се могу презентовати као невус са верукозном површином или у виду пигментованог нодуса и хистолошки их одликује присуство конфлуентних гнезда дермалних меланоцита [97].

Амеланотични меланом је меланом коме недостаје пигмент и јавља се код 2-8% свих типова [98–102]. 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%) и кутаних метастаза. Клинички се презентује 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 услед постојања различитих типова крвних судова у виду тачкастих, ирегуларних линеарних, гломеруларних или типа укоснице. Сходно томе треба бити посебно обазрив у постављању дијагнозе [98,100].

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 [103,104].

Меланом у циновском конгениталном невусу обично настаје у невусу који су већи од 20 cm [105–107]. Јавља се код 2.5%–2.9% пацијената са циновским конгениталним меланоцитним невусом. С друге стране, сматра се да особе са

средњим и малим конгениталним невусом немају већи ризик за малигну трансформацију. У ретким случајевима, настанак меланома се може јавити и у средњим и малим конгениталним меланоцитним невусима [108]. Малигна трансформација у малим и средњим конгениталним невусима настаје касније, током четвте и пете деценије живота, док у циновским има тенденцију настајања у првој и другој деценији живота [105,107,109].

Спитзоидни меланом је субтип меланома који клинички и хистолошки личи на спитзов 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 Спитзовим невусом, код спитзоидног меланома постоји блага преминација особа мушког пола и јавља се касније у току живота, око 55. године [110,111]. Код млађих особа (препубертетске и особе млађе од 10 година) спитзоидни меланом има бољи ток, мада су описани и смртни исходи [112,113].

Меланом у плавом невусу (енгл. *Malignant blue nevus*) јавља се на поглавини, али су описани случајеви појаве лезија и на рукама. Обично настаје из претходног плавог невуса, сем у јако ретким случајевима када настаје *de novo*, без претходног постојања бенигне прекурсорске лезије [114–117]. Иако су прекурсорске лезије присутне на рођењу или у раном детињству, малигна трансформација је забележена после 45. године и чешћа је код мушкараца. Клинички знаци малигне трансформације укључују брзи раст, достижући димензије 3-13 cm, промену боје лезије и присуство улцерације. Тумор се одликује агресивним понашањем и метастазира код већине пацијената [117–119].

Меланом балонских ћелија (енгл. *Balloon cell melanoma*) је ретка форма коју одликује вертикална фаза раста и карактерише се нодалном пролиферацијом неопластичних балонских ћелија. Настаје на терену површинско ширећег меланома [120]. Клинички има изглед меканог или чврстог нодуса са полипоидним или папиломатозним ивицама, сивкасте или беличасте боје. У највећој објављеној серији код 57.5% је смртност услед присуства метастаза наступила је у периоду од 2 месеца до 12 година након иницијалне хируршке терапије [121].

Рабдомиоидни меланом (енгл. *Rhabdoid melanoma*) карактерише се великим полигоналним ћелијама са обилном цитоплазмом која садржи еозинофилне

инклузије И периферно расутих везикуларних једрима. Није неуобичајено да се рабдомиоидни налаз нађе у метастатском меланому, али је веома ретко описан у примарном меланому [118].

Меланоми слузница представљају ретке туморе који имају веома лошу прогнозу. Меланоми слузнице главе и врата најчешће захватају слузницу носне дупље и параназалних синуса (75%), а потом слузницу усне дупље (25%) [122,123]. Меланом коњуктиве чини 5% меланома окуларне регије [124]. Аноректални меланом чини мање од 1% аноректалних тумора [125,126]. Под појмом аноректалног меланома подразумева се меланом унутар аналног канала, док се изван тог подручја сматра меланомом коже. Меланом мушких спољашњих гениталија и доњег уринарног тракта, као и меланом вулве је веома редак тумор који чини мање од 1% гинеколошких малигнитета [127,128]. Најчешћи хистолошки типови су лентиринозни или нодуларни меланом.

2.4.3. Хистопатолошка анализа примарног меланома

Дефинитивна дијагноза меланома коже поставља се на основу хистопатолошке анализе биопсије примарне лезије, а анализом узорка добијају се параметри неопходни за одређивање стадијума болести, чиме би се касније спровеле све неопходне дијагностичке процедуре за одређени стадијум болести.

Најважнији параметри који се одређују су:

2.4.3.1. Дебљина меланома по Бреслоу

Представља најважнији прогностички параметар који се изражава у милиметрима и мери се од врха гранулозног слоја или дна улцерације (уколико је присутна) до најдубљег места инавазије малигних ћелија. Овај параметар представља основу за поделу на Т стадијуме. Мерење се врши окуларним микроскопом и не укључује микросателите уколико су присутни [9,129–131].

2.4.3.2. Улцерација

На основу мултиваријантних анализа које су рађене, улцерација представља кључни параметар који указује на краће време преживљавања унутар рТ стадијума. Улцерација подразумева одсуство свих слојева епидерма (укључујући стратум

корнеум) уз присуство ткивне реакције полиморфонуклеарним леукоцитима и фибрина [9,129,130].

Уколико је присутна, у патохистолошком извештају означава се *b* подстадијумом унутар сваког *pT* стадијума [9,129–131].

2.4.3.3. Број митоза

На основу TNM класификације Америчког здруженог комитета за рак (енгл. *American Joint Committee on Cancer - AJCC*) из 2009. године број митоза представља независан прогностички параметар за меланоме који су дебљине до 1 mm. Митотски индекс је најважнији прогностички фактор након дебљине тумора по Бреслоу и указује на лошије преживљавање. Изражава се бројем митоза по 1 mm² и у извештају треба бити наведен као цео број. Њихово постојање означава *b* подстадијум за меланоме чија је дебљина мања од 1 mm [130]. Уколико нису евидентирани митозе треба нагласити да је број 0 митоза на mm² [9].

Пацијенти са локализованим примарним меланомом и високим митотским индексом указују на агресивнији тумор јер указују на активну деобу ћелија, као и могућност бржег метастазирања и удружени су са лошијом прогнозом насупрот ниже митотске стопе која је повезана са бољим исходом [132].

2.4.3.4. Сателитске и *in transit* метастазе

Сателитске метастазе чине метастатска гнезда већа од 0.05 mm на раздаљини 2 cm од примарног меланома локализована у дерму или субкутису, док се појам *in transit* метастаза односу на скупине ћелија које се налазе на удаљености већој од 2 cm од примарног меланома на путу до регионалних лимфних нодуса. Под појмом микросателитозе означавају се микроскопски видљиве метастазе. Присуство сателитских или *in transit* метастаза у TNM класификацији означава III стадијум болести (N2c), тј. N3 уколико је уз њих дошло до дисеминације и у регионалне лимфне нодусе [130].

2.4.3.5. Ниво инвазије по Кларку (Clark)

Према последњој ревизији TNM система ниво инвазије по Кларку се користи алтернативно уколико тумор не поседује улцерацију и није одређена митотска

активност у случају меланома чија је дебљина мања од 1 mm. Он означава ниво анатомске инвазије меланома у 5 нивоа.

Ниво I : меланом ограничен на епидерм (*in situ* меланом)

Ниво II: меланом који је ограничен на папиларни дерм

Ниво III: ограниченост папиларног и ретикуларног дерма

Ниво IV: захватање ретикуларног дерма

Ниво V: захватање субкутиса и дубљих структура

У ранијим хистолошким анализама коришћен је као примарни фактор ниво инвазије по Кларку, међутим, последњих година је утврђено да је индексирање дебљине по Бреслоу егзактније и прецизније.

2.4.3.6. Остали хистолошки параметри

Лимфоваскуларна инвазија подразумева инвазију туморских ћелија унутар лимфних и крвних судова које су обложене ендотелом јер на тај начин искључујемо могућност ретракционог артефакта који може настати након хистолошке обраде ткива.

Регресија је честа у примарном кутаном меланому подразумева одсуство туморских ћелија у инванзивној компоненти и замену лимфоцитним инфилтратом са или без фиброзе, меланофага и телеангиектазија. Одговор домаћина доводи до ирегуларности архитектонике и асиметрије што резултира дегенерацијом и ишчезавањем туморских ћелија у одређеним деловима тумора, обично фокално у виду парцијалне регресије и/или ретко долази до потпуног нестанка читаве туморске лезије односно комплетне регресије. Уколико захвата више од 75% инванзивне компоненте сматра се лошим прогностичких фактором, мада постоје студије које указују да може бити знак и боље прогнозе. Клинички се регресија презентује депигментацијом унутар или хипопигментованим халоом око пигментне лезије. [9,131,133–135].

Неуротропизам указује на захватање нервних снопова и повезан је већом учесталošћу рецидива, посебно код дезмопластичне варијанте меланома.

Лимфоцитна инфилтрација подразумева интратуморске лимфоците у инванзивној компоненти тумора и њено израженије присуство означава бољу прогнозу.

Може бити:

- Одсутна уколико не постоји или је унутар самог тумора,
- *Non-brisk* – фокални дуж периферије тумора или унутар самог тумора и
- *Brisk*- дифузно дуж периферије тумора или унутар самог тумора.

2.5. TNM КЛАСИФИКАЦИЈА МЕЛАНОМА

За класификацију меланома примењује се TNM класификација Америчког здруженог комитета за рак (енгл. *American Joint Committee of Cancer-AJCC*) из 2009. године и којом се одређује стадијум болести пацијента на основу кога се у даљем току индикују одређене дијагностичке и терапијске процедуре [130].

Табела 2. Клиничка класификација меланома по стадијумима*

КЛИНИЧКИ СТАДИЈУМ	ПРИМАРНИ ТУМОР (Т)	МЕТАСТАЗЕ У РЕГИОНАЛНИМ ЛИМФНИМ ЖЛЕЗДАМА (N)	УДАЉЕНЕ МЕТАСТАЗЕ (M)
0	<i>In situ</i> Tis	нема N0	нема M0
IA	≤ 1 mm без улцерације T1a	нема N0	нема M0
IB	≤ 1 mm са улцерацијом или бројем митоза ≥1mm ² T1b	нема N0	нема M0
	1.01-2.0 mm без улцерације T2a	нема N0	нема M0
IIA	1.01-2.0 са улцерацијом T2b	нема N0	нема M0
	2.01-4.0 mm без улцерације T3a	нема N0	нема M0
IB	2.01-4.0 mm са улцерацијом T3b	нема N0	нема M0
	>4.0 mm без улцерације T4a	нема N0	нема M0
IIIC	>4.0 mm са улцерацијом T4b	нема N0	нема M0
IIIA	Било која дебљина тумора без улцерације	микростазае у ≤3 лимфна чвора N1a, N1b	нема M0

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гена код пацијената са метастазским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

	T(1-4)a		
IIIb	Било која дебљина тумора са улцерацијом T(1-4)b	микростазае у ≤3 лимфна чвора N1a, N1b	нема M0
	Било која дебљина тумора без улцерације T(1-4)a	≤3 нодалне макростазае N1a, N2a	нема M0
	Било која дебљина тумора без улцерације T(1-4)a	сателитске и/или <i>in transit</i> метастазе без регионалних метастазе у лимфним чворовима N2c	нема M0
IIIc	Било која дебљина тумора са улцерацијом T(1-4)b	≤3 нодалне микростазае или сателитске и/или <i>in transit</i> метастазе без регионалних метастазе у лимфним чворовима N1b, N2b, N2c	нема M0
	Било која дебљина тумора са улцерацијом T(1-4)b или без ње T(1-4)a	4 или више нодалних макростазае или лимфни чворови збрисане структуре или сателитске и/или <i>in transit</i> метастазе са метастазом у бар једном регионалном лимфном чвору N3	нема M0
IV	Било који T	Било који T	Удаљене метастазе M1

*према Valch CM и сар. [130]

Осмо издање нове TNM класификације меланома важиће од јануара 2018. године [136].

2.6. КЛИНИЧКЕ МАНИФЕСТАЦИЈЕ МЕТАСТАТСКОГ МЕЛАНОМА

Према подацима из литературе 30% укупног броја пацијената који се лече од меланома има унапредовалу болест са краћим временом преживљавања и лошом прогнозом. Потенцијално значајни фактори лоше прогнозе укључују присуство висцералних метастаза, већи број захваћених органа и повишене вредности ензима лактат дехидрогеназе (LDH) у серуму. У лонгитудиналној, ретроспективној студији (MELODY) код 14% су дијагностиковане метастазе у мозгу, што је мање од очекиваног с обзиром да су у другим студијама верификоване у око 40% случајева, 29% је имало метастазе у јетри и највећи број пацијената, 44%, је припадао M1 стадијуму. Вредности LDH у серуму су повишене у 20%. На основу присуства или

одсуства метастаза у мозгу медијана укупног преживљавања је мања у случају када имамо евидентирану прогресију у мозгу и износи 8,9 месеци према 16,5 [137].

2.6.1. Локализација метастаза

Имајући у виду да је меланом један од најагресивнијих тумора његова дисеминација може настати у било ком органу. Шири се на три начина: локално, лимфогено и хематогено. Током развоја може пролазити кроз радијалну фазу са меланомским ћелијама унутар епидерма и папиларног дерма без метастатске способности и вертикалну фазу раста у дубље структуре што може довести до појаве метастаза. Лимфогена дисеминација подразумева ширење меланомских ћелија лимфним путем према одговарајућој лимфној регији. Познавајући анатомију лимфних путева, ширење меланома који су локализовани на горњим и доњим екстремитетима је у одговарајућој аксиларној или ингвиналној регији или у обе аксиларне и ингвиналне регије уколико су позиционирани на трупцу. Меланоми на глави имају сложенији начин ширења у регионалне лимфне чворове врата и паротидну регију.

Хематогена дисеминација настаје ширењем меланомских ћелија крвотоком и може настати у било ком органу. Најчешће су захваћени јетра, плућа, мозак, кости, субкутано ткиво, у ређим случајевима и предња очна комора, органи гастроинтестиналног, урогениталног тракта и дојке [5]. Услед хематогене дисеминације, метастазе у висцералним органима могу се јавити без присуства метастатских депозита у регионалним лимфним чворовима заобилазећи лимфоток. Пацијенти са удаљеним метастазама имају лошију прогнозу са петогодишњим преживљавањем од 16% и медијаном преживљавања која је мања од годину дана, док је тај проценат 60% уколико пацијенти имају регионално локализовану болест [130,138].

Показано је да постоји веза између клиничко-патолошких карактеристика и одређеног места настанка метастаза. Метастазе у мозгу су чешће код особа мушког пола, кавкаске расе узраста <70 године, меланомом који је локализован деснострано, непознатог Т стадијума и без дисеминације у лимфним чворовима. Метастазе у костима су повезане са повишеним вредностима LDH и чешће су код особа млађих од 40. године. Метастазе у плућима се чешће јављају код особа мушког пола, старије животне доби на дијагнози, без дисеминације у лимфне нодусе и повишеним

вредностима LDH. Метастазе у јетри су повезане са десностраним локализацијом на труп, повишеним вредностима LDH и захватањем лимфних чворова.

Метастатски депозити у удаљеним лимфним чворовима су повезане са метастазама у регионалним лимфним чворовима и повишеним вредностима LDH. Субкутане метастазе се доводе у везу са левостраним локализацијом примарног тумора, чешће су код жена и повишеним вредностима LDH [139]. Прогноза пацијената са метастатским меланомом се разликује на основу локализације и броја метастатских депозита. Пацијенти са појединачним кутаним/субкутаним депозитима имају најбољу прогнозу, потом удаљене метастазе у лимфним чворовима и на крају плућне метастазе. За разлику од њих, појединачне лезије у јетри, мозгу и костима имају најгору прогнозу. Такође, пацијенти са солитарним лезијама имају боље преживљавање насупрот мултиплих метастаза, што је конзистентно са подацима везаним за друге солидне туморе [140,141].

2.6.2. Фактори ризика за метастазе у примарном меланому

У литератури се наводе бројни прогностички фактори који помажу у процени биолошког понашања тумора. У групи патохистолошких фактора који утичу на исход је дебљина тумора по Бреслоу која корелира са ризиком од локалног рецидива, појавом сателитских и *in transit* метастаза и метастаза у регионалним лимфним чворовима. Такође, присуство улцерације представља кључни параметар који указује на краће време преживљавања унутар рТ стадијума, односно означава биолошки агресивнији тумор са већом могућношћу метастазирања. Након дебљине тумора по Бреслоу, митотски индекс је најважнији прогностички фактор и указује на лошије преживљавање и представља независан прогностички параметар за меланоме који су дебљине до 1 mm [9,129–131].

Тумори који су дебљине мање од 0,76 mm и тумори дебљи од 1,5 mm најчешће доводе до појаве сателитских или *in transit* метастаза, насупрот туморима чија је дебљина између 0,75 и 1,5 mm који доводе до појаве удаљених метастаза [142]. Начин раста ММ је такође значајан прогностички показатељ. Такође, вертикални начин раста од самог постанка нодуланог меланом представља лошију прогнозу. На основу TNM класификације сматра се да је меланом стадијума IA меланом ниског ризика, стадијуми IB, IIA и IIB средњег ризика, а особе у IIC стадијуму са високим ризиком од рецидива и прогресије болести [11,143,144].

Анатомска локализација примарног тумора је још један фактор ризика и показано је да меланом на труп и горњим екстремитетима имају различит образац прогресије у односу на туморе локализоване на доњим екстремитетима, глави и врату [145].

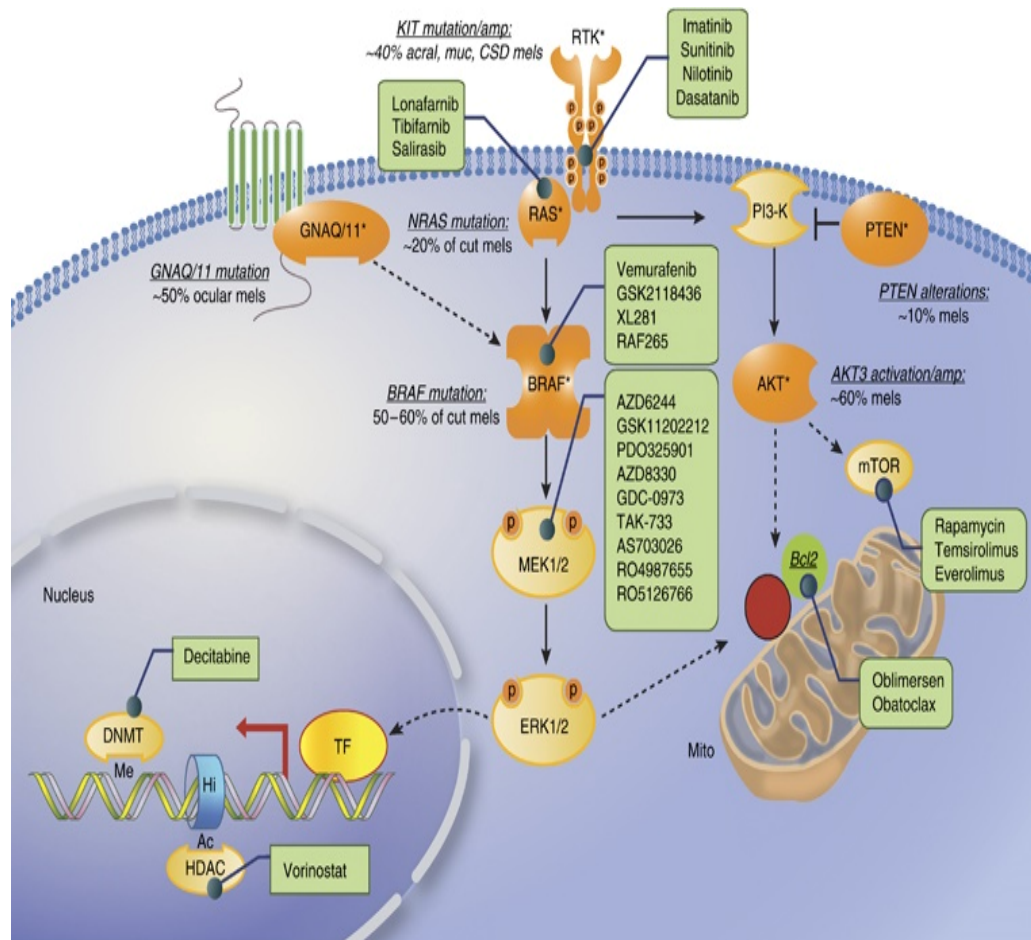
2.7. ГЕНЕТСКЕ АЛТЕРАЦИЈЕ У МЕТАСТАТСКОМ МЕЛАНОМУ

У туморогенези меланома идентификоване су важне, специфичне генетске и геномске абериације. Соматске генетске и геномске промене у генима као што су NRAS, BRAF, KIT, NF1, PTEN, MITF, TP53, GNAQ/GNA11 и MAP2K1/2 (MEK1/2) су круцијалне у метастатском меланому, с акцентом на BRAF и NRAS мутације који припадају MAPK сигналном путу и кључне су за кутани метастатски меланом.

2.7.1. MAPK сигнални пут у метастатском меланому

Меланом је хетерогени тумор, његова патогенеза је делом зависна од ДНК мутације која доводи до активације онкогена или до инактивације супресорних гена као и до амплификације дела или целих хромозома. Поменуге абериације доводе до промена у кариотипском профилу који се разликује у различитим типовима меланома. Један од круцијалних сигналних путева у меланому је MAPK - митогеном активиран протеин киназни пут [146]. Интрацелуларни MAPK сигнални пут је активиран различитим екстрацелуларним импулсима. Фактори раста као што су EGF (епидермални фактор раста), IGF (инсулину сличан фактор раста) и TGF (трансформишући фактор раста) индукују сигналну трансдукцију везивањем за трансмембранске рецепторе који се налазе на површини ћелије. Ово доводи до активације RAS протеина и преноса сигнала до серин-треонин киназе RAF укључујућу ARAF, BRAF и CRAF. Свака од ове 3 киназе може активирати следећи корак у сигналном путу, односно каскадно MEK 1 или MEK 2 киназе. У наредном кораку, ERK 1 или ERK2 доводе до фосфорилације цитоплазматских протеина или мигрирају у ћелијско једро и утичу на транскрипционе факторе који регулишу пролиферацију, диференцијацију и гене који су повезани са овим процесом [147,148,149]. Велики број мутација које су везане за протеине MAPK сигналног

пу̀та наїђене су код броїјних типова тумора меїђу коїјима је и меланом. Познато је да се мутације EGFR гена среїђу код карцинома плуїђа (80% код неситноћелиїјских карцинома плуїђа), мутације у KRAS код карцинома дебелог црева (преко 50%). С обзиром да сви протеини коїји настаїју из ових мутираних гена су чланови MAPK сигналног пу̀та јасно је да се ради о изузетно комплексном сигналном пу̀ту.



Слика 8. KIT-RAS-RAF-MEK-ERK сигнални пу̀т са мутацијама и терапеутицима, преузето из Nikolau и сар. [150]

2.7.2. Мутације у BRAF гену

BRAF ген је лоциран на дугом краку хромозома 7 на позицији 34 (7q34). Састоји се од 22 егзона од коїјих су егзони 11 и 15 са највеїим онкогеним потенцијалом. Увидом у COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) базу, соматске активираїуће бесмислене (енгл. *missense*) мутације у BRAF детектоване су

Му̀тације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код љацијенаїа са метастаїаїским меланомом и њихова повезаност са клиничко-љаїолошким каракїтеристикама, факїорима ризика и шоком болесїи

код папиларног тироидног карцинома (39–69%), холоангиокарцинома (22%), колоректалног карцинома (5-12%) и оваријалног карцинома (30%) [151–153].

Мутације су углавном смештене или у активирајућем сегменту егзона 15 или у Р-петљи егзона 11. Тачкаста мутација 1799 Т → А која доводи до замене једне аминокиселине на позицији 600 валин у глутаминску киселину у активирајућем сегменту егзона 15 (V600E раније позната као V559E) је најчешћа измена везана за BRAF ген и нађена је код око 30 до 70% мутираних тумора [154–156].

Када је реч о меланому, до сада је детектовано 75 соматских мутација у BRAF гену од чега 70 – 90% су V600E [157], а 16 – 29% су B600K док је на трећем месту B600P са 5 – 7% [158]. Учесталост BRAF мутација у примарним меланомима 36 – 45% [159], а 42 – 55% у метастатским меланомима [160]. Присуство BRAF мутација код раних меланома није показало никакву корелацију са интервалом без болести или укупним преживљавањем [161], док је присуство мутација код метастатских меланома повезано са slabим преживљавањем од времена настанка прве метастазе [162].

Механизам по ком долази до активације сигналног пута у присуству V600E мутације је да мутирани протеин (настао као продукт мутираног гена), имитира фосфорилацију активационе петље која након тога прекида своју инхибиторну интеракцију са АТФ-везујућим доменом, прелазећи у стално активну форму.

2.7.3. Мутације у NRAS гену

NRAS је други најчешће активирани онкоген после BRAF. Као и код других чланова Ras породице измене се догађају на позицији 12 (глицин- G) или позицији 61 (глутамин-Q). Типови мутација који се срећу у NRAS код меланома, 80–90% се јавља на Q61 локусу (Q61K, Q61E, Q61R, Q61L) а много ређе на G12 (G12C,D,S,R) или G13 (G13R,A,D,V) локусима. Мутације у NRAS продукују протеин који је константно активан и као такав утиче на раст и преживљавање самог тумора. Онкогене мутације NRAS на Q61 смањују GTP хидролизну реакцију [163]. Као резултат овога, NRAS остаје у GTP односно „активном“ стању омогућавајући ћелијски раст, преживљавање и инвазију тумора. Мутације детектоване у NRAS, као и у случају BRAF спадају у тзв. „driver“ мутације, те је тумор са таквом врстом мутације завистан од ње за свој раст и преживљавање [164]. Истраживања су

показала да око 15% метастатских меланома носи мутацију у NRAS, али са развојем нових метода детектовано је до 25% мутација. Како покушаји да се директно делује на мутирани NRAS нису дали резултате, пажња је преусмерена на Ras ефекторске путеве. Међутим, иако око 20% меланома има активирајуће NRAS мутације, како због агресивне природе тако и због комплексне молекулске сигнализације клинички ефикасан третман као опција и даље не постоји [165].

2.7.4. Мутације у C-KIT гену

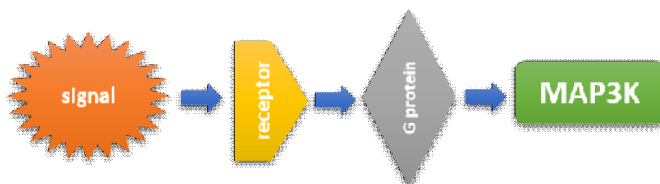
Бројни меланоцитни сигнални путеви иницирају се на ћелијској мембрани преко C-KIT који припада фамилији RTK. C-KIT рецептор је означен као главни покретач диференцијације меланоцита, те је с тога био интересантан са становишта истраживања у области меланома. Међутим, иако означен као главни покретач диференцијације меланоцита, експресија C-KIT-а се губи у многим меланомима. Ласам и сар. су показали да ћелијске линије меланома не дају детектабилан ниво KIT mRNA или протеина у односу на нормалне меланоците [166]. Имунохистохемијске студије које су уследиле такође су потврдиле Ласамов закључак [167]. Међутим када је извршено груписање пацијената Куртин и сар. пријављују 39, 36 и 28% аберација у мукозним, акралним и хронично изложеним сунцу меланомима и на тај начин отварају ново „поглавље“ у истраживању меланома [168]. Мутације у највећем броју случајева погађају јукстамембранске регионе рецептора са L576P у егзону 11 [169]. Активирајуће C-KIT мутације покрећу серију сигналних догађаја који резултују у ћелијској пролиферацији и пропагацији канцера. Тачан механизам није у потпуности јасан. Истраживања везана за C-KIT највише су одмакла на пољу гастроинтестиналних стромалних тумора (GIST) јер око 85% ових тумора носи мутацију у C-KIT. С обзиром на велики број преклапања у мутационим статусима GIST (гастроинтестинални стромални тумори) и меланома терапија која се користи за GIST (иматиниб и сунутиниб– инхибитори RTK) примењена је на пацијенте који имају исти мутациони профил и дала добре резултате што су показале студије [170–172].

2.7.5. Структура и компоненте MAPK сигналног пута

Митогеном активиран протеин кинзни пут (MAPK) је круцијални сигнални пут одговоран за преживљавање ћелија канцерских ћелија, дисеминацију и резистенцију на примењену терапију [173].

Структурно гледано, MAPK су протеин, односно ензими познати као Ser/Thr киназе (фосфорилишу OH групу серина или треонина). MAPK спада у CMGC киназну групу и специфична за аминокиселине серин, треонин и тирозин.

MAP киназе се могу поделити у 2 велике групе: конвенционалне MAPK и атипичне MAPK [174]. Конвенционалне MAPK обухватају киназе регулисане екстрацелуларним сигналом 1/2 (ERK1/2), c-Jun аминокиселине (N)-терминалне киназе 1/2/3 (JNK1/2/3), p38 изоформе (α , β , γ и δ), и ERK 5 [175], док атипичне MAPK укључују ERK3/4, ERK7 и Nemo-like киназе (NLK) [176]. ERK1/2, JNK1/2/3 и p38 изоформе спадају у групу највише изучаваних MAPK међу сисарима. MAPK чини група од три еволуционо очуване киназе које делују секвенцијално: MAPK, MAPK киназа (MAP2K) и MAPK киназа (MAP3K) (слика 9).



Слика 9. MAPK сигнална каскада

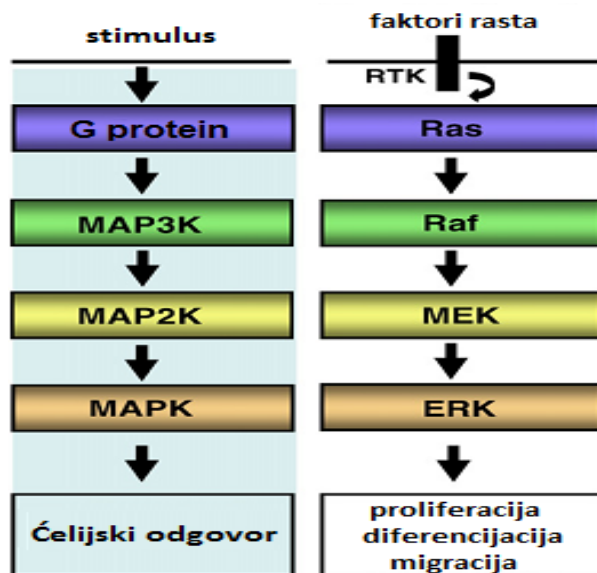
Уопштено гледано каскада укључује рецептор, G протеин који делује узводно док само MAPK језгро чине MAPKKK (MAP3K) која фосфорилише и активира MAPKK (MAP2K) а која потом стимулише активацију MAPK механизмом двоструке тј. дупле фосфорилације. Оваква каскада не само да обезбеђује амплификацију сигнала, него обезбеђује и додатна места за регулисање саме каскаде.

Ras/Raf/MEK/ERK сигнални пут. Ако посматрамо горе описану MAPK сигналну каскаду у ERK каскади рецептор је RTK (рецептор тирозин киназе), G протеин је Ras, MAP3K је Raf, MAP2K представља MEK и MAPK је ERK (Слика 10).

Рецептор тирозин киназе познати и као TRK и TKR је рецептор високог афинитета на површини ћелије. Постоје у приближно 20 различитих класа. Лиганди

за ове рецепторе су полипептидни фактори раста, цитокини и хормони. Поред функције да преносе сигнал из окружења, ови молекули делују и као ензими.

RTK чине екстрацелуларни домен који садржи место за везивање лиганда, један хидрофобни трансмембрански α хеликс и цитоплазматски домен где се налази регион са протеин тирозин киназном активношћу. Када се сигнални молекул веже за RTK они формирају укрштено везане димере. Димеризација покреће тирозин киназну активност у процесу познатом као укрштена фосфорилација. Фосфорилација специфичних тирозинских остатака у склопу активираниог рецептора ствара везујуће место за протеине који садрже SH2 (енгл. Src homology 2) домен и фосфотирозин везујући (РТВ) домен.



Слика 10. Ras/Raf/MEK/ERK сигнални пут, преузето из Ким и сар. [177]

У ERK сигналној каскади спона између RTK и Ras су 2 молекула - GRB2 и Sos (енгл. *son of sevenless*). GRB2 поседује SH2 домен преко кога се везује за фосфотирозински остатак на рецептору и активира. SH3 домен GRB2 везује и активира Sos, који функционише као гуанин нуклеотид измењујући фактор (GEF) и помаже конвертовање GDP у GTP.

C-KIT рецептор (CD117) по структури и функцији спада у RTK-ове. Лиганд за C-KIT је SCF (stem cell factor), хематопоезни цитокин који игра важне улоге у одржавању преживљавања хематопоезних ћелија, промотовању диференцијације и пролиферације, као и регулацији раста и развоја хематопоезних ћелија. Сам C-KIT рецептор се састоји од укупно 976 аминокиселина од чега 519 припадају

Мујације у BRAF, NRAS и C-KIT геноу код њацијенаиша са мејасијашким меланомом и њихова

екстрацелуларном домену (D1 – D5), 23 чине трансмембрански домен, а 413 цитоплазматски домен (кога чине јукстамембрански домен и тирозин киназни домен). С-KIT зависни ћелијски типови укључују хематопоетичке ћелије, герминативне ћелије, маст ћелије, меланома ћелије и GTC (gastrointestinal tract сајал) ћелије. С-KIT сигнални пут игра значајну улогу у продукцији црвених крвних зрна, пролиферацији лимфоцита, продукцији меланина и развоју маст ћелија. Везивање SCF индукује димеризацију и покреће низводно сигналну каскаду [178]. Екстрацелуларни домен чине 5 имуноглобулину сличних домена означених као D1 – D5. Када се SCF веже за активно место, долази до формирања D4-D4 и D5-D5 димера и даљег преношења сигнала. Даља трансдукција сигнала и активација Ras од стране С-KIT одвија се преко GRB2 и Sos протеина.

Ras. Ras протеини припадају класи малих GTP-aze и укључене су у пренос сигнала унутар ћелије. Активиран Ras доводи до активације гена укључених у ћелијски раст, диференцијацију и преживљавање. Постоје разне поделе Ras фамилије протеина [179,180]. Класификација која је најједноставнија и најчешће коришћена је HRAS, NRAS и KRAS. Ras протеин је састављен 2 домена: G домен од 166 аминокиселина и 20kDa који везује гуанозин нуклеотиде, и С терминални мембрански регион познат као СААХ бокс. G домен, који се састоји из 4 мотива, везује GDP/GTP. У скопу G домена G1 мотив (P – петља) везује β фосфат GDP и GTP, G2 мотив (*Switch I*) везује γ фосфат GTP-а и Mg^{2+} , док се у G3 мотиву (*Switch II*) одиграва хидролиза GTP у GDP. G4 мотив обезбеђује интеракцију са гуанином.

Везивањем GTP-а за Ras, долази до конформационе промене у G2 и G3 мотиву који формирају интеракциону површину за ефекторске молекуле. Ras се понаша као бинарни прекидач. Они алтерирају између GDP и GTP везане форме где GTP везана форма је активно стање, а GDP везана форма представља неактивно стање [181]. Додатни протеини који учествују у каскади је GAP (GTP-aza активирајући протеин) који убрзава хидролизу, као и GEF (guanine nucleotide exchange factors) који катализује измену са GTP по принципу уметања у близини P-петље и Mg^{2+} везујућег места. Баланс између GEF и GAP активно детерминишу статус Ras, а самим тим и његову активност.

N-Ras (Neuroblastoma-Ras) је протеин који је превасходно укључен у регулацију ћелијске деобе. Ген који кодира овај протеин је N-ras прото-онкоген на хромозому 1. NRAS ген се састоји од 7 егзона. Мутације које се јављају су углавном

Мутације у BRAF, NRAS и С-KIT гену код пацијената са метастазним меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

лоциране у екзону 1 (позицијама 12 и 13 – G12, G13) и екзону 2 (позиција 61 – Q61). Мутације у гену узрокују измењену конформацију протеина спречавајући GAP катализовану хидролизу GTP и остављајући N-Ras у стално активираној форми.

Raf. Raf протеини припадају MAP3K групи и представљају есенцијалну везу између Ras и MEK-ERK пута. Сисари поседују 3 изоформе (Raf-1/c-Raf, B-Raf, и A-Raf) који деле заједничку структуру – 3 конзервирана региона (CR1, CR2 и CR3) са различитим функцијама.

CR1 регион садржи Ras везујући домен (RBD) који је неопходан за интеракцију са Ras као и цистеином богат домен (CRD) које је секундарно Ras везујуће место. CR2 домен садржи фосфорилациона места укључена у негативну регулацију везивања Ras и активације Raf. CR3 је киназни домен, где је смештен активациони сегмент који, фосфорилисан, игра кључну улогу у активирању киназе. Са функционалног аспекта, Raf чине регулаторни N-терминални регион са RBD који је кључан како за активацију тако и за инхибицију фосфорилационих места и каталитички C терминални регион где су смештена фосфорилациона места неопходна за киназну активност. Регулаторни домени ограничавају активност киназних домена а њихово уклањање доводи до онкогене активације [182].

B-Raf протеин је серин/треонин специфична протеин киназа. Њена функција је да катализује фосфорилацију серинских и треонинских остатака. Фосфорилација се врши АТФ-ом. Структурно, ради се о протеину величине 766 аминокиселина и као сви Raf протеини састоји се из 3 CR – CR1, CR2 и CR3.

CR1 садржи RBD, који аутоинхибира домен CR3. CR2 обезбеђује флексибилну везу између CR1 и CR3. CR3 је киназни домен B-Raf-а.

Подрегиони (P-петља, нуклеотид везујући цеп, каталитичка петља, DFG мотив, активациона петља) који такође чине структуру B-Raf протеина играју значајну улогу у функционисању B-Raf где је, са становишта онкогеног потенцијала, од посебног интереса P-петља, чија је улога да стабилизује фосфатне групе приликом везивања АТФ.

B-Raf се активира везивањем Ras-GDP комплекса. Након везивања, долази до активације B-Raf-а који потом вржи фосфорилацију протеина. Киназни домен B-Raf (CR3) инхибиран је на 2 начина – аутоинхибиција са CR1 и недостатак посттранслационе модификације серинских и треонинских остатака у CR2.

Приликом активације B-Raf, CR1 везује Ras-GTP за RBD доводећи до ослобађања киназног CR3 домена.

BRAF ген је лоциран на дугој руци хомозома 7 на позицији 34 (7q34). Састоји се од 22 егзона од којих су егзони 11 и 15 они са највећим онкогеним потенцијалом.

Мек протеини припадају групи MAP2K и функционално гледано ради се о протеин киназама. Код сисара постоје 3 високо очуване изоформе - 45 kDa MEK1, 43 kDa MEK1b и 46 kDa MEK2 [183–185]. Структурно гледано, МЕК чини каталитички домен, који је окружен N терминалним регулаторним доменом и кратким C- терминалним доменом. МЕК се активира фосфорилацијом два серинска остатка. У самој сигналној каскади МЕК је задужен за амплификацију сигнала. Активиран МЕК делује као двоструко специфична киназа (фосфорилише тирозинске и триптофанске остатке ERK, и служи као цитоплазматско седиште за ERK).

Erk протеини који припадају групи MAPK. Функционално гледано ради се о протеин киназама (Erk1 и Erk2) величине 44 и 42 kDa [186,187]. Ове киназе се састоје од једног каталитичког домена који је окружен регулаторним доменима. Активација Erk се врши двоструком фосфорилацијом тирозинских и треонинских остатака [188]. Након фосфорилације Erk прелази у потентну серин треонин киназу [189].

Erk фосфорилише велики број транскрипционих фактора као што су Elk1, c-Fos, p53, Ets1/2 и c-Jun који су од изузетне важности за иницијацију и регулацију пролиферације и онкогене трансформације [190].

2.8. ТЕРАПИЈА МЕЛАНОМА

Савремени терапијски приступ овој болести подразумева пре свега комбиновано лечење применом хируршких метода који су златни стандард и основ лечења пацијената оболелих од меланом, а са друге стране употребу медикаментне терапије код пацијената код којих је евидентирано постојање метастатске болести. Поменути видови лечења имају за циљ продужење преживљавања ових пацијената и побољшање њиховог квалитета живота.

2.8.1. Хирургија меланома

Хируршко лечење се примењује у случајевима локализованих стадијума, стадијуму локалних и регионалних метастаза и у случају постојања удаљених солитарних метастаза.

Дијагностика меланома коже почиње комплетном ексцизионом биопсијом сумњиве лезије која има клиничке и дермоскопске критеријуме меланома. Применом ове врсте хируршке методе врши се потпуно исецање сумњиве промене елиптичним резом са ексцидирањем коже, масног ткива и мишичне фасције у зависности од анатомске регије и могућности. Ексцизија је ширине 1-3 mm од ивице промене у клинички здраву кожу, која се затвара примарном директном сугуром [11,143,144]. Широка ексцизија примарне промене, веће од претходно наведене се не препоручује због могућег компромитовања лимфне дренаже и даље отежане детекције лимфног чвора стражара (енгл. *sentinel lymph node biopsy*, SLNB) [191,192].

У случајевима када комплетну ексцизију није могуће извести, примењује се парцијална биопсија која подразумева исецање дела тумора који је суспектан клинички и дермоскопски на меланом [193].

Након патохистолошке потврде меланома, ради хируршког лечења индикована је радикална ексцизија (широка ексцизија) са одговарајућим маргинама у зависности од дебљине самог тумора, а у циљу превенције локалних рецидива [11,143].

Према савременим европским препорукама, у случајевима када је дебљина примарног меланома по Бреслоу већа од 1 mm или пак мања од 1 mm, али уз присуство митоза и/или улцерације или IV степен инвазије по Кларку уз одсуство удаљених метастаза индикована је биопсија лимфног чвора стражара (SLNB) [130].

SLNB је такође индикована у случајевима постојања микросателита у патохистолошком налазу примарног меланома. Ова дијагностичко-прогностичка процедура је најважнија метода којом се одређује прецизан стадијум болести и представља индикацију за дисекцију лимфног басена и/или примену евентуално адјувантне терапије. Заправо њоме се идентификују пацијенти код којих клиничким и ултразвучним прегледом постоје недетектабилне метастазе. У случајевима када је SLNB детектовано присуство метастаза, у следећем кораку се приступа евакуацији захваћеног лимфног басена.

Када је присутно клиничко и ултразвучно постојање регионалне метастазе у лимфном чвору, пре извођења процедуре SLNB, индикована је дисекција регионалног лимфног басена [194].

За пацијенте са дисеминованом болешћу, односно пацијенте у IV стадијуму хирургија је резервисана само у случају постојања солитарних метастаза.

2.8.2. Адјувантна терапија меланома

Под појмом адјувантне терапије подразумевамо примену системске терапије после комплетне хируршке ресекције меланома код који постоји велики ризик за релапс болести, а то су болесници у I и II стадијуму код којих је болест локализована или пацијенти са узнапредовалом болешћу у нересектабилном III и IV стадијуму са циљем да се продужи време без болести и укупно преживљавање пацијената.

У више од 25 рандомизованих студија код пацијената у II и III стадијуму болести није показана ефикасност након примене BCG, *Corynebacterium parvum*, левамизолом или комбинација ових агенаса са дакарбазином и нису утицале на продужење DFS и OS у односу на контролну групу [195].

У адјувантној терапији је испитивана и примена вакцина које у досадашњим студијама такође нису продужиле DFS и OS. Две велике студије са применом Canvaxin вакцине су прекинуте због штетног исхода код пацијената који су примали вакцину [196].

Такође две велике студије ECOG 1694 и EORTC 18961 које су поредиле адјувантну примену ганглиозидне вакцине GM2/KLH/QS21 са високим дозама интерферона су прекинуте због штетности дуготрајне употребе вакцине [197]. Примена GM-CSF вакцине у ECOG E4697 клиничкој студији није показала продужење преживљавања, односно не само да су поједине вакцине неефикасне већ су показале и штетне утицаје [198].

Последњи резултати примене MAGE-A3 протеина у комбинацији са имуностимулусима AS15 и рандомизованој клиничкој студији фазе III после комплетне хируршке ресекције у III стадијуму болести нису потврдили побољшање DFS [199].

Протеклих 25 година највећи број проспективних рандомизованих студија је испитивао ефикасност адјувантне примене интерферона алфа у ниским, средњим и

високим дозама у стадијуму ПБ-С и III стадијуму. У мета-анализи публикованој 2010. године свих досадашњих студија није утврђена ефикасност у односу на примењену дозу, шему и дужину давања интерферона [200].

Пегиловани интерферон алфа 2b представља новију генерацију интерферона која је испитивана код 1256 пацијената у клиничкој студији EORTC 18991 и EORTC 18952 код 1388 пацијената и на основу резултата студије, сходно позитивним ефектима на продужење преживљавања без болести и преживљавање без удаљених метастаза, али и укупно преживљавање у групи пацијената у стадијуму ПБ,С и IIIA је 2011. године FDA одобрила употребу пегилованог интерферона у терапији III стадијума меланома [201,202].

У САД и Европи високодозни интерферон и пегиловани интерферон примењују код пацијената са микро и макростастазама у лимфним чворовима иако не постоји консензус о дози, шеми и дужини давања интерферона. Најчешћи нежељени ефекти примене интерферона су симптоми слични грипу у виду грознице, малаксалости, болова у мишићима, главобоље, повишене телесне температуре и веома ретко појаве депресије и суицидних мисли [203,204].

Последњих година у току су клиничке студије које испитују адјувантну ефикасност и примену вемурафениба као таргет лека и анти PD1 антитела (ниволумаб, пембролизумаб), а који су одобрени за примену у IV стадијуму болести.

2.8.3. Хемиотерапија меланома

Пацијенти са метастатским меланомом су у периоду од 1975. до 2011. године имали лимитиране могућности лечења с обзиром да је хемиотерапија сматрана стандардом лечења, а најчешће коришћени цитостатик је дакарбазин (DTIC). Укупно преживљавање пацијената који су лечени стандардном монохемиотерапијом DTIC је 6-9 месеци, а комплетна ремисија забележена код 1% пацијената [205]. Такође је коришћен и темозоломид, који је показао подједнаку ефикасност као и DTIC, али има бољу пенетрантност у ЦНС и примењиван је у случају постојања метастатских депозита у ЦНС [206]. Од осталих коришћених су фотемустин, кармустин, цисплатина, карбаплатина, са сличном стопом објективног одговора од 5-20% [207–209]. Код пацијената код којих је забележена прогресија болести након примене системске терапије примењивани су полихемиотерапијски режими (CVD) који нису

доказали своју супериорност и подразумевају примену цисплатин, виндезин и DTIC који имају бољи објективни одговор од 40%, али није постигнуто боље укупно преживљавање пацијената [206,210].

Такође ни комбинација паклитаксела и карбаплатине није дала задовољавајуће резултате са медијаном PFS од 7.8 месеци [211].

Комбинација хемиотерапије, IL-2 и IFN алфа показала је већи објективни одговор, али не и укупно преживљавање у поређењу са хемиотерапијом [212,213].

2.8.4. Таргет терапија метастатског меланома

Током 2011. године постигнут је значајан помак у терапији метастатског меланома са открићем лекова нове генерације за које је доказано да значајно продужавају преживљавање пацијената са метастатским меланомом те су одобрени у САД и Европској Унији. Једна група лекова су циљни (таргет) лекови који блокирају пролиферацију тумора инхибишући сигнални пут мутираног BRAF гена којима припадају вемурафениб и дабрафениб, док другој групи лекова припадају моноклонска антитела која блокирају цитотоксичне Т лимфоците (CTLA-4) и рецепторе за програмирану ћелијску смрт (PD-1) која представљају имунотерапију. [214,215]

Вемурафениб (Zelboraf) и дабрафениб (Tafinlar) припадају групи инхибитора BRAF протеина и представљају мале молекуле који блокирају функцију V600E и V600K мутираног BRAF протеина, односно њихова примена је индикована само код оних пацијената код којих је детектована ова мутација. Након позитивних резултата фазе III BRIM 3 рандомизоване студије која је поредила вемурафениб са дакарбазином код BRAF мутираних, претходно нелечених пацијената са иноперабилним или метастатским меланомом [216], FDA је августа 2011. одобрила употребу вемурафениба за лечење пацијената с BRAF мутираним метастатским меланомом [217]. Фебруара 2012. одобрен је у Европској Унији и још неколико земаља укључујући Израел, Бразил, Нови Зеланд и Канаду [218].

Резултати BRIM 3 студије након медијане праћења од 12.5 месеци показали су побољшање у медијани укупног преживљавања код пацијената лечених вемурафенибом 13.2 vs 9.6 месеци, ПФС време до прогресије болести је износило 6.9

vs 1.6 месеци, а стопа објективног одговора 57 vs 8.6% [218]. Уобичајена доза вемурафениба износи 960 mg два пута дневно. Најчешћи нежељени ефекти узроковани применом вемурафениба су артралгије (18%), осип (10%), малаксалост (11%), мучнина (7%), алопеција (18%), пруритус (6%), фотосензитивност 12%, планоцелуларни карцином 19%, кератоакантом 11% и папиломи 28% [218].

Други инхибитор мутираног BRAF протеина за лечење узнапредовалог меланома је дабрафениб. Маја 2013. године одобрен од стране FDA, а јуна 2013. у Европској Унији, након фазе III клиничке студије (BREAK-3) за BRAF мутиране пацијената са нересектабилним IIIc или IV стадијумом болести. Испитаници претходно нису лечени и рандомизовани су у односу 3:1 који су примали дабрафениб 150 mg два пута дневно насупрот дакарбазина који се давао у тронедељном режиму у дози 1000 mg/m².

Резултати студије су показали да је медијана PFS 5.1 vs 2.7 месеци, а стопа објективног одговора 53% vs 19% у корист дабрафениба [219].

Клиничка студија BREAK–MB дизајнирана за пацијенте са BRAF мутацијом и метастазама у мозгу указала је да се дабрафениб сматра добром терапијском опцијом за ову групу пацијенте [220,221].

Најчешћи нежељени ефекти повезани са употребом овог лека су хиперкератоза (37%), главобоља (32%), повишена телесна температура (28%), артралгије (27%) и папиломи (24%). Појава планоцелуларног карцинома забележена је у мањем проценту и то код 6%, а нови примарни меланом код 2%, док је у поређењу са вемурафенибом фотосензитивност ређи, а пирексија чешћи нежељени ефекат иако припадају истој групи лекова.

Након 6 месеци од примене инхибитора BRAF протеина у виду монотерапије, долази до развоја резистенције на лек због истовремене реактивације MAPK сигналног пута, укључујући усходни COT заобилазни сигнални пут (енгл. *cancer Osaka thyroid kinase*), развој *de novo* NRAS или MEK мутација, димеризацију или спајање BRAF V600E прекурсорских mRNA с аберантним формама BRAF V600E и активацију рецептора тирозин киназе у BRAF сигналном путу [222,223].

Због развоја резистенције у лечењу су придодати и орални MEK инхибитори, trametinib (Mekinist) и кобиметиниб (Cotellic) који селективно blokira MEK 1 и MEK 2 који се налазе нисходно од активног BRAF у меланому који има активационе

мутације овог гена. Осим превазилажења проблема резистенције, значајно је смањена и инциденца планоцелуларног карцинома и повећана ефикасност лечења. Рандомизована фаза III студије укључивала је пацијенте са BRAF V600E или K мутираним метастатским меланомом поредећи траметиниб и дакарбазин. Траметиниб је довео до комплетног или парцијалног одговора код 22% vs 8%, као и бољег PFS (4.8 vs 1.5 месеци) и шестомесечно преживљавање је било веће у групи која је примала траметиниб 81% vs 67% [217]. Најчешћи нежељени ефекат овог лека је осип (57% свих градуса), дијареја (43% свих градуса), умор (26% свих градуса), периферни едеми (26% свих градуса) и акнеиформни дерматитис (19% свих градуса). Европска агенција за лекове је септембра 2015. је одобрила комбиновање дабрафениба са траметинибом за лечење одраслих пацијената са нересектабилним или метастатским меланомом код кога је детектована BRAF V600 мутација.

Кобиметиниб (Cotellic) је након првих обећавајућих резултата соBRIM рандомизоване фазе III студије новембра 2015. године одобрен од стране FDA за лечење одраслих пацијената са нересектабилним или метастатским меланомом код кога је детектована BRAF V600 E или K мутација у комбинацији са вемурафенибом. Студија је поредила пацијенте који су лечени вемурафенибом наспрам комбинације вемурафениба и цобиметиниба током 21 дан, након чега је уследила пауза од 7 дана. Група пацијената са комбинацијом лекова је имала бољу медијану PFS 9.9 vs 6.2 месеци, али с обзиром да се завршетак очекује 2017. медијана укупног преживљавања није израчуната за обе групе пацијената [225].

Код пацијената са акралним лентигозним и меланомом слузница мутиран је C-KIT ген у 5%, те се у лечењу ових пацијената примењују инхибитори иматиниб, сунитиниб, нилотиниб, дасатиниб [171].

2.8.5. Имунотерапија

Знајући да је меланом имуногени тумор примена ове врсте терапије има значајну улогу са циљем да активира сопствени имунски систем у борби против малигних ћелија. Након фазе активације и пролиферације наступа инхибиција имунског одговора и апоптоза лимфоцита, те су регулатори инхибиције и апоптозе CTLA-4 и PD-1 рецептори на Т лимфоцитима.

2.8.5.1. Анти CTLA антитела

Ипилимумаб (Yervoy) је хумано моноклонско имуноглобулин G1 антитело, које блокира CTLA-4 молекулу која се налази на Т лимфоцитима што последично доводи до стимулације имунског одговора против ћелија тумора. Ипилимумаб је FDA одобрила 2011. године за пацијенте са нересектабилним и метастатским меланомом, а 2013. године је одобрен и од стране Европске агенције за лекове. Ипилимумаб је први лек који је продужио укупно преживљавање болесника. Рандомизована фаза III студије поредила је ипилимумаб са дакарбазином и монотерапију дакарбазином код 502 претходно нелечена испитаника. Резултати су показали да је укупно преживљавање било боље у групи са ипилимумабом у односу на монотерапију дакарбазином и да је износило 11.2 vs 9.2 месеци. Укупно преживљавање након 1, 2 и 3. године је веће у групи са ипилимумабом са смањеним ризиком од смртног исхода за 28% и смањењем ризика за прогресију болести за 24% након 3 године [226].

Ипилимумаб се даје у дози од 3mg/kg у виду интравенске инфузије током 90 минута на три недеље, укупно 4 дозе.

С обзиром да ипилимумаб стимулише Т ћелије очекивани нежељени ефекти његове примене су имунолошки посредоване реакције које се јављају у 61.1% у виду осипа (43%), дијареја/колитис (29%), хепатитис (3,8%), хипофизитис (7.6%) и пријављено је седам смртних случајева због токсичности лека те су након тога развијени прецизни алгоритми за лечење нежељених реакција са применом високих доза кортикостероида [227].

У недавној анализи обједињених података укупног преживљавања II и III фазе студија са ипилимумабом показале су да медијана OS износи 11.4 месеци са стопом трогодишњег преживљавања од 22%. Каплан-Маиерове криве су показале плато који почиње након треће године од завршетка терапије и траје код неких пацијената до 10 година [228].

2.8.5.2. Анти PD-1 и анти PDL-1 антитела

PD-1 (енгл. *programmed death 1*) је експримиран на активираним Т ћелијама и представља циљно место на које је усмерена имунотерапија. PD-1 поседује два лиганда; PD-L1 и PD-L2 који су чланови B7 фамилије протеина и експримирани на ћелијама тумора [229].

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гена код пацијената са метастатским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

Ниволумаб (Opdivo) је комплетно хумано моноклонско антитело имуноглобулин G4 који је у фази I пацијената са метастатским меланомом показао охрабрујуће резултате са стопом објективног одговора од 31%, док је укупно преживљавање након прве године износило 62%, у другој 44%, а у трећој 40% са медијаном укупног преживљавања од 16.8 месеци у свим примењеним дозама. Токсичност узрокована ниволумабом је добро толерисана и забележена код 10% пацијената у виду лимфопеније 3%, дијареје 2%, повећања серумских вредности липасе 2%, ендокриних поремећаја 2% и хепатитиса 1% [230].

Потврда овога је добијена у рандомизованој III фази клиничке студије у којој је ниволумаб показао побољшање OS у поређењу са DTIC код претходно нелечених пацијената са меланомом, са стопом одговора од 40% у односу на 13.9% у групи пацијената који су примали DTIC [231]. Ниволумаб је показао бенефит и код пацијената који су прогредирали након терапије ипилимумабом, те су на основу клиничких студија ниволумаб и пембролизумаб званично одобрени за лечење ипилимумаб-рефракторних меланома.

Пембролизумаб (Keytruda) представља хуманизовано IgG4 моноклонско антитело које је у фокусу испитивања због своје ефикасности, подношљивости и безбедоносног профила. Пембролизумаб је антитело које се везује за рецептор програмиране ћелијске смрти (PD-1) и блокира његову интеракцију са лигандима PD-L1 и PD-L2. PD-1 рецептор је негативни регулатор активности Т-ћелија за који је показано да је укључен у контролу имунског одговора Т-ћелија. Пембролизумаб појачава одговоре Т-ћелија, укључујући одговоре против тумора, блокирањем везивања PD-1 за PD-L1 и PD-L2 који су експримирани на антиген презентујућим ћелијама, а могу да их експримирају туморске или друге ћелије у туморском микроокружењу. Уобичајена доза пембролизумаба износи 2 mg/kg у интравенској инфузији у тронедељном интервалу.

У фази I клиничке студије показана је ефикасност пембролизумаба код претходно нелечених пацијената са стопом објективног одговора код 38% и највећим одговором у кохорти која је примала 10 mg/kg сваке друге недеље од 52% и медијана PFS је износила 7 месеци [232].

У фази III студије пембролизумаб је поређен са ипилимумабом код пацијената који су претходно примили бар један вид системске терапије где је потврђена

ефикасност пембролизумаба у смислу продужења PFS и OS. Једногодишње преживљавање износи 74% vs 58% у корист пембролизумаба, смањен је ризик од смртог исхода за 37%, а стопа објективног одговора је износила 33%. С бозиром да је у две инерим анализе укупно преживљавање било боље студија је прекинута. Најчешћи нежељени ефекти се односе на малаксалост (33%), пруритус (26%) и осип (18%) и остали имунопосредовани ефекти у смислу појаве витилига, ендокриних поремећаја итд. [233].

Последњих година у клиничким студијама испитује се синергистичко дејство комбинације CTLA-4 и PD1 антитела. Недавно су објављени резултати III фазе упоређујући комбинацију ниволумаба са ипилимумабом у односу на монотерапију ипилимумабом и ефекте монотерапије ниволумабом у односу на ипилимумаб. Комбинација терапије је доказала своју супериорност са дужим PFS који износи 11.5 месеци у односу на монотерапију ниволумабом од 6.9 месеци или ипилимумабом 2.9 месеци. Стопа објективног одговора у групи која је примала комбинацију износи 57.6%, монотерапија ниволумабом 43.7% док је 19% забележено у групи која је примала ипилимумаб. Разумљиво је да је и токсичност градуса 3 и 4 била највећа у групи са комбинацијом и износи 55%, монотерапија ипилимумабом 27% а ниволумаб 16%. На основу ове клиничке студије је комбинација одобрена за пацијенте са метастатским меланомом и PD-L1 негативне туморе у САД и Европској Унији без обзира на PD-L1 статус у мају 2016. године [234].

2.9. Клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора и повезаност са мутационим статусом

Активација мутације у BRAF онкогену у меланому и већини меланоцитних невуса објављена је први пут 2002. године од стране Дејвиса (Davies) и сарадника у 66% меланома и доводи се у везу са експозицијом УВ зрачењу [154]. BRAF мутација је у претходним студијама детектована у 31 до 47% у примарних меланома [83,84,161,235–238] и 41 до 55% у метастатској болести [239–244].

Поједини аутори су доказали да мутациони статус корелира са одређеним клиничкопатолошким карактеристикама примарног тумора, те се BRAF-мутирани меланоми јављају код особа млађе животне доби, на кожи на којој постоји минимално оштећења од сунца без знакова соларне еластозе у односу на кожу која је

изложена константно сунчевим зрацима, са већом кумулативном дозом УВ зрачења и ређе захватају главу и врат, дланове и табане, односно јављају се на трупку и проксималним екстремитетима, у поређењу са меланомима без BRAF мутација [235] који захтева акумулацију високих УВ доза током времена [168,245]. Повезаност клиничко-патолошких карактеристика примарног меланома код BRAF мутираних пацијената укључују осим претходно наведених и одређени хистолошки тип, најчешћи је површноширећи и нодуларни меланом, и присуство митоза, док није показана значајна повезаност са невосом на хистопатолошком прегледу примарног тумора, дебљином по Бреслоу и присуством улцерације [162]. BRAF и NRAS мутације су на основу претходно изнетих резултата честе у кутаном меланому, али се скоро никада не детектују заједно у истом тумору. У студији рађеној на 237 узорка, Елерхост (Ellerhorst) и сар. су код три пацијента нашли истовремено присуство NRAS и BRAF мутације. Запажено је да мутације у NRAS или BRAF примарном меланому показују агресивнији клинички фенотип него тумори *wild type* на оба локуса [246]. Такође су анализирали мутациони статус и хистопатологију тумора (која је укључивала дебљину по Бреслоу, ниво по Кларку, број митоза и присуство улцерације) и утврдили да мутирани NRAS тумори показују најдубљу инвазију (1,40 mm), мутирани BRAF тумори средњу инвазију (1,28 mm), док *wild type* има најмању од 0.93 mm. Постоје и разлике у улцерацији на основу генотипа, те је она највећа код мутираног BRAF тумора у односу на NRAS и WW мутиране туморе. Код сва три генотипа није било разлике у односу на пол, годиште и митотски однос. Анализа мутационог статуса и локализације указује да мутирани туморски NRAS је најчешће лоциран на екстремитетима у 90% и само 6% на трупку, наспрот туморима са мутираним BRAF геном и туморима без мутација у BRAF и NRAS гену који су локализовани на трупку 46% и екстремитетима 41% случајева. У великој проспективној студији код 197 пацијената са метастатским меланомом (III и IV стадијум болести), упоређиване су клиничко-патолошке вариабле и BRAF мутациони статус. Резултати овог истраживања показују да осим година постављања дијагнозе удаљених метастаза није постајала сигнификантна разлика у клиничким налазима пацијената са метастатским меланомом и мутационим статусом. И у овој студији су потврђени претходни налази да су пацијенти са BRAF мутираним меланомом млађи у односу на пацијенте са *wild type* BRAF меланомом у тренутку дијагнозе удаљених метастаза и дијагнозе примарног тумора [162]. Све остале карактеристике пацијената са метастатским меланомом нису сигнификантне између

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастатским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

пацијената са мутираним и *wild type* BRAF-ом, посебно није било разлика у односу на дистрибуцију, фамилијарну појаву меланома, тип метастаза, лактат дехидрогеназу, перформанс, статус у првој дијагнози метастатског меланома, појаву метастаза у мозгу и одговора на прву линију хемотерапије. На основу спроведеног истраживања дошли су до закључка да прогноза пацијената са BRAF- мутираним метастатским меланомом није повољнија у односу на BRAF *wild type* метастатским меланомом. Пацијенти са метастатским меланомом и мутацијом у BRAF-у су млађи и имају лошије преживљавање изузев ако нису лечени BRAF инхибиторима. Анализа преживљавања након дијагнозе удаљених метастаза је нејасна услед постојања подгрупе пацијената са мутираним BRAF геном који су примали BRAF инхибиторе из два разлога: прво, BRAF инхибитори могу продужити свеукупно преживљавање (BRAF инхибитори су активни против метастатског меланома у I фази студија и преживљавање је дуже од 6 месеци) и друго, пацијенти који су одабрани да учествују у клиничким студијама могу имати боље прогностичке факторе, укључујући бољи перформанс статус, одсуство симптоматских метастаза у мозгу али и социјалне, психолошке и економске факторе, као и то да није постојала контролна група у истраживању [162].

У Србији истраживања и подаци везани за епидемиологију и клиничко-патолошке карактеристике меланома су новијег датума, али до сада није рађена анализа података везаних за мутациони статус пацијената са метастатским меланомом и корелација са клиничко-патолошким карактеристикама примарног тумора, те ће стога потенцијални подаци добијени овим истраживањем бити значајни. Подаци у Србији указују је током периода 2005-2010. године, код 266 пацијената са меланомом најчешћа локализација код мушкараца на трupu (53.28%) и доњим екстремитетима код жена (32.46%). Најчешћи хистопатолошки субтип је површинско ширећи меланом (63.53%), затим нодуларни меланом (21.43%) и улцерација је присутна у 40.6% примарних тумора. Код пацијената старије животне доби меланоми су презентовани најчешће на глави и врату и најчешћи тип је LMM, док је површинско ширећи меланом најзаступљенији на доњим екстремитетима и акралним подручјима, а нодуларни меланом на трupu (51.72%) [16].

Анализирани подаци у 2011. години добијени из шест референтних онколошких центара у Србији указују да је лечено 986 пацијената, од којих је 320 било новодијагностикованих. У стадијуму иноперабилног меланома (III и IV) је

регистровано 317 пацијената, код којих је дијагноза код 12.5% постављена у III стадијуму када су захваћени регионални лимфни нодуси, а код 4.5% у стадијуму удаљених метастаза што означава IV стадијум болести. Код 877 (92,4%) пацијената у питању је кутани меланом и најчешћи хистолошки тип је површноширећи 50-66%, док се нодуларни меланом јавља у 23,5-50%. Подаци такође указују на касно постављање дијагнозе примарног меланома сходно томе да се код 42% ради о високо ризичном меланому чија је дебљина примарног тумора преко 4 mm, док је код 39,6% дебљина тумора мања од 1 mm. С обзиром на ове податке пажња је сада усмерена на превенцију и рано откривање меланома јер је петогодишње преживљавање код пацијената у раној фази болести преко 90%, уколико се болест регионално проширила у лимфне нодусе 60%, а у случају иницијално детектованих метастаза свега 15-20%. Код пацијената у IV стадијуму болести са присуством удаљених метастаза кожа и меко ткиво су најчешће место код 12-55%, плућа код 19-55,5%, метастазе у мозгу су присутне код 15,5%, док се метастазе у костима јављају код 3-10% пацијената. Системска терапија меланома у Србији базирана је на примени хемиотерапије код 95% пацијената, док је палијативна хирургија у случају постојања солитарних метастаза примењена код 11,6% пацијената. Донедавно је монохемиотерапија дакарбазином или полихемиотерапија по CVD протоколу била једина терапијска могућност за лечење ових пацијената за коју је доказано да је код анализираних пацијената комплетна, парцијална ремисија и стабилна болест постигнута код 25%, а прогресија болести забележена код 75% пацијената. Постигнут терапијски одговор након прве линије или друге линије хемиотерапије је краткотрајан и износи 6.66 и 6.75 месеци [247].

Међутим, од 2011. године почиње нова ера у лечењу меланома коришћењем инхибитора BRAF и MEK протеина или примена имунотерапије с обзиром да су ови лекови значајно продужили време преживљавања. Иако је BRAF статус обавезујући критеријум за примену BRAF и MEK инхибитора, свакако да се не требају увек користити као прва линија терапије у случају детектоване мутације у BRAF гену. Моно или комбинација имунотерапије је ефикасна код пацијената са BRAF мутацијом, са могућношћу постизања дуготрајне ремисије, остављајући таргет терапију као резервну опцију у случају неуспеха имунотерапије.

3. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

1. У узорцима тумора пацијената оболелих од метастатског меланома IV стадијума могу се детектовати мутације у BRAF гену код 40-60%, NRAS гену код 15-25% и C-KIT гену код 5-10%.
2. Присуство BRAF мутација јавља се чешће код пацијената са одређеним клиничко-патолошким карактеристикама и факторима ризика.
3. Не постоји корелација између BRAF мутационог статуса и тока болести.

У сврху провере радне хипотезе поставили смо следеће циљеве:

1. одређивање стопе учесталости мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастатским меланомом у IV стадијуму болести
2. корелација налаза у BRAF (мутирани и *wild type*), NRAS и C-KIT гену са клиничко-патолошким карактеристикама примарног тумора (локализација, хистолошки тип тумора, дебљина тумора по Бреслоу, присуство улцерације, митоза, број лимфних нодуса)
3. корелација између нађених мутација BRAF (мутирани и *wild type*), NRAS и C-KIT гену са факторима ризика: изложеност УВ зрачењу (континуирано и интермитентно), опекотине, фототип коже, боја очију, број невуса, број диспластичних невуса, породична појава меланома, претходна анамнеза о меланому и узраста на дијагнози примарног тумора
4. корелација мутационог статуса са узрастом и полом у тренутку дијагнозе удаљених метастаза
5. корелације између нађених мутација BRAF (мутирани и *wild type*) и NRAS (мутирани и *wild type*) гена и исхода болести

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Подаци о пацијентима и анализираним узорцима

По одобрењу идејног пројекта студије поштујући све нормативе и прописе у пољу медицинске етике и биоетике спроведена је проспективна студија у периоду 2009. до 2016. године на 123 пацијената који су лечени и праћени у оквиру Амбуланте за меланом, Клинике за кожане и полне болести, Клинике за пластичну и реконструктивну хирургију, Института за патологију и судску медицину, Одсека за молекулску генетику, Одељења за молекулску медицину Института за медицинска истраживања ВМА. Демографски подаци, клиничко-патолошке карактеристике и ток болести описани су у Табели 3 и 4.

Табела 3. Демографске и клиничко-патолошке карактеристике пацијената оболелих од меланома

Карактеристике испитаника	Број пацијената	%
ПОЛ		
Мушкарци	74	60,2
Жене	49	39,8
УЗРАСТ		
Медијана узраста	54.1±15.3	
Старосне групе		
<40	21	17.2
41-50	28	23.0
51-60	29	23.8
61-70	23	18.9
више од 70	21	17.2
ФАКТОРИ РИЗИКА		
Фототип коже		
Фототип II	31	27,9
Фототип III	60	54,1
Фототип IV	19	17,1
Фототип V	1	0,9

Боја очију		
Плава	30	26,8
Зелена	31	27,7
Браон/црна	51	45,5
УВ зречење		
Интермитентно	98	100,0
Континуирано	14	100,0
Опекотине до 18. године	33	42,9
Опекотине у одраслом добу	39	49,4
Меланом у породици	4	3,6
Невуси		
До 25 невуса	55	49,5
Од 25-50 невуса	39	35,1
Од 50-100 невуса	14	12,6
Више од 100 невуса	3	2,7
Соларни лентиго	86	79,6
ЛОКАЛИЗАЦИЈА ПРИМАРНОГ ТУМОРА		
Глава и врат	32	26,00
Екстремитети	33	26,80
Труп	46	37,40
Акрални	12	9,80
ХИСТОПАТОЛОШКИ СУБТИП		
Површинско ширећи	39	31,70
Нодуларни меланом	55	44,70
Лентиго малигна меланом	1	0,80
Акрални лентигозни меланом	2	1,60
Амеланотични	2	1,60
Дезмопластични	4	3,30
Непознати тип	20	16,30
ДЕБЉИНА ТУМОРА ПО БРЕСЛОУ (mm)		
Медијана дебљине тумора	4,5 (0,1-35,2)	
УЛЦЕРАЦИЈА		
Присутна	69	74,20
Одсутна	24	25,80
МИТОЗЕ		
Медијана вредности броја митоза	5,0 (0-28,0)	
BRAF СТАТУС		

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастазским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

BRAF позитивни	72	58,50
BRAF негативни	51	41,50
СТАДИЈУМ НА ДИЈАГНОЗИ		
I	7	6,30
II	66	58,90
III	27	24,10
IV	12	10,70
Медијана времена до прогресије (месеци)	38 (95% CI 28,5-47,5)	
IV СТАДИЈУМ		
Медијана узраста на дијагнози IV стадијума (године)	56,7±15,5 (16-89)	
IVA	8	6,50
IVB	16	13,00
IVC	99	80,50
ПРИМЕЊЕНА ТЕРАПИЈА		
I линија терапије (хемиотерапија)	84	68,30
II линија терапије (иновативна терапија)	39	31,70

Табела 4. Преживљавање пацијената оболелих од меланома у IV стадијуму

Време преживљавања	Медијана преживљавања свих испитаника
DFS	38,0 (95% CI 25,3-50,7)
DMFS	38,0 (95% CI 28,5-47,5)
III до IV	18,0 (95% CI 7,0-29,0)
DMS	14,7 (95% CI 7,2-22,5)
OS	48,0 (95% CI 42,7-53,3)
DMS хемиотерапија	11,5 (95% CI 7,3-15,6)
OS хемиотерапија	46,0 (95% CI 40,9-51,1)
DMS хемиотерапија	11,5 (95% CI 7,3-15,6)
DMS иновативна терапија	24,3 (95% CI 8,0-40,6)
OS хемиотерапија	46,0 (95% CI 40,9-51,1)
OS иновативна терапија	77,0 (95% CI 46,7-168,6)

*Подаци презентовани као медијана са интервалом поверења

Анализирани су пацијенти са примарним кутаним меланомом који имају верификовану метастатску болест (пацијенти у IV стадијуму болести) и код којих је одређивана мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену. Мутациони статус ових пацијената корелиран је са клиничко-патолошким карактеристикама примарног тумора, факторима ризика за настанак меланома и током болести. Дијагноза примарног меланома је постављена на основу клиничког, дермоскопског прегледа и патохистолошког налаза. Након примарног уклањања меланома рађена је биопсија лимфног чвора стражара или дисекција регионалних лимфних нодуса у зависности од патохистолошког или ултразвучног налаза којом је потврђена патолошка лимфонодопатија у циљу одређивања иницијалног стадијума болести. У циљу потпуне дијагностике и према најновијим протоколима, пацијентима је урађена евалуација која подразумева ултразвучну дијагностику лимфних нодуса врата, аксила, ингвина, абдомена и карлице, компјутеризована томографија главе, грудног коша, абдомена и карлице у зависности од стадијума болести, као и концентрација S100 протеина и LDH у серуму. Стадијум болести је одређиван према прихваћеној TNM класификацији болести Америчког здруженог комитета за рак из 2009. године. Код пацијената са метастатским меланомом праћено је време од дијагнозе до уласка у III или IV стадијум болести (енгл. *disease free survival* - DFS), време од дијагнозе до прогресије у IV стадијум болести (енгл. *distant metastases-free survival* - DMFS), време од IV стадијума до последњег контакта са пацијентом (DMS) и укупно преживљавање (енгл. *overall survival* - OS). Такође је код пацијената праћен ток болести, односно време постизања комплетне или парцијалне ремисије, стабилне болести, време без прогресије или прогресија болести. Прва линија терапије код 84 пацијента у IV стадијуму метастатског меланома била је хемиотерапија, најчешће је примењиван дакарбазин (диметил-триазено-имидазол-карбоксамид–DTIC). Пацијентима код којих је евидентирана прогресија болести ординирана је полихемиотерапија (цисплатина-винбластин-дакарбазин и паклитаксел-карбаплатина). Иновативна терапија примењена је код 39 пацијента у виду таргет терапије или имунотерапије (вемурафениб, дабрафениб и траметиниб, ипилимумаб и ниволумаб).

Испитаници су као дијагностички критеријум имали примарни кутани меланом са метастатским ширењем болести, док пацијенти са непознатим примарним меланомом, меланомом ока и слузница нису укључени у ово истраживање.

4.1.1. Упитник за пацијенте оболеле од меланома

Сви пацијенти су попуњавали структурисани упитник при првом прегледу у Амбуланти за меланом. Упитник је обухватао следеће групе питања:

1. Прва група питања односила се на испитивање демографских чинилаца, фенотипске карактеристикама у смислу одређивања боје очију и фототипа коже (према Фицпатриковој (*Fitzpatrick*) скали), факторима ризика за настанак меланома, пре свега континуираном или повременим излагању сунцу, појави опекотина у детињству и одраслом добу, коришћењу артефицијалних извора УВ зрачења, као и претходна појава меланома код испитаника или чланова њихове породице. Параметри који су коришћени као маркери за континуирано излагање УВ зрацима су: број година које је пацијент проводио у спољашњој средини (више од 50% времена у току године) и интермитентно излагање број година које је провео у подручјима с високом инсолацијом (до 3 месеца годишње).

2. Друга група питања односи се на податке о разлозима јављања на преглед, временски период који је протекао од промене већ постојеће пигментне или непигментне промене или новонастале промене до доласка на преглед, као и симптомима примарног тумора у виду промене облика, величине, избочења, присуства бола, свраба, влажења, перугања, повреде и крварења.

3. Трећом групом добијени су подаци о присуству и броју невуса, пигментних и непигментних промена на кожи у циљу детекције новог примарног меланома, преканцерозних лезија и немеланомских карцинома коже током клиничког и дермоскопског прегледа које је обавио дерматолог (Прилог - упитник).

4.2. Патохистолошка обрада ткива

Парафински калупи тумора преузети су са Института за патологију и судску медицину ВМА у Београду. За сумњиве лезије, у смислу постојања кутаног меланома рађена је комплетна ексцизиона биопсија и ткиво подвргавано патохистолошкој обради. Ексцидирана лезија је потапана у пуферизовани 10% формалин који је коришћен као фиксатив да би се ткиво сачувало од могућих оштећења. Пре обраде добијеног исечка, мерене су његове укупне димензије, потом димензије саме лезије и удаљеност од најближе ресекционе линије и бележене у

милиметрима. Након тога је ткиво уклапано у парафин, где је у првом делу вршена дехидрација, а у другом делу је ткиво просветљавано и импрегнирано парафином, односно вршено је уклапање ткива у парафински блок који је резан микротомом. Микротомом су прављени резови ткива дебљине 5-10 микрона и постављани на предметно стакло након чега су препарати бојени хематоксилин-еозин методом (HE). За имунохистохемијску анализу коришћени су S100 протеин и НМВ-45 моноклонско антитело које је створено применом екстракта меланома.

За сваког испитаника узиман је један парафински калуп где је патохистолошким налазом потврђено присуство највеће концентрације туморског ткива. Прављено је 10 исечака ткива дебљине 10 микрона са калуца након чега се приступало даљој обради узорка. Хистолошки прогностички параметри за одређивање стадијума који су коришћени у анализи израде овог рада су: хистолошки подтип, дебљина тумора по Бреслоу, ниво инвазије по Кларку, улцерација, број митоза, микросателити или *in transit* метастазе.

4.3. Детекција мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену

Истраживање у смислу детекције мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену је реализовано у Одсеку за молекулску генетику, Одељења за молекулску медицину Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије (ВМА) у Београду. Детекција мутација у поменутим генима почиње изолацијом дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) из туморског ткива.

4.3.1. Изолација ДНК

Први корак у изоловању ДНК је била депарафинизација ткива укалупљеног у парафин.

Депарафинизација. Депарафинизација се састојала из неколико узастопних третирања узорака *BioClear* раствором: Десет парафинских љуспица дебљине 10 μm је преливено са 1 ml *BioClear* раствора (Biognost, Хрватска) који је нетоксична замена за ксилол, снажно мућкано 2 минута, центрифугирано седам минута на 10000 rpm (Mikro 220, Hettich, Немачка) на собној температури, а потом су одбачени супернатанти у којима су били остаци раствореног фенола. Супернатант је одливан водећи рачуна да се не изгуби талог.

Узорци су два пута испрани са по 1 ml 96% етанола (ZorkaPharm, Србија), снажно мућкани 30 секунди, а потом центрифугиран 2 минута на 14000 rpm на собној температури. Супернатанти су одливани, а талози сушени на ваздуху око 45 мин. на собној температури.

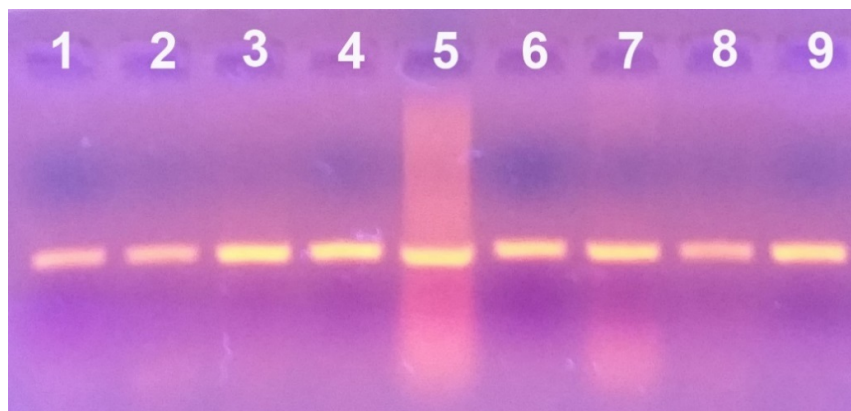
Изолација ДНК. ДНК је изолована из депарафинизованог туморског ткива помоћу комерцијалног кита *ExtractMe Tissue DNA Extraction Kit* (DNA Гдањск, Пољска) према упутству произвођача.

Изолована ДНК је након ове процедуре чувана на температури од 4°C (краћи временски период) или на - 20° С (дужи период) до коришћења у PCR амплификацији.

Одређивање концентрације ДНК. Концентрације ДНК су одређиване спектрофотометријски на апарату *GeneQuant (Pharmacia LKB, Шведска)*. Узорци су разблаживани 100 пута (5µl узорка је растворено у 500 µl стерилисане дестиловане воде). Апсорбанце су мерене на таласној дужини од 260 nm, а концентрације ДНК је рачунате по формули $c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260} \times R \times F \times \text{OP}) / 1000$, где је A_{260} апсорбанца узорка на 260 nm, R - разблажење (100), F - фактор конверзије за дволанчану ДНК (50µg/ml), а OP оптички пут светлости (1cm).

Провера квалитета ДНК. Квалитет изоловане ДНК је провераван електрофорезом на 1% агарозном гелу. Агароза у праху (Serva, Немачка) је растварана у 0.5xTBE пуферу (44,5 mM Tris, 44,5 mM борна киселина, 1 mM EDTA; pH=8) до кључања. У раствор охлађен до 70°C је додаван етидијум-бромид (Serva) у финалној концентрацији од 5µg/µl. Гел (t≈60°C) је изливан у кадицу за електрофорезу и остављен да полимерише. У бунариће гела је додавано по 7 µl геномске ДНК и 2 µl боје (6x loading buffer; 0.25% бром-фенол плаво, 0.25% ксиленцијанол, 20% фикол 400; све хемикалије је произвела Serva). Апаратура коришћена за електрофорезу била је EV231 (PeqLab, Белгија). Електрофореза се одвијала 20 минута при напону од 80V и струји од 40mA. Гелови су анализирани под краткоталасном светлошћу трансилуминатора (Pharmacia LKB, Шведска).

Геномска ДНК је била одговарајућег квалитета уколико је на гелу након електрофорезе била уочљива јасна трака недалеко од бунарића (Слика 11).



Слика 11. Провера квалитета изоловане ДНК електрофорезом на 1% агарозном гелу

4.3.2. Детекција мутација у BRAF, NRAS и C-KIT генима

Ланчана реакција полимеризације (PCR). Делови NRAS (екзони 2 и 3), C-KIT (екзони 9, 11, 13 и 17) и BRAF (екзон 15) гена су умножени PCR методом помоћу прајмера (Metabion, Немачка) чије су секвенце наведене у Табели 5.

Табела 5. Секвенце прајмера за PCR амплификацију делова BRAF, NRAS и C-KIT гена

ГЕН	ЕКЗОН	СЕКВЕНЦА ПРАЈМЕРА
NRAS	2	5'-CGCCAATTAACCCTGATTACT-3' 5'-CACTGGGCCTCACCTCTA-3'
	3	5'-CCCCTTACCCCTCCACAC-3' 5'-AGGTTAATATCCGCAAATGAC-3'
C-KIT	9	5'-GATGCTCTGCTTCTGTA CTG-3' 5'-GCCTAAACATCCCCTTAAATTGG-3'
	11	5'-CTCTCCAGAGTGCTCTAATGAC-3' 5'-AGCCCCTGTTTCATACTGACC-3'
	13	5'-CGGCCATGACTGTCGCTGTAA-3' 5'-CTCCAATGGTGCAGGCTCCAA-3'
	17	5'- TCTCCTCCAACCTAATAGTG -3' 5'- GGA CTGTCAAGCAGAGAAT -3'
BRAF	15	5'-ACAGAATTATAGAAATTAGATCTCTTACC-3' 5'-GACA ACTGTTCAA ACTGATGG-3'

Све PCR реакције извођене су у апарату *GeneAmp 9700 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, САД) у финалној запремини од 25 μ L са 400-600 ng геномске ДНК и финалном концентрацијом прајмера од 4 μ M. За PCR је коришћен *HotStart Taq Plus*

DNA Polymerase kit (Qiagen, Немачка) према упутству произвођача. Услови PCR амплификације су приказани у Табелама 6, 7 и 8.

Табела 6. Услови за ПЦР амплификацију ексона 2 и 3 NRAS гена

NRAS					
Екзон 2			Екзон 3		
95°C	5 мин.	1 циклус	95°C	5 мин.	1 циклус
95°C	45 сек.		95°C	45 сек.	
55°C	45 сек.	40 циклуса	56°C	45 сек.	40 циклуса
72°C	1 мин.		72°C	1 мин.	
72°C	7 мин.	1 циклус	72°C	7 мин.	1 циклус

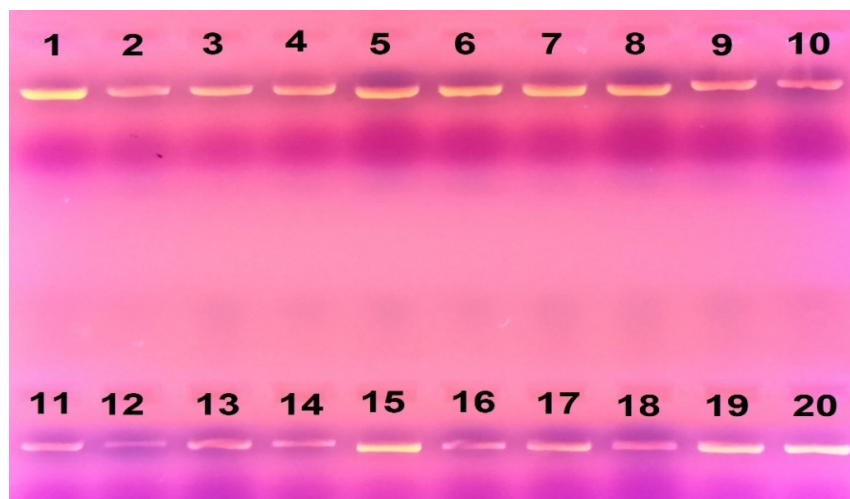
Табела 7. Услови за PCR амплификацију ексона 9, 11, 13 и 17 C-KIT гена

C-KIT					
Екзон 9			Екзон 11		
95°C	5 мин.	1 циклус	95°C	5 мин.	1 циклус
95°C	30 сек.		95°C	5 мин.	
52°C	30 сек.	35 циклуса	52°C	30 сек.	35 циклуса
72°C	45 сек.		72°C	30 сек.	
72°C	7 мин.	1 циклус	72°C	7 мин.	1 циклус
Екзон 13			Екзон 17		
95°C	5 мин.	1 циклус	95°C	5 мин.	1 циклус
95°C	30 сек.		95°C	30 сек.	
56°C	30 сек.	35 циклуса	50°C	30 сек.	35 циклуса
72°C	45 сек.		72°C	45 сек.	
72°C	7 мин.	1 циклус	72°C	7 мин.	1 циклус

Табела 8. Услови за PCR амплификацију екзона 15 BRAF гена

BRAF		
Екзон 15		
95°C	15 мин.	1 циклус
95°C	15 сек.	
62°C	30 сек.	10 циклуса
72°C	1 мин.	
95°C	15 сек.	
70°C	7 мин.	
79,5°C	3 сек.	35 циклуса
62°C	30 сек.	
72°C	1 мин.	

Успешност PCR реакције проверавана је електрофоретски на 2% агарози у 0,5 x TBE пуферу. За визуализацију трака гелови су бојени етидијум бромидом (Слика 12)



Слика 12. Провера успешности умножавања екзона 2 NRAS гена након електрофорезе на 2% агарозном гелу и бојења етидијум-бромидом

Секвенцирање ДНК (одређивање редоследа нуклеотида у молекулу ДНК). Након завршене амплификације, продукти PCR-а су пречишћени коришћењем комбинације ензима Fast AP термосензитивне алкалне фосфатазе (Thermo Fisher Scientific, САД) и Егзонуклеаза I (Thermo Fisher Scientific, САД) према следећем протоколу:

Табела 9. Услови за пречишћавање PCR амплификата који претходи секвенцирању

PCR амплификат	5 μ l
Егзонуклеаза I (Ехо I)	0,5 μ l (10U)
Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (SAP)	1 μ l (1U)

Смеша је инкубирана 15 минута на 37°C, а потом 15 мин на 85°C.

За сваки ген, пречишћени PCR амплификати су даље коришћени у *Cycle Sequencing* реакцији са F (*foreward*), односно са R (*reverse*) прајмером. анализираних егзона горе наведених гена. За *Cycle Sequencing* реакцију коришћен је BigDye® Terminator v3.1 Kit (Thermo Fisher Scientific, САД) према упутству произвођача:

Табела 10. Услови за *Cycle Sequencing* реакцију

Реакционе компоненте	запремина
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4 μ l
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2 μ l
Forward primer (3.2 μM)	1 μ l
Дејонизована вода	1 μ l
Пречишћен амплификат	2 μ l
Укупна запремина	10 μ l

Табела 11. Програм за PCR

Услови за <i>Cycle Sequencing</i> PCR		
96°C	1 мин.	1 циклус
96°C	10 сек.	
50°C	5 сек.	25 циклуса
60°C	4 мин.	

С обзиром да присуство необележених као и обележених реакционих компоненти може ометати електрофоретско раздвајање, добијени *Cycle Sequencing*

продукти су пречишћени коришћењем BigDye® X Terminator™ Purification Kit-a (Thermo Fisher Scientific, САД) према упутству произвођача (у 10 µl Cycle Sequencing продукта је додавано 10 µl X Terminator™ раствора и 45 µl SAM раствора, смеша је снажно мућкана 30 мин., а потом центрифугирана на „*swinging bucket*“ ротору на 1000 x g 2 мин.).

Овако пречишћени *Cycle Sequencing* продукти анализирани су на Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific) према упутству произвођача коришћењем полимера POP 7 (Thermo Fisher Scientific), на капилари дужине 36 cm (Thermo Fisher Scientific) према BDX протоколу. Добијени резултати су обрађени коришћењем софтвера Sequencing Analysis v5.2 (Thermo Fisher Scientific), док су добијене секвенце поређене са референтним секвенцама за NRAS и С-KIT коришћењем софтвера SeqScape v2.5 (Thermo Fisher Scientific). Референтне секвенце за NRAS (NM_002524.4) и С-KIT (NM_000222) преузете су са NCBI базе података.

Алелска дискриминација Real Time PCR-ом. Детекција мутација у BRAF гену на позицији V600E вршена је на апарату *Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) коришћењем комерцијалног CE-IVD кита „B-Raf V600E Mutation Analysis Kit for Real-Time PCR“ (Entrogen, САД) према упутству произвођача:

Табела 12. Поставка реакција за алел специфични Real Time PCR

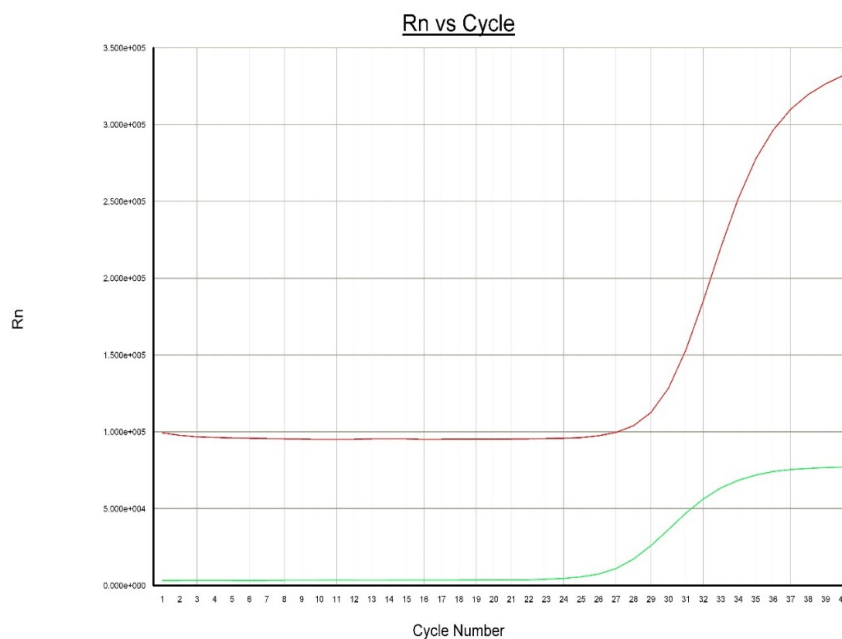
	УЗОРАК	Позитивна контрола	Негативна контрола
Реакциона смеша за PCR (2X)	15 µl	15 µl	15 µl
Прајмери	6 µl	6 µl	6 µl
ДНК	3 µl	1 µl	0 µl
Дејонизована вода	6 µl	8 µl	9 µl
УКУПНО	30 µl	30 µl	30 µl

Табела 13. Услови за PCR :

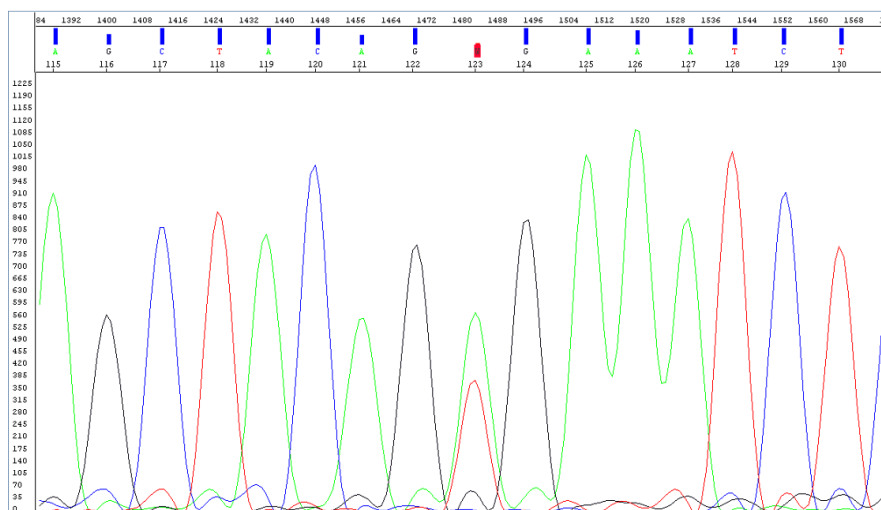
Real time PCR		
95°C	10 мин.	1 циклус
95°C	15 сек.	40 циклуса

60°C* 1 мин.

За анализу резултата је коришћен софтвер SDS v2.3 (Thermo Fisher Scientific). Сваки узорак је анализиран паралелно са одговарајућим позитивним и негативним контролама.



Слика 13. Алел специфични Real Time PCR за анализу присуства мутације у BRAF гену на позицији V600E



Слика 14. Секвенцирање NRAS гена на Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастазиским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

4.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

За анализу примарних података коришћене су дескриптивне статистичке методе, методе за тестирање статистичких хипотеза и методе за анализу времена до настанка исхода од интереса. Од дескриптивних статистичких метода коришћене су мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација) и релативни бројеви. Од метода за тестирање статистичких хипотеза коришћени су: *t*-тест, *Mann-Whitney* тест, *Hi-kvadrat* тест и *Fisherov* тест тачне вероватноће. За анализу преживљавања коришћена је *Kaplan Meierova* метода, за процену функције преживљавања ових пацијената у зависности од мутационог статуса *Log Rank* тест. Подаци су цензурисани из следећих разлога: испитаник преживео целокупан период или је изгубљен из евиденције. Статистичке хипотезе тестиране су на нивоу статистичке значајности од 0.05.

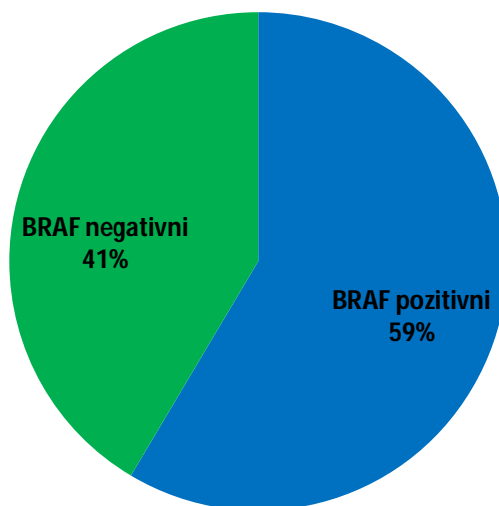
5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Демографске и клиничкопатолошке карактеристике испитаника и BRAF статус

Истраживањем су била укључена 123 пацијента, који су подељени према испитиваној групи на BRAF позитивне, односно пацијенте код којих је нађена мутација у BRAF гену на позицији V600E и BRAF негативне пацијенте, тј. испитанике код којих није детектовано присуство мутације. Од укупног броја пацијента, 72 (58,5%) испитаника је BRAF позитивних и 51 (41,5%) BRAF негативних испитаника.

Табела 14. Дистрибуција испитаника према испитиваној групи

Мутација у BRAF гену	n	%
BRAF позитивни	72	58,5
BRAF негативни	51	41,5
Укупно	123	100,0



Графикон 1. Дистрибуција испитаника на основу мутације у BRAF гену

5.1.1. Полна и старосна структура испитаника

Од свих испитаника укључених у истраживање, мушког пола било је 60,2% а женског 39,8%.

Табела 15. Дистрибуција испитаника према полу

ПОЛ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Мушки	39	54,2	35	68,6	74	60,2
Женски	33	45,8	16	31,4	49	39,8
Укупно	72	100,0	51	100,0	123	100,0

Код укупно 72 BRAF позитивних испитаника мушког пола било је 39 (54,2%), а женског 33 (45,8%), док је 35 (68,6%) испитаника мушког пола и 16 испитаника (31,4%) женског пола било у групи BRAF негативних испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости пола између испитиваних група ($\chi^2=2,605$; $p=0,107$).

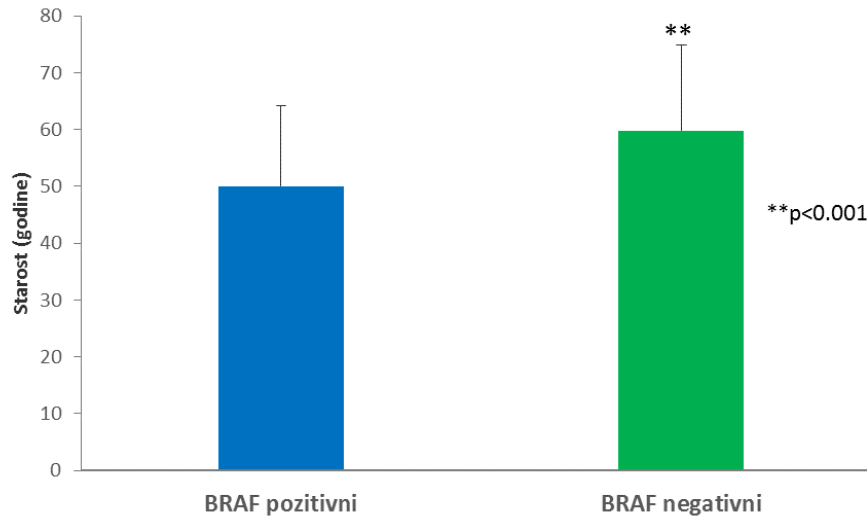
Према старосној структури, просечна старост свих испитаника укључених у истраживање на дијагнози примарног тумора износи $54,1 \pm 15,3$ година. Најмлађи испитаник има 15,0 а најстарији 86,0 година.

Табела 16. Старост испитаника у истраживању на дијагнози примарног тумора

СТАРОСТ (године)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	71	50,0	14,1	49,0	15,0	79,0
BRAF негативни	51	59,8	15,1	62,0	22,0	86,0
Укупно	122	54,1	15,3	55,0	15,0	86,0

Просечна старост на дијагнози примарног тумора BRAF позитивних испитаника износи $50,0 \pm 14,1$ година, док је просечна старост BRAF негативних испитаника $59,8 \pm 15,1$ година.

Постоји статистички значајна разлика у просечној старости између испитиваних група ($t=3,638$; $p<0,001$), што указује да су BRAF негативни испитаници значајно старији.



Графикон 2: Старост испитаника у истраживању

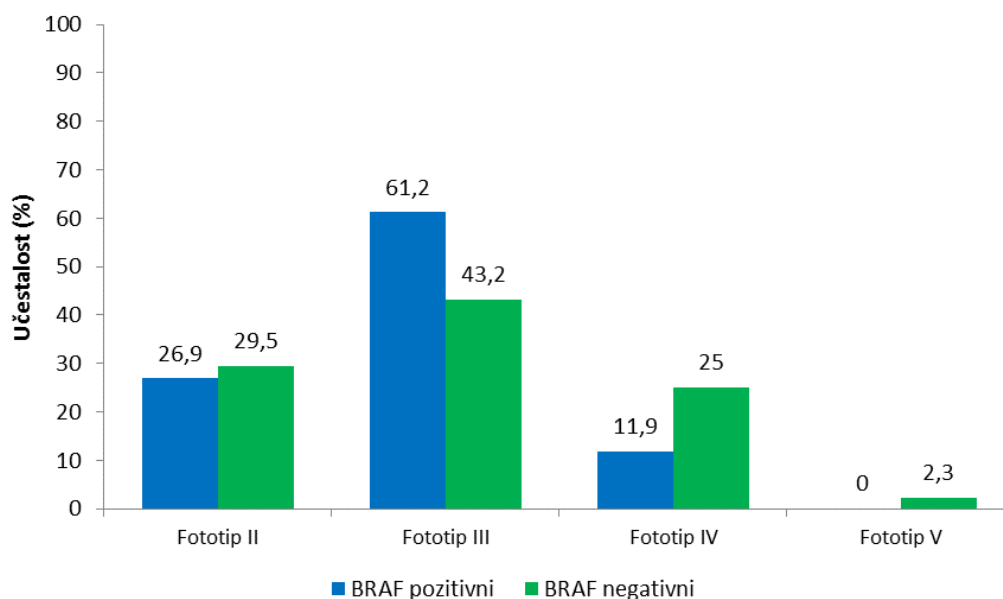
5.2. Фактори ризика код оболелих од метастатског меланома са BRAF мутацијом

Поредећи фенотипске карактеристике и факторе ризика пацијената, добијени резултати приказани су у следећим табелама и графиконима.

Табела 17. Фототип коже према Фицпатрику у испитиваним групама

ФОТОТИП КОЖЕ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Фототип II	18	26,9	13	29,5	31	27,9
Фототип III	41	61,2	19	43,2	60	54,1
Фототип IV	8	11,9	11	25,0	19	17,1
Фототип V	0	0,0	1	2,3	1	0,9
Укупно	67	100,0	44	100,0	111	100,0

Према Фицпатриковој скали међу испитаницима најчешћи је фототип коже III код 60 (54,1%) испитаника, од којих је 41 (61,2%) BRAF позитивних и 19 (43,2%) BRAF негативних пацијената. Фототип коже II забележен је код 31 (27,9%), односно код 18 (26,9%) BRAF позитивних и 13 (29,5%) BRAF негативних пацијената. Од 19 (17,1%) пацијената са фототипом коже IV, 11 (25,0%) је BRAF негативних и 8 (11,9%) BRAF позитивних. У групи BRAF негативних испитаника један (2,3%) је имао фототип коже V. Ниједан испитаник није имао фототип коже I. Статистички није показана значајна разлика између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=0.098$).



Графикон 3. Дистрибуција испитаника према фототипу коже по Фицпатрику

У односу на боју очију није показана статистички значајна разлика у боји очију код испитиваних група (Hi-kvadrat= 0,430; $p=0,807$).

Табела 18. Дистрибуција испитаника према боји очију

БОЈА ОЧИЈУ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Плава	17	25,4	13	28,9	30	26,8
Зелена	20	29,9	11	24,4	31	27,7
Браон/црна	30	44,8	21	46,7	51	45,5
Укупно	67	100,0	45	100,0	112	100,0

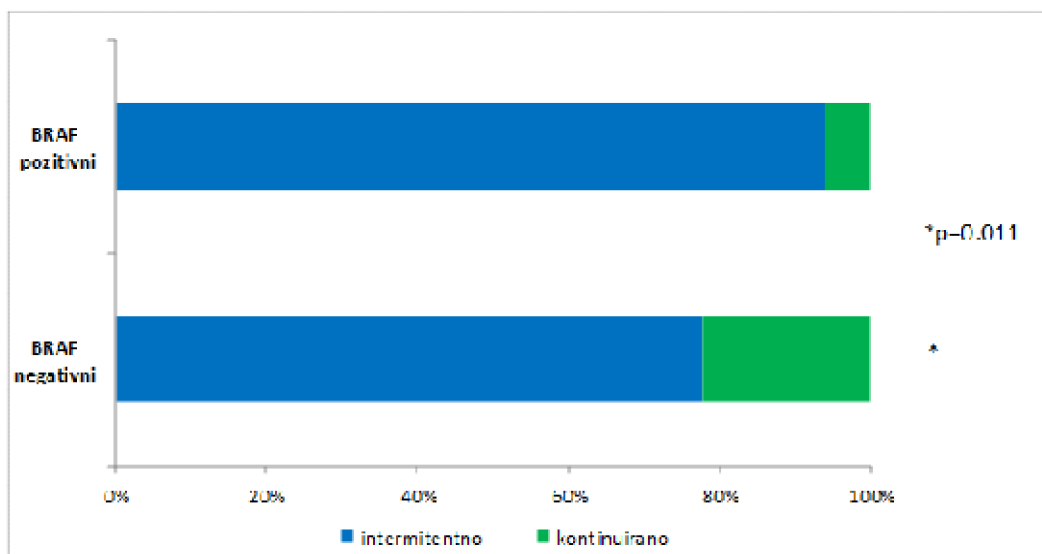
Браон боју очију имао је највећи број испитаника, 30 (44,8%) BRAF позитивних и 21 (46,7%) BRAF негативних испитаника. У групи BRAF позитивних испитаника зелену боју очију је имало 20 (29,9%) и 11 (24,4%) BRAF негативних испитаника. Плаву боју очију је имало 17 (25,4%) BRAF позитивних и 13 (28,9%) BRAF негативних. Није показана статистичка значајност у односу на BRAF мутациони статус и боју очију код наших испитаника ($t=0,430$, $p=0,807$).

Појаву опекотина од сунца до 18. године живота имало је 33 (42,9%) испитаника, од којих је BRAF позитивних било 24 (43,6%) и 9 (40,9%) BRAF негативних испитаника. Опекотине није имао 31 (56,4%) BRAF позитиван и 13 (59,1%) BRAF негативних пацијената. Није показана статистичка значајност између испитиваних група и настанка опекотина од сунца до 18. године живота (Hi-kvadrat тест=0.048, $p=0.827$)

BRAF позитивни испитаници су чешће интермитентно изложени сунчевим зрацима у односу на континуирано излагање (64,3% према 28,6%, респективно), док су BRAF негативни изложени интермитентном излагању наспрам континуираног код 35,7 према 71,4% испитаника. Овај параметар је показао статистички значајну разлику између испитиваних група и излагања УВ зрацима (Hi-kvadrat тест=6,501, $p=0.011$)

Табела 19. Дистрибуција испитаника према излагању УВ зрацима

ИЗЛАГАЊЕ УВ ЗРАЦИМА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	п	%	п	%	п	%
Интермитентно	63	64,3	35	35,7	98	100
Континуирано	4	28,6	10	71,4	14	100
Укупно	67	59,8	45	40,2	112	100,0



Графикон 4: Дистрибуција испитаника према излагању сунцу

Табела 20. Опекотине од сунца до 18.године према испитиваним групама

Опекотине од сунца до 18. године	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	31	56,4	13	59,1	44	57,1
ДА	24	43,6	9	40,9	33	42,9
Укупно	55	100,0	22	100,0	77	100,0

Након периода адолесценције и у одраслом добу опекотине није имало 40 (50,6%) BRAF позитивних или негативних испитаника (52,7 према 45,8 респективно). Опекотине је имало 39 (49,4%) BRAF позитивних или негативних испитаника (47,3% према 54,2% респективно).

Није показана статистички значајна разлика између испитиваних група и настанка опекотина након 18. године живота ($t= 0,318$; $p= 0,573$).

Табела 21. Опекотине након 18.године и у одраслом добу

Опекотине од сунца након 18. године и у одраслом добу	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	29	52,7	11	45,8	40	50,6
ДА	26	47,3	13	54,2	39	49,4
Укупно	55	100,0	24	100,0	79	100,0

Такође није показана статистички значајна разлика између испитиваних група и активности на отвореном (Hi-kvadrat тест=1,067; $p=0.302$). Највећи број BRAF позитивних и негативних испитаника 28 (63,6%) имао је активности везане за боравак на отвореном у временском период дужем од 10 година (55,2% према 80,0% респективно). Није показана статистичка значајност између испитиваних група и временске активности на отвореном (Тест тачне вероватноће= 3,585; $p=0,348$)

Табела 22. Дистрибуција испитаника према активностима у спољашњој средини

АКТИВНОСТ НАПОЉУ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	37	56,1	29	65,9	66	60,0
ДА	29	43,9	15	34,1	44	40,0
УКУПНО	66	100,0	44	100,0	110	100,0

Табела 23. Дистрибуција испитаника према активностима у спољашњој средини

АКТИВНОСТ НАПОЉУ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
До 1 године	1	3,4	1	6,7	2	4,5
Од 2 до 5 година	5	17,2	1	6,7	6	13,6
Од 6 до 10 година	7	24,1	1	6,7	8	18,2
Преко 10 година	16	55,2	12	80,0	28	63,6
УКУПНО	29	100,0	15	100,0	44	100,0

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гена код пацијената са метастазским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

Употреба соларијума, артефицијалног извора УВ зрачења забележена је само код 3 (4,5%) BRAF позитивних пацијената, док 109 (97,3%) BRAF позитивних и негативних испитаника није користило ове изворе зрачења. Није уочена статистички значајна разлика између испитиваних група и употребе соларијума (Тест тачне вероватноће $p=0.272$).

Табела 24. Употреба соларијума у односу на испитиване групе

УПОТРЕБА СОЛАРИЈУМА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	64	95,5	45	100,0	109	97,3
ДА	3	4,5	0	0,0	3	2,7
УКУПНО	67	100,0	45	100,0	112	100,0

Породична појава меланома забележена је код 4 (3,6%) испитаника, BRAF позитивних и негативних испитаника (3,0% према 4,4% респективно) што не указује на статистички значајну разлику (Тест тачне вероватноће; $p=1,000$).

Табела 25. Меланом у породици у односу на испитиване групе

МЕЛАНОМ У ПОРОДИЦИ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	65	97,0	43	95,6	108	96,4
ДА	2	3,0	2	4,4	4	3,6
УКУПНО	67	100,0	45	100,0	112	100,0

Појава другог примарног меланома евидентирана је код 5 (4,5%) испитаника, BRAF позитивних и негативних испитаника (4,6% према 4,4% респективно) чиме није доказана статистички значајна разлика између испитиваних група (тест тачне вероватноће; $p=1,000$).

Табела 26. Други примарни меланом у односу на испитиване групе

ДРУГИ ПРИМАРНИ МЕЛАНОМ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	62	95,4	43	95,6	105	95,5
ДА	3	4,6	2	4,4	5	4,5
УКУПНО	65	100,0	45	100,0	110	100,0

У обе испитиване групе 49.5% испитаника је имао до 25 невуса. Од укупно 39 (35.1%) испитаника, 25 до 50 невуса је имало 26 (39.4%) BRAF позитивних, у односу на 13 (28.9%) BRAF негативних испитаника. Присуство више од 100 невуса забележено је искључиво у групи BRAF негативних испитаника 3 (6.7%). Овим параметром није доказана статистички значајна разлика у односу на испитиване групе (тест тачне вероватноће; $p=0,149$)

Табела 27. Број невуса у испитиваним групама

БРОЈ НЕВУСА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
До 25 невуса	31	47,0	24	53,3	55	49,5
Од 25-50 невуса	26	39,4	13	28,9	39	35,1
Од 50-100 невуса	9	13,6	5	11,1	14	12,6
Преко 100 невуса	0	0,0	3	6,7	3	2,7
УКУПНО	66	100,0	45	100,0	111	100,0

Такође није показана статистичка значајност у односу на присуство и број диспластичних невуса у испитиваним групама (Hi-kvadrat тест; $p=0.987$)

Табела 28. Присуство диспластичних невуса у испитиваним групама

ДИСПЛАСТИЧНИ НЕВУС	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	56	86,2	37	86,0	93	86,1
ДА	9	13,8	6	14,0	15	13,9
УКУПНО	65	100,0	43	100,0	108	100,0

Код 15 пацијената код којих је забележено присуство диспластичних невуса, 9 (13,8%) је било у групи BRAF позитивних у односу на 6 (14%) BRAF негативних. BRAF позитивни пацијенти имали су највише 4 (6,2%) диспластичних невуса, док су BRAF негативни имали 5 (11,4%). Није показана статистички значајна разлика између BRAF мутационог статуса и присуства диспластичних невуса ($p=0,987$).

Табела 29. Број диспластичних невуса у односу на испитиване групе

БРОЈ ДИСПЛАСТИЧНИХ НЕВУСА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
	0	57	87,7	37	84,1	94
1	2	3,1	5	11,4	7	6,4
2	4	6,2	2	4,5	6	5,5
5	1	1,5	0	0,0	1	0,9
7	1	1,5	0	0,0	1	0,9
УКУПНО	65	100,0	44	100,0	109	100,0

Није показана статистички значајна разлика између испитиваних група и соларног лентиго (Hi-kvadrat тест=2,502; $p=0,114$)

Табела 30. Присуство соларног лентиго у односу на испитиване групе

СОЛАРНИ ЛЕНТИГО	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	10	15,4	12	27,9	22	20,4
ДА	55	84,6	31	72,1	86	79,6
УКУПНО	65	100,0	43	100,0	108	100,0

Није показана статистички значајна разлика између испитиваних група и броја соларног лентиго (Hi-kvadrat тест=3,079; $p=0,545$). Највећи број BRAF позитивних 25 (37,9%) и негативних пацијената 13 (30,2%) има преко 100 промена то типу соларног лентиго.

Табела 31. Број промена то типу соларног лентига у односу на испитиване групе

БРОЈ СОЛАРНОГ ЛЕНТИГА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Нема	11	16,7	13	30,2	24	22,0
До 25	9	13,6	6	14,0	15	13,8
Од 25-50	12	18,2	7	16,3	19	17,4
Од 50 -100	9	13,6	4	9,3	13	11,9
Преко 100	25	37,9	13	30,2	38	34,9
УКУПНО	66	100,0	43	100,0	109	100,0

5.3. Симптоми тумора и BRAF статус

На основу анкете оболели од меланома су се изјаснили да је меланом настао на претходно постојећем младежу код 62 (57,9%) испитаника и то код 37 (58,7%) BRAF позитивних и 25 (56,8%) BRAF негативних пацијената. *De novo* постојање меланома уочено је код 45 (42,1%) испитаника од којих је код BRAF позитивних у 26 (41,3%) и BRAF негативних у 19 (43,2%) пацијената. Није уочена статистички значајна разлика између испитиваних група у односу на трансформацију пигментне промене (Hi-kvadrat тест; $p=0,844$).

Табела 32. Поређење настанка меланома у односу на испитиване групе

ТРАНСФОРМАЦИЈА МЕЛАНОМА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Ранији младеж	37	58,7	25	56,8	62	57,9
Новонастала промена	26	41,3	19	43,2	45	42,1
Укупно	63	100,0	44	100,0	107	100,0

Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастазским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

Табела 33. Временски период до појаве меланома код испитиваних група

ВРЕМЕ ДО ПОЈАВЕ МЕЛАНОМА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	н	%	н	%	н	%
	До 6 месеци	6	9,1	4	9,1	10
Од 6 до 1 године	4	6,1	6	13,6	10	9.1
Од 1 до 2 године	4	6,1	4	9,1	8	7.3
Од 2- 5 година	9	13,6	4	9,1	13	11.8
Од 6-10 година	10	15,2	4	9,1	14	12.7
Више од 10 година	26	39,4	19	43,2	45	40.9
Непознато	7	10,6	3	6,8	10	9.1
УКУПНО	66	100,0	44	100,0	110	100

Није показана статистички значајна разлика од тренутка појаве сумњиве лезије до јављања лекару (Тест тачне вероватноће=3,717; $p=0,735$)

Симптоми тумора су најчешћи разлог јављања лекару код 104 (94,5%) испитаника, код 63 (95,5%) BRAF позитивних и 41 (93,2%) BRAF негативних испитаника у односу на уочавање меланома од стране лекара опште праксе или прегледа другог специјалисте. Није уочена статистички значајна разлика између испитиваних група и разлога јављања лекару (Тест тачне вероватноће; $p=0,368$). Вулнерабилност лезије је статистички значајан симптом код BRAF позитивних пацијената у односу на компаративну групу ($p=0,025$)

Узимајући у обзир анамнестичке податке о промени лезије у виду величине, облика, боје, крварење, влажење, свраб, бол, перутање или избочење није добијена статистичка значајност између ове две групе пацијената (Табела 34)

Табела 34. Симптоми тумора код испитиваних група

Симптоми тумора	BRAF позитивни		BRAF негативни		р вредност
Промена у величини	Не	18 (27.3%)	Не	18 (40.9%)	p=0.135
	Да	48 (72.7%)	Да	26 (59.1%)	
Промена облика	Не	41 (62.1%)	Не	32 (72.7%)	p=0.249
	Да	25 (37.9%)	Да	12 (27.3%)	
Промена боје	Не	37 (56.1%)	Не	22 (50.0%)	p=0.532
	Да	29 (43.9%)	Да	22 (50.0%)	
Вулнерабилност	Не	50 (76.9%)	Не	41 (93.2%)	*p=0.025
	Да	15 (23.1%)	Да	3 (6.8%)	
Крварење	Не	39 (59.1%)	Не	27 (61.4%)	p=0.812
	Да	27 (40.9%)	Да	17 (38.6%)	
Влажење	Не	54 (81.8%)	Не	37 (84.1%)	p=0.757
	Да	12 (18.2%)	Да	7 (15.9%)	
Бол или свраб	Не	49 (74.2%)	Не	35 (79.5%)	p=0.521
	Да	17 (25.8%)	Да	9 (20.5%)	
Перутање	Не	62 (93.9%)	Не	41 (93.2%)	p=1.000
	Да	4 (6.1%)	Да	3 (6.8%)	
Избочење	Не	56 (84.8%)	Не	37 (84.1%)	p=0.914
	Да	10 (15.2%)	Да	7 (15.9%)	
Пораст преко 6 mm	Не	44 (66.7%)	Не	31 (70.5%)	p=0.676
	Да	22 (33.3%)	Да	13 (29.5%)	

5.4. Клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора и BRAF статус

5.4.1. Локализација примарног тумора

Од 123 испитаника који су укључени у истраживање, меланом је најчешће био заступљен на трупy (37,4%). Најчешћа локализација меланома према полу испитаника била је на трупy код мушкараца у 31 (41,9%) , потом на глави и врату 23 (31,1%), док су жене најчешће имале меланом на екстремитетима у 16 (32,7%) а труп је заступљен у 15 (30,6%). Постоји статистички значајна разлика у учесталости локализације меланома између испитиваних група, труп је чешће заступљен код мушкараца у односу на друге локализације, док су код жена чешће захваћени екстремитети (Hi-kvadrat тест=10,055; p=0,018).

Табела 35. Дистрибуција испитаника према локализацији примарног тумора према полу испитаника

Муџације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код њацијениа са меџасџаџским меланомом и њихова џовезаносџ са клиничко-џаџолоџским каракџерисџикама, факџорима ризика и џоком болесџи

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	Мушкарци		Жене		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	23	31,1	9	18,4	32	26,0
екстремитети	17	23,0	16	32,7	33	26,8
Труп	31	41,9	15	30,6	46	37,4
Акрални	3	4,1	9	18,4	12	9,8
Укупно	74	100,0	49	100,0	123	100,0

Најчешћа локализација меланома код BRAF позитивних или негативних испитаника била је на трupu (37,5% према 37,3%, респективно). На екстремитетима у групи BRAF позитивних испитаника меланом је заступљен у 22 (30,6%) пацијената, а у групи BRAF негативних код 11 (21,6%) испитаника. Меланом у пределу главе и врата код BRAF позитивних или негативних испитаника био је заступљен са 23,6% према 29,4% респективно. Најређа локализација меланома је у пределу акралних делова у обе групе испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости локализације меланома између испитиваних група (Hi-kvadrat=1,646; $p=0,649$).

Табела 36. Дистрибуција испитаника према локализацији примарног тумора

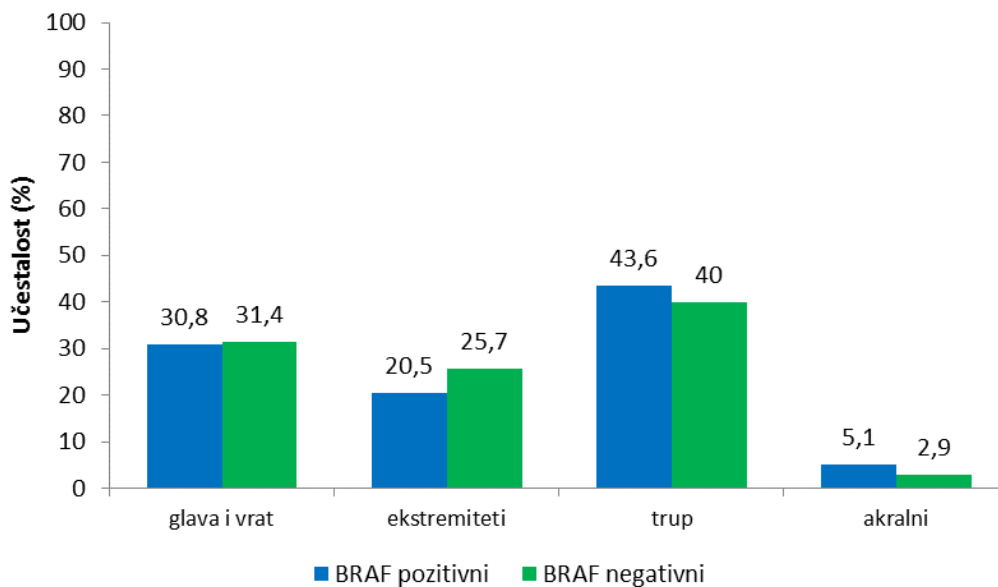
ЛОКАЛИЗАЦИЈА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	17	23,6	15	29,4	32	26,0
екстремитети	22	30,6	11	21,6	33	26,8
Труп	27	37,5	19	37,3	46	37,4
Акрални	6	8,3	6	11,8	12	9,8
Укупно	72	100,0	51	100,0	123	100,0

Анализирани су и подаци локализације примарног тумора према полу у односу на BRAF мутациони статус и није нађена статистички значајна разлика између испитиваних варијабли (Тест тачне вероватноће; $p=0,981$ према 0,125)

Табела 37. Локализација примарног тумора код мушкараца према BRAF статусу

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	12	30,8	11	31,4	23	31,1
екстремитети	8	20,5	9	25,7	17	23,0
Труп	17	43,6	14	40,0	31	41,9
Акрални	2	5,1	1	2,9	3	4,1
Укупно	39	100,0	35	100,0	74	100,0

Код особа мушког пола труп је подједнако заступљен у обе групе испитаника (43,6% према 40,0%, респективно). Није нађена статистички значајна разлика у локализацији примарног тумора код мушкараца у односу на BRAF мутациони статус (Тест тачне вероватноће; $p=0,981$)



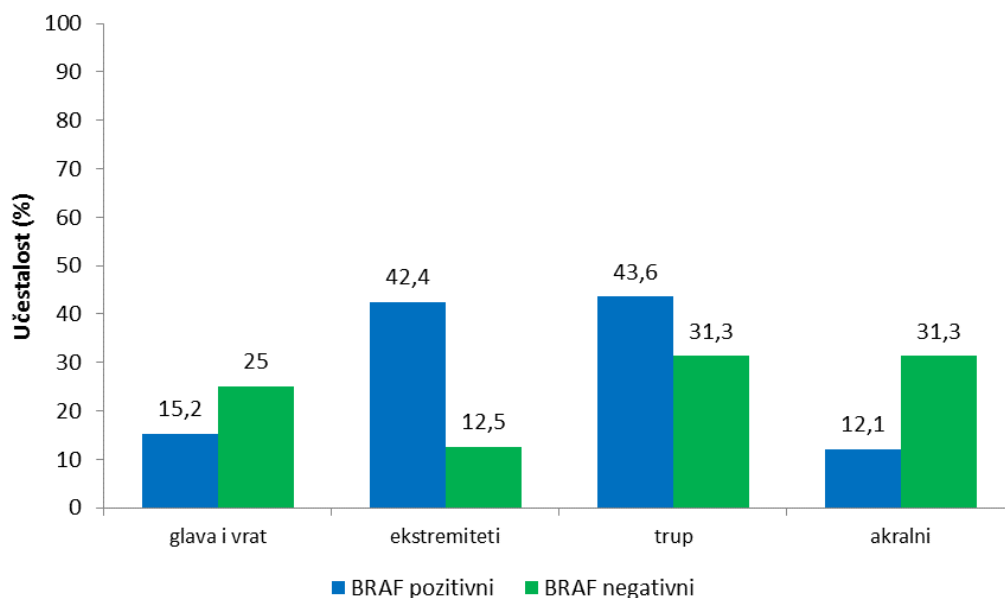
Графикон 5. Локализација примарног тумора код особа мушког пола у односу на BRAF мутациони статус

Код особа женског пола екстремитети су најчешће заступљени у групи BRAF позитивних испитаника, док је у групи BRAF негативних испитаника меланом подједнако локализован на екстремитетима и акралним деловима (31,3% према

31,3%, респективно). Није нађена статистички значајна разлика у локализацији примарног тумора код мушкараца у односу на BRAF мутациони статус (Тест тачне вероватноће; $p=0,125$)

Табела 38. Локализација примарног тумора код жена и BRAF статусу

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	5	15,2	4	25,0	9	18,4
екстремитети	14	42,4	2	12,5	16	32,7
Труп	10	43,6	5	31,3	15	30,6
Акрални	4	12,1	5	31,3	9	18,4
Укупно	33	100,0	16	100,0	49	100,0



Графикон 6. Локализација примарног тумора код жена у односу на BRAF мутациони статус

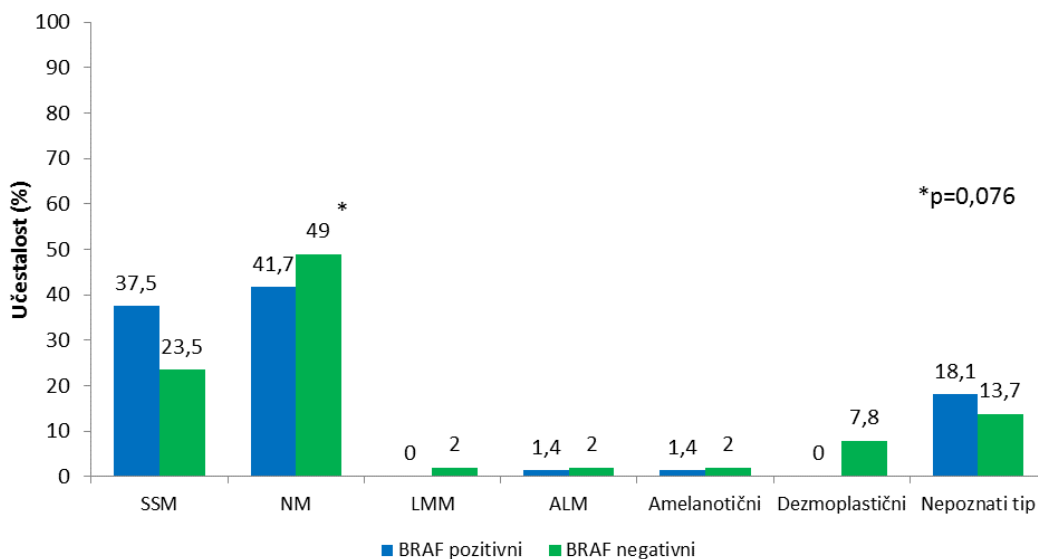
5.4.2. Хистолошки тип примарног тумора

Од свих испитаника укључених у истраживање, најчешћи хистолошки тип меланома био је нодуларни меланом који је у испитиваној групи заступљен са 45,1% (табела 3.1). Најчешћи хистолошки тип меланома код BRAF позитивних или

негативних испитаника био је нодуларни меланом (41,7% према 49,0%, респективно). Површинско ширећи тип меланома имало је укупно 39 (31,7%) испитаника, од чега је 27 (37,5%) BRAF позитивних наспрам 12 (23,5%) BRAF негативних испитаника. Акрални лентиринозни и амеланотични меланом код BRAF позитивних или негативних пацијената евидентиран је у 1,4% према 2,0% респективно. Лентиго малигна меланома забележен је у групи BRAF позитивних и негативних испитаника и то код по 1 (2,0%) пацијента, док је дезмопластичан тип примарног тумора нађен само у групи BRAF негативних испитаника и то код 4 (7,8%) испитаника. Непознати хистолошки тип имало је укупно 20 (16,3%) испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости хистолошког типа меланома између испитиваних група, али постоји тренд (Тест тачне вероватноће; $p=0,076$).

Табела 39. Хистолошки типови меланома у испитиваним групама

ХИСТОЛОШКИ ТИП	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Површно ширећи меланом	27	37,5	12	23,5	39	31,7
Нодуларни меланом	30	41,7	25	49,0	55	44,7
Лентиго малигна меланома	0	0,0	1	2,0	1	0,8
Акрални лентиринозни меланом	1	1,4	1	2,0	2	1,6
Амеланотични	1	1,4	1	2,0	2	1,6
Дезмопластични	0	0,0	4	7,8	4	3,3
Непознати тип	13	18,1	7	13,7	20	16,3
Укупно	72	100,0	51	100,0	123	100,0



Графикон 7. Дистрибуција испитаника према хистолошком типу меланома

5.4.3. Дебљина тумора по Бреслоу

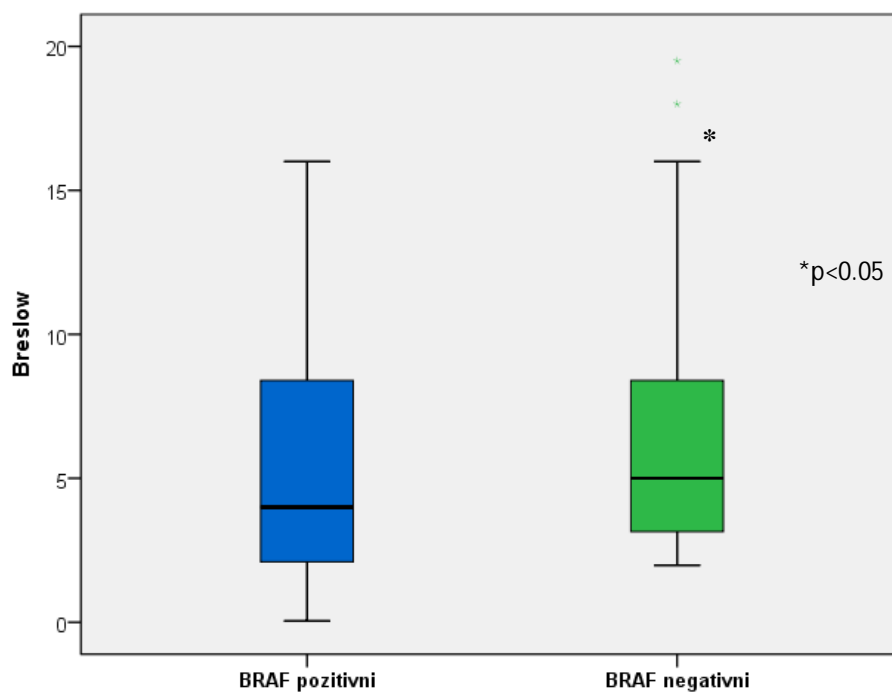
Медијана вредности дебљине примарног тумора по Бреслоу свих испитаника у истраживању износи 4,5 mm (опсег, 0,1-35,2).

Табела 40. Дебљина тумора по Бреслоу испитаника у истраживању

ДЕБЉИНА ТУМОРА ПО БРЕСЛОУ, (mm)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	67	6,0	6,2	4,0	0,1	35,2
BRAF негативни	44	6,9	5,1	5,0	2,0	25,0
Укупно	111	6,4	5,8	4,5	0,1	35,2

Медијана вредности дебљине тумора по Бреслоу BRAF позитивних испитаника износи 4,0 (опсег, 0,1-35,2), док је код BRAF негативних испитаника 5,0 (опсег, 2,0-25,0).

Постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана дебљине тумора по Бреслоу између испитиваних група ($U=1135,5$; $p=0,041$). BRAF негативни испитаници имају значајно више вредности медијана дебљине тумора по Бреслоу.



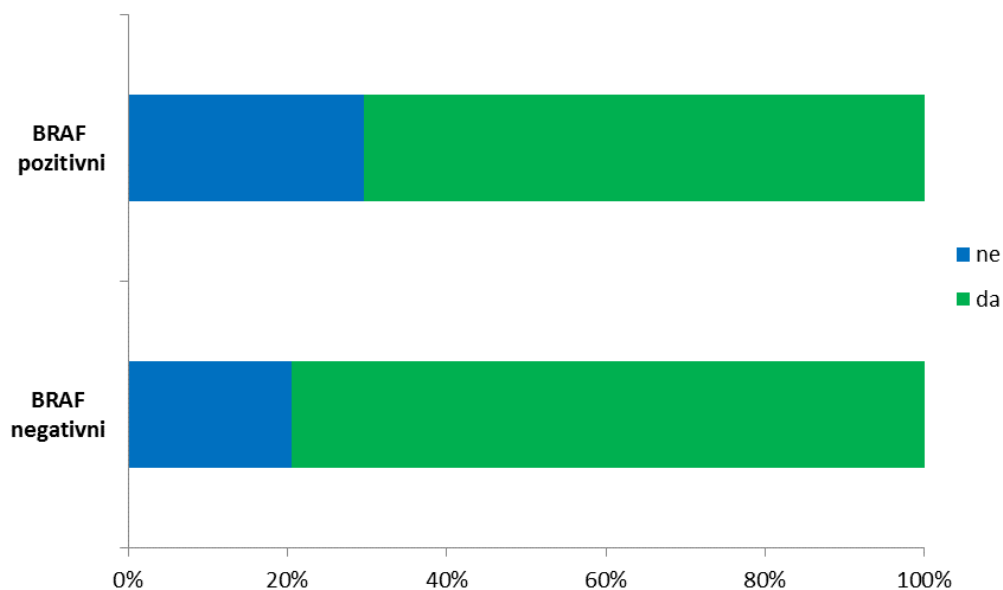
Графикон 8. Дебљина тумора по Бреслоу испитаника у истраживању

5.4.4. Улцерација примарног тумора

Улцерацију примарног тумора је имало 38 (70,4%) BRAF позитивних испитаника и 31 (79,5%) BRAF негативних испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости улцерација између испитиваних група (Ни-квдрат=0,983; $p=0,321$).

Табела 41. Дистрибуција испитаника према улцерацији примарног тумора

УЛЦЕРАЦИЈА ПРИМАРНОГ ТУМОРА	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
НЕ	16	29,6	8	20,5	24	25,8
ДА	38	70,4	31	79,5	69	74,2
Укупно	54	100,0	39	100,0	93	100,0



Графикон 9. Дистрибуција испитаника према улцерацији примарног тумора

5.4.5. Број митоза

Медијана вредности броја митоза свих испитаника у истраживању износи 5,0 (опсег 0,0-28,0).

Табела 42. Број митоза испитаника у истраживању

БРОЈ МИТОЗА	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	33	5,9	5,6	5,0	0,0	28,0
BRAF негативни	19	5,6	4,7	5,0	0,0	15,0
Укупно	52	5,8	5,2	5,0	0,0	28,0

Медијана вредности броја митоза BRAF позитивних испитаника износи 5,0 (опсег 0,0-28,0), док је код BRAF негативних испитаника 5,0 (опсег 0,0-15,0).

Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана броја митоза између испитиваних група ($U=302,0$; $p=0,826$).

5.4.6. Број патолошки измењених лимфних чворова

Медијана вредности броја патолошких лимфних чворова свих испитаника у истраживању износи 2,0 (опсег 0,0-22,0). Медијана вредности броја патолошких лимфних чворова BRAF позитивних испитаника износи 3,0 (опсег 0,0-22,0), док је код BRAF негативних испитаника 2,0 (опсег 1,0-7,0). Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана броја патолошких лимфних чворова између испитиваних група ($U=228,5$; $p=0,282$).

Табела 43. Број патолошких лимфних чворова испитаника у истраживању

БРОЈ ПАТОЛОШКИХ ЛИМФНИХ ЧВОРОВА	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	31	4,6	5,7	3,0	0,0	22,0
BRAF негативни	18	2,5	1,9	2,0	1,0	7,0
Укупно	49	3,8	4,8	2,0	0,0	22,0

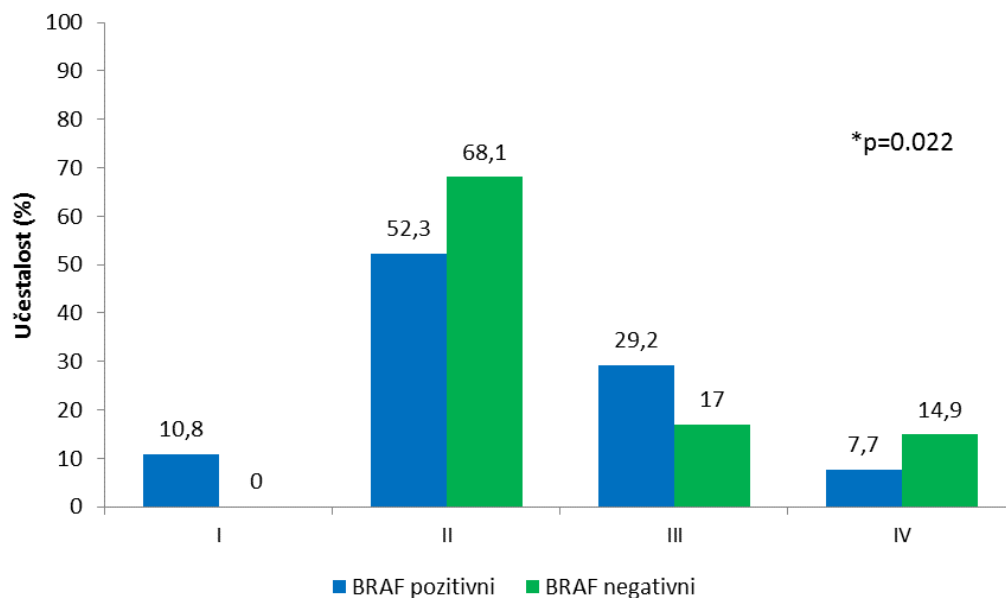
5.4.7. Иницијални клинички стадијум на дијагнози

Најчешћи стадијум на дијагнози код BRAF позитивних (52,3%), односно BRAF негативних (68,1%) испитаника био је II. Први стадијум је забележен искључиво код BRAF позитивних испитаника у 10,8%. Трећи стадијум на дијагнози са захватањем регионалних лимфних чворова имало је 27 (24,1%), BRAF позитивних испитаника 19 (29,2%) наспрам 8 (17%) BRAF негативних испитаника. Метастатску болест, што представља IV стадијум болести на иницијалној дијагнози имало је 12 (10,7%), односно, 5 (7,7%) BRAF позитивних и 7 (14,9%) BRAF негативних испитаника.

Табела 44. Дистрибуција испитаника на основу иницијалног стадијума на

СТАДИЈУМ НА ДИЈАГНОЗИ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
I	7	10,8	0	0,0	7	6,3
II	34	52,3	32	68,1	66	58,9
III	19	29,2	8	17,0	27	24,1
IV	5	7,7	7	14,9	12	10,7
Укупно	65	100,0	47	100,0	112	100,0

Постоји статистички значајна разлика у учесталости стадијума на дијагнози између испитиваних група, указујући да BRAF негативни испитаници имају већи стадијум на дијагнози II, III и IV, за разлику од BRAF позитивних (Тест тачне вероватноће; $p=0,022$).



Графикон 10. Дистрибуција испитаника на основу стадијума на дијагнози

5.4.8. Дистрибуција испитаника према подстадијуму метастатске болести IV стадијума

Просечна старост свих испитаника укључених у истраживање на дијагнози удаљених метастаза износи $56,7 \pm 15,5$ година. Најмлађи испитаник има 16, а најстарији 89 година.

Табела 45. Старост испитаника у истраживању на дијагнози удаљених метастаза

СТАРОСТ (године)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	71	52,8	14,3	52,0	16,0	79,0
BRAF негативни	51	62,0	15,7	64,0	23,0	89,0
Укупно	122	56,7	15,5	57,0	16,0	89,0

Просечна старост на дијагнози удаљених метастаза BRAF позитивних испитаника износи $52,8 \pm 14,3$ година, док је просечна старост BRAF негативних

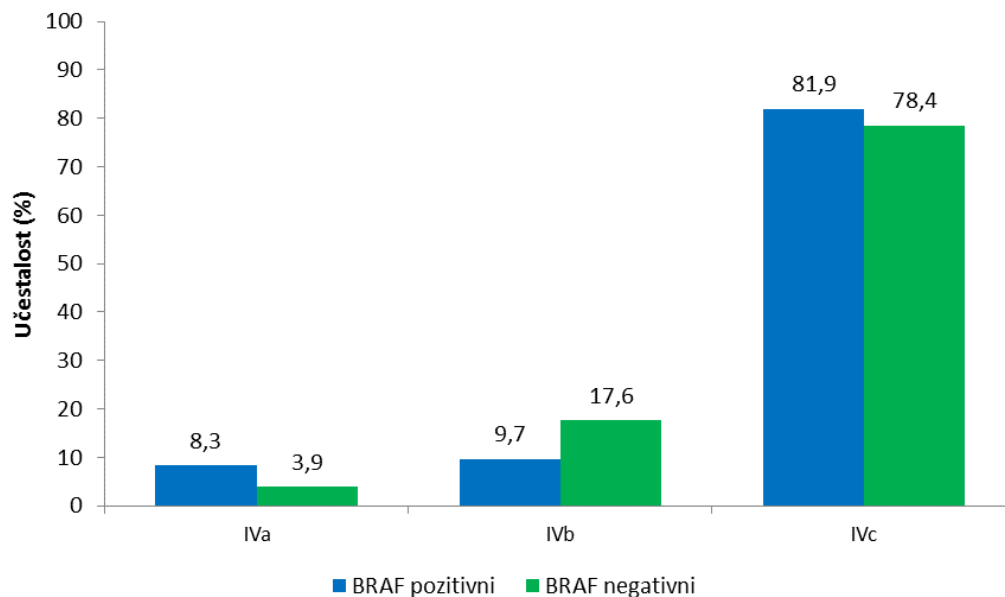
Мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастатским меланомом и њихова

испитаника $62,0 \pm 15,7$ година. Постоји статистички значајна разлика у просечној старости између испитиваних група ($t=3,360$; $p<0,001$), што указује да су BRAF негативни испитаници значајно старији.

Табела 46. Дистрибуција испитаника према подстадијуму

IV СТАДИЈУМ БОЛЕСТИ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Iva	6	8,3	2	3,9	8	6,5
Ivb	7	9,7	9	17,6	16	13,0
Ivc	59	81,9	40	78,4	99	80,5
Укупно	72	100,0	51	100,0	123	100,0

Најчешћи IV стадијум код BRAF позитивних или негативних испитаника био је Ivc (81,9% према 78,4%, респективно), што указује да је највећи број испитаника имао метастатско ширење у удаљеним органима у односу на ширење у плућа, илијачне лимфне нодусе и субкутане метастатске депозите. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости категорија четвртог стадијума болести између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=0,302$).



Графикон 11. Дистрибуција испитаника према месту удаљених метастаза у IV стадијуму болести

5.4.9. Локализација удаљених метастаза

Табела 47. Дистрибуција испитаника према захваћеном органу

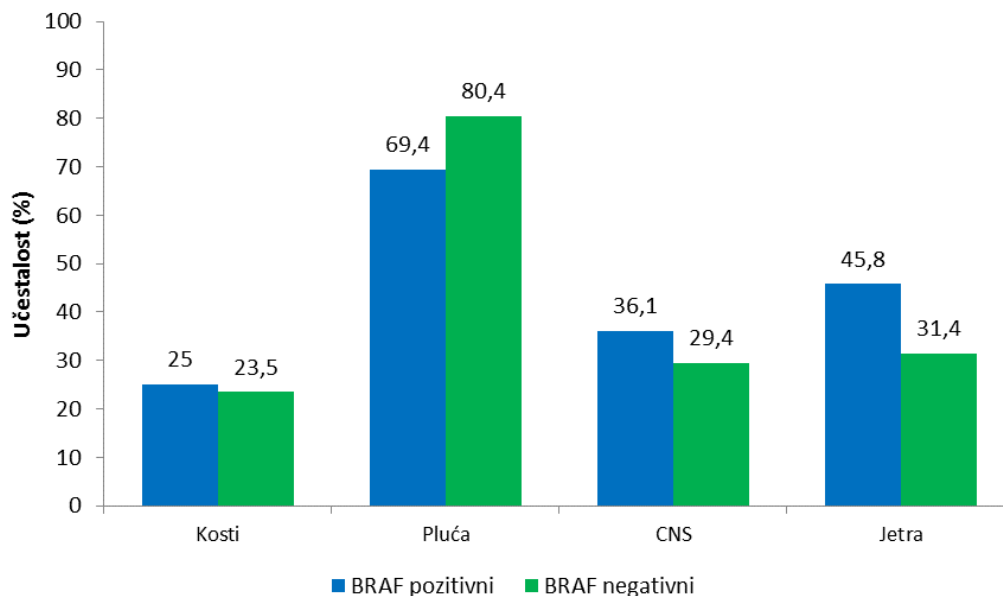
ЗАХВАЋЕНИ ОРГАН	BRAF позитивни		BRAF негативни		p-вредност
	n	%	n	%	
Кости	18	25,0	12	23,5	0,852
Плућа	50	69,4	41	80,4	0,173
ЦНС	26	36,1	15	29,4	0,437
Јетра	33	45,8	16	31,4	0,107

Метастазе на костима имало је 18 (25,0 %) BRAF позитивних испитаника и 12 (23,5%) BRAF негативних, што није статистички значајна разлика (Hi-kvadrat=0,035; p=0,852).

Метастазе на плућима нотиране су код 50 (69,4%) BRAF позитивних испитаника и 41 (80,4%) BRAF негативних, што није статистички значајна разлика (Hi-kvadrat=1,859; p=0,173).

Метастазе у централном нервном систему имало је 26 (36,1%) BRAF позитивних испитаника и 15 (29,4%) BRAF негативних, што није статистички значајна разлика (Hi-kvadrat=0,603; p=0,437).

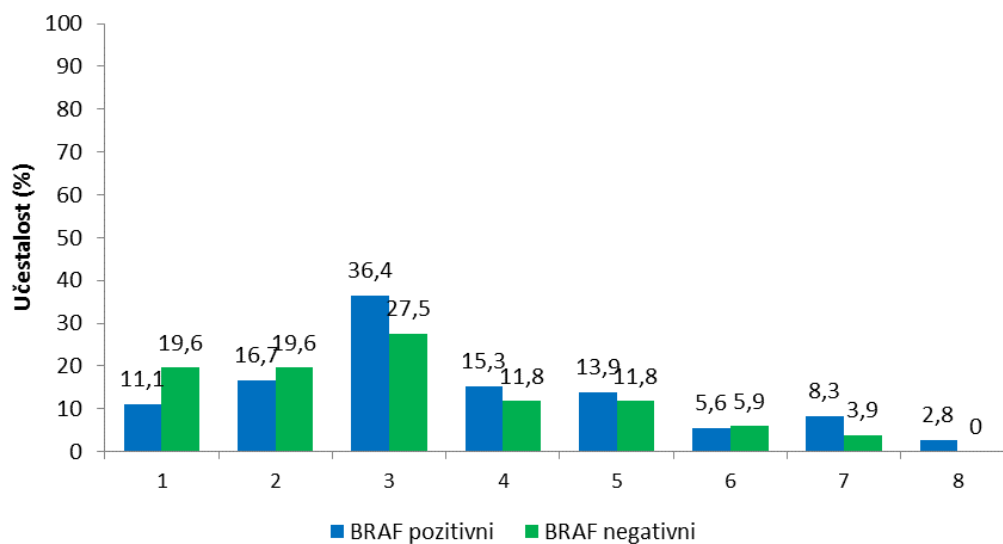
Метастазе на јетри имало је 45,8% BRAF позитивних испитаника и 31,4% BRAF негативних, што није статистички значајна разлика (Hi-kvadrat=2,605; p=0,107).



Графикон 12. Дистрибуција испитаника према месту удаљених метастаза

5.4.10. Дистрибуција испитаника према броју захваћених органа

Најчешћи број захваћених органа код BRAF позитивних или негативних испитаника био је 3 (36,4% према 27,5%, респективно). Не постоји статистички значајна разлика у медијанама броја захваћених органа између испитиваних група (U=1510,0; p=0,089).



Графикон 13. Дистрибуција испитаника према броју захваћених органа

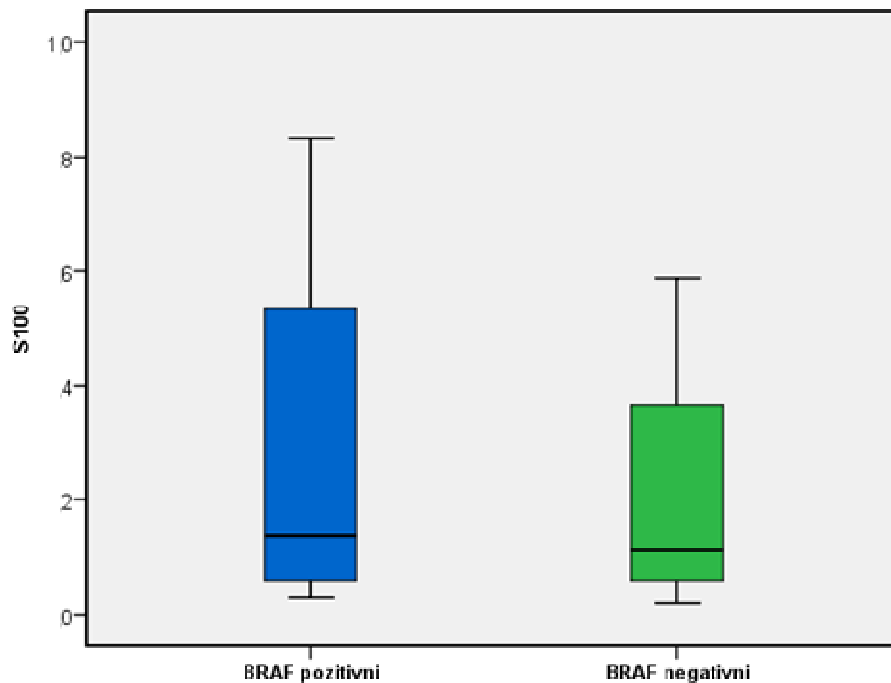
5.4.10.1. Вредности S100 протеина

Медијана вредности S100 протеина свих испитаника у истраживању у тренутку прогресије болести у IV стадијум износи 0,1 (опсег, 0,0-6,3).

Табела 48. Вредност S100 протеина испитаника у истраживању

S100 ПРОТЕИН	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	45	0,8	1,5	0,1	0,0	6,3
BRAF негативни	31	0,4	0,6	0,1	0,0	2,8
Укупно	76	0,6	1,2	0,1	0,0	6,3

Медијана вредности S100 протеина BRAF позитивних испитаника износи 0,1 (опсег, 0,0-6,3), док је код BRAF негативних испитаника 0,1 (опсег, 0,0-2,8). Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана S100 протеина између испитиваних група у тренутку прогресије болести у IV стадијум ($U=633,0$; $p=0,495$).



Графикон 14. Медијана вредности S100 протеина у тренутку прогресије болести испитаника у истраживању

5.4.10.2. Дистрибуција испитаника према вредностима S100 протеина код испитиваних група

Табела 49. Дистрибуција испитаника према вредностима S100 протеина код испитиваних група

S100 ПРОТЕИН	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Нормалан	23	46,0	14	45,2	37	45,7
Повишен	27	54,0	17	54,8	44	54,3
Укупно	50	100,0	31	100,0	81	100,0

Повишене вредности S100 протеина имало је 27 (54,0%) BRAF позитивних испитаника и 17 (54,8%) BRAF негативних испитаника. Од укупно 37 (45,7%) испитаника, 23 (46,0%) BRAF позитивних и 14 (45,2%) BRAF негативних имало је нормалне вредности S100 протеина.

Не постоји статистички значајна разлика у учесталости S100 протеина између испитиваних група ($H_i\text{-kvadrat}=0,005$; $p=0,941$).

5.4.11. Дистрибуција испитаника према вредностима LDH код испитиваних група

Медијана вредности LDH свих испитаника у истраживању износи 284,0 (опсег,106,0-3468,0).

Табела 50. Вредности LDH у истраживању према испитиваним групама

ЛАКТАТ ДЕХИДРОГЕНАЗА	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF позитивни	45	391,5	502,7	279,0	106,0	3468,0
BRAF негативни	41	352,1	239,2	311,0	120,0	1278,0
Укупно	86	372,7	397,7	284,0	106,0	3468,0

Медијана вредности LDH BRAF позитивних испитаника износи 279,0 (опсег, 106,0-3468,0), док је код BRAF негативних испитаника 311,0 (опсег, 120,0-1278,0).

Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана LDH између испитиваних група ($U=918,5$; $p=0,972$).

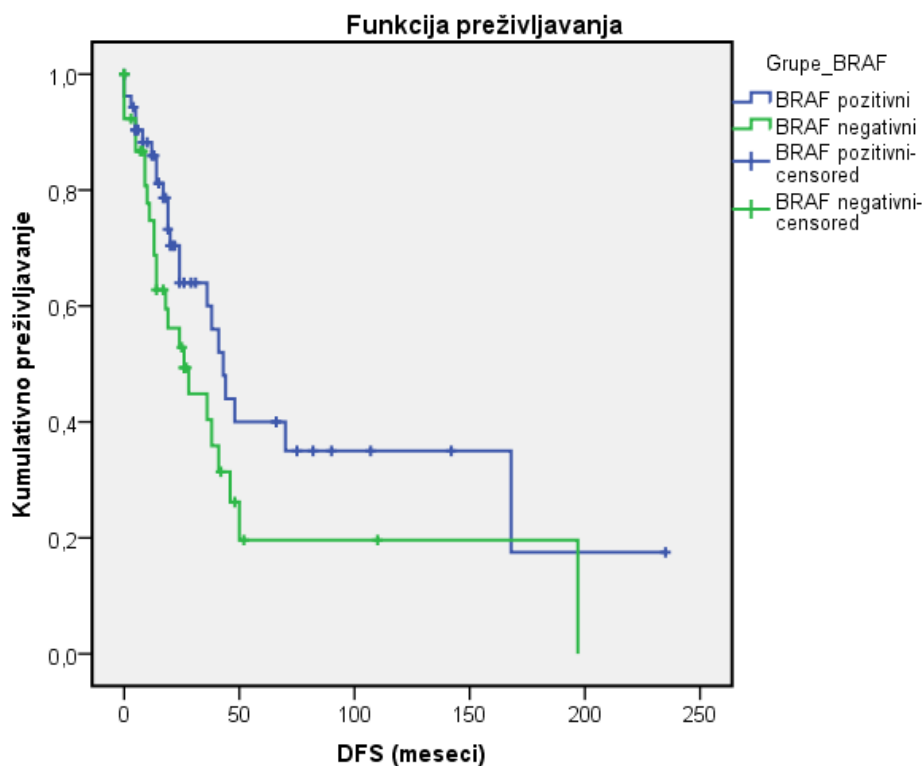
Повишене вредности LDH у тренутку прогресије болести имало је 21 BRAF позитивних испитаника, односно 38,2% и 20 (45,5%) BRAF негативних испитаника. Од укупно 58 (58,6%) испитаника, нормалне вредности лактат дехидрогеназе имало је 34 (61,8%) BRAF позитивних и 24 (54,5%) BRAF негативних испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости лактат дехидрогеназе између испитиваних група у тренутку прогресије болести ($Hi\text{-}kvadrat=0,533$; $p=0,465$).

5.5. АНАЛИЗА ТОКА БОЛЕСТИ И BRAF МУТАЦИОНИ СТАТУС

У нашем истраживању анализиран је ток болести испитаника према мутационом статусу, добијени резултати приказани су графиконима.

5.5.1. Време од дијагнозе до првих удаљених метастаза

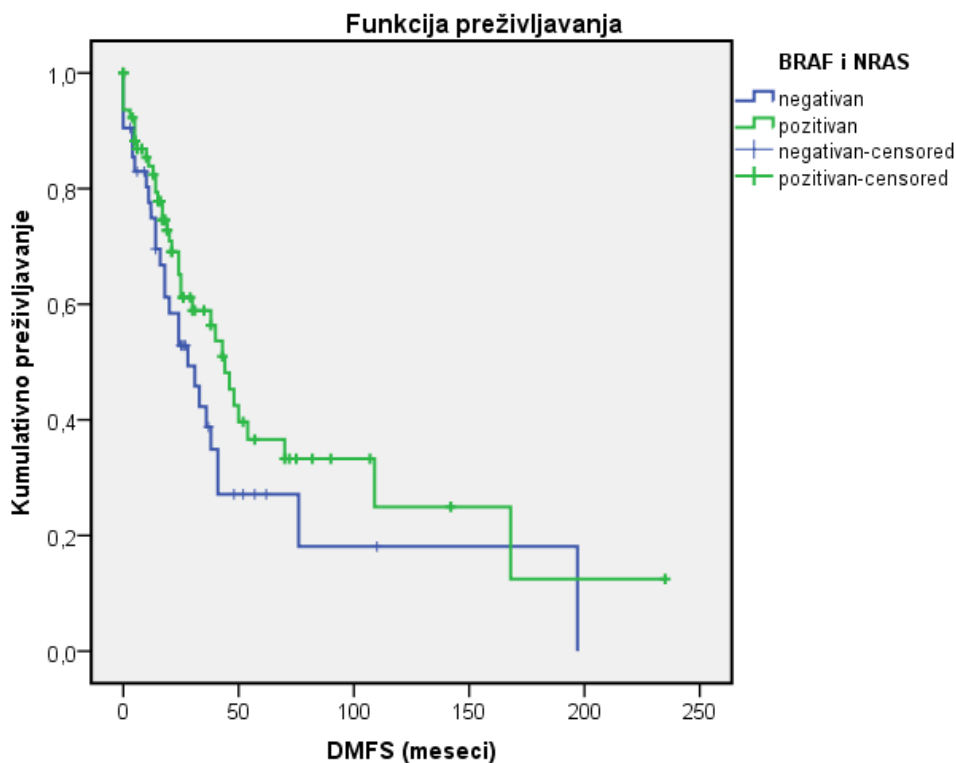
Медијана DFS свих испитаника износи 38,0 месеци (95% CI 25,3-50,7).



Графикон 15. Време од дијагнозе до првих удаљених метастаза

Медијана DFS код BRAF позитивних испитаника износи 43,0 месеци (95% CI 34,1-51,9), док је код BRAF негативних испитаника 26,0 месеци (95% CI 12,3-39,7). Не постоји статистички значајна разлика у DFS у односу на BRAF статус, али је евидентан тренд (Hi-kvadrat=3,016; $p=0,082$).

Медијана DMFS свих испитаника износи 38,0 месеци (95% CI 28,5-47,5).

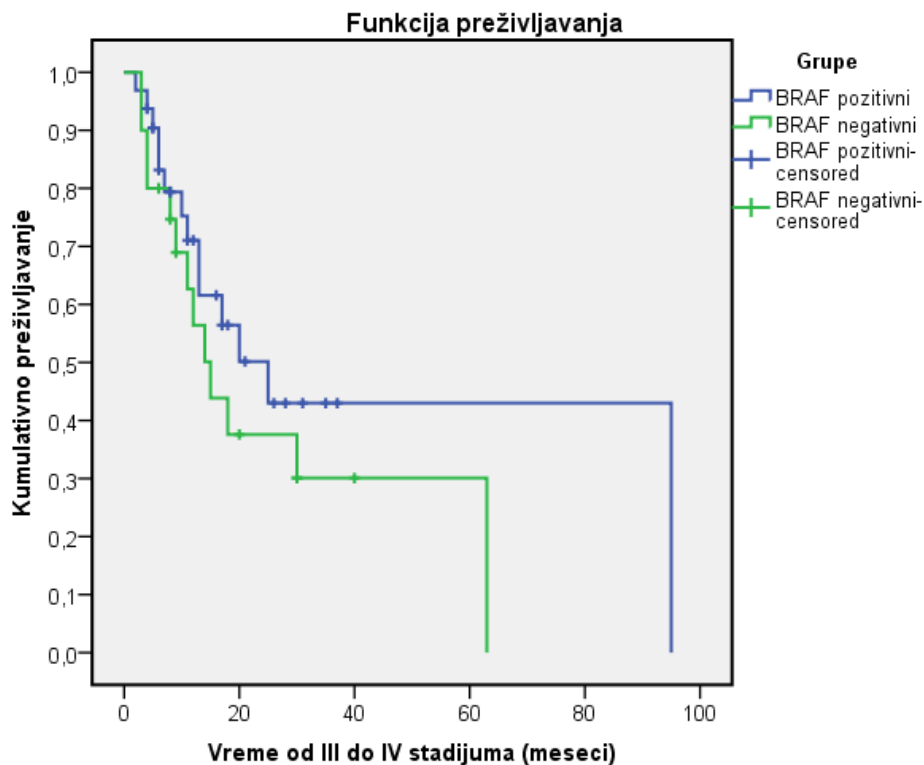


Графикон 16. Време од дијагнозе до прогресије у IV стадијум болести
(енгл. *distant metastasis-free survival-DMFS*)

Медијана DMFS код BRAF позитивних испитаника износи 44,0 месеци (95% CI 31,9-56,1), док је код BRAF негативних испитаника 31,0 (95% CI 19,6-42,4). Не постоји статистички значајна разлика у DMFS у односу на BRAF статус (Hi-kvadrat=2,306; $p=0,129$).

5.5.2. Време од III до IV стадијума

Медијана времена до прогресије у III или IV стадијум износи 18,0 месеци (95% CI 7,0-29,0).

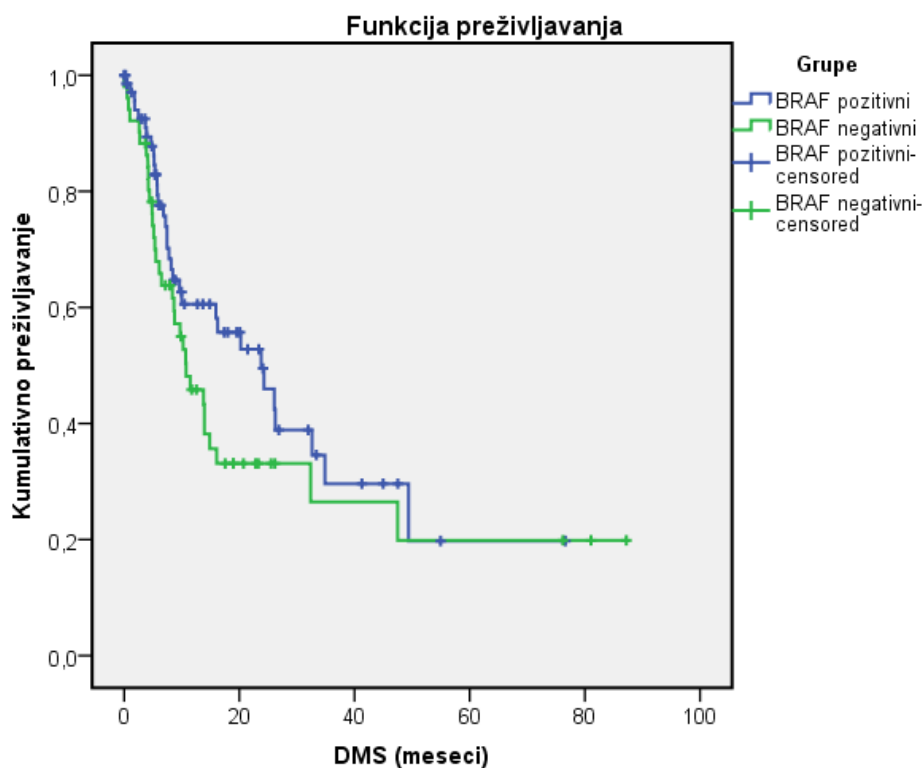


Графикон 17. Време од III стадијума до прогресије у IV стадијум болести

Медијана времена од III до IV стадијума код BRAF позитивних испитаника износи 25,0 месеци (95% CI 11,6-38,3), док је код BRAF негативних испитаника 15,0 (95% CI 9,3-20,6). Не постоји статистички значајна разлика у времену од III до IV стадијума у односу на BRAF статус (Hi-kvadrat=1,156; p=0,282).

5.5.3. Време од IV стадијума до последњег контакта са пацијентом

Медијана DMS свих испитаника износи 14,7 месеци (95% CI 7,2-22,5).

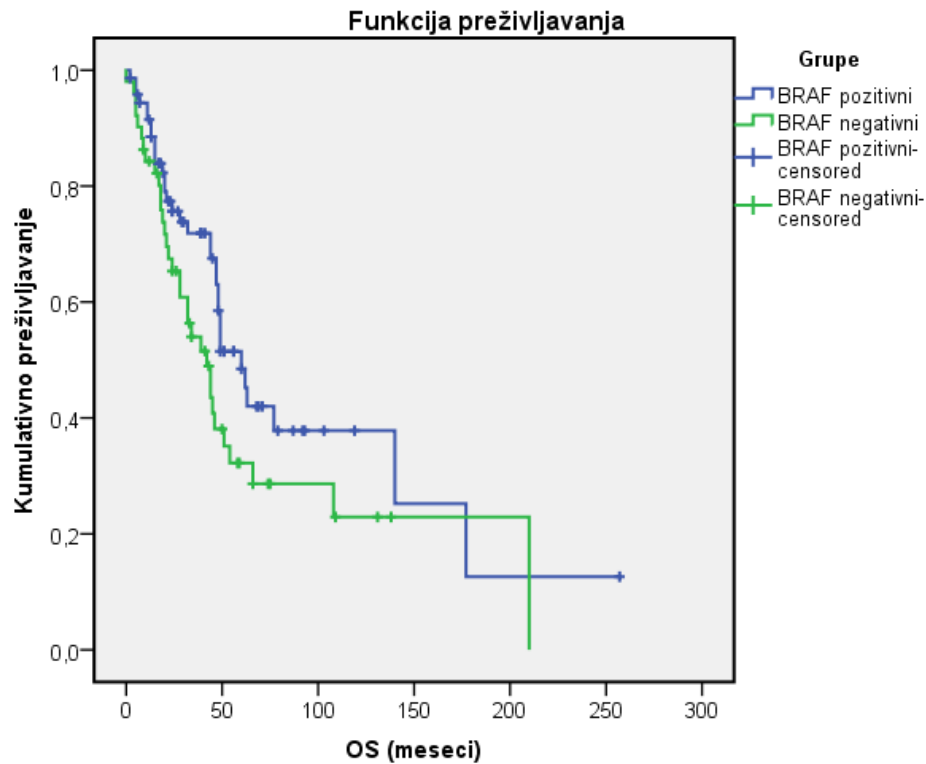


Графикон 18. Време од IV стадијума до последњег контакта са пацијентом (енгл. *distant metastases survival DMS*)

Медијана DMS код BRAF позитивних испитаника износи 23,8 месеци (95% CI 13,1-34,4), док је код BRAF негативних испитаника 10,7 (95% CI 5,8-15,7). Не постоји статистички значајна разлика у DMFS у односу на BRAF статус (Hi-kvadrat=2,141; p=0,143).

5.5.4. Укупно преживљавање испитаника

Медијана укупног преживљавања свих испитаника износи 48,0 месеци (95% CI 42,7-53,3).



Графикон 19. Укупно преживљавање (енгл. *overall survival-OS*)

Медијана укупног преживљавања код BRAF позитивних испитаника износи 60,0 месеци (95% CI 47,0-72,9), док је код BRAF негативних испитаника 42,0 (95% CI 28,7-55,6). Не постоји статистички значајна разлика у DMFS у односу на BRAF статус (Hi-kvadrat=3,281; $p=0,070$).

5.5.5. Једногодишње и двогодишње преживљавање пацијената са метастатским меланомом

Табела 51. Дистрибуција испитаника на основу једногодишњег и двогодишњег преживљавања

ПРЕЖИВЉАВАЊЕ	BRAF позитивни		BRAF негативни		p-вредност
	n	%	n	%	
Једногодишње	63	87,5	42	82,4	0,426
Двогодишње	45	62,5	32	62,7	0,978

Једногодишње преживљавање имало је 87,5% BRAF позитивних испитаника и 82,4% BRAF негативних, што није статистички значајна разлика (Hi-kvadrat=0,633; p=0,426).

Двогодишње преживљавање имало је 62,5% BRAF позитивних испитаника и 62,7% BRAF негативних, што није статистички значајна разлика (Hi-kvadrat=0,001; p=0,978).

5.6. Демографске и клиничкопатолошке карактеристике NRAS испитаника

Мутације у NRAS гену рађене су код пацијената код којих није детектована BRAF мутација, имајући у виду да су оне искључујуће. Од укупно 51 BRAF негативног испитаника, 8 (15,7%) испитаника је NRAS позитивно и 43 (84,3%) NRAS негативних испитаника.

Табела 52. Дистрибуција испитаника према испитиваној групи

Мутација у NRAS гену	n	%
NRAS позитивни	8	15,7
NRAS негативни	43	84,3
Укупно	51	100,0

Полна и старосна структура испитаника. Просечна старост NRAS испитаника укључених у истраживање износи $59,8 \pm 15,1$ година. Најмлађи испитаник има 22,0 а најстарији 86,0 година.

Табела 53. Старост NRAS испитаника у истраживању

СТАРОСТ (године)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
NRAS негативни	43	59,7	15,0	63,0	22,0	83,0
NRAS позитивни	8	60,2	16,9	55,0	42,0	86,0
Укупно	51	59,8	15,1	62,0	22,0	86,0

Просечна старост NRAS позитивних испитаника износи $60,2 \pm 16,9$ година, док је просечна старост NRAS негативних испитаника $59,7 \pm 15,0$ година. Не постоји статистички значајна разлика у просечној старости између испитиваних група ($t=0,098$; $p=0,922$).

Табела 54. Дистрибуција NRAS испитаника према полу

ПОЛ	NRAS позитивни		NRAS негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Мушки	5	62,5	30	69,8	35	68,6
Женски	3	37,5	13	30,2	16	31,4
Укупно	8	100,0	43	100,0	51	100,0

Од укупног броја испитаника, у групи NRAS позитивних испитаника, мушког пола је било 5 (62,5%) испитаника а женског пола 3 (37,5%). Код NRAS негативних 30 (69,8%) чине особе мушког пола и 13 (30,2%) женског. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=0,694$).

5.6.1. Фактори ризика код оболелих од метастатског меланом са NRAS

мутацијом

Фототип коже. Према Фицпатриковој скали међу испитаницима најчешћи је фототип коже III код 19 (43,2%) испитаника, од којих је 16 (42,1%) NRAS негативних и 3 (50,0%) NRAS позитивних испитаника. Фототип коже II забележен је

код 13 (29,5%) испитаника, односно код 11 (28,9%) NRAS негативних и 2 (33,3%) NRAS позитивних пацијената. Од 11 (25,0%) пацијената са фототипом коже IV, 10 (26,3%) је NRAS негативних и 1 (16,7%) NRAS позитивних. У групи NRAS негативних испитаника један (2,6%) је имао фототип коже V. Ниједан испитаник није имао фототип коже I. Статистички није показана значајна разлика између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=1,000$).

Табела 55. Дистрибуција испитаника према фототипу коже код NRAS испитаника

ФОТОТИП КОЖЕ	NRAS негативни		NRAS позитивни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Фототип II	11	28,9	2	33,3	13	29,5
Фототип III	16	42,1	3	50,0	19	43,2
Фототип IV	10	26,3	1	16,7	11	25,0
Фототип V	1	2,6	0	0,0	1	2,3
Укупно	38	100,0	6	100,0	44	100,0

Боја очију. Највећи број NRAS испитаника је имао браон боју очију, тј. 21 (45,5%) од који 19 (50,0%) NRAS негативних и 2 (28,6%) NRAS позитивних испитаника. Од 13 (28,9%) испитаника плаву боју очију је имало 10 (26,3%) NRAS негативних и 3 (42,9%) NRAS позитивних испитаника. Зелена боја очију је присутна код 11 (24,4%) испитаника, односно код 9 (23,7%) NRAS негативних и 2 (28,6%) NRAS позитивних пацијената. Није показана статистички значајна разлика у боји очију код испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=0,575$).

Табела 56. Дистрибуција испитаника према боји очију

БОЈА ОЧИЈУ	NRAS негативни		NRAS позитивни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Плава	10	26,3	3	42,9	13	28,9
Зелена	9	23,7	2	28,6	11	24,4
Браон/Црна	19	50,0	2	28,6	21	46,7
Укупно	38	100,0	7	100,0	45	100,0

Излагање УВ зрачењу и активност напољу. Интермитентно излагање УВ зрацима имало је 40 (90,9%) испитаника, од којих је 33 (89,2%) NRAS негативних испитаника и 7 (100,0%) NRAS позитивних, док је континуираном дејству УВ зрачења изложено 4 (10,8%) NRAS негативних и ниједан позитиван испитаник. Није показана статистички значајна разлика између испитиваних група и излагање УВ зрацима (Тест тачне вероватноће; $p=1,000$)

Табела 57. Дистрибуција испитаника према излагању УВ зрацима

ИЗЛАГАЊЕ УВ ЗРАЦИМА	NRAS негативни		NRAS позитивни		Укупно	
	п	%	п	%	п	%
Интермитентно	33	89,2	7	100,0	40	90,9
Континуирано	4	10,8	0	0,0	4	9,1
Укупно	37	100,0	7	100,0	44	100,0

Није показана статистички значајна разлика између испитиваних група и активности у спољашњој средини (Тест тачне вероватноће; $p=0.393$), као ни на основу година излагања (тест тачне вероватноће; $p=1,000$).

5.6.2. Клиничко-патолошке карактеристике примарног тумора и NRAS мутација

Локализација примарног тумора. Труп је најчешће место јављања меланома код NRAS испитаника у обе групе. У групи 8 NRAS позитивних испитаника, меланом је на трupu забележен код 5 (62,5%), на глави и врату код 2 (25%) и код 1 (12,5%) испитаника на екстремитетима. Ниједан NRAS позитиван испитаник није имао меланом на акралним деловима. Од 43 NRAS негативних испитаника труп је такоше најчешће место настанка меланома код 14 (32,6%), на глави и врату је уочен код 13 (30,2%) и екстремитетима у 23,3% односно код 10 NRAS негативних испитаника. Акрални меланом је присутан искључиво код NRAS негативних испитаника у 6 (14,0%) случајева. Није уочена статистичка значајност између испитиваних група и локализације примарног тумора (тест тачне вероватноће; $p=0,512$)

Анализирајући NRAS мутациони статус и локализацију примарног тумора према полу, код жена труп је најчешће место јављања примарног тумора у групи NRAS позитивних испитаника у 3 (100%), док су екстремитети најчешће место код NRAS негативних испитаника женског пола у 16 (34,8%). Иако постоји тренд, није уочена статистичка значајност између испитиваних варијабли (тест тачне вероватноће; $p=0,069$)

Табела 58. Дистрибуција NRAS испитаника према локализацији примарног тумора

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	NRAS негативни		NRAS позитивни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	13	30,2	2	25,0	15	29,4
екстремитети	10	23,3	1	12,5	11	21,6
Труп	14	32,6	5	62,5	19	37,3
Акрални	6	14,0	0	0,0	6	11,8
Укупно	43	100,0	8	100,0	51	100,0

Табела 59. Локализација примарног тумора код жена и NRAS статус

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	NRAS позитивни		NRAS негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	0	0,0	9	19,6	9	18,4
екстремитети	0	0,0	16	34,8	16	32,7
Труп	3	100,0	12	26,1	15	30,6
Акрални	0	0,0	9	19,6	9	18,4
Укупно	3	100,0	46	100,0	49	100,0

Код особа мушког пола, у групи NRAS позитивних испитаника примарни тумор је локализован у истом процентну на трупу и у пределу главе и врата у 40% респективно, док је код NRAS негативних испитаника најчешће локализован на трупу код 29 (42,0%) испитаника, а затим на глави и врату у 21 (30,4%). Није уочена статистичка значајност између испитиваних варијабли (тест тачне вероватноће; $p=1,000$).

Табела 60. Локализација примарног тумора код мушкараца и NRAS статус

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	NRAS позитивни		NRAS негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
глава и врат	2	40,0	21	30,4	23	31,1
екстремитети	1	20,0	16	23,2	17	23,0
Труп	2	40,0	29	42,0	31	41,9
Акрални	0	0,0	3	4,3	3	4,1
Укупно	5	100,0	69	100,0	74	100,0

Хистолошки тип примарног тумора. Од свих испитаника код којих је детектована мутација у NRAS тумору, укључених у истраживање најчешћи хистолошки тип меланом био је нодуларни меланом који је у испитиваној групи заступљен са 50,0%.

Табела 61. Дистрибуција NRAS испитаника према хистолошком типу примарног тумора

ХИСТОЛОШКИ ТИП	NRAS негативни		NRAS позитивни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Површно ширећи меланом	11	25,6	1	12,5	12	23,5
Нодуларни меланом	20	46,5	5	62,5	25	49,0
Лентиго малигна меланома	1	2,3	0	0,0	1	2,0
Акрални лентигозни меланом	1	2,3	0	0,0	1	2,0
Амеланотични	0	0,0	1	12,5	1	2,0
Дезмопластични	4	9,3	0	0,0	4	7,8
Непознати тип	6	14,0	1	12,5	7	13,7
Укупно	8	100,0	43	100,0	51	100,0

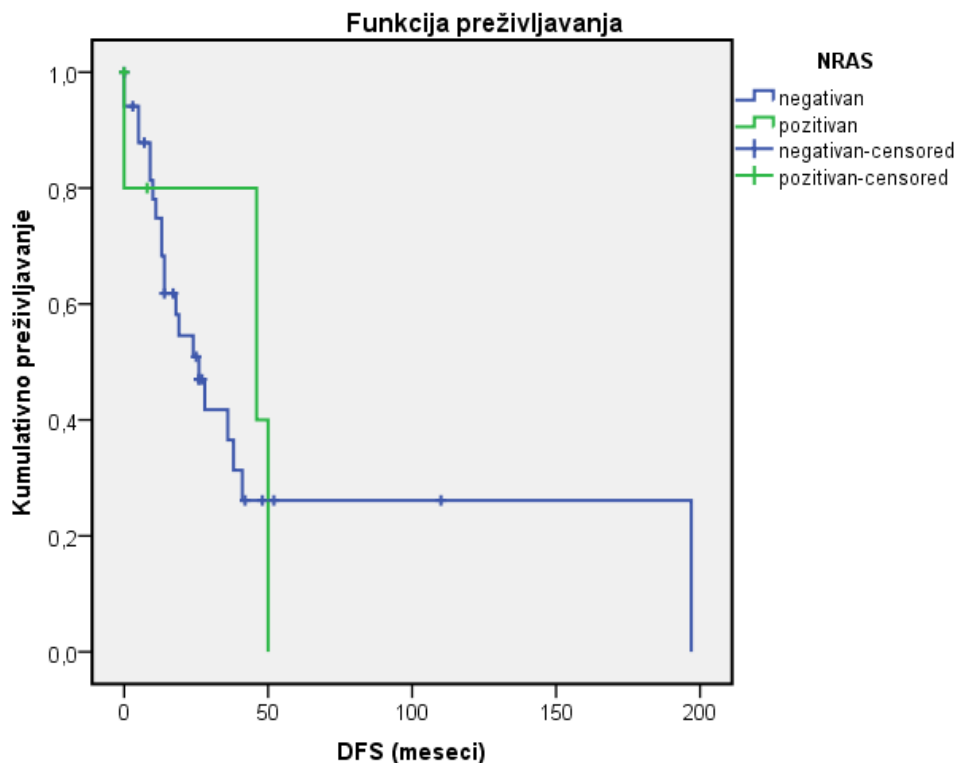
Нодуларни меланом је најчешћи хистолошки тип у групи NRAS негативних болесника и чини 20 (46.5%), док је код NRAS позитивних испитаника заступљен код 5 (62.5%). Површноширећи тип меланома од укупно 12 (23.5%), код NRAS

негативних испитаника је чинио 11 (25.6%) за разлику од 1 (12.5%) NRAS позитивних испитаника. Лентиго малигна меланома и акрални лентигинозни меланом је забележен код по 1 (2.3%) NRAS негативног испитаника и није нађен у групи NRAS позитивних. Дезмопластични меланом је присутан искључиво у групи NRAS негативних пацијената код 4 (9.3%), док је амеланотични меланом био код 1 (12.5%) NRAS позитивног пацијента. Није уочена статистички значајна разлика хистолошког типа у односу на испитиване групе (тест тачне вероватноће; $p=0.505$)

Дебљина тумора по Бреслоу, присуство улцерације, митоза, код NRAS испитаника. Медијана вредности дебљине примарног тумора по Бреслоу NRAS испитаника у истраживању износи 5,0 (опсег, 2,0-25,0). Медијана вредности дебљине тумора по Бреслоу NRAS позитивних испитаника износи 5,0 (опсег, 2,0-19,5), док је код NRAS негативних испитаника 5,0 (опсег, 2,2-25,0). Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана дебљине тумора по Бреслоу између испитиваних група ($U=104,0$; $p=0,413$).

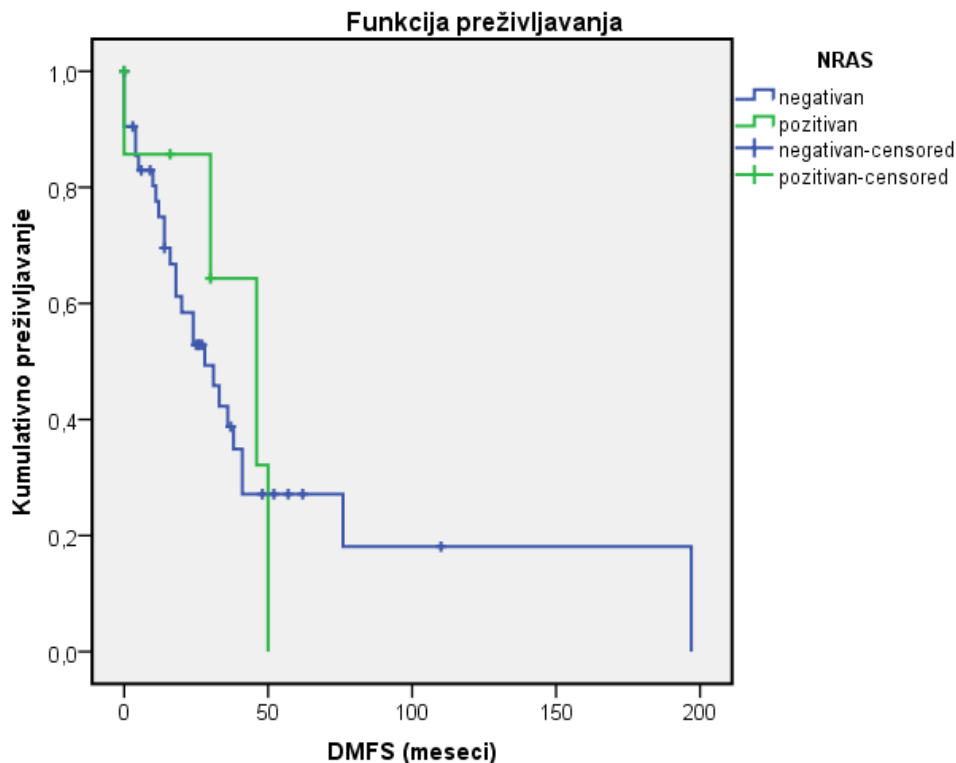
Улцерацију примарног тумора имао је 31 (79,5%) испитаник, код NRAS позитивних испитаника забележена код 4 (80,0%) и 27 (79,4%) NRAS негативних испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости улцерација између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=1,000$). Медијана вредности броја митоза свих испитаника у истраживању износи 5,0 (опсег, 0,0-15,0). Медијана вредности броја митоза NRAS негативних испитаника износи 6,5 (опсег, 0,0-15,0), док је код NRAS позитивних испитаника 2,0 (опсег, 1,0-5,0). Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана броја митоза између испитиваних група ($U=15,0$; $p=0,310$)

5.6.3. Анализа тока болести и NRAS мутациони статус



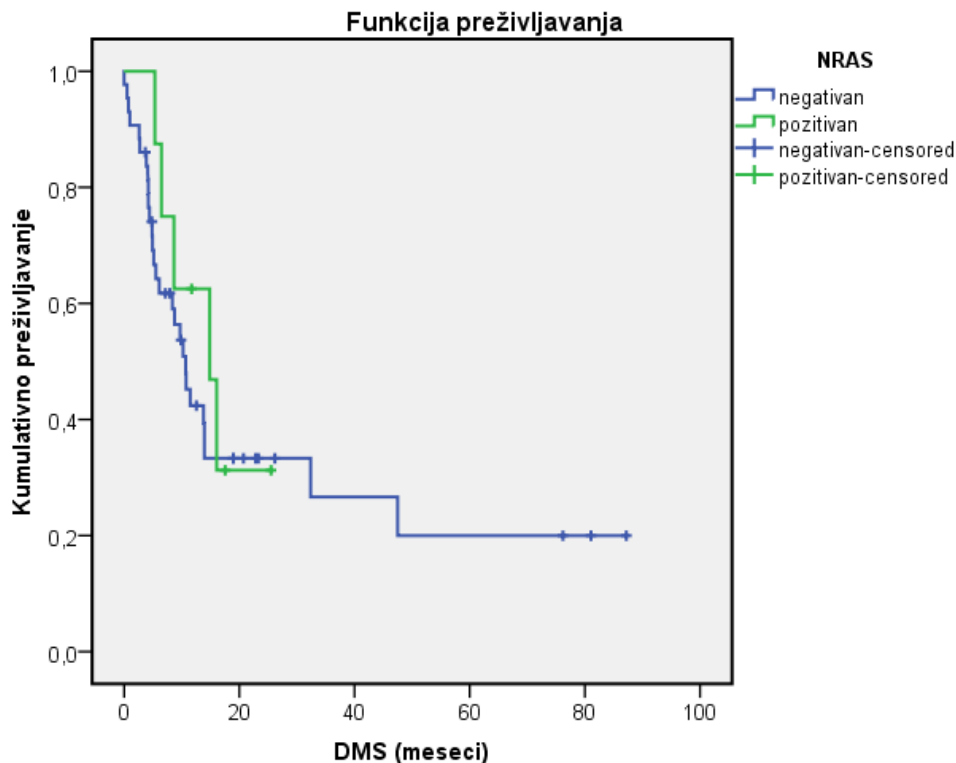
Графикон 20. DFS код NRAS испитаника

Медијана DFS код NRAS позитивних испитаника износи 46,0 месеци (95% CI 0,0-112,9), док је код NRAS негативних испитаника 26,0 (95% CI 14,9-37,1). Не постоји статистички значајна разлика у DFS у односу на NRAS статус (Hi-kvadrat=0,003; P=0,953).



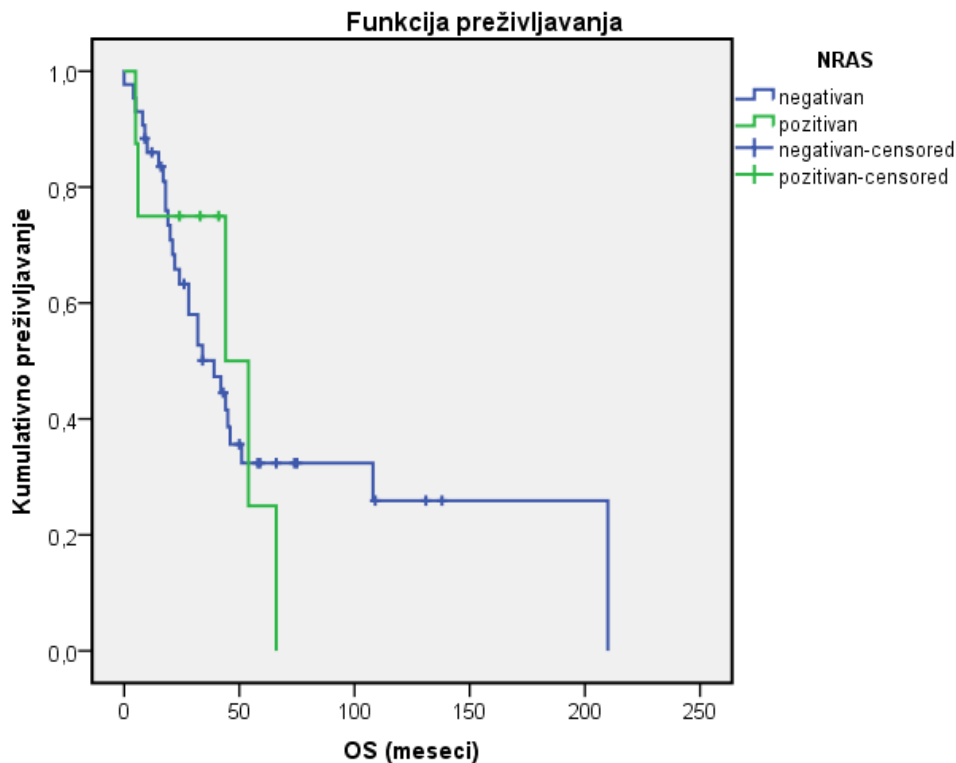
Графикон 21. DMFS код NRAS испитаника

Медијана DMFS код NRAS позитивних испитаника износи 46,0 месеци (95% CI 21,6-70,4), док је код NRAS негативних испитаника 28,0 (95% CI 14,8-41,2). Не постоји статистички значајна разлика у DFS у односу на NRAS статус (Hi-kvadrat=0,062; p=0,804).



Графикон 22. DMS код NRAS испитаника

Медијана DMS код NRAS позитивних испитаника износи 14,9 месеци (95% CI 6,2-23,5), док је код NRAS негативних испитаника 10,7 (95% CI 7,6-13,7). Не постоји статистички значајна разлика у DMS у односу на NRAS статус (Hi-kvadrat=0,350; $p=0,554$).



Графикон 23. OS код NRAS испитаника

Медијана OS код NRAS позитивних испитаника износи 44,0 месеци (95% CI 1,0-86,9), док је код NRAS негативних испитаника 39,0 (95% CI 22,7-55,3). Не постоји статистички значајна разлика у OS у односу на NRAS статус (Hi-kvadrat=0,001; p=0,973)

5.7. Демографске и клиничко-патолошке карактеристике

BRAF/NRAS позитивних и BRAF/NRAS негативних испитаника

У овом делу истраживања све испитанике смо поделили према испитиваној групи на BRAF и NRAS негативне наспрам било које позитивности у BRAF или NRAS гену. Од укупног броја пацијента, 43 (35,0%) испитаника припада групи BRAF/NRAS негативних и 80 (65,0%) BRAF/NRAS позитивних испитаника.

Табела 62. Дистрибуција испитаника према испитиваној групи

Мутација у BRAF и NRAS гену	n	%
BRAF/NRAS негативни	43	35,0
BRAF/NRAS позитивни	80	65,0
Укупно	123	100,0

Према старосној структури просечна старост BRAF/NRAS негативних испитаника износи $60,0 \pm 15,0$ година, док је просечна старост BRAF/NRAS позитивних испитаника $51,0 \pm 14,6$ година. Постоји статистички значајна разлика у просечној старости између испитиваних група ($t=3,071$; $p=0,003$), сто указује да су BRAF/NRAS негативни испитаници значајно старији.

Табела 63. Старост испитаника у истраживању

Старост (године)	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF и NRAS негативни	43	60,0	15,0	63,0	22,0	83,0
BRAF / NRAS позитивни	79	51,0	14,6	50,0	15,0	86,0
Укупно	122	54,1	15,3	55,0	15,0	86,0

Према полу особе мушког пола чине 74 (60,2%), а 49 (39,8%) су особе женског пола. У групи BRAF/NRAS негативних пацијената 30 (69,8%) је мушког пола, а у групи BRAF/NRAS позитивних је 44 (55,0%). Особе женског пола у групи BRAF/NRAS негативних чине 13 (30,2%), док је у групи BRAF/NRAS позитивних било 36 (45,0%). Није доказана статистички значајна разлика према полу код испитиваних група (Hi-kvadrat тест; $p=0,111$)

Табела 64. Дистрибуција испитаника према полу

ПОЛ	BRAF/NRAS негативни		BRAF/NRAS позитивни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
	Мушки	30	69,8	44	55,0	74
Женски	13	30,2	36	45,0	49	39,8
Укупно	43	100,0	80	100,0	123	100,0

Табела 65. Дистрибуција испитаника према локализацији меланома

ЛОКАЛИЗАЦИЈА	BRAF/NRAS негативни		BRAF/NRAS позитивни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
	глава и врат	13	30,2	19	23,8	32
екстремитети	10	23,3	23	28,8	33	26,8
Труп	14	32,6	32	40,0	46	37,4
Акрални	6	14,0	6	7,5	12	9,8
Укупно	43	100,0	80	100,0	123	100,0

Најчешћа локализација меланома код BRAF/NRAS негативних наспрам позитивних испитаника била је на трупу (32,6% према 40,0%, респективно), а затим у пределу главе и врата код BRAF /NRAS негативних у односу на било коју BRAF и NRAS позитивност био је заступљен са 30,2 % према 23,8%, респективно. Најређа локализација меланома је у пределу акралних делова у обе групе испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости локализације меланома између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=0,500$).

Медијана вредности дебљине примарног тумора по Бреслоу свих испитаника у истраживању износи 4,5 (опсег, 0,1-35,2).

Табела 66. Дебљина тумора по Бреслоу испитаника у истраживању

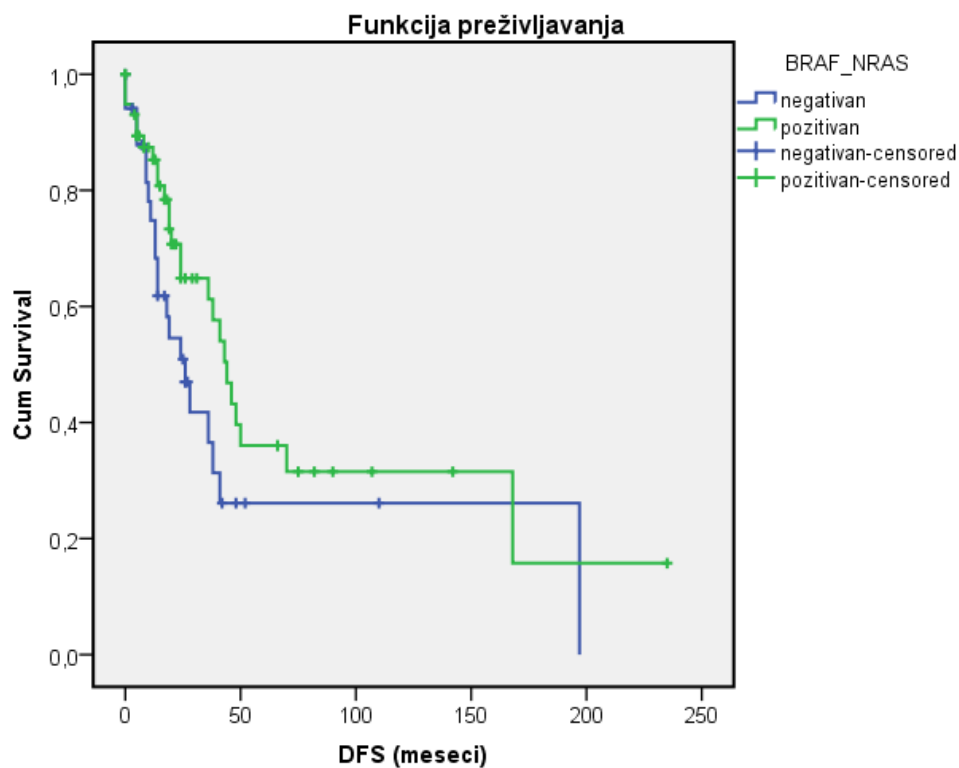
Дебљина тумора по Бреслоу	n	\bar{x}	SD	med	min	max
BRAF/NRAS негативни	37	7,0	5,0	5,0	2,2	25,0
BRAF/NRAS позитивни	74	6,0	5,8	4,0	0,1	35,2
Укупно	111	6,4	5,8	4,5	0,1	35,2

Медијана вредности дебљине тумора по Бреслоу BRAF/NRAS негативних испитаника износи 5,0 (опсег, 2,2-25,0), док је код BRAF/NRAS позитивних испитаника 4,0 (опсег, 0,1-35,2). Постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана дебљине тумора по Бреслоу између испитиваних група ($U=1027,5$; $p=0,033$).

Улцерацију примарног тумора је имало 27 (79,4%) BRAF/NRAS негативних испитаника и 42 (71,2%) BRAF/NRAS позитивних испитаника. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости улцерација између испитиваних група ($\chi^2=0,762$; $p=0,383$). Медијана вредности броја митоза свих испитаника у истраживању износи 5,0 (опсег, 0,0-28,0).

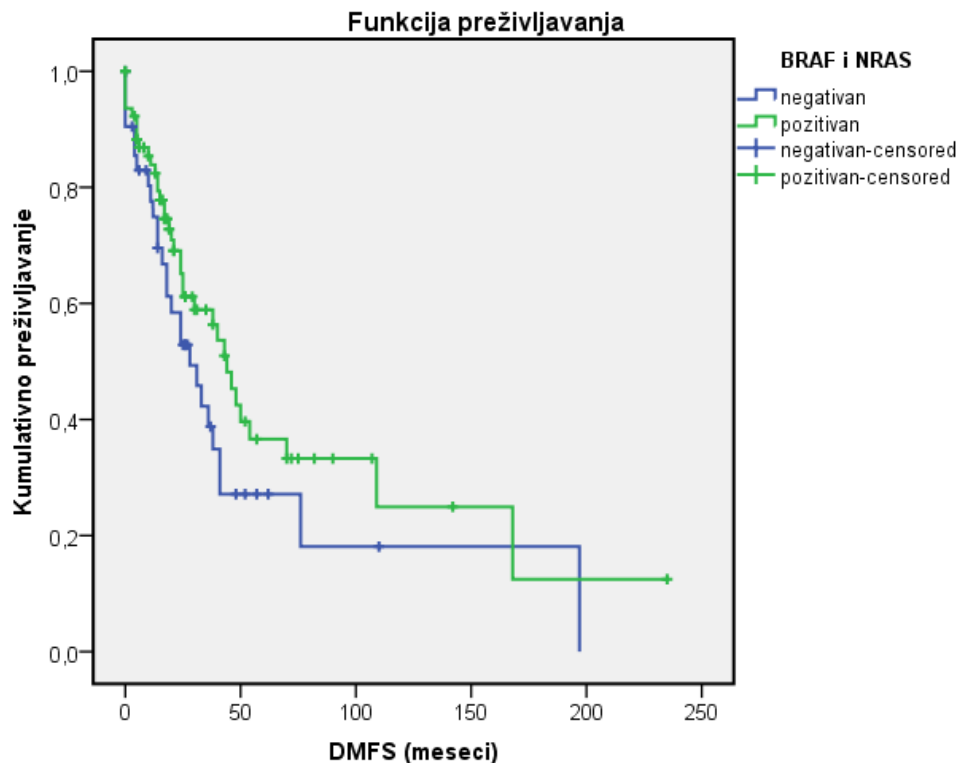
Медијана вредности броја митоза BRAF/NRAS негативних испитаника износи 6,5 (опсег, 0,0-15,0), док је код BRAF/NRAS позитивних испитаника 5,0 (опсег, 0,0-28,0). Не постоји статистички значајна разлика у вредностима медијана броја митоза између испитиваних група ($U=271,0$; $p=0,734$). У групи BRAF/NRAS негативних испитаника медијана вредности патолошких лимфних чворова износи 2,0 (опсег, 1,0-7,0), док је код BRAF/NRAS позитивних испитаника 2,50 (опсег, 0-22,0). Не постоји статистичка значајност између испитиваних група ($U=227,5$; $p=0,697$).

5.7.1. Анализа преживљавања BRAF/NRAS испитаника



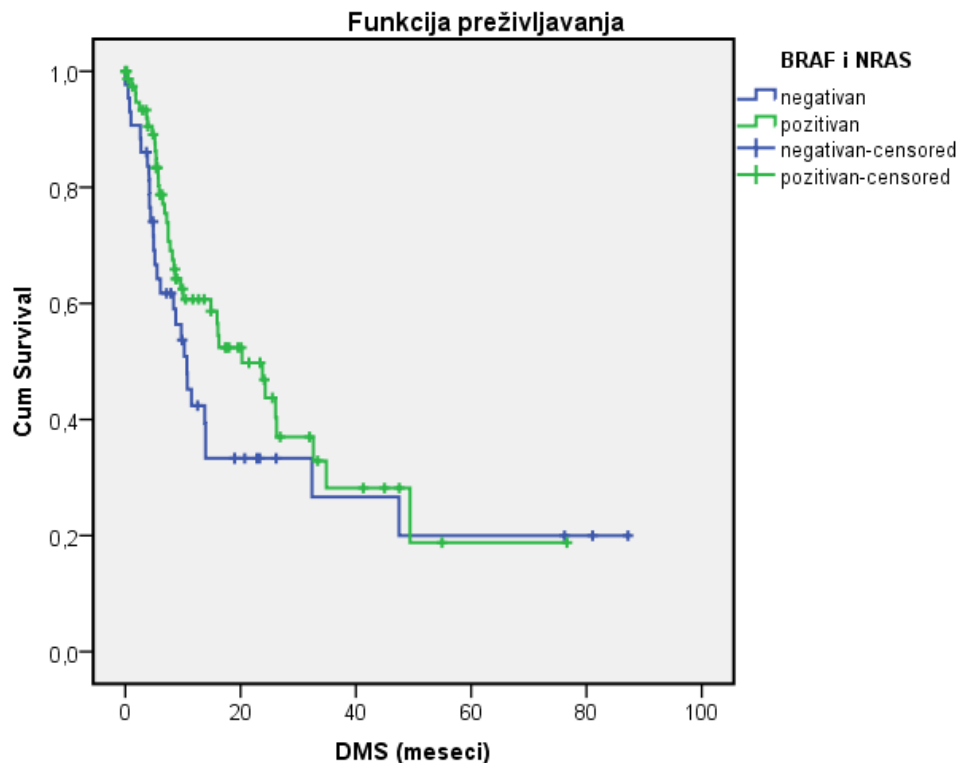
Графикон 24. DFS код BRAF/NRAS испитаника

Медијана DFS код BRAF/NRAS позитивних испитаника износи 44,0 месеци (95% CI 34,6-53,4), док је код BRAF/NRAS негативних испитаника 26,0 (95% CI 14,9-37,0). Не постоји статистички значајна разлика у DFS у односу на BRAF/NRAS статус (Hi-kvadrat=2,530; $p=0,112$).



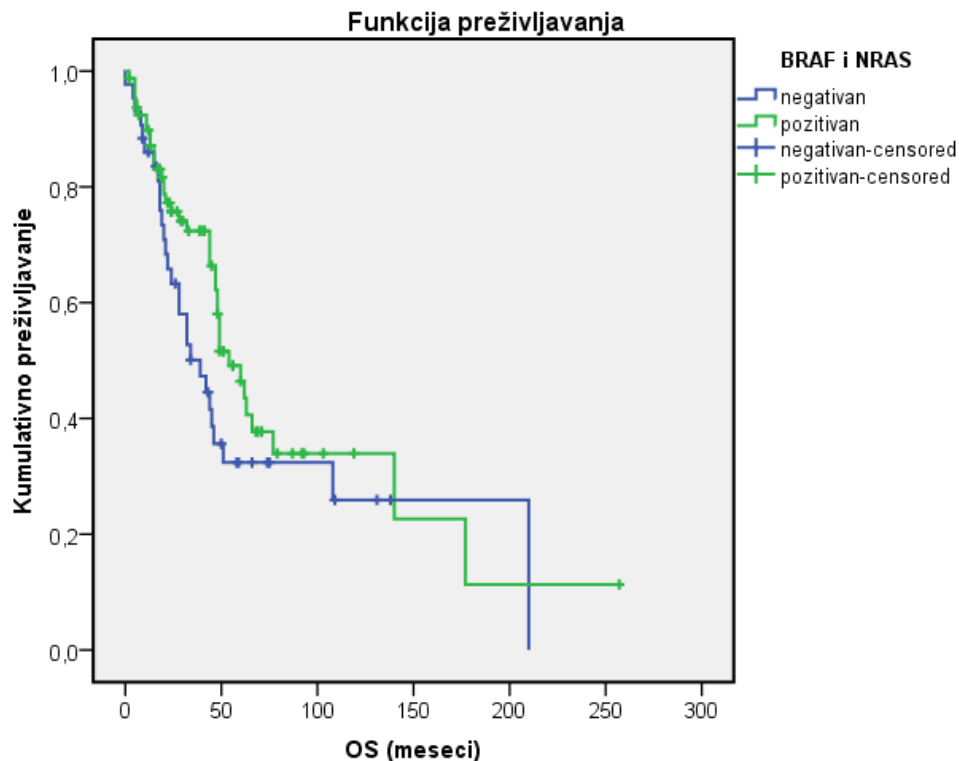
Графикон 25. DMFS код BRAF/NRAS испитаника

Медијана DMFS код BRAF/ NRAS позитивних испитаника износи 44,0 месеци (95% CI 33,8-54,1), док је код BRAF/NRAS негативних испитаника 28,0 (95% CI 14,8-41,1). Не постоји статистички значајна разлика у DMFS у односу на BRAF/NRAS статус (Hi-kvadrat=2,107; $p=0,147$).



Графикон 26. OS код BRAF/NRAS испитаника

Медијана DMS код BRAF/NRAS позитивних испитаника износи 20,2 месеци (95% CI 11,7-28,8), док је код BRAF/NRAS негативних испитаника 10,6 (95% CI 7,6-13,7). Не постоји статистички значајна разлика у DMS у односу на BRAF/NRAS статус (Hi-kvadrat=2,184; p=0,139).



Графикон 27. OS код BRAF/ NRAS испитаника

Медијана укупног преживљавања (OS) код BRAF/ NRAS позитивних испитаника износи 54,0 месеци (95% CI 41,1-66,9), док је код BRAF/ NRAS негативних испитаника 39,0 (95% CI 22,7-55,3). Не постоји статистички значајна разлика у OS у односу на BRAF/ NRAS статус (Hi-kvadrat=2,362; $p=0,124$).

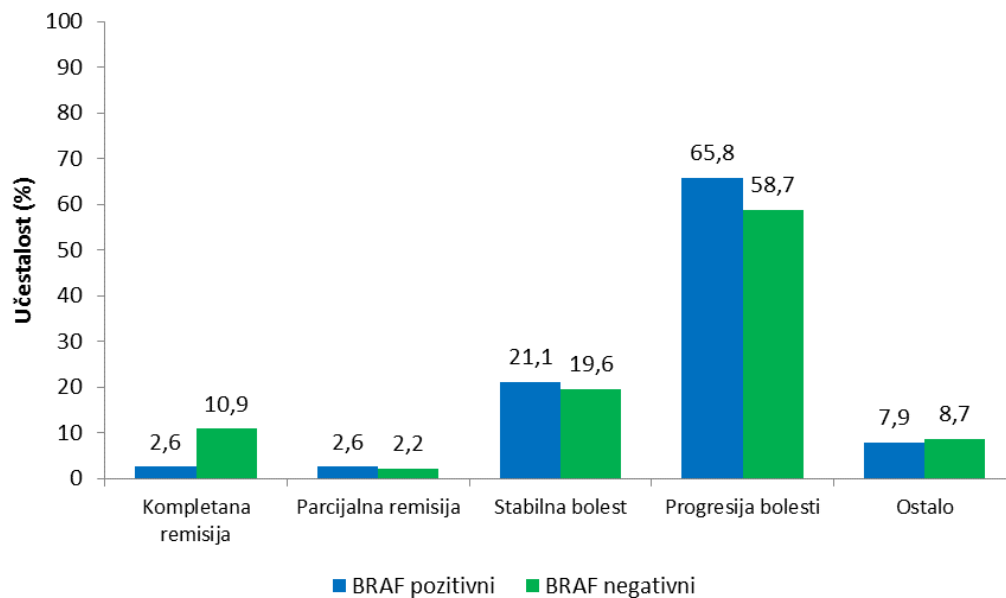
5.8. Терапијски ефекат хемотерапије и иновативне терапије

Терапијска ефикасност хемотерапије. Од укупно 123 испитаника у овом истраживању, 84 је примило прву линију хемотерапије са најчешће примењиваним леком DTIC уз постизање комплетне ремисије код 6 (7.1%) испитаника, стабилне болести код укупно 17 (20.2%) пацијената и забележеном прогресијом болести 52 (61.9%) пацијената. Трајање одговора код пацијената са комплетном ремисијом износи 10.83 ± 3.5 месеци (од 6-16 месеци).

Табела 67. Ефекат терапије након прве линије хемотерапије и BRAF статус

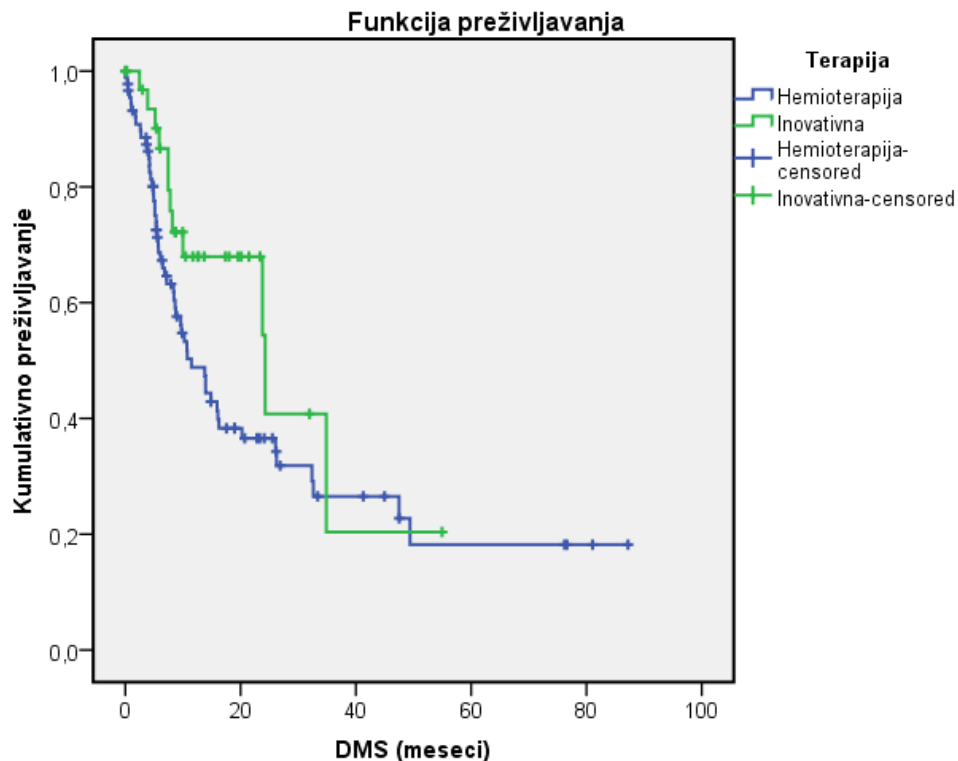
ЕФЕКАТ ПРВЕ ЛИНИЈЕ ХЕМОТЕРАПИЈЕ	BRAF позитивни		BRAF негативни		Укупно	
	n	%	n	%	n	%
Комплетна ремисија	1	2,6	5	10,9	6	7,1
Парцијална ремисија	1	2,6	1	2,2	2	2,4
Стабилна болест	8	21,1	9	19,6	17	20,2
Прогресија болести	25	65,8	27	58,7	52	61,9
Непознат	3	7,9	4	8,7	7	8,3
Укупно	38	100	46	100	84	100

Не постоји статистички значајна разлика у учесталости ефекта хемотерапије између испитиваних група (Тест тачне вероватноће; $p=0,740$).



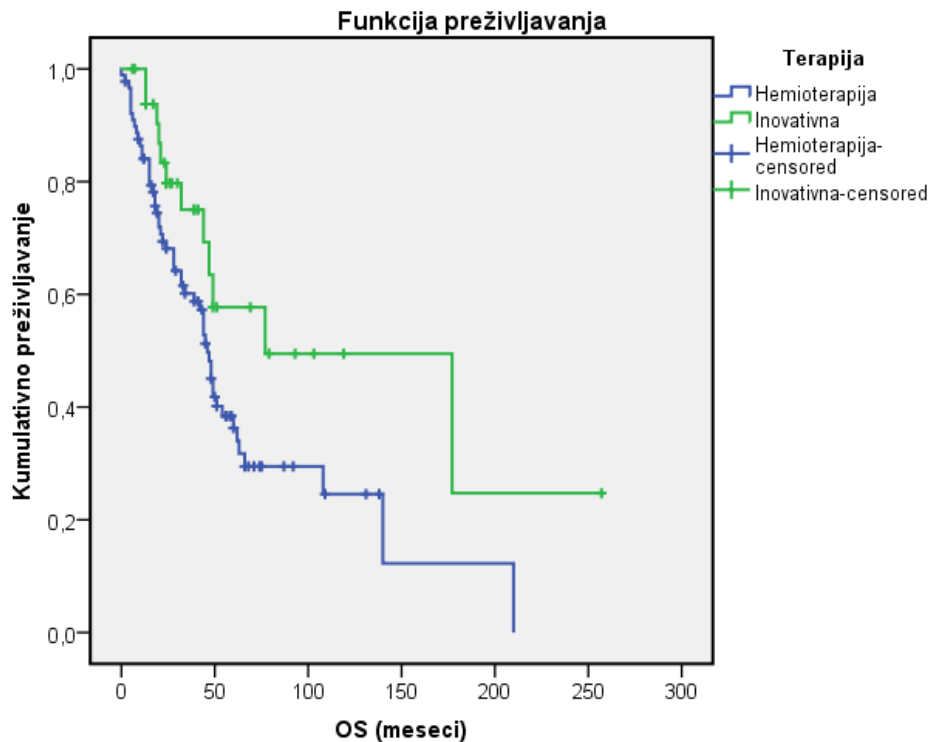
Графикон 28. Дистрибуција испитаника према ефекту прве линије хемотерапије

Анализа преживљавања пацијената на хемотерапији и иновативним лековима. Медијана DMS код испитаника са хемотерапијом износи 11,5 месеци (95% CI 7,3-15,6), док је код испитаника са иновативном терапијом 24,3 (95% CI 8,0-40,6). Не постоји статистички значајна разлика у DMS у односу на врсту примењене терапије (Hi-kvadrat=3,188; p=0,074).



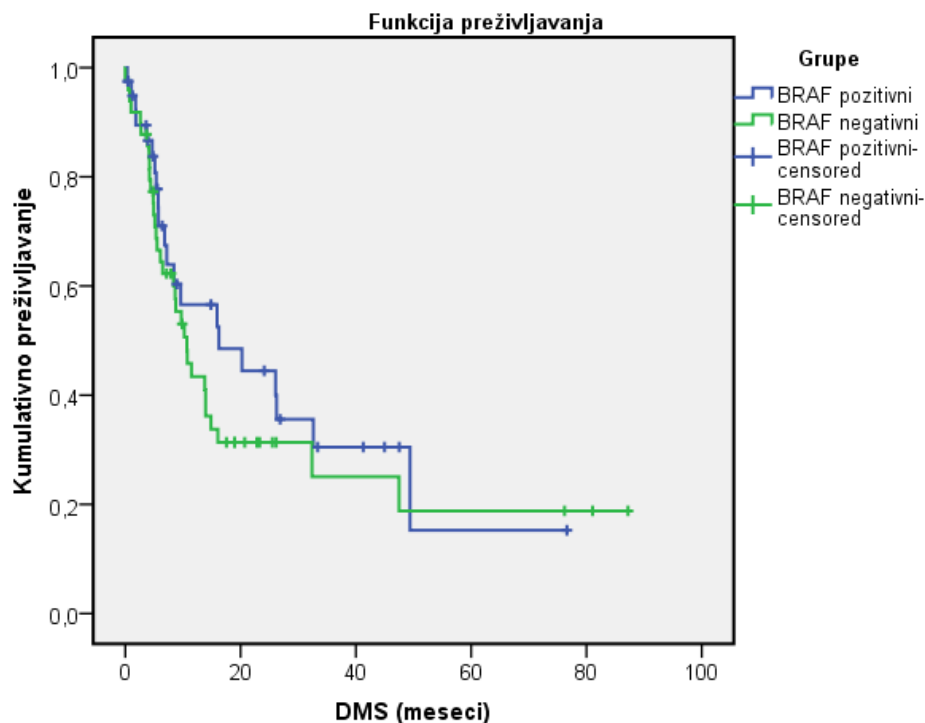
Графикон 29. DMS пацијената на хемиотерапији и иновативној терапији

Медијана DMS код испитаника са хемиотерапијом износи 11,5 месеци (95% CI 7,3-15,6), док је код испитаника са иновативном терапијом 24,3 (95% CI 8,0-40,6). Не постоји статистички значајна разлика у DMS у односу на врсту примењене терапије (Ни-kvadrat=3,188; p=0,074).



Графикон 30. OS пацијената на хемиотерапији и иновативној терапији

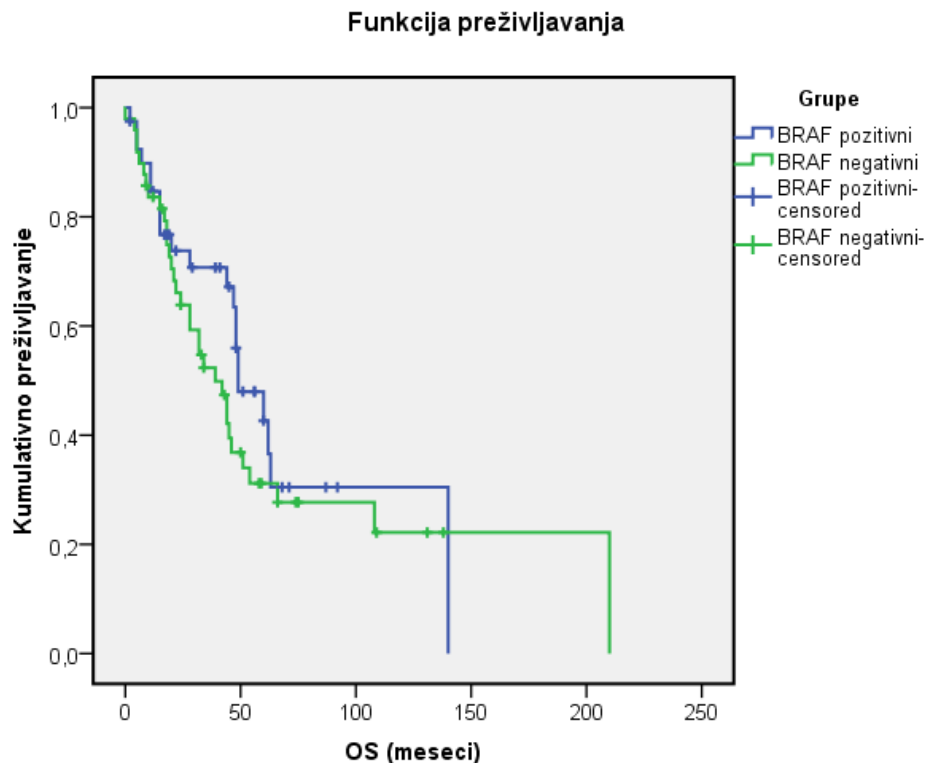
Медијана укупног преживљавања код испитаника са хемиотерапијом износи 46,0 месеци (95% CI 40,9-51,1), док је код испитаника са иновативном терапијом 77,0 (95% CI 46,7-168,6). Постоји статистички значајна разлика у укупном преживљавању у односу на врсту примењене терапије (Hi-kvadrat=4,618; p=0,032). Испитаници са иновативном терапијом имају значајно дужи период укупног преживљавања.



Графикон 31. DMS пацијената на хемиотерапији и BRAF статус

Медијана DMS свих испитаника са хемиотерапијом износи 11,5 месеци (95% CI 7,3-15,6).

Медијана DMS испитаника са хемиотерапијом код BRAF позитивних износи 16,2 месеца (95% CI 0,2-32,3), док је код BRAF негативних 1,7 месеци (95% CI 7,4-14,0). Не постоји статистички значајна разлика у DMS у односу на BRAF статус код испитаника на хемотерапији (Hi-kvadrat=0,841; p=0,359).



Графикон 32. OS пацијената на хемиотерапији и BRAF статус

Медијана OS свих испитаника са хемиотерапијом износи 46,0 месеци (95% CI 40,9-51,1).

Медијана укупног преживљавања испитаника са хемиотерапијом код BRAF позитивних износи 49,0 месеца (95% CI 32,7-65,2), док је код BRAF негативних 39,0 месеци (95% CI 25,4-52,6). Не постоји статистички значајна разлика у укупном преживљавању у односу на BRAF статус код испитаника на хемотерапији (Hi-kvadrat=0,976; p=0,323).

6. ДИСКУСИЈА

Меланом је агресивни облик рака коже који настаје из меланоцита и који је одговоран за највећи број смртних случајева узрокованих раком коже. Досадашњи епидемиолошки подаци показују да је инциденца у сталном порасту у последње две деценије. Процењује се да је у Сједињеним Америчким Државама 2003. године регистровано 54.200 новодијагностикованих случајева меланома са 7600 смртних случајева [20], док је у 2016. години откривено више од 76.000 нових меланома и преко 10.000 смртних случајева је узроковано овом болешћу [248].

Уколико се открије у раној фази болести, петогодишње преживљавање оболелих је преко 90%, у стадијуму постојања регионалних метастаза је 60%, а код иницијално удаљених метастаза мање од 20% [130].

Епидемиолошки подаци у Србији у 2009.години указују да инциденца меланома износи 9.3 код мушкараца и 7.7 код жена, док је светска стандардизована инциденца (WCI) 5.5 код мушкараца и 4.5 код жена на 100.000 становника. Годишње се у просеку региструје 500 новодијагностикованих случајева оболелих од меланома [249]. Анализа клиничко-патолошких карактеристика пацијената са меланомом у Србији указује да су особе старости преко 50 година, које имају високоризичан меланом, чија дебљина тумора по Бреслоу код 50% је преко 4 mm, док је код 39.6% дебљина мања од 1 mm. Најчешћи клиничко-патолошки тип је површноширећи (50–66%) и нодуларни меланом (23,5–50%). Код 12,5% болесника иницијална дијагноза је постављена у стадијуму III, а код 4,5% у стадијуму IV болести када је евидентирано метастатско ширење болести у удаљене органе. Претходно наведени подаци о клиничко-патолошким карактеристикама у Србији указују на касну дијагнозу и потребу за ефикаснијим мерама примарне и секундарне превенције [247].

Главни фактори ризика за појаву меланома су периодично и интензивно излагање сунцу, светао тен и боја косе, опекотине од сунца у дечијем узрасту, велики број младежа, као и лична и породична анамнеза о претходном примарном меланому. Несумњиво је да су када говоримо о меланому важне и соматске мутације у BRAF, NRAS и C-KIT гену које су повезане са одређеним клиничко-патолошким

карактеристикама примарног тумора. Анализирајући BRAF и NRAS мутациони статус примарних меланома показано је да ове мутације имају различите клиничке и патолошке карактеристике, биолошко понашање, самим тим прогнозу и исход болести. BRAF мутација се јавља код млађих особа, који су интермитентно изложени сунчевим зрацима, односно немају знаке хроничног оштећења на кожи, најчешћи хистолошки тип је нодуларни и површинско ширећи меланом који је локализован на телу [83] [250].

Насупрот томе, NRAS пацијенти су старије животне доби са знацима хроничног оштећења од сунчевих зрака, а нодуларни меланом је најчешћи хистолошки субтип који је првенствено локализован на екстремитетима.

Молекуларна дијагностика у смислу откривања мутација у туморском ткиву за пацијенте са метастаском болешћу је обигаторна, јер квалификује кандидате за примену иновативних видова терапије у смислу ординирања имуноterapiје или таргет терапије.

6.1. Детекција мутација у BRAF, NRAS и C-KIT гену код пацијената са метастатским меланомом

Последњих година се у дијагностици метастатског меланома, користи молекуларна анализа одређивања мутација у BRAF, NRAS и C-KIT протеину које кодирају ови гени јер се може наћи у преко 50% меланома коже, али у истом проценту и код бенигних и атипичних меланоцитних невуса [251,252].

Она данас представља стандардну процедуру која се користи за дијагностику и одлуку о лечењу, имајући у виду да су у случају детекције одређене мутације пацијенти кандидати за примену таргет терапије која би инхибирала мутацију, док су код пацијената са мутацијама које нису таргетабилне може применити само имуноterapiја. Имајући у виду мутациону хетерогеност тумора, детекцију мутације треба урадити у унапредовалом стадијуму меланома (III и IV стадијуму), односно у ткиву метастазе, а не у примарном тумору. NRAS мутације се откривају у 15 до 20% пацијената са унапредовалом болешћу, док се истовремено присуство ове две мутације јако ретко налази у ткиву тумора. Детекција C-KIT мутација је значајна за акрални лентигинозни меланом и меланом слузница и налази се код 5% пацијената [69,144].

У нашем истраживању је укључено 123 пацијента са кутаним меланомом у IV стадијуму болести. Молекуларна анализа је подразумевала детекцију мутације у BRAF гену, егзон 15 на позицији V600E. Тестирани узорци су показали да је 58,5% испитаника BRAF позитивних и 41,5% BRAF негативних тј., испитанике код којих није детектовано присуство мутације. Код пацијената који су BRAF негативни, учињено је NRAS тестирање и у случају активне мутације даље истраживање није спроведено. Мутација на кодону 61 NRAS гена детектована је код 15,7% испитаника и није нађена код 84,3% испитаника. Наши подаци су у сагласности са подацима из литературе. Алтерације C-KIT гена у егзону 9, 11, 13 и 17 нису испитиване јер је у нашем истраживању регистровано 2 пацијента са акралним лентигозним меланомом и поменути број је био недовољан за даљу молекуларну и статистичку обраду.

6.2. Демографске и клиничке карактеристике пацијената на основу BRAF мутационог статуса

Овим истраживањем обухваћена су 123 пацијента са метастатским меланомом који су од 2009-2016. године лечени у Војномедицинској академији. Од свих испитаника укључених у истраживање, мушког пола било је 74 (60,2%), а женског 49 (39,8%), старости од 15 до 86 година. Просечна старост свих испитаника укључених у истраживање износи $54,1 \pm 15,3$ година. Већина радова указује да је инциденца меланома већа код мушкараца у односу на жене, међутим тај однос се разликује и у земљама са високомincidенцом меланома као што су Аустралија и Сједињене Америчке Државе где се меланом нешто јавља код мушкараца [253–256], док у земљама са нижом incidенцом као што је Велика Британија постоји преминација женског пола [257], док је у Немачкој тај однос изједначен [258].

У нашем истраживању од укупног броја пацијената са метастатским меланомом, код 58,5% испитаника детектована је мутација у BRAF гену, док код 41,5% BRAF мутација није детектована. Добијени подаци су у складу са постојећом литературом [154,237,239,244].

Код 72 BRAF позитивна испитаника мушког пола било је 39 (54,2%), а женског 33 (45,8%), док је 35 (68,6%) испитаника мушког пола и 16 испитаника (31,4%) женског пола било у групи BRAF негативних испитаника. Просечна старост BRAF

позитивних испитаника на дијагнози примарног тумора износи $50,0 \pm 14,1$ година, док је просечна старост BRAF негативних испитаника $59,8 \pm 15,1$ година, што указује да су BRAF негативни испитаници значајно старији ($p < 0,001$). Такође је показано да су BRAF позитивни испитаници на дијагнози удаљених метастаза статистички сигнификантно млађи у односу на BRAF негативне испитанике ($p < 0,001$). Добијени подаци су компатибилни са другим подацима из литературе. У студији Лонг и сар. која је обухватала 197 пацијената, код BRAF позитивних пацијената мушког пола било је 69 (73%) и женског 26 (27%) док су у групи BRAF негативних пацијената мушког пола било 69 (68%) и женског 33 (32%). У истој студији пацијенти са BRAF мутираним меланомима су млађи од BRAF негативних пацијената на дијагнози примарног меланома (медијана старости, 51.9 и 60.6 година, респективно) и на дијагнози удаљених метастаза (медијана старости, 55.8 и 63.1 година, респективно) [162]. Слични подаци, објављени су у студији Карлино и сар. код 193 пацијената и говоре у прилог томе да су пацијенти са BRAF мутацијом такође значајно млађи у односу на немутираних метастаске меланоме са медијаном старости 56 наспрам 63 године [259].

Епидемиолошке студије су идентификовале одређене фенотипске факторе који су несумњиво удружени са повећаним ризиком у настанку меланома. Постоје подаци који указују на корелацију између степена пигментације и ризика развоја меланома. У мета-анализи фактора ризика Гандини и сар. истичу да особе са фототипом коже I и II имају значајно већи ризик у настанку меланома него особе са фототипом III и IV (RR = 2.99 и 95% CI: 1.75, 5.12), плаве и/или зелене боје очију у односу на тамне (RR = 1.62; 95% CI: 1.44; 1.81) и као особе са плавом или црвеном бојом косе. Подаци из литературе указују да је најзаступљенији фототип коже код BRAF позитивних пацијената I и II, док су фототипови III и IV чешћи код BRAF негативних пацијената [260].

У нашем истраживању најчешћи је фототип коже III код 54,1%, фототип коже II забележен је код 27,9% док је 17,1% је имало фототип коже IV. Ниједан испитаник није имао фототип коже I и VI. У односу на мутациони статус и фототип коже, најчешћи у обе групе испитаника је III и II, с тим што је код BRAF негативних пацијената заступљенији фототип IV. Међутим, није доказана значајност између фототипа коже и BRAF мутационог статуса ($p=0.098$). Ово указује на разлике

заступљености различитих фототипова која је везана за географско подручје Југоисточне Европе.

У студији Шлак (Schlaak) и сар. анализирајући фототип коже по Фицпатрику и BRAF мутациони код пацијената са метастатским меланомом показано је да 16 % пацијента са BRAF мутацијом има фототип III и IV у односу на 29% BRAF негативних пацијената, док је I и II фототип забележен са 46% код BRAF позитивних на супрот 39.2% BRAF негативних пацијената [261].

У односу на боју очију, нашом анализом је показано да је највећи број испитаника 45,5% имао браон боју очију, али није доказана корелација између боје очију и BRAF мутационог статуса ($p=0,807$). Анализирајући фенотипске карактеристике пацијената са меланомом и здраве контроле у Медитеранској популацији, показано је да је светлија боја очију заступљенија у популацију у односу на тамну са 2.4 (95% CI=1.1-5.2) и 1.8 (95% CI=1.0-3.0) [262]. Међутим, према нашим сазнањима нема студија које су анализирале фенотипске карактеристике и BRAF мутациони статус у Југоисточној Европи.

Улога УВ зрачења као једног од водећих фактора у настанку карцинома коже, не само меланома већ и SCC (*Squamous Cell Carcinoma*) и BCC (*Basal Cell Carcinoma*) је добро документована. Док је ризик од SCC и BCC повезан са континуираним, хроничним излагањем сунцу [42,263], ризик од настанка меланома је снажно повезан са интермитентном, интензивном, а краткотрајном експозицијом сунчевим зрацима [34].

Постоје докази да је меланом на глави и врату повезан са континуираном експозицијом сунчевим зрацима док је меланом на трупцу и екстремитетима чешће повезан са интермитентним излагањем [35,51,264–266].

Повезаност BRAF мутација у односу на степен излагања УВ зрачењу који је потврђен хистолошким прегледом ткива и налазом соларне еластозе, истраживан је у 14 студија. BRAF мутација је нађена код 177 од 620 (28.5%) особа, који су имали знаке хроничног оштећења од сунчевих зрака и код 750 од 1444 (51.9%) случајева са интермитентним, периодичним оштећењима, што указује да је BRAF мутација значајно повезана са интермитентним, али интензивним оштећењима (OR = 2.833 [95% CI, 1.947-4.122]; $p= 0.001$). Поређењем BRAF мутационог статуса између особа беле расе и особа азијског порекла видимо да је BRAF мутација чешће детектована

код особа беле расе (655/1195; 54.8%) у поређењу са пацијентима азијског порекла (95/249; 38.2%) који немају знаке хроничног оштећења од сунца и да је BRAF мутација сигнификантно повезана са интермитентним излагањем оштећењем у обе групе (OR = 2.968 [95% CI, 2.384-3.695]; $p=0.001$ и OR = 3.253 [95% CI, 1.415-7.478]; $P = .005$.) [267].

Према Куртину (Curtin) и сар. ово се може објаснити чињеницом да је кожа која је изложена интермитентном, али интензивнијем соларном оштећењу осетљивија на УВ зрачење, што доводи до веће вероватноће да настане BRAF мутација. У прилог овоме говоре и подаци да је BRAF мутација претежно повезана са меланомима на трупу, за које се зна да су места на кожи која су интермитентно изложена зрачењу [235].

У нашем истраживању, подаци указују да се највећи број BRAF позитивних пацијената интермитентно излагао сунчевим зрацима 64,3% у односу на континуирано излагање које је заступљеније у групи BRAF негативних пацијената 71,4%, чиме је доказана статистичка значајна разлика ($p=0,011$). Ови резултати су у сагласности са постојећим подацима у литератури. У погледу клиничких карактеристика примарног тумора, код BRAF позитивних пацијената труп је најчешћа локализација меланома која је интермитентно изложена сунчевим зрацима, на супрот BRAF негативних који се чешће налазе на екстремитетима или глави и врату, места која су хронично изложена дејству сунчевих зрака [162,261,268].

У току првих 18 година живота кожа прими 80% укупне количине сунчевих зрака, те је став Светске здравствене организације да треба обратити посебну пажњу у циљу избегавања прекомерног излагања УВ зрачењу у току детињства и спречити појаву опекотина за које се зна да представљају фактор ризика за настанак меланома. Опекотине у току раног детињства, али и у каснијем периоду живота представљају фактор ризика за настанак меланома. Већина аутора сматра да је податак о опекотинама у личној анамнези веома важан индикатор интермитентног, али интензивног излагања сунчевим зрацима [38,40,269].

У нашем истраживању опекотине од сунца до 18. године живота имало је 42,9% испитаника, од којих је BRAF позитивних било 43,6% и 40,9% BRAF негативних испитаника, док је након периода адолесценције и у одраслом добу имало 49,4% BRAF позитивних или негативних испитаника (47,3% према 54,2%

респективно). Овим параметрима није доказана статистички значајна разлика код наших испитаника ($p=0.827$ и $p=0.573$).

Такође смо анализирали употребу соларијума, који је један од значајнијих фактора ризика. У нашој студији соларијум је користило свега 4,5% пацијента и то у групи BRAF позитивних који свакако припадају особама млађе животне доби које иначе чешће користе соларијум, али није доказана статистичка значајност због малог узорка ($p=0,272$). Недавне студије указују да употреба соларијума повећава ризик од развоја меланома и да особе које користе соларијум пре 35.године имају за 59% већи ризик од оних који га не користе [270]. Истраживања у САД показују да 30 милиона становника годишње користи соларијум и да су 70% жене старосне доби од 16 до 49 године [271–273]. Међутим, најугроженија група су свакако адолесценти и младе одрасле жене између 20. и 35. године живота које и најчешће користе соларијуме, што је резултирало повећањем инциденце меланома код млађих особа [274,275]. На основу базе америчких конзумената соларијума 2.3 милиона су тинејџери, што је повећало употребу соларијума од 1% у 1988. години на 27% у 2007. години, што указује на то да је употреба соларијума вероватно одговорна за све већи број млађих пацијената оболелих од меланома.

Дуготрајно излагање сунцу доводи до појаве соларног лентига као последица кумулативних доза УВ зрачења и чешће се јавља код старијих особа који имају знаке хроничног оштећења од сунца, а то су претежно BRAF негативни пацијенти. Има података да соларни лентиги у ствари представља маркер интермитентног, интензивног излагања сунцу с обзиром да настаје као резултат претходних опекотина. Повезаност соларног лентига и настанка опекотина пре 15 године живота, указује на сензитивност коже и реакцију коже на акутно, интермитентно излагање сунцу, посебно у детињству, представља фактор ризика за настанак меланома [276].

Према добијеним подацима у нашој студији нисмо доказали значајну разлику између мутационог статуса и појаве соларног лентига ($p=0.545$).

Прикупљеним подацима из породичне анамнезе о породичној појави меланома као једног од фактора ризика у нашем истраживању је забележена код 3,6% испитаника, подједнако у обе испитиване групе. Није нађена статистички значајна разлика из разлога непотпуних података испитаника о овој варијабли ($p=1.000$).

Према подацима из литературе, 10% пацијената са меланомом има фамилијарну генезу меланома. Лонг (Long) и сар. су у студији метастатског меланома евидентирали 9% BRAF позитивних и 10% NRAS позитивних пацијената са фамилијарним меланомом. [162].

Зебару (Zebary) и сар. су анализирајући повезаност CDKN2A са BRAF и NRAS мутационим статусом приказали да су BRAF и NRAS мутације нађене код 43% и 11% фамилијарних кутаних меланома без статистички значајне разлике у односу на то да ли постоји или није детектабилна мутација у CDKN2A гену [162,277,278].

BRAF мутациони статус у бројним студијама корелиран је са бројем невуса. У студији Шлака (Сцхлаак) и сар. код 141 пацијента показана је статистичка значајност у групи BRAF позитивних пацијената који су имали већи број невуса ($p=0.007$) и фототип коже I и II. Стечени невуси настају у прве две деценије живота и број невуса представља фактор ризика за настанак меланома.[261]. Слични подаци добијени су и у другим студијама које су показале да BRAF мутација позитивно корелира са већом експозицијом УВ зрачењу у ранијем периоду живота и бројем стечених невуса [238,279].

Наши резултати указују да у обе испитиване групе, 49.5% испитаника је имао до 25 невуса. Од 25 до 50 невуса је имало 39.4% BRAF позитивних, у односу на 28.9% BRAF негативних испитаника. Присуство више од 100 невуса забележено је искључиво код 6.7% BRAF негативних испитаника. Овим параметром нисмо доказали статистички значајну разлику у односу на BRAF мутациони статус и већи број невуса ($p=0.149$). Није било разлике у односу на BRAF мутациони статус и присуство и број диспластичних невуса ког наших испитаника ($p=0.987$)

Показано је да у нашој студији процентуално већи број BRAF позитивних пацијената има симптоме вулнерабилности ($p=0.025$) што се може објаснити тиме да су BRAF позитивни пацијенти су млађи, чешће се контролишу и раније јављају лекару у односу на BRAF негативне пацијенте. Анализирали смо и друге симптоме тумора у виду промене величине, облика, боје, крварења, влажења, свраба, бола, перутања или избочења где није добијена статистичка значајност између ове две групе пацијената.

У истраживању наших испитаника, поређењем BRAF мутационог статуса и локализације примарног тумора труп је такође најчешће место развоја меланома код

обе групе испитаника (37,5% према 37,3%), на екстремитетима меланом је чешће заступљен у групи BRAF позитивних (30,6%), а на глави и врату и акралним деловима је заступљенији у групи BRAF негативних испитаника (29,4% и 11,8%). Међутим није доказана статистички значајна разлика ($p=0.649$). Ови налази су логични уколико знамо да је труп место које се интермитентно излаже сунчевим зрацима, док су глава и врат и дистални екстремитети локализације које су континуирано изложене дејству сунчевих зрака са знацима хроничног оштећења и чешће се јављају код BRAF негативних пацијената [235,245].

Анализирајући податке локализације примарног тумора према полу нађена је статистички значајна разлика ($p=0,018$) између испитиваних група која указује да је меланом код особа мушког пола најчешће локализован на трupu у 31 (41,9%) док је у групи особа женског пола меланом чешћи на екстремитетима код 16 (32,7%). Ови подаци су у корелацији са подацима из литературе и могу се објаснити различитим навикама у облачењу између особа мушког и женског пола, посебно у току летњих месеци када је највећа инсолација и управо су ови делови тела најизложенији УВ зрачењу што још једном потврђује улогу УВ зрачења у настанку меланома [145].

Анализирани су и подаци локализације примарног тумора према полу у односу на BRAF мутациони статус и није нађена статистички значајна разлика између особа мушког ($p=0,981$) и женског пола и испитиваних варијабли ($p=0,125$).

Претходне студије указују да су BRAF мутације у меланому повезане са одређеним хистолошким подтипом који показује карактеристичне епидемиолошке, клиничке, хистолошке и молекуларне карактеристике. Најчешће је BRAF мутација удружена са површинско ширећим, потом нодуларним меланомом. Подаци из различитих студија су у сагласностима са добијеним резултатима у нашем истраживању [162,280–284].

Најчешћи хистолошки тип меланома код 123 наша пацијента је нодуларни меланом који се чешће јавља у групи BRAF негативних пацијената (49,0% према 41,7%, респективно), док јасну превагу учесталости има површинско ширећи тип меланома код BRAF позитивних пацијената (37,5% према 23,5%) у односу на BRAF негативне пацијенте. Дезмопластичан тип примарног тумора је нађен искључиво у групи BRAF негативних испитаника, код 4 испитаника (7,8%). Овим није достигнута статистичка значајност, али постоји тренд ($p=0,076$).

Показано је у бројним студијама да је дебљина тумора по Бреслоу најважнији прогностички показатељ преживљавања од меланома. Анализирајући наше пацијенте постоји значајна разлика медијане дебљине меланома по Бреслоу код BRAF негативних 5,0 (опсег, 2,0-25,0) у односу на BRAF позитивне пацијенте 4,0 (опсег, 0,1-35,2), и указује да BRAF негативни пацијенти имају значајно више вредности дебљине тумора ($p=0,041$). Лонг и сар. су дошли до закључка да BRAF мутациони статус није у корелацији са дебљином примарног тумора и улцерацијом [162]. У другој студији Шлака (Сцхлаак) и сар. медијана дебљине BRAF негативних пацијената износи 2.96 (0.63-11.0) а у групи BRAF позитивних 3.1 (0.64-12.0) ($p=0.38$) [261].

Ким и аутори су у мета-анализи BRAF мутација и клиничко-патолошких карактеристика примарног тумора анализирали податке 8 студија везаних за дебљину тумора и 14 студија за улцерацију и потврдили да ова варијабла није повезана са BRAF мутационим статусом [267].

Наши резултати су потврдили налазе претходних студија и показали да улцерација није повезана са BRAF мутационим статусом. Улцерацију примарног тумора је имало 70,4% BRAF позитивних испитаника и 79,5% BRAF негативних испитаника ($p=0,321$).

Митотски индекс се показао најзначајнијим прогностичким показатељем после дебљине меланома и уврштен у TNM класификацију меланома из 2009. године. Присуство митоза је чешће код BRAF мутираних меланома у студији Лонг и сарадника [162].

Истраживањем је показано да медијана вредности броја митоза наших BRAF позитивних и негативних испитаника износи 5,0 (опсег, 0-28,0 и 0-15,0) и да нема статистичке значајности између испитиваних група ($p=0,826$).

Статистичка значајност је показана у учесталости иницијалног стадијума на дијагнози у односу на BRAF мутациони статус ($p=0,022$). Најчешћи стадијум на дијагнози код обе групе испитаника био је II (52,3% према 68,1%, респективно). Трећи стадијум је заступљенији у групи BRAF позитивних испитаника (29,2% према 17%). Први стадијум је забележен искључиво код BRAF позитивних испитаника у 10,8%, док је четврти чешће регистрован у групи BRAF негативних 14,9%, разлог томе може бити то што су BRAF негативни пацијенти старије животне

доби, који се ређе контролишу и касно јављају лекару, као и чињеница да имају већу дебљину тумора по Бреслоу.

Пацијенти у нашем истраживању су на основу AJCC класификације из 2009. подељени у три категорије: M1a (захватање илијачних лимфних нодуса, метастазе у меким ткивима), M1b (метастазе у плућима) и M1c (метастазе у другим удаљеним органима). На основу овога највећи број наших испитаника 80,5% је имало M1c стадијум, метастатско ширење у удаљеним органима је забележено код 81,9% BRAF позитивних наспрам 78,4 BRAF негативних испитаника. Метастазе у илијачним лимфним нодусима и субкутане су забележене чешће код BRAF позитивних (8,3 према 3,9%), а плућне метастазе чешће имају BRAF негативни пацијенти (17,6 према 9,7%). Статистичка значајност није достигнута ($p=0,302$). Наши подаци су компатибилни са подацима из других студија који нису уочили везу између BRAF мутационог статуса са захватањем удаљених органа у тренутку прогресије у четврти стадијум болести [239,259].

У другој студији, аутори су анализирајући анатомску локализацију која карактерише M1c стадијум дошли до резултата о корелацији између мутационог статуса са чешћим процентом захватања централног нервног система у тренутку дијагнозе IV стадијума код BRAF и NRAS мутираних меланома у односу на немутиране [281].

Насупрот томе, у истој студији није показана удруженост са мутационим статусом и захватањем одређеног органа као што су јетра ($p=0.79$), лимфни нодуси ($p=0.83$) и кожа ($p=0.42$), али је уочена значајна удруженост са постојањем метастаза у плућима ($p=0.049$), са мањом стопом метастаза у плућима код BRAF и NRAS мутираних меланома у поређењу са немутираним меланомима у тренутку дијагнозе четвртог стадијума болести [281].

У нашем истраживању такође није показана статистичка значајност у односу на BRAF мутациони статус и захватање одређеног органа, као што су метастазе на костима ($p=0,852$), јетри ($p=0,107$), ЦНС-у ($p=0,437$) и плућима ($p=0,173$), с тим што је уочено да су метастазе на јетри чешће биле присутне код BRAF мутираних, а на плућима код BRAF негативних пацијената.

С обзиром да је меланом метаболички активан тумор који синтетише и у циркулацији ослобађа ензиме, цитокине и друге молекуле, предложени су маркери

који се користе у откривању прогресије болести, пре свега одређивање концентрације LDH и S100 протеина. LDH је ензим чија се активност повећава у серуму у случају постојања канцера, али и других болести и услед тога се не користи за скрининг и дијагнозу меланома. LDH је упоређиван са другим туморским маркерима, укључујући S100 И МИА (меланом-инхибиторна активност) и показано је да има најбољу предиктивну вредност за лош исход болести. Концентрација LDH је прогностички фактор у четвртом стадијуму болести, те је његова анализа неопходна. Ово је довело до тога да је у AJCC класификацији из 2009. и 2017. меланома вредност LDH је саставни део M1 стадијума са удаљеним метастазама који је заснован на активности LDH у серуму. Протеин S100 је калцијум-везујући протеин који је укључен у ћелијски циклус раста и диференцијације. Иницијално је препознат као маркер меланома, али је присутан и код шванома, неуробластома и глиома. Концентрација S100 у серуму је сензитивнија у односу на LDH у детекцији прогресије болести и одговора на терапију у IV стадијуму болести и треба бити обавезна дијагностичка процедура уколико постоје могућности за њено извођење [11,129,143,144,285,286].

У бројним студијама са метастатским меланомом анализирана је и вредност LDH у односу на мутациони статус и није било битне разлике између BRAF позитивних и негативних пацијената. Наши подаци су у сагласности са подацима из поменутих студија. Код наших испитаника медијана вредности LDH свих испитаника у истраживању износи 284,0 (опсег, 106,0-3468,0) чиме није показана статистички значајна разлика у вредностима медијана LDH између испитиваних група ($p=0,972$) [162,259,281].

У групи испитаника са BRAF мутацијом повишене вредности LDH у тренутку прогресије болести у IB стадијум имало је 38,2% и 45,5% BRAF негативних испитаника, док су нормалне вредности забележене код 61,8% BRAF позитивних и 54,5% BRAF негативних испитаника ($p=0,465$). Медијана вредности S100 протеина свих испитаника у истраживању у тренутку прогресије болести износи 0,1 (опсег, 0,0-6,3) без статистичке значајности у односу на BRAF мутацију ($p=0,495$). Такође, у тренутку прогресије у IV стадијум повишене вредности S100 протеина имало је 54,0% BRAF позитивних испитаника 54,8% BRAF негативних испитаника без значајности у испитиваним групама и у односу на нормалне вредности S100 протеина у серуму ($p=0,941$).

6.3. Демографске и клиничке карактеристике пацијената на основу NRAS мутационог статуса

NRAS је други најчешће активирани онкоген после BRAF који се јавља на Q61 локусу, а много ређе на G12 или G13 локусима, мутиран у 15-20% меланом. Корелацијом клиничких карактеристика и NRAS мутационог статуса пацијената са метастатским меланомом, доказано је да се чешће јавља код старијих особа (>55 год), са знацима хроничног оштећења од УВ зрачења, нодуларни меланом је најчешћи хистолошки тип који је локализован на екстремитетима, већом дебљином тумора по Бреслоу, већим процентом митоза и мањом стопом улцерације у односу на BRAF мутиране пацијенте и сматра се лошијим прогностичким фактором. Неколико студија се базирало на анализирању ефеката NRAS мутације у односу на укупно преживљавање (OS) и добијени су различити резултати. У случају када је OS мерено од иницијалне дијагнозе, показано је да NRAS мутације немају утицаја на OS [246,287].

Међутим, у друге две студије где је укупно преживљавање рачунато од тренутка метастатске болести показано је да су NRAS мутације повезане са бољим OS у поређењу са туморима који имају мутацију у BRAF гену или негативним BRAF/NRAS туморима [157,288].

Екедал (Екедахл) и сар. су такође испитивали клинички значај NRAS и BRAF статуса од прве локорегионалне метастазе и није нађена значајност у DMFS и OS ($p=0.31$ и 0.82 , респективно) [268].

У нашем истраживању мутације у NRAS гену рађене су код пацијената код којих није нађена мутација у BRAF гену. Од укупно 51 BRAF негативног испитаника, код 15,7% испитаника је нађена мутација у NRAS гену и 84,3% NRAS су негативни испитаници. Међу нашим испитаницима није нађена значајна разлика према полној структури ($p=0,694$), као ни између просечне старости испитаника у NRAS групама ($p=0,922$).

Анализирајући факторе ризика у обе групе NRAS испитаника нисмо достигли статистичку значајност у односу на фототип коже ($p=1,000$), боју очију ($p=0,575$), континуирано или интермитентно излагање УВ зрачењу ($p=1,000$), према активностима у спољашњој средини на основу година излагања ($p=1,000$). Према

Фицпатриковој скали међу испитаницима најчешћи је фототип III код 42,1% NRAS негативних и 50,0% NRAS позитивних испитаника. Фототип коже II 28,9% NRAS негативних и 33,3%, до NRAS позитивних пацијената.

Код наших испитаника није било статистичке значајности у односу на анатомску локализацију меланом, с тим да је труп најчешће место јављања у обе групе NRAS испитаника, потом глава и врат, док је акрални меланом присутан искључиво код 6 NRAS негативних испитаника ($p=0,512$) за разлику од других студија које су анализирале NRAS мутациони статус локализацију примарног меланом и потврдиле да се јавља најчешће на екстремитетима [289].

Најчешћи хистолошки тип меланом код наших NRAS позитивних и негативних испитаника је нодуларни меланом (62.5% према 46.5%, респективно), затим површноширећи тип меланом (12.5% према 25.6%), док је дезмопластични меланом присутан искључиво у групи NRAS негативних пацијената код 9.3% . Међутим, код наших пацијената није уочена статистички значајна разлика хистолошког типа у односу на испитиване групе ($p=0.505$). Ови подаци су у сагласности са досадашњим подацима из доступне литературе [289].

У нашој студији, нису нађене ни значајне разлике међу групама у односу на медијану дебљине тумора по Бреслоу ($p=0,413$), присуство улцерације ($p=1,000$), броју митоза ($p=0,310$) и броја патолошких лимфних нодуса ($p=0,236$). Поређењем са подацима из литературе и у студији Екедахл и сар. NRAS мутирани метастатски меланоми имају већу дебљину тумора по Бреслоу 2.4 mm (0-17), одсуство улцерације у 22.8% и мањи број митоза 11.8%, без статистичке значајности у односу на BRAF и WT туморе [268].

Поређењем групе пацијената код којих су нађене мутације у МАП киназном путу BRAF/NRAS позитивни, 72/8, (65%) у односу на BRAF/NRAS негативне, 51/43, (35%), Нађена је статистички значајна разлика у просечној старости између испитиваних група што указује да су BRAF/NRAS негативни испитаници значајно старији у односу на компаративну групу ($p=0,003$) и да имају значајно већу дебљину тумора по Бреслоу у односу на другу групу испитаника ($p=0,033$). Није било значајне разлике према полној структури између група ($p= 0.111$), локализацији примарног тумора ($p=0,500$), присуства улцерације ($p=0,383$), медијани броја митоза ($p=0,734$) и медијани броја патолошких лимфних нодуса ($p=0,697$).

Наши подаци су у сагласности са подацима из литературе који указују да су BRAF/NRAS негативни пацијенти старији у поређењу са позитивним пацијентима у оба гена. Показано је да је акрални лентигинозни и дезмопластични меланом чешћи у групи BRAF/NRAS негативних пацијената, али услед малог броја пацијената није достигнута статистичка значајност. Није показана статистички значајна разлика у дебљини тумора по Бреслоу, митотском односу и присуству улцерације [259].

6.4. Анализа преживљавања BRAF и NRAS испитаника

Бројне студије су анализирале прогностички значај BRAF и NRAS мутационог статуса код пацијената са метастатским меланомом са добијеним подацима који су опречни. Одређене студије су показале да пацијенти са NRAS мутираним туморима имају боље укупно преживљавање (енгл. *overall survival* – OS) у поређењу са BRAF мутираним или BRAF/NRAS немутираним туморима [244], док друга студија сугерише да NRAS мутирани тумори имају лошије OS од дијагнозе IV стадијума [281]. Хубен (Houben) и сар. наглашавају да је присуство BRAF или NRAS мутације повезано са лошијим исходом код метастатске болести [237], док Карлино и сар, као и други аутори истичу да BRAF или NRAS мутациони статус нема прогностички значај у IV стадијуму болести код пацијената који нису лечени BRAF и MEK инхибиторима [239,259,279].

Скорија анализа преживљавања код пацијената са метастатским меланомом у време када су BRAF и MEK инхибитори били доступна терапијска опција у склопу клиничких студија и група пацијената је примала, управо је отежала анализирање података између BRAF мутираних и немутираних меланома и довела до закључка да нема разлике у преживљавању од дијагнозе IV стадијума између BRAF позитивних и негативних пацијената. Међутим, када су анализирани пацијенти са BRAF мутацијом који нису примали инхибиторе доказано је значајно краће време преживљавања код BRAF позитивних пацијената [162].

У циљу провере да ли BRAF и NRAS мутациони статус утичу на преживљавање, детаљно смо анализирали време од дијагнозе до уласка у III или IV стадијум болести (енгл. *disease free survival* - DFS), време од дијагнозе до прогресије у IV стадијум болести (енгл. *distant metastases-free survival-DMFS*), време од IV

стадијума до последњег контакта са пацијентом (енгл. *distant metastasis survival-DMS*) и укупно преживљавање (енгл. *overall survival-OS*).

Време од дијагнозе до првих удаљених метастаза, укључујући и нересектабилни III стадијум статистички се не разликује између BRAF позитивних и негативних пацијената, али постоји тренд који показује BRAF позитивни пацијенти имају дужи временски интервал у односу на BRAF негативне пацијенте, да је медијана времена BRAF позитивних испитаника износи 43,0 месеци (95% CI 34,1-51,9), док је код BRAF негативних испитаника 26,0 (95% CI 12,3-39,7). Не постоји статистички значајна разлика у DFS у односу на BRAF статус ($p=0,082$). Медијана DFS свих испитаника износи 38,0 месеци (95% CI 25,3-50,7).

У студији која је анализирао DFS од дијагнозе до првих удаљених метастаза (укључујући иноперабилни III стадијум) није показана статистичка значајност између BRAF позитивних и BRAF негативних пацијената са метастатским меланомом ($p=0,822$). Активирани BRAF онкоген, односно његова мутација нема утицаја на DFS, али је показано да је присуство мутације повезано са лошијим исходом [162]. Сен-Жан (Saint-Jean) и сар. су такође показали да нема разлике у DFS између BRAF позитивних и негативних испитаника [290].

Такође, код наших испитаника није доказана статистички значајна разлика у медијани времена од стадијума III до првих удаљених метастаза и BRAF мутационог статуса ($p=0,282$). Резултат је остао непромењен када смо анализирали и време од дијагнозе до појаве првих удаљених метастаза у односу на BRAF мутациони статус ($p=0,129$) са медијаном DMFS код BRAF позитивних испитаника износи 44,0 месеци (95% CI 31,9-56,1), док је код BRAF негативних испитаника 31,0 (95% CI 19,6-42,4).

У нашем истраживању време од IV стадијума до последњег контакта са пацијентом (DMS) не разликује се код BRAF позитивних у односу на BRAF негативне испитанике ($p=0,143$). Медијана OS код BRAF позитивних испитаника износи 60,0 месеци (95% CI 47,0-72,9), док је код BRAF негативних испитаника 42,0 (95% CI 28,7-55,6). Не постоји статистички значајна разлика OS у односу на BRAF мутациони статус ($p=0,070$), али постоји тренд који би се могао објаснити тиме да су BRAF мутирани пацијенти примали иновативне лекове и били укључени у интернационалне клиничке студије са бољим перформанс статусом у односу на

негативне пацијенте. Није било разлике ни у једногодишњем и двогодишњем преживљавању у односу на BRAF мутациони статус ($p=0,426$ и $p=0,978$).

У студији која је анализирала BRAF мутациони статус и медијану преживљавања до првих удаљених метастаза (DMFS) лечења BRAF инхибиторима износи 46,1 месец код BRAF негативних и 11,1 месеци BRAF позитивних који нису примали BRAF инхибиторе. Када су анализирани само пацијенти са метастатским меланомом који претходно нису лечени медијана преживљавања износила је 8,5 месеци за BRAF негативне и 5,7 месеци за BRAF позитивне пацијенте ($p=0,147$). Студија је показала на основу анализе преживљавања пацијената са метастатским меланомом и мутацијом у BRAF гену није боље у односу на BRAF негативне пацијенте, односно да пацијенти са BRAF мутираним метастатским меланомом имају лошију прогнозу уколико нису лечени BRAF инхибиторима [162].

Мутација у NRAS гену се сматра независним предиктивним фактором лошијег преживљавања након дијагнозе IV стадијума болести [281].

У циљу анализе ових података код пацијената у нашем истраживању дошли смо до резултата који не указују на корелацију и статистичку значајност NRAS мутационог статуса у односу на медијану DFS код NRAS позитивних и негативних испитаника ($p=0,953$), медијану DMFS ($p=0,804$), медијану DMS ($p=0,554$), медијану OS ($p=0,973$). У нашој студији није показано да је NRAS фактор лошијег преживљавања. Није нађена значајност и у групи BRAF/NRAS позитивних или негативних пацијената у односу на медијану DFS ($p=0,112$), медијану DMFS ($p=0,147$), медијану DMS ($p=0,139$), медијану OS ($p=0,124$).

6.5. Одговор на терапију

С обзиром да су терапијске могућности за метастатски меланом у Србији до 2016. године лимитиране због недоступности новоодобрених биолошких лекова и веома малог броја мултицентричних интернационалних клиничких студија, највећи број наших пацијената је лечен хемиотерапијом. Прва линија терапије код 84 (68,3%) пацијената у IV стадијуму метастатског меланома био је дакарбазин (диметрил-триазено-имидазол-карбоксамид–DTIC). Пацијентима код којих је евидентирана прогресија болести након примене дакарбазина ординирана је полихемиотерапија (цисплатина-винбластин-дакарбазин и паклитаксел-карбаплатина).

Контрола болести у виду постизања комплетне ремисије забележена је код 7.1% пацијената, парцијалне ремисије код 2.4%, стабилне болести у случају 20.2%, а прогресија болести код 61.9%.

Трајање одговора код пацијената са комплетном ремисијом износи 10.83 ± 3.5 месеци (од 6-16 месеци). Наши подаци су у сагласности са досадашњим подацима из литературе који истичу да дакарбазин као прва линија терапије и примена полихемиотерапијских режима након неуспешног лечења дакарбазином нису ефикасни у лечењу метастатског меланом, изузев када BRAF негативним пацијентима није доступна имуноterapiја или је након примене имуноterapiје болест и даље резистентна [137,291,292].

То је разлог што су потребе за новим терапијским опцијама које су значајно утицале на укупно преживљавање пацијената неопходне за лечење ових пацијената. У Србији, међутим, постоји доступна за сада само монотерапија BRAF инхибитором вемурафенибом, док је имуноterapiја анти-PD1 антителом доступна само за пацијенте који немају детектабилну мутацију у BRAF гену, у првој линији терапије.

Анализирајући одговор на системску терапију 38 пацијента са BRAF мутацијом је примало системску терапију и код 2,6% је постигнута комплетна ремисија, док је од 46 BRAF негативних 10,9% имало комплетну ремисију. Није доказана статистички значајна разлика ($p=0.740$) што указује да мутациони статус не утиче на хемиотерапијски одговор. Иако је у неким студијама објављено да BRAF негативни пацијенти имају бољи одговор на хемиотерапију [241], друге студије нису то потврдиле и наглашавају да мутациони статус нема удела у одговору или преживљавању након примене системске терапије са паклитакселом или дакарбазином [293].

Осталих 39 (31,7%) пацијената у нашој студији је примало иновативне лекове (ипилимумаб, вемурафениб, дабрафениб и траметиниб) укључивањем у клиничке студије у иностранству или донацијом лекова из програма из самилости (*compassionate use programmes*). Није евидентирана значајност у односу на медијану DMS испитаника са хемиотерапијом која износи 11,5 месеци (95% CI 7,3-15,6), док је код испитаника са иновативном терапијом 24,3 (95% CI 8,0-40,6), али свакако да постоји тренд ($p=0,074$). Статистичка значајност је нађена у медијани укупног преживљавања код испитаника са иновативном терапијом 77,0 (95% CI 46,7-168,6) у

односу на испитанике са хемиотерапијом 46,0 месеци (95% CI 40,9-51,1) и указује на значајност у укупном преживљавању у односу на врсту примењене терапије ($p=0,032$), која потврђује да испитаници са иновативном терапијом имају значајно дужи период укупног преживљавања. Ово је потврђено у бројним клиничким студијама [294–297]. У односу на мутациони статус анализирана је медијана DMS испитаника са хемиотерапијом код BRAF позитивних износи 16,2 месеца (95% CI 0,2-32,3), док је код BRAF негативних 1,7 месеци (95% CI 7,4-14,0). Не постоји статистички значајна разлика у DMS у односу на BRAF статус код испитаника на хемотерапији ($p=0,359$). Такође, медијана укупног преживљавања испитаника са хемиотерапијом код BRAF позитивних износи 49,0 месеца (95% CI 32,7-65,2), док је код BRAF негативних 39,0 месеци (95% CI 25,4-52,6). Није достигнута значајност у укупном преживљавању у односу на BRAF статус код испитаника на хемотерапији ($p=0,323$).

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу изнетих резултата могу се донети следећи закључци:

1. Мутације у BRAF гену нађене су код 58,5% пацијената и 15,7% у NRAS гену код пацијената у IV стадијуму болести
2. BRAF позитивни пацијенти су млађе животне доби на дијагнози примарног тумора и имају мању дебљину тумора по Бреслоу у односу на BRAF негативне пацијенте.
3. BRAF и NRAS мутациони статус не корелира са локализацијом примарног тумора, хистолошким типом тумора, присуством улцерације, митоза и бројем патолошки измењених лимфних чворова на иницијалној дијагнози.
4. BRAF позитивни пацијенти се чешће интермитентно излажу сунцу, док фототип коже, боја очију, број невуса, породична и лична анамнеза о меланому нису у корелацији са BRAF и NRAS статусом.
5. Пацијенти са BRAF мутацијом су млађе животне доби у тренутку удаљених метастаза, док нема утврђене корелације са полом.
6. BRAF негативни пацијенти су дијагностиковани у вишем узнапредовалом стадијуму на индицијалној дијагнози.
7. BRAF и NRAS мутациони статус нема утицаја на ток болести.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Thomas NE, Groben P. Invasive superficial spreading melanomas arising from clinically normal skin. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51: 466–70. doi:10.1016/j.jaad.2004.04.027
2. Purdue MP, From L, Armstrong BK, Kricger A, Gallagher RP, McLaughlin JR, et al. Etiologic and other factors predicting nevus-associated cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14: 2015–22. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0097
3. Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19: 1557–68. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1249
4. Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res.* 2002;12: 271–8.
5. Kalkman E, Baxter G. Melanoma. *Clin Radiol.* 2004;59: 313–26. doi:10.1016/j.crad.2003.09.020
6. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2010;46: 270–83. doi:10.1016/j.ejca.2009.10.032
7. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, et al. Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: surgical treatment and radiotherapy of melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18: 61–7. doi:10.1097/CMR.0b013e3282f0c893
8. Dummer R, Guggenheim M, Arnold AW, Braun R, von Moos R, Project Group Melanoma of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. Updated Swiss guidelines for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. *Swiss Med Wkly.* 2011;141: w13320. doi:10.4414/smw.2011.13320
9. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, et al. Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol.* 2010;163: 238–56. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09883.x
10. Saiag P, Bosquet L, Guillot B, Verola O, Avril M-F, Bailly C, et al. 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;17: 325–31. doi:10.1684/ejd.2007.0209
11. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur J Cancer.* 2012;48: 2375–90. doi:10.1016/j.ejca.2012.06.013
12. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol.* 2009;27: 3–9. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.09.001
13. Parkin DM, Ferlay J, Curado M-P, Bray F, Edwards B, Shin H-R, et al. Fifty years

- of cancer incidence: CI5 I-IX. *Int J cancer*. 2010;127: 2918–27. doi:10.1002/ijc.25517
14. de Vries E, Bray FI, Coebergh JWW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J cancer*. 2003;107: 119–26. doi:10.1002/ijc.11360
 15. Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14: 280–90. doi:10.1159/000056358
 16. Kandolf-Sekulović L, Zivković-Perišić S, Radević T, Rajović M, Dinić M, Zolotarevski L, et al. Melanoma in South-East Europe: epidemiological data from the central cancer registry and clinicopathological characteristics from the hospital-based registry in Serbia. *Int J Dermatol*. 2012;51: 1186–94. doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05518.x
 17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer*. 2015;136: E359-86. doi:10.1002/ijc.29210
 18. Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkievicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, et al. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer*. 2006;107: 1331–9. doi:10.1002/cncr.22126
 19. Mervic L, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Forschner A, Metzler G, et al. Sex differences in survival of cutaneous melanoma are age dependent: an analysis of 7338 patients. *Melanoma Res*. 2011;21: 244–52. doi:10.1097/CMR.0b013e32834577c8
 20. Jemal A, Devesa SS, Hartge P, Tucker MA. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93: 678–83.
 21. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014;170: 11–9. doi:10.1111/bjd.12492
 22. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*. 2000;89: 1269–78.
 23. Baade PD, English DR, Youl PH, McPherson M, Elwood JM, Aitken JF. The relationship between melanoma thickness and time to diagnosis in a large population-based study. *Arch Dermatol*. 2006;142: 1422–7. doi:10.1001/archderm.142.11.1422
 24. Geller AC, Elwood M, Swetter SM, Brooks DR, Aitken J, Youl PH, et al. Factors related to the presentation of thin and thick nodular melanoma from a population-based cancer registry in Queensland Australia. *Cancer*. 2009;115: 1318–27. doi:10.1002/cncr.24162
 25. Lasithiotakis KG, Leiter U, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Meier F, et al. Improvement of overall survival of patients with cutaneous melanoma in Germany, 1976-2001: which factors contributed? *Cancer*. 2007;109: 1174–82. doi:10.1002/cncr.22511
 26. Pastila R, Leszczynski D. Ultraviolet-A radiation induces changes in cyclin G gene expression in mouse melanoma B16-F1 cells. *Cancer Cell Int*. 2007;7: 7.

- doi:10.1186/1475-2867-7-7
27. Glanz K, Buller DB, Saraiya M. Reducing ultraviolet radiation exposure among outdoor workers: state of the evidence and recommendations. *Environ Health*. 2007;6: 22. doi:10.1186/1476-069X-6-22
 28. Lautenschlager S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. *Lancet* (London, England). 2007;370: 528–37. doi:10.1016/S0140-6736(07)60638-2
 29. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010;49: 978–86. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x
 30. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* (London, England). 2005;365: 687–701. doi:10.1016/S0140-6736(05)17951-3
 31. Thomas NE, Berwick M, Cordeiro-Stone M. Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiation? *J Invest Dermatol*. 2006;126: 1693–6. doi:10.1038/sj.jid.5700458
 32. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224: 241–8. doi:10.1016/j.taap.2006.12.006
 33. Gallagher RP, Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92: 119–31. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.011
 34. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005;41: 45–60. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.016
 35. Chang Y, Barrett JH, Bishop DT, Armstrong BK, Bataille V, Bergman W, et al. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol*. 2009;38: 814–30. doi:10.1093/ije/dyp166
 36. Olsen CM, Zens MS, Green AC, Stukel TA, Holman CDJ, Mack T, et al. Biologic markers of sun exposure and melanoma risk in women: pooled case-control analysis. *Int J Cancer*. 2011;129: 713–23. doi:10.1002/ijc.25691
 37. Whiteman D, Green A. Melanoma and sunburn. *Cancer Causes Control*. 1994;5: 564–72.
 38. Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Bronstein BR, Mihm MC, et al. Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. *Pediatrics*. 1989;84: 199–204.
 39. Saraiya M, Hall HI, Uhler RJ. Sunburn prevalence among adults in the United States, 1999. *Am J Prev Med*. 2002;23: 91–7.
 40. Wu S, Cho E, Li W-Q, Weinstock MA, Han J, Qureshi AA. History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. *Am J Epidemiol*. 2016;183: 824–33. doi:10.1093/aje/kwv282
 41. Walls AC, Han J, Li T, Qureshi AA. Host Risk Factors, Ultraviolet Index of Residence, and Incident Malignant Melanoma In Situ Among US Women and Men. *Am J Epidemiol*. 2013;177: 997–1005. doi:10.1093/aje/kws335
 42. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN, Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol*. 2003;120: 1087–93. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12246.x

43. Dawe RS. Ultraviolet A1 phototherapy. *Br J Dermatol.* 2003;148: 626–37.
44. Nijsten TEC, Stern RS. The increased risk of skin cancer is persistent after discontinuation of psoralen+ultraviolet A: a cohort study. *J Invest Dermatol.* 2003;121: 252–8. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12350.x
45. Swerdlow AJ, Weinstock MA. Do tanning lamps cause melanoma? An epidemiologic assessment. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38: 89–98.
46. Spencer JM, Amonette RA. Indoor tanning: risks, benefits, and future trends. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33: 288–98.
47. Ting W, Schultz K, Cac NN, Peterson M, Walling HW. Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. *Int J Dermatol.* 2007;46: 1253–7. doi:10.1111/j.1365-4632.2007.03408.x
48. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J cancer.* 2007;120: 1116–22. doi:10.1002/ijc.22453
49. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol.* 2009;10: 751–2.
50. Reguiaï Z, Jovenin N, Bernard P, Derancourt C. Melanoma, past severe sunburns and multiple solar lentigines of the upper back and shoulders. *Dermatology.* 2008;216: 330–6. doi:10.1159/000114207
51. Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24: 3172–7. doi:10.1200/JCO.2006.06.1325
52. Naldi L, Altieri A, Imberti GL, Gallus S, Bosetti C, La Vecchia C, et al. Sun exposure, phenotypic characteristics, and cutaneous malignant melanoma. An analysis according to different clinico-pathological variants and anatomic locations (Italy). *Cancer Causes Control.* 2005;16: 893–9. doi:10.1007/s10552-005-2300-4
53. Gillgren P, Brattström G, Djureen Mårtensson E, Frisell J, Palmgren J, Ringborg U, et al. A new computerized methodology to analyse tumour site in relation to phenotypic traits and epidemiological characteristics of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2002;146: 1023–30.
54. Cust AE, Pickles KM, Goumas C, Vu T, Schmid H, Nagore E, et al. Accuracy of self-reported nevus and pigmentation phenotype compared with clinical assessment in a population-based study of young Australian adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24: 736–43. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-1203
55. Bakos L, Mastroeni S, Bonamigo RR, Melchi F, Pasquini P, Fortes C. A melanoma risk score in a Brazilian population. *An Bras Dermatol.* 2013;88: 226–32. doi:10.1590/S0365-05962013000200007
56. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 2005;41: 28–44. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.015
57. Chiarugi A, Nardini P, Crocetti E, Carli P, De Giorgi V, Borgognoni L, et al. Familial and sporadic melanoma: different clinical and histopathological features in the Italian population - a multicentre epidemiological study - by GIPMe (Italian Multidisciplinary Group on Melanoma). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26:

- 194–9. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04035.x
58. Hansson J. Familial melanoma. *Surg Clin North Am.* 2008;88: 897–916, viii. doi:10.1016/j.suc.2008.04.005
59. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol.* 2010;49: 362–76. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04381.x
60. Niendorf KB, Tsao H. Cutaneous melanoma: family screening and genetic testing. *Dermatol Ther.* 2006;19: 1–8. doi:10.1111/j.1529-8019.2005.00050.x
61. Brewer JD, Christenson LJ, Weaver AL, Dapprich DC, Weenig RH, Lim KK, et al. Malignant melanoma in solid transplant recipients: collection of database cases and comparison with surveillance, epidemiology, and end results data for outcome analysis. *Arch Dermatol.* 2011;147: 790–6. doi:10.1001/archdermatol.2011.159
62. MacKie RM. Malignant melanoma: clinical variants and prognostic indicators. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25: 471–5.
63. Swetter SM. Dermatological perspectives of malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 2003;83: 77–95, vi.
64. Rongioletti F, Smoller BR. Unusual histological variants of cutaneous malignant melanoma with some clinical and possible prognostic correlations. *J Cutan Pathol.* 2005;32: 589–603. doi:10.1111/j.0303-6987.2005.00418.x
65. Mancini EA, Balch CM, Murad TM, Soong SJ. Polypoid melanoma, a virulent variant of the nodular growth pattern. *Am J Clin Pathol.* 1981;75: 810–5.
66. Plotnick H, Rachmaninoff N, VandenBerg HJ. Polypoid melanoma: a virulent variant of nodular melanoma. Report of three cases and literature review. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23: 880–4.
67. McKenna JK, Florell SR, Goldman GD, Bowen GM. Lentigo maligna/lentigo maligna melanoma: current state of diagnosis and treatment. *Dermatol Surg.* 2006;32: 493–504. doi:10.1111/j.1524-4725.2006.32102.x
68. Piliang MP. Acral Lentiginous Melanoma. *Clin Lab Med.* 2011;31: 281–288. doi:10.1016/j.cll.2011.03.005
69. 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;24: 879–97. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00880.x
70. Scolyer RA, Murali R, McCarthy SW, Thompson JF. Histologically ambiguous ("borderline") primary cutaneous melanocytic tumors: approaches to patient management including the roles of molecular testing and sentinel lymph node biopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134: 1770–7. doi:10.1043/2009-0612-RAR.1
71. Smoller BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2006;19 Suppl 2: S34-40. doi:10.1038/modpathol.3800508
72. Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell Res.* 2005;18: 150–9. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00235.x
73. Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment cell Res.* 2007;20: 161–72. doi:10.1111/j.1600-0749.2007.00378.x

74. Cramer SF. Consumption of the epidermis--what is its place in the spectrum of aberrant melanocyte-keratinocyte interactions? *Am J Dermatopathol.* 2008;30: 200–3. doi:10.1097/DAD.0b013e318164ede6
75. Laga AC, Murphy GF. Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134: 1750–7. doi:10.1043/2009-0394-RAR.1
76. Scolyer RA, Thompson JF. Desmoplastic Melanoma: A Heterogeneous Entity in Which Subclassification as 'Pure' or 'Mixed' May Have Important Prognostic Significance. *Ann Surg Oncol.* 2005;12: 197–199. doi:10.1245/ASO.2005.12.914
77. Li G, Satyamoorthy K, Meier F, Berking C, Bogenrieder T, Herlyn M. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene.* 2003;22: 3162–71. doi:10.1038/sj.onc.1206455
78. Speeckaert R, van Geel N, Vermaelen K V, Lambert J, Van Gele M, Speeckaert MM, et al. Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24: 334–44. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00799.x
79. Busam KJ, Antonescu CR, Marghoob AA, Nehal KS, Sachs DL, Shia J, et al. Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. *Am J Clin Pathol.* 2001;115: 856–60. doi:10.1309/G6EK-Y6EH-OLGY-6D6P
80. Malafrente P, Sorrells T. Lymph node melanosis in a patient with metastatic melanoma of unknown primary. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133: 1332–4. doi:10.1043/1543-2165-133.8.1332
81. Roesch A, Volkenandt M. Braun-Falcos *Dermatology.* Burgdorf W, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, editors. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
82. Broekaert SMC, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23: 763–770. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00778.x
83. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol.* 2007;127: 900–5. doi:10.1038/sj.jid.5700632
84. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. Rees J, editor. *PLoS Med.* 2008;5: e120. doi:10.1371/journal.pmed.0050120
85. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol.* 1986;17: 443–50.
86. Knezević F, Duancić V, Sitić S, Horvat-Knezević A, Benković V, Ramić S, et al. Histological types of polypoid cutaneous melanoma II. *Coll Antropol.* 2007;31: 1049–53.
87. 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;86: 288–99.
88. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol.* 2000;143: 275–80.

89. Barnhill RL, Piepkorn M, Busam KJ, editors. Pathology of Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2004. doi:10.1007/978-0-387-21619-5
90. Busam KJ. Cutaneous desmoplastic melanoma. *Adv Anat Pathol.* 2005;12: 92–102.
91. Posther KE, Selim MA, Mosca PJ, Stanley WE, Johnson JL, Tyler DS, et al. Histopathologic characteristics, recurrence patterns, and survival of 129 patients with desmoplastic melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2006;13: 728–39. doi:10.1245/ASO.2006.03.091
92. Anstey A, McKee P, Jones EW. Desmoplastic malignant melanoma: a clinicopathological study of 25 cases. *Br J Dermatol.* 1993;129: 359–71.
93. Barnhill RL, Gupta K. Unusual variants of malignant melanoma. *Clin Dermatol.* 2009;27: 564–87. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.09.015
94. Su LD, Fullen DR, Lowe L, Wang TS, Schwartz JL, Cimmino VM, et al. Desmoplastic and neurotropic melanoma. *Cancer.* 2004;100: 598–604. doi:10.1002/cncr.11947
95. Chen JY, Hruby G, Scolyer RA, Murali R, Hong A, Fitzgerald P, et al. Desmoplastic neurotropic melanoma: a clinicopathologic analysis of 128 cases. *Cancer.* 2008;113: 2770–8. doi:10.1002/cncr.23895
96. Jaroszewski DE, Pockaj BA, DiCaudo DJ, Bite U. The clinical behavior of desmoplastic melanoma. *Am J Surg.* 2001;182: 590–5.
97. Idriss MH, Rizwan L, Sferuzza A, Wasserman E, Kazlouskaya V, Elston DM. Nevoid melanoma: A study of 43 cases with emphasis on growth pattern. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73: 836–842. doi:10.1016/j.jaad.2015.07.003
98. Moloney FJ, Menzies SW. Key points in the dermoscopic diagnosis of hypomelanotic melanoma and nodular melanoma. *J Dermatol.* 2011;38: 10–5. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.01140.x
99. Koch SE, Lange JR. Amelanotic melanoma: the great masquerader. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42: 731–4.
100. Pizzichetta MA, Talamini R, Stanganelli I, Puddu P, Bono R, Argenziano G, et al. Amelanotic/hypomelanotic melanoma: clinical and dermoscopic features. *Br J Dermatol.* 2004;150: 1117–1124. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.05928.x
101. Adler MJ, White CR. Amelanotic malignant melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 1997;16: 122–30.
102. Cheung WL, Patel RR, Leonard A, Firoz B, Meehan SA. Amelanotic melanoma: a detailed morphologic analysis with clinicopathologic correlation of 75 cases. *J Cutan Pathol.* 2012;39: 33–9. doi:10.1111/j.1600-0560.2011.01808.x
103. Stam-Posthuma JJ, van Duinen C, Scheffer E, Vink J, Bergman W. Multiple primary melanomas. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44: 22–7.
104. Damianov N, Tronnier M, Koleva N, Wollina U, Gianfaldoni S, Lotti T, et al. Verrucous-Keratotic Malignant Melanoma (VKMM). *Open Access Maced J Med Sci.* 2017;5: 547. doi:10.3889/oamjms.2017.142
105. Marghoob AA, Schoenbach SP, Kopf AW, Orlow SJ, Nossar R, Bart RS. Large congenital melanocytic nevi and the risk for the development of malignant melanoma. A prospective study. *Arch Dermatol.* 1996;132: 170–5.

106. Watt AJ, Kotsis S V, Chung KC. Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113: 1968–74.
107. Krenzel S, Hauschild A, Schäfer T. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *Br J Dermatol*. 2006;155: 1–8. doi:10.1111/j.1365-2133.2006.07218.x
108. Yélamos O, Arva NC, Obregon R, Yazdan P, Wagner A, Guitart J, et al. A comparative study of proliferative nodules and lethal melanomas in congenital nevi from children. *Am J Surg Pathol*. 2015;39: 405–15. doi:10.1097/PAS.0000000000000351
109. Mackie RM, Watt D, Doherty V, Aitchison T. Malignant melanoma occurring in those aged under 30 in the west of Scotland 1979-1986: a study of incidence, clinical features, pathological features and survival. *Br J Dermatol*. 1991;124: 560–4.
110. Semkova K, Lott JP, Lazova R. Clinicopathologic features and survival in Spitzoid malignant melanoma and conventional malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71: 516–20. doi:10.1016/j.jaad.2014.04.012
111. Harms KL, Lowe L, Fullen DR, Harms PW. Atypical Spitz Tumors: A Diagnostic Challenge. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139: 1263–70. doi:10.5858/arpa.2015-0207-RA
112. Pol-Rodriquez M, Lee S, Silvers DN, Celebi JT. Influence of age on survival in childhood spitzoid melanomas. *Cancer*. 2007;109: 1579–83. doi:10.1002/cncr.22584
113. Paradela S, Fonseca E, Pita-Fernández S, Prieto VG. Spitzoid and non-spitzoid melanoma in children: a prognostic comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27: 1214–21. doi:10.1111/j.1468-3083.2012.04686.x
114. Okun MR. Letter: Malignant blue nevus. *Arch Dermatol*. 1973;108: 726–7.
115. Connelly J, Smith JL. Malignant blue nevus. *Cancer*. 1991;67: 2653–7.
116. Ariyanayagam-Baksh SM, Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Abernethy J, Barnes EL. Malignant blue nevus: a case report and molecular analysis. *Am J Dermatopathol*. 2003;25: 21–7.
117. Sugianto JZ, Ralston JS, Metcalf JS, McFaddin CL, Smith MT. Blue nevus and “malignant blue nevus:” A concise review. *Semin Diagn Pathol*. 2016;33: 219–224. doi:10.1053/j.semdp.2016.04.006
118. Magro CM, Crowson AN, Mihm MC. Unusual variants of malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2006;19 Suppl 2: S41-70. doi:10.1038/modpathol.3800516
119. Özgür F, Akyürek M, Kayıkçioğlu A, Barışta I, Gököz A. Metastatic malignant blue nevus: a case report. *Ann Plast Surg*. 1997;39: 411–5.
120. Perniciaro C. Dermatopathologic variants of malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*. 1997;72: 273–9. doi:10.1016/S0025-6196(11)64762-9
121. 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;69: 2942–52.
122. López F, Devaney KO, Hanna EY, Rinaldo A, Ferlito A. Metastases to nasal cavity and paranasal sinuses. Eisele DW, editor. *Head Neck*. 2016;38: 1847–1854. doi:10.1002/hed.24502

123. Gavriel H, McArthur G, Sizeland A, Henderson M. Review: mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res.* 2011;21: 257–66. doi:10.1097/CMR.0b013e3283470ffd
124. Isager P, Østerlind A, Engholm G, Heegaard S, Lindegaard J, Overgaard J, et al. Uveal and conjunctival malignant melanoma in Denmark, 1943-97: incidence and validation study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2005;12: 223–32. doi:10.1080/09286580591000836
125. Heyn J, Placzek M, Ozimek A, Baumgaertner AK, Siebeck M, Volkenandt M. Malignant melanoma of the anal region. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32: 603–7. doi:10.1111/j.1365-2230.2007.02353.x
126. Maqbool A, Lintner R, Bokhari A, Habib T, Rahman I, Rao BK. Anorectal melanoma--3 case reports and a review of the literature. *Cutis.* 2004;73: 409–13.
127. Chokoeva AA, Tchernev G, Castelli E, Orlando E, Verma SB, Grebe M, et al. Vulvar cancer: a review for dermatologists. *Wien Med Wochenschr.* 2015;165: 164–77. doi:10.1007/s10354-015-0354-9
128. Lemańska A, Banach P, Magnowska M, Frankowski A, Nowak-Markwitz E, Spaczyński M. Vulvar melanoma with urethral invasion and bladder metastases - a case report and review of the literature. *Arch Med Sci.* 2015;11: 240–52. doi:10.5114/aoms.2013.36184
129. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19: 3635–48. doi:10.1200/JCO.2001.19.16.3635
130. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27: 6199–206. doi:10.1200/JCO.2009.23.4799
131. Frishberg DP, Balch C, Balzer BL, Crowson AN, Didolkar M, McNiff JM, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133: 1560–7. doi:10.1043/1543-2165-133.10.1560
132. Thompson JF, Soong S-J, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol.* 2011;29: 2199–205. doi:10.1200/JCO.2010.31.5812
133. Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol.* 1987;123: 1326–30.
134. Compton CC, Barnhill R, Wick MR, Balch C, Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127: 1253–62. doi:10.1043/1543-2165(2003)127<1253:PFTEOS>2.0.CO;2
135. Ivan D, Prieto VG. An update on reporting histopathologic prognostic factors in melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135: 825–9. doi:10.1043/2010-0229-RAR.1
136. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long G V, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67: 472–492. doi:10.3322/caac.21409

137. Lebbe C, Lorigan P, Ascierto P, Testori A, Bédane C, Middleton M, et al. Treatment patterns and outcomes among patients diagnosed with unresectable stage III or IV melanoma in Europe: a retrospective, longitudinal survey (MELODY study). *Eur J Cancer*. 2012;48: 3205–14. doi:10.1016/j.ejca.2012.05.010
138. Korn EL, Liu P-Y, Lee SJ, Chapman J-AW, Niedzwiecki D, Suman VJ, et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol*. 2008;26: 527–34. doi:10.1200/JCO.2007.12.7837
139. Abdel-Rahman O. Clinical correlates and prognostic value of different metastatic sites in patients with malignant melanoma of the skin: a SEER database analysis. *J Dermatolog Treat*. 2017; 1–6. doi:10.1080/09546634.2017.1360987
140. Ren Y, Dai C, Zheng H, Zhou F, She Y, Jiang G, et al. Prognostic effect of liver metastasis in lung cancer patients with distant metastasis. *Oncotarget*. 2016;7: 53245–53253. doi:10.18632/oncotarget.10644
141. Riihimäki M, Hemminki A, Fallah M, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, et al. Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;86: 78–84. doi:10.1016/j.lungcan.2014.07.020
142. Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schitteck B, Rassner G, et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*. 2002;147: 62–70.
143. Dummer R, Hauschild A, Guggenheim M, Keilholz U, Pentheroudakis G, ESMO Guidelines Working Group. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012;23 Suppl 7: vii86-91. doi:10.1093/annonc/mds229
144. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, et al. S3-Guideline “Diagnosis, therapy and follow-up of melanoma” - short version. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft*. 2013;11: 563–602. doi:10.1111/ddg.12044
145. Adler NR, Haydon A, McLean CA, Kelly JW, Mar VJ. Metastatic pathways in patients with cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2017;30: 13–27. doi:10.1111/pcmr.12544
146. Junkins-Hopkins JM. Malignant melanoma: molecular cytogenetics and their implications in clinical medicine. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63: 329–32. doi:10.1016/j.jaad.2010.04.044
147. Vultur A, Villanueva J, Herlyn M. Targeting BRAF in advanced melanoma: a first step toward manageable disease. *Clin Cancer Res*. 2011;17: 1658–63. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0174
148. Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2010;80: 561–7. doi:10.1016/j.bcp.2010.03.019
149. Ramnath N AA. Inhibitors of Raf kinase and MEK signaling. *Updat Cancer Ther*. 2007;2: 111–118.
150. Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol*. 2012;132: 854–63. doi:10.1038/jid.2011.421
151. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary

- thyroid cancer. JAMA. 2013;309: 1493–501. doi:10.1001/jama.2013.3190
152. Grisham RN, Iyer G, Garg K, Delair D, Hyman DM, Zhou Q, et al. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. Cancer. 2013;119: 548–554. doi:10.1002/cncr.27782
153. Li Y, Li W. BRAF mutation is associated with poor clinicopathological outcomes in colorectal cancer: A meta-analysis. Saudi J Gastroenterol. 2017;23: 144–149. doi:10.4103/1319-3767.207712
154. Millington GWM. Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al. (Nature 2002; 417: 949-54). Clin Exp Dermatol. 2013;38: 222–3. doi:10.1111/ced.12015
155. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res. 2002;62: 6997–7000.
156. Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, Puchta U, Reckwerth A, Rütten A, et al. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. J Invest Dermatol. 2003;121: 1160–2. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12559.x
157. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. Mol Oncol. 2008;1: 395–405. doi:10.1016/j.molonc.2007.12.003
158. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. Smalley K, editor. PLoS One. 2012;7: e35309. doi:10.1371/journal.pone.0035309
159. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, et al. BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. PLoS One. Public Library of Science; 2011;6: e25806. doi:10.1371/journal.pone.0025806
160. Arkenau H-T, Kefford R, Long G V. Targeting BRAF for patients with melanoma. Br J Cancer. 2011;104: 392–8. doi:10.1038/sj.bjc.6606030
161. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DSB. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. Clin Cancer Res. 2004;10: 1753–7.
162. Long G V, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2011;29: 1239–46. doi:10.1200/JCO.2010.32.4327
163. Buhrman G, Holzapfel G, Fetcs S, Mattos C. Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107: 4931–6. doi:10.1073/pnas.0912226107
164. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer. 2003;3: 459–65. doi:10.1038/nrc1097
165. Vu HL, Aplin AE. Targeting mutant NRAS signaling pathways in melanoma. Pharmacol Res. 2016;107: 111–116. doi:10.1016/j.phrs.2016.03.007
166. Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. Oncogene. 1992;7: 51–6.
167. Montone KT, van Belle P, Elenitsas R, Elder DE. Proto-oncogene c-kit expression

- in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Mod Pathol*. 1997;10: 939–44.
168. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24: 4340–6. doi:10.1200/JCO.2006.06.2984
169. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008;14: 6821–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0575
170. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, Mac Rae S, Kruse A, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol*. 2008;26: 2046–51. doi:10.1200/JCO.2007.14.0707
171. Jiang X, Zhou J, Yuen NK, Corless CL, Heinrich MC, Fletcher JA, et al. Imatinib targeting of KIT-mutant oncoprotein in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14: 7726–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1144
172. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol*. 2011;29: 2904–9. doi:10.1200/JCO.2010.33.9275
173. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16 Suppl 2: S17-27. doi:10.1517/14728222.2011.639361
174. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75: 50–83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
175. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, et al. MAP Kinases. *Chem Rev*. 2001;101: 2449–2476. doi:10.1021/cr000241p
176. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2007;1773: 1376–1387. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.001
177. Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010;1802: 396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009
178. Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell*. 2007;130: 323–34. doi:10.1016/j.cell.2007.05.055
179. Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*. 2004;2004: RE13. doi:10.1126/stke.2502004re13
180. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*. 2005;118: 843–6. doi:10.1242/jcs.01660
181. Goody RS, Frech M, Wittinghofer A. Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artefacts. *Trends Biochem Sci*. 1991;16: 327–8.
182. Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, et al. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer*. 2011;2: 232–60. doi:10.1177/1947601911407323

183. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992;258: 478–80.
184. Seger R, Seger D, Lozeman FJ, Ahn NG, Graves LM, Campbell JS, et al. Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem*. 1992;267: 25628–31.
185. Zheng CF, Guan KL. Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*. 1993;268: 23933–9.
186. Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R. ERK1b, a 46-kDa ERK Isoform That Is Differentially Regulated by MEK. *J Biol Chem*. 2000;275: 15799–15808. doi:10.1074/jbc.M910060199
187. Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol*. 2004;24: 10000–15. doi:10.1128/MCB.24.22.10000-10015.2004
188. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, et al. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*. 1991;10: 885–92.
189. Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem*. 1991;266: 22159–63.
190. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773: 1213–26. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.005
191. Schlagenhauff B, Ellwanger U, Breuninger H, Stroebel W, Rassner G, Garbe C. Prognostic impact of the type of anaesthesia used during the excision of primary cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2000;10: 165–9.
192. Kelemen PR, Essner R, Foshag LJ, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy after wide local excision of primary melanoma. *J Am Coll Surg*. 1999;189: 247–52.
193. Ariyan S, Ali-Salaam P, Cheng DW, Truini C. Reliability of lymphatic mapping after wide local excision of cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2007;14: 2377–83. doi:10.1245/s10434-007-9468-7
194. Wong SL, Balch CM, Hurley P, Agarwala SS, Akhurst TJ, Cochran A, et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2012;30: 2912–8. doi:10.1200/JCO.2011.40.3519
195. Eggermont AMM, Gore M. Randomized adjuvant therapy trials in melanoma: surgical and systemic. *Semin Oncol*. 2007;34: 509–15. doi:10.1053/j.seminoncol.2007.09.003
196. Morton DL, Mozzillo N, Thompson J et al. An international, randomized, phase III trial of bacillus Calmette-Guerin (BCG) plus allogeneic melanoma vaccine (MCV) or placebo after complete resection of melanoma metastatic to regional or distant sites. *J Clin Oncol*. 2007;25 (Suppl.
197. Eggermont AMM. Therapeutic vaccines in solid tumours: can they be harmful? *Eur J Cancer*. 2009;45: 2087–90. doi:10.1016/j.ejca.2009.05.004

198. Faries MB, Hsueh EC, Ye X, Hoban M, Morton DL. Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on vaccination with an allogeneic whole-cell melanoma vaccine. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 7029–35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1540
199. The investigational MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapeutic does not meet first co-primary endpoint in Phase III melanoma clinical trial. Available online: <https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/the-investigational-mage-a3-antigen-specif>. 2013;
200. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102: 493–501. doi:10.1093/jnci/djq009
201. Eggermont AMM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WHJ, Marsden J, et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet (London, England).* 2008;372: 117–26. doi:10.1016/S0140-6736(08)61033-8
202. Eggermont AMM, Suci S, MacKie R, Ruka W, Testori A, Kruit W, et al. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. *Lancet (London, England).* 2005;366: 1189–96. doi:10.1016/S0140-6736(05)67482-X
203. Ascierto PA, Gogas HJ, Grob JJ, Algarra SM, Mohr P, Hansson J, et al. Adjuvant interferon alfa in malignant melanoma: an interdisciplinary and multinational expert review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;85: 149–61. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.07.004
204. Hauschild A, Gogas H, Tarhini A, Middleton MR, Testori A, Dréno B, et al. Practical guidelines for the management of interferon-alpha-2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer.* 2008;112: 982–94. doi:10.1002/cncr.23251
205. Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000;19: 21–34.
206. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 2000;18: 158–66. doi:10.1200/JCO.2000.18.1.158
207. Buzaid AC. Management of metastatic cutaneous melanoma. *Oncology (Williston Park).* 2004;18: 1443-50–9.
208. Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman JJ. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105: 1774-99–1.
209. Mays SR, Nelson BR. Current therapy of cutaneous melanoma. *Cutis.* 1999;63: 293–8.
210. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer.* 1989;64: 2024–9.

211. Rao RD, Holtan SG, Ingle JN, Croghan GA, Kottschade LA, Creagan ET, et al. Combination of paclitaxel and carboplatin as second-line therapy for patients with metastatic melanoma. *Cancer*. 2006;106: 375–82. doi:10.1002/cncr.21611
212. Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J Clin Oncol*. 2007;25: 5426–34. doi:10.1200/JCO.2007.12.0253
213. Hamm C, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M, Melanoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2008;34: 145–56. doi:10.1016/j.ctrv.2007.10.003
214. Kaufman HL, Kirkwood JM, Hodi FS, Agarwala S, Amatruda T, Bines SD, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10: 588–98. doi:10.1038/nrclinonc.2013.153
215. Schadendorf D, Vaubel J, Livingstone E, Zimmer L. Advances and perspectives in immunotherapy of melanoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012;23 Suppl 1: x104-8. doi:10.1093/annonc/mds321
216. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364: 2507–16. doi:10.1056/NEJMoal103782
217. FDA Approval for Vemurafenib & Companion Diagnostic Test for Late-Stage Melanoma with BRAF V600E Mutation. *Oncol Times*. 2011;33: 12. doi:10.1097/01.COT.0000405399.22766.44
218. Karimkhani C, Gonzalez R, Dellavalle RP. A review of novel therapies for melanoma. *Am J Clin Dermatol*. 2014;15: 323–37. doi:10.1007/s40257-014-0083-7
219. Niezgodna A, Niezgodna P, Czajkowski R. Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 1–16. doi:10.1155/2015/851387
220. Menzies AM, Long G V, Murali R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther*. 2012;6: 391–405. doi:10.2147/DDDT.S38998
221. Long G V, Trefzer U, Davies MA, Kefford RF, Ascierto PA, Chapman PB, et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13: 1087–95. doi:10.1016/S1470-2045(12)70431-X
222. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012;366: 707–14. doi:10.1056/NEJMoal112302
223. Chapman PB. Mechanisms of resistance to RAF inhibition in melanomas harboring a BRAF mutation. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Meet*. 2013; doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.e80
224. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2012;367: 107–14. doi:10.1056/NEJMoal203421

225. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371: 1867–76. doi:10.1056/NEJMoa1408868
226. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011;364: 2517–26. doi:10.1056/NEJMoa1104621
227. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol.* 2012;30: 2691–7. doi:10.1200/JCO.2012.41.6750
228. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33: 1889–1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736
229. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2012;24: 207–12. doi:10.1016/j.coi.2011.12.009
230. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366: 2443–54. doi:10.1056/NEJMoa1200690
231. Robert C, Long G V, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372: 320–30. doi:10.1056/NEJMoa1412082
232. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369: 134–44. doi:10.1056/NEJMoa1305133
233. Robert C, Schachter J, Long G V, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372: 2521–32. doi:10.1056/NEJMoa1503093
234. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373: 23–34. doi:10.1056/NEJMoa1504030
235. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353: 2135–2147. doi:10.1056/NEJMoa050092
236. Hacker E, Hayward NK, Dumenil T, James MR, Whiteman DC. The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: findings from an Australian population. *J Invest Dermatol.* 2010;130: 241–8. doi:10.1038/jid.2009.182
237. Houben R, Becker JC, Kappel A, Terheyden P, Bröcker E-B, Goetz R, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog.* 2004;3: 6. doi:10.1186/1477-3163-3-6
238. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Millikan RC, Groben PA, Hao H, et al. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16: 991–7. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-1038

239. Chang DZ, Panageas KS, Osman I, Polsky D, Busam K, Chapman PB. Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. *J Transl Med.* 2004;2: 46. doi:10.1186/1479-5876-2-46
240. Gorden A, Osman I, Gai W, He D, Huang W, Davidson A, et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* 2003;63: 3955–7.
241. Gallagher SJ, Thompson JF, Indsto J, Scurr LL, Lett M, Gao B-F, et al. p16INK4a expression and absence of activated B-RAF are independent predictors of chemosensitivity in melanoma tumors. *Neoplasia.* 2008;10: 1231–9.
242. Kirschner M, Helmke B, Starz H, Benner A, Thome M, Deichmann M. Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in the B-raf kinase domain is enhanced in melanoma lymph node metastases. *Melanoma Res.* 2005;15: 427–34.
243. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhönen S, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2003;9: 3362–8.
244. Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, et al. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. Blagosklonny M, editor. *PLoS One.* 2007;2: e236. doi:10.1371/journal.pone.0000236
245. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95: 1878–90.
246. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17: 229–35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2276
247. Kandolf-Sekulović L, Babović N, Jokić N, Nikolin B, Nikolić D, Janjić Z, et al. Clinicopathological characteristics, diagnosis and treatment of melanoma in Serbia—the Melanoma Focus Study. *Vojnosanit Pregl.* 2015;72: 312–6.
248. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66: 7–30. doi:10.3322/caac.21332
249. Miljuš D, Vukičević A, ŽC. Cancer incidence and mortality in central Serbia (1999–2007) Belgrade: Cancer Registry of Serbia, Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović-Batut.” 2010;
250. Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen C-Y, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24: 666–672. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00873.x
251. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003;33: 19–20. doi:10.1038/ng1054
252. Uribe P, Wistuba II, González S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol.* 2003;25: 365–70.

253. Geller AC, Miller DR, Annas GD, Demierre M-F, Gilchrest BA, Koh HK. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *JAMA*. 2002;288: 1719–20.
254. Marrett LD, Nguyen HL, Armstrong BK. Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996. *Int J cancer*. 2001;92: 457–62.
255. Marks R. The changing incidence and mortality of melanoma in Australia. *Recent Results Cancer Res*. 2002;160: 113–21.
256. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25: 459–63.
257. MacKie RM, Bray CA, Hole DJ, Morris A, Nicolson M, Evans A, et al. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study. *Lancet (London, England)*. 2002;360: 587–91. doi:10.1016/S0140-6736(02)09779-9
258. Buettner PG, Leiter U, Eigentler TK, Garbe C. Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer*. 2005;103: 616–24. doi:10.1002/cncr.20816
259. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2014;111: 292–9. doi:10.1038/bjc.2014.287
260. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41: 2040–59. doi:10.1016/j.ejca.2005.03.034
261. Schlaak M, Bajah A, Podewski T, Kreuzberg N, von Bartenwerffer W, Wardelmann E, et al. Assessment of clinical parameters associated with mutational status in metastatic malignant melanoma: a single-centre investigation of 141 patients. *Br J Dermatol*. 2013;168: 708–16. doi:10.1111/bjd.12140
262. Landi MT, Baccarelli A, Calista D, Pesatori A, Fears T, Tucker MA, et al. Combined risk factors for melanoma in a Mediterranean population. *Br J Cancer*. 2001;85: 1304–10. doi:10.1054/bjoc.2001.2029
263. Wu S, Han J, Vleugels RA, Puett R, Laden F, Hunter DJ, et al. Cumulative ultraviolet radiation flux in adulthood and risk of incident skin cancers in women. *Br J Cancer*. 2014;110: 1855–61. doi:10.1038/bjc.2014.43
264. Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fargnoli MC, Boniol M, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer*. 2009;45: 3054–63. doi:10.1016/j.ejca.2009.05.009
265. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14: 1241–4. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0632
266. Newton-Bishop JA, Chang Y-M, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, et al. Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *Eur J Cancer*. 2011;47: 732–41. doi:10.1016/j.ejca.2010.10.008
267. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF

- site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24: 345–51. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00837.x
283. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18: 3242–3249. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0052
284. Moreau S, Saiag P, Aegerter P, Bosset D, Longvert C, Hélias-Rodzewicz Z, et al. Prognostic value of BRAF(V⁶⁰⁰) mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. *Ann Surg Oncol.* 2012;19: 4314–21. doi:10.1245/s10434-012-2457-5
285. Beyeler M, Waldispühl S, Strobel K, Joller-Jemelka HI, Burg G, Dummer R. Detection of melanoma relapse: first comparative analysis on imaging techniques versus S100 protein. *Dermatology.* 2006;213: 187–91. doi:10.1159/000095034
286. Henry L, Fabre C, Guiraud I, Bastide S, Fabbro-Peray P, Martinez J, et al. Clinical use of p-proteasome in discriminating metastatic melanoma patients: comparative study with LDH, MIA and S100B protein. *Int J cancer.* 2013;133: 142–8. doi:10.1002/ijc.27991
287. Akslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol.* 2005;125: 312–7. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23788.x
288. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2003;9: 6483–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695152>
289. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *Onco Targets Ther.* 2017;10: 3941–3947. doi:10.2147/OTT.S117121
290. Saint-Jean M, Quereux G, Nguyen J-M, Peuvrel L, Brocard A, Vallee A, et al. Younger age at the time of first metastasis in BRAF-mutated compared to BRAF wild-type melanoma patients. *Oncol Rep.* 2014;32: 808–14. doi:10.3892/or.2014.3265
291. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol.* 2003;4: 748–59.
292. Propper DJ, Braybrooke JP, Levitt NC, O’Byrne K, Christodoulos K, Han C, et al. Phase II study of second-line therapy with DTIC, BCNU, cisplatin and tamoxifen (Dartmouth regimen) chemotherapy in patients with malignant melanoma previously treated with dacarbazine. *Br J Cancer.* 2000;82: 1759–63. doi:10.1054/bjoc.2000.1141
293. Hersh EM, Del Vecchio M, Brown MP, Kefford R, Loquai C, Testori A, et al. A randomized, controlled phase III trial of nab-Paclitaxel versus dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with metastatic melanoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015;26: 2267–74. doi:10.1093/annonc/mdv324
294. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al.

- Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363: 711–723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
295. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, et al. Results of a Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Sorafenib in Combination With Carboplatin and Paclitaxel As Second-Line Treatment in Patients With Unresectable Stage III or Stage IV Melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;27: 2823–2830. doi:10.1200/JCO.2007.15.7636
296. Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Ribas A, Hogg D, et al. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol.* 2017;28: 2581–2587. doi:10.1093/annonc/mdx339
297. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Schadendorf D, Hamid O, Robert C, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16: 908–918. doi:10.1016/S1470-2045(15)00083-2

УПИТНИК ЗА ПАЦИЈЕНТА ОБОЛЕЛОГ ОД МЕЛАНОМА

ПОПУЊАВА ПАЦИЈЕНТ:

1. Име и презиме.....
2. матични број.....
3. датум рођења
4. Адреса и телефон.....
5. Пол мушки женски
6. Фототип коже?
 - Тип I (врло светла кожа, увек поцрвени, никад не потамни)
 - Тип II (светла кожа, увек поцрвени, минимално потамни)
 - Тип III (светла, тамнија кожа, у почетку поцрвени, а потом потамни)
 - Тип IV (светло браон кожа, минимално поцрвени, лако потамни)
 - Тип V (тамно браон кожа, минимално поцрвени, лако потамни)
 - Тип VI(црна, минимално поцрвени, лако потамни)
7. Боја очију? ПЛАВА , ЗЕЛЕНА , БРАОН , ЦРНА
8. Излагања сунцу?

К-континуирано (стално) И- повремено (број месеци у години)
9. Да ли сте изгорели на сунцу у току живота?

До 18.године? Да Не, ако да колико пута

Од 18.године и у одраслом добу? Да Не, ако да, колико пута
10. Да ли сте раније или још увек радите на отвореном? ДА НЕ

Ако да колико: до 1 год. 2-5 год. 6-10 год. преко 10 год.
11. Колико дана годишње на годишњем одмору проведете на сунцу?.....
12. Да ли се сунчате на годишњем одмору да би кожа потамнела? ДА НЕ
Ако да, колико дана годишње?
13. Да ли користите соларијум? НЕ , ДА-до 20х годишње , ДА-преко 20х годишње

Колико година користите соларијум?.....
14. Да ли је неко у породици боловао од меланом? НЕ-0 ДА-1, ко?.....
15. Да ли сте имали неки тумор коже? НЕ-0 ДА-0, који?.....
16. Да ли болујете од неког другог тумора? НЕ-0, ДА-1 Ако ДА
којег?..... Година дијагнозе другог тумора?.....
17. Да ли болујете од других обољења? НЕ-0, ДА-1 којих?
18. Да ли неко у породици болује од меланом или другог тумора коже?

Меланом ДА НЕ Базоцелуларни карцином ДА НЕ
Планоцелуларни карцином ДА НЕ
Ко је боловао?.....
19. Да ли је неко у породици боловао од следећих тумора:

Карцином панкреаса ДА НЕ Карцином дојке ДА НЕ Сарком ДА НЕ Тумор мозга ДА НЕ
НЕ - У којој години живота је особа оболела?.....

РАЗЛОЗИ ЗА ЈАВЉАЊЕ ЛЕКАРУ

1. Пре колико месеци/година се појавила први пут ова промена на кожи?.....
2. Да ли се меланом појавио на ранијем младежу или на потпуно неизмењеној кожи?.....
3. Колико месеци/година је прошло од када се младеж//промена на кожи променила?.....
4. Време које је протекло од појаве нове промене или промене постојећег младежа до јављања лекару због тога?
.....
5. Ако је прошло више од 3 месеца, наведите разлог зашто се нисте раније јавили лекару?.....
6. Због чега сте се јавили лекару да уклоните промену на кожи:
 - a. Редовно прегледам кожу па сам приметио промену
 - b. Мој партнер ми је скренуо пажњу
 - c. Рођак/пријатељ ми је скренуо пажњу
 - d. Био сам на прегледу у оквиру кампање Еуромеланом или другог програма бесплатног прегледа младежа
 - e. Информисао сам се на радију/телевизији/новинама/интернету (подвући који медиј)
 - f. Лекар опште праксе ме је прегледао и приметио промену
 - g. Био сам на прегледу код лекара друге специјалности који је приметио промену
 - h. Младеж се променио (промена величине, облика, боје, посветлео, потамнео, “упалио се“, почео да влажи, крвари, бол/свраб/промена осећаја, перутање, повреда младежа, повећао се преко 7 mm)- подвући све што одговара
7. Обавештен сам да се треба одмах јавити лекару чим се примети појава на младежу или се појави нова израслина на кожи:
ТАЧНО НЕТАЧНО.....
8. Многи су ми рекли да се младеж не сме дирати, чак иако се мења:
ТАЧНО НЕТАЧНО.....

ПРЕГЛЕД (попуњава лекар):

1. Локализација промене:
2. Дермоскопија учињена пре интервенције: ДА НЕ
3. Број невуса 25, 25-50, 50-100, 100 и више
4. Присуство соларног лентига НЕ-0 ДА-1 ако да број
5. Присуство атипичног невуса НЕ-0 ДА-1 ако да број
6. Присуство суспектних лезија на прегледу целе коже
Меланом НЕ ДА ако да број
- ВСС НЕ ДА ако да број
- ССС НЕ ДА ако да број

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Татјана Радевић

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мутација у БРАФ, НРАС, ЦКИТ гену код пацијената са метастатским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, __5.12.2017.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Татјана Радевић

Број индекса _____

Студијски програм Докторске студије медицинских наука

Наслов рада

Мутација у BRAF, NRAS, ЦКИТ гену код пацијената са метастатским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести

Ментор: проф др Лидија Кандолф Секуловић

Потписани/а _____ Татјана Радевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, 5.12.2017.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

”Мутација у БРАФ, НРАС, ЦКИТ гену код пацијената са метастатским меланомом и њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама, факторима ризика и током болести”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, 05.12.2017.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.