

Kliničko-patološke karakteristike melanoma s pozitivnom BRAF mutacijom dijagnosticiranih u Kliničko bolničkom centru Osijek

Golovrški, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:473962>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Maja Golovrški

**KLINIČKO-PATOLOŠKE
KARAKTERISTIKE MELANOMA S
POZITIVNOM BRAF MUTACIJOM
DIJAGNOSTICIRANIH U KLINIČKOM
BOLNIČKOM CENTRU OSIJEK**

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Maja Golovrški

**KLINIČKO-PATOLOŠKE
KARAKTERISTIKE MELANOMA S
POZITIVNOM BRAF MUTACIJOM
DIJAGNOSTICIRANIH U KLINIČKOM
BOLNIČKOM CENTRU OSIJEK**

Završni rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Jasmina Rajc, dr. med.

Rad sadrži: (27) listova, (13) tablica

Zahvale:

Ovim bih se putem zahvalila mentorici doc. dr. sc. Jasmini Rajc, dr. med. na pristupačnosti, strpljenju i velikoj pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Najveća hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i potpori. Hvala i mojim M., T., M. bez kojih mi studiranje u Osijeku ne bi bilo u ovako lijepom sjećanju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Klasifikacija melanoma	2
1.1.2. Superficialno šireći melanom (SSM) ili površinsko šireći melanom.....	2
1.1.3. Nodularni melanom.....	2
1.1.4. Lentigo maligni melanom	3
1.1.5. Akralni lentiginozni melanom.....	3
1.1.6. Amelanotični melanom	3
1.1.7. Nevoidni melanom	4
1.1.8. Dezmodoplastični melanom.....	4
1.2. Prognoza malignog melanoma i određivanje stadija bolesti	4
1.2.1. Histopatološki pregled	4
1.2.2. Klasifikacija po Breslowu	4
1.2.3. Klasifikacija po Clarku	5
1.2.4. TNM klasifikacija	5
2. CILJEVI.....	7
3. MATERIJAL I METODE	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Ispitanici	8
3.3. Metode	8
3.4. Statističke metode.....	8
4. REZULTATI.....	10
5. RASPRAVA	17
6. ZAKLJUČAK	20
7. SAŽETAK	21
8. SUMMARY.....	22
9. LITERATURA	23
10. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

AIDS - sindrom stečene imunodeficijencije (prema engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

ALM - akralno-lentigozni melanom (prema engl. *Acral lentiginous melanoma*)

BRAF - ljudski gen koji kodira protein B-Raf/protoonkogen B-Raf

BRAFⁱ - inhibitori BRAF mutacije

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (prema engl. *Extra-cellular Signal Regulated Kinase*)

KBC - Kliničko bolnički centar

LMM - lentigo maligni melanom (prema engl. *Lentigo maligna melanoma*)

LVI - limfovaskularna invazija (prema engl. *Lymphovascular invasion*)

MAPK - mitogenom aktivirane protein-kinaze (prema engl. *Mitogen-activated protein kinase*)

NM - nodularni melanom (prema engl. *Nodular melanoma*)

PNI - perineuralna invazija (prema engl. *Perineural invasion*)

SSM - superficijalno šireći melanom (prema engl. *Superficial spreading melanoma*)

TNM - sustav za procjenu proširenosti tumora (uključuje procjenu primarnog tumora-T, stanje regionalnih limfnih čvorova-N, te prisutnost udaljenih metastaza-M, prema engl. *Tumour, Node, Metastasis*)

UV - ultraljubičasto zračenje (prema engl. *ultraviolet*)

1. UVOD

Melanom je jedan od najagresivnijih oblika malignog tumora kože koji se razvija iz melanocita - specijaliziranih pigmentiranih stanica. Melanociti se uglavnom nalaze u dubokom sloju epidermisa (površinskog sloja kože), no ima ih i u sluznicama, oku, unutarnjem uhu te ovojnicama središnjega živčanog sustava (1). Melanin, pigment koji proizvode melanociti, prirodni je pigment proteinske strukture čija je funkcija određivanje boje kose, kože i očiju na temelju razlika u količini i vrsti melanina. Razlikujemo dvije vrste melanina - eumelanin i feomelanin. Eumelanin je odgovoran za tamnije nijanse očiju, kose i kože, dok njegov nedostatak ili smanjena količina dovodi do svijetle boje kose. Feomelanin daje ružičastu boju usnama i bradavicama. Osobe s crvenom kosom imaju podjednaku količinu obje vrste melanina (2).

Melanom karakterizira brz i nekontrolirani rast melanocita te sposobnost metastaziranja, odnosno širenja na druge dijelove tijela. Maligni se melanom može razviti iz benignih nevusa ili de novo. Srećom, s obzirom na veliku učestalost benignih nevusa, potencijal je maligne transformacije ovih lezija nizak (3). Također, poznati su faktori rizika koji doprinose nastanku melanoma, a dijele se na okolišne faktore te na faktore povezane s domaćinom. Najvažniji je okolišni faktor UV zračenje. Sunce emitira dva tipa UV svjetla koja mogu dospjeti do površine Zemlje, UVA i UVB. Najonkogeniji dio Sunčeva svjetla su UVB zrake čiji fotoni oštećuju deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) u stanicama kože. UVB zrake najvažnije su za nastanak melanoma (4). Faktori rizika povezani s domaćinom uključuju obiteljsku sklonost melanomu, prethodnu dijagnozu melanoma, vrstu i broj nevusa, tip kože i pigmentaciju (osobe svijetle puti, plave ili crvenkaste kose te s plavim ili zelenim očima su pod većim rizikom) (5), te imunodeficientne i imunosuprimirane osobe (oboljeli od kroničnih leukemija, AIDS-a ili pacijenti nakon transplantacije organa).

Jedna od ključnih genetskih karakteristika melanoma je prisutnost BRAF mutacije. *BRAF* je gen koji kontrolira stanični rast i diobu, a mutacija u tom genu može dovesti do nekontroliranog rasta stanica i stvaranja tumora. *BRAF* gen kodira protein B-Raf, serin/treonin-protein kinazu koja je dio MAPK (mitogen-aktivirane protein kinaze) signalnog puta (6, 7). Ovaj je signalni put ključan za regulaciju stanične diobe, diferencijacije i preživljavanja. MAPK/ERK signalni put je lanac proteina u stanici koji prenosi signal od receptora na površini stanice do DNA u jezgri stanice (6, 8). Kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (ERK) je vrhunac kaskade protein kinaze aktivirane mitogenom koja regulira stanične procese poput

proliferacije, migracije i preživljavanja. Posljedično, abnormalno ERK signaliziranje često ima ulogu u tumorigenezi i metastazama brojnih karcinoma. Ova je mutacija često prisutna, posebice kod metastatskih oblika melanoma. Zbog toga je molekularno testiranje na BRAF mutaciju postalo važan dio dijagnostike i liječenja melanoma. U liječenju metastatskih oblika melanoma ključni su BRAF inhibitori (BRAFi). Oni djeluju na specifične mutacije u *BRAF* genu, inhibiraju njegovu aktivnost i usporavaju njegov rast (9). Pokazali su se značajnima u smanjenju veličine tumora, kontroliranju bolesti i produžavanju životnog vijeka pacijenta, što je ključno za razumijevanje mehanizma razvoja melanoma i razvoju personalizirane terapije. BRAF mutacija vezana je za primjenu terapije BRAF inhibitorima i primjenjuje se kod pacijenata kliničkog stadija III i više.

1.1. Klasifikacija melanoma

Postoje četiri glavna oblika melanoma i nekoliko rjeđih čiji klinički izgled varira ovisno o načinu rasta i dijelu tijela na kojem nastaje (10).

1.1.2. Superficialno šireći melanom (SSM) ili površinsko šireći melanom

Superficialno šireći melanom najčešći je oblik melanoma koji se uglavnom pojavljuje kod žena, i to na donjim udovima, dok se u manjoj mjeri javlja kod muškaraca (na trupu). Često je asimptomatski. Klinički se prezentira kao plak nepravilnog oblika s izdignutim svijetlosmeđim ili smeđim područjima, često s crvenim, bijelim, crnim ili plavim mrljama ili izbočenim plavo-crnim čvorićima. Na rubovima lezije mogu se vidjeti mala udubljena, a lezija se može povećavati ili mijenjati boju. Histološki, atipični melanociti prodiru u epidermis i dermis (11, 12).

1.1.3. Nodularni melanom

Nodularni melanom (NM) drugi je po učestalosti među melanomima. Najveću incidenciju ima u pedesetim godinama života, podjednako u oba spola, a ponajprije se pojavljuje na trupu, glavi i vratu. Većinom je asimptomatski, osim u slučajevima kada je prisutna ulceracija. Karakteriziran je ranom vertikalnom fazom rasta i brzom progresijom, dok je horizontalna faza rasta kratka ili izostaje u potpunosti, što znatno otežava postavljanje

dijagnoze u ranom stadiju. Izgledom je čvorast ili polipoidan, ravnomjerne pigmentacije, a često su prisutne ulceracije i krvarenja. Može se pojaviti bilo gdje na tijelu, često u obliku tamne, izbočene papule ili plaka. Boja lezije varira od biserne do sive i crne. NM je agresivniji oblik melanoma i obično se brzo širi u dublje slojeve kože i druge dijelove tijela, što ga čini posebno opasnim (11).

1.1.4. Lentigo maligni melanom

Lentigo maligni melanom (LMM) najčešće se javlja kod starijih bolesnika. Nastaje iz lentigo maligne (poznate i kao Hutchinsonova mrlja ili maligni melanom in situ), koja se pojavljuje kao svijetlosmeđa ili smeđa makula. Obično se javlja na područjima kože izloženima suncu, najčešće na licu, te se prezentira kao asimptomatska plosnata smeđa mrlja s crnim ili tamnosmeđim točkicama na površini. Kod lentigo maligne i normalni i zloćudni melanociti ograničeni su na epidermis. Kada maligni melanociti prodru u dermis, promjena se naziva lentigo maligni melanom koji može metastazirati (11).

1.1.5. Akralni lentiginozni melanom

Akralni lentiginozni melanom (ALM) pokazuje iste histološke karakteristike kao i lentigo maligni melanom. Budući da ljudi s tamnijom bojom kože rijetko razvijaju druge oblike melanoma, ovaj je oblik kod njih najčešći. ALM se pojavljuje na koži tabana, dlanova ili ispod noktiju. S obzirom na neobične lokacije manifestiranja, često se teško prepoznaje u ranim fazama, što rezultira kasnom dijagnozom i lošijim ishodom. UV zračenje ne igra glavnu ulogu u razvoju i nastanku ovog tipa melanoma upravo zbog specifičnih lokalizacija na kojima se manifestira. Najrjeđi je oblik melanoma, s pojavnosti 2 do 3 % (11, 13).

1.1.6. Amelanotični melanom

Amelanotični melanom je oblik melanoma koji ne proizvodi pigment. Može biti bilo koji od četiriju glavnih oblika melanoma, ali se najčešće svrstava među rjeđe tipove, uz spitzoidni, dezmodoplastični, neurotrofski melanom i druge. Lezije mogu biti ružičaste, crvene ili nježno svijetlosmeđe te imati pravilne rubove. Zbog svoga izgleda često nalikuje

dobročudnim promjenama ili nemelanomskim tumorima kože pa se kasno dijagnosticira, što u liječenju može dovesti do lošije prognoze (14).

1.1.7. Nevoidni melanom

Nevoidni melanom je rijedak i histološki atipičan oblik melanoma koji može izgledati poput benignih nevusa, što otežava dijagnozu. Može se pojaviti kao tamni, pigmentirani čvor ili plak koji s vremenom promijeni boju, veličinu i oblik. Ranije otkrivanje i pažljivo histološko ispitivanje ključni su za uspješno liječenje. U razlikovanju nevoidnog melanoma od benignih nevusa može pomoći dermatoskopija, no za točnu su dijagnozu ključni biopsija i histološki pregled.

1.1.8. Dezoplastični melanom

Ovaj se tip melanoma uglavnom sastoji od amelanotskih vretenastih melanocita i javlja se obično u područjima koja su kronično izložena sunčevoj svjetlosti. Teško ih je prepoznati jer mogu nalikovati ožiljcima pojavljujući se kao čvrsta nepigmentirana papula ili plak s loše definiranim rubovima. Češće se javlja kod muškaraca, a najčešći je u šezdesetim godinama života (15).

1.2. Prognoza malignog melanoma i određivanje stadija bolesti

1.2.1. Histopatološki pregled

Postoje različiti tipovi biopsija kojima se može utvrditi dijagnoza melanoma.

Prognoza malignog melanoma ovisi o kliničkom stadiju bolesti, dubini invazije te lokalizaciji samog melanoma. Prognostički je vrlo važna histološka klasifikacija prema dubini prodora tumorskih stanica (Clarkova klasifikacija) i prema debljini tumora (klasifikacija po Breslowu).

1.2.2. Klasifikacija po Breslowu

Debljina po Breslowu, nazvana po Alexanderu Breslowu, mjerenje je koje određuje dubinu invazije u kožu (I - tumor debljine do 0,75 mm; II – od 0,76 mm do 1,5 mm; III – od

1,51 mm do 4 mm; IV 4 mm i više). Deblji su tumori obično lošije prognoze od tanjih melanoma. Histopatološki pregled omogućuje točno mjerenje debljine po Breslowu, što pomaže pri određivanju stadija bolesti i odluci o liječenju.

1.2.3. Klasifikacija po Clarku

Clarkova razina invazije kategorizira lezije na temelju dubine njihove penetracije u slojeve kože. Svaka razina predstavlja dublju invaziju u slojeve kože koja je pod većim rizikom za lošiju prognozu i metastaziranje od prethodne (I - promjena samo u epidermisu, II – promjena zahvaća papilarni dermis, III – promjena ispunjava čitav papilarni dermis, IV – promjena zahvaća retikularni dermis, V – promjena zahvaća subkutis) (16).

1.2.4. TNM klasifikacija

Ranije se stadij bolesti određivao samo po klasifikaciji po Clarku i klasifikaciji prema Breslowu. Danas se koristi TNM klasifikacija koja uz debljinu primarnog tumora u obzir uzima i ostale najvažnije prognostičke faktore, kao što su prisutnost ulceracije te broj mitozu. Ulceracija tumora je raspadanje kože na vrhu melanoma. Melanomi s ulceracijom su ozbiljniji jer imaju veći rizik od širenja, pa su za stadij viši od tumora bez ulceracije. Broj mitozu je procjena broja stanica koje se dijele. Veći broj mitozu ukazuje na brži rast tumora, a samim time i njegovu veću agresivnost.

Uz TNM klasifikaciju, za bolju odluku o liječenju te procjenu prognoze bolesti, liječnici u nalazima navode i druge patohistološke karakteristike poput limfovaskularne invazije, perineuralne invazije te ekspresije Ki67 faktora. Prisutnost limfovaskularne invazije (LVI) označava prodor karcinoma u krvne žile (bilo da se radi o malim kapilarama, limfnim ili krvnim žilama) i samim time predstavlja rizik za povrat bolesti i negativno utječe na preživljavanje. Treba se navesti u svakom nalazu jer njezino postojanje ili činjenica da je nema pomaže onkologu pri odluci o liječenju. Ako je LVI negativna, manja je mogućnost da se karcinom proširio u limfne čvorove ili metastazirao. Perineuralna invazija (PNI) koristi se za opisivanje tumorskih stanica u prostoru oko živaca. Obično se vidi samo u zloćudnih tumora pa ih patolozi koriste kao dokaz malignosti (16). Pozitivan PNI povećava rizik od ponovnog rasta tumora nakon liječenja. Taj se podatak ne mora navoditi u nalazu jer postojanje ili odsutnost

perineuralne invazije ne utječe na prognozu bolesti. U melanocitnim lezijama ekspresija Ki67 predložena je kao pomoćni dijagnostički biomarker, a njegova je uloga dokazana u debljim primarnim melanomima.

2. CILJEVI

- ispitati razlike u učestalosti melanoma s obzirom na dob i lokalizaciju na koži
- ispitati učestalost BRAF mutacije u populaciji ispitanika
- ispitati postoji li razlika skupine BRAF pozitivnih i BRAF negativnih melanoma s obzirom na kliničko patološke karakteristike u objema skupinama

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je presječno, a pri pisanju rada upotrijebljeni su povijesni podatci.

3.2. Ispitanici

U radu je upotrijebljena postojeća medicinska dokumentacija (arhiva) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu patohistološki dokazanih melanoma operiranih u KBC-u Osijek od siječnja 2011. do prosinca 2023. godine. Obrada i rezultati upotrijebljeni u studiji neće utjecati na dijagnozu i liječenje pacijenata.

3.3. Metode

Iz arhivskih patohistoloških nalaza pohranjenih na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek prikupljeni su podatci o dobi i spolu ispitanika, lokalizaciji i veličini promjene, histološkom podtipu melanoma, dubini infiltracije po Breslowu i Clarku i broju mitoza. Ovi su podatci deskriptivno statistički obrađeni te je napravljena usporedba s nalazom BRAF mutacije koja se također određuje na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu i pohranjuje kao dodatak nalazu.

3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc®

Statistical Software version 22.016 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium;
<https://www.medcalc.org>; 2023)

4. REZULTATI

U razdoblju od dvanaest godina (od siječnja 2011. do prosinca 2023. godine) na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek, kod bolesnika u dobi medijana 64 godine (interkvartilnog raspona od 55,5 do 73 godine) u rasponu od 27 do 86 godina, operirano je ukupno 48 melanoma kod kojih je napravljena i molekularna analiza na BRAF mutaciju. Od ukupnog broja, najviše je pacijenata starijih od 50 godina. Kod 26 je pacijenata utvrđena BRAF mutacija, od kojih je njih 22 starijih od 50 godina (tablica 1).

Tablica 1. Razdioba dobi pacijenata s BRAF mutacijom i bez BRAF mutacije.

Dob pacijenta	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
Mlađi od 50 godina	4	5	9
50 i više godina	22	17	39
Ukupno	26	22	48

Od ukupno 48 pacijenata, 35 je muškaraca (aritmetička sredina dobi 61,3 sa standardnom devijacijom 1,2 godine) i 13 žena (aritmetička sredina dobi 69,9 sa standardnom devijacijom 3,1 godina).

Od ukupnog broja muškaraca, njih je 24 pozitivno na BRAF mutaciju, kao i dvije žene (tablica 2). Fisherovim egzaktnim testom uočena je statistički značajna razlika spola i prisutnosti, odnosno odsutnosti BRAF mutacije, posebice kod žena ($P = 0,002$).

Tablica 2. Razdioba spola pacijenata u odnosu na prisutnost/odsutnost BRAF mutacije.

Spol	Broj pacijenata	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacije
Muškarci	35	24	11
Žene	13	2	11

Najvećem je broju pacijenata melanom utvrđen na trupu te gornjim ekstremitetima, a najmanje na području lica (tablica 3). Također, test nije uočio razliku u povezanosti lokalizacije melanoma ovisno o tome je li pacijentu molekularnom analizom dokazana BRAF mutacija ili nije jer je $P = 0,051$ (χ^2 test).

Tablica 3. Razdioba lokalizacije melanoma u odnosu na BRAF mutaciju.

Lokalizacija	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
Trup	14	7	21
Gornji ekstremiteti	4	9	13
Vlasište	3	4	7
Donji ekstremiteti	4	1	5
Koža lica	0	2	2
Ukupno	26	22	48

Najviše pacijenata s melanomima lokaliziranim na trupu starije je od 50 godina, a svi pacijenti s melanomom na koži lica, koja je najrjeđa lokalizacija u uzorku, mlađi su od 50 godina. Melanomi lokalizirani na trupu, gornjim ekstremitetima i vlasištu češće se pojavljuju kod osoba starijih od 50 godina, dok su donji ekstremiteti te koža lica češći kod mlađih od 50 godina. Uočeno je da postoji statistički značajna razlika u povezanosti lokalizacije i dobi pojavnosti melanoma u cijelom uzorku jer je $P = 0,02$ (χ^2 test) (tablica 4).

Tablica 4. Razdioba lokalizacije melanoma i dobi pacijenta.

Lokalizacija	Pacijenti dobi manje od 50 godina	Pacijenti dobi 50 i više godina	Ukupno
Trup	5	16	21
Gornji ekstremiteti	2	11	13
Donji ekstremiteti	0	5	5
Vlasište	0	7	7
Koža lica	2	0	2
Ukupan broj pacijenata	9	39	48

Najviše je pacijenata imalo tumor promjera veličine od 1 do 2 centimetra, kod kojih je najčešće i utvrđena BRAF mutacija. Kod 10 pacijenata je tumor bio veličine promjera manje od 1 centimetra, od kojih je njih 4 molekularnom analizom pozitivno na BRAF mutaciju. Test nije uočio statistički značajnu razliku jer je $P = 0,57$ (χ^2 test) (tablica 5).

Tablica 5. Razdioba veličine tumora u centimetrima i BRAF mutacije.

Veličina tumora u centimetrima	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
< 1	4	6	10
1 – 2	12	8	20
> 2	10	8	18
Ukupno	26	22	48

Histološkom je analizom kod većine pacijenata utvrđeno da se radi o nodularnom i/ili superficijalnom melanomu, dok je jedan slučaj dezmoplastičnog i jedan slučaj akralno-lentiginoznog melanoma (tablica 6).

Tablica 6. Razdioba histološkog podtipa melanoma i BRAF mutacije.

Histološki podtip	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
Nodularni	12	10	22
Superficialni	11	6	17
Nevoidni	2	4	6
Akralno-lentiginozni	1	0	1
Dezmoplastični	0	1	1

Testom je uočeno da kod slučajeva s nodularnim melanomom nema statistički značajne razlike u povezanosti dobi i lokalizacije jer je $P = 0,19$ (χ^2 test) (tablica 7).

Tablica 7. Razdioba dobi pacijenta i lokalizacije nodularnog melanoma.

Lokalizacija	Mladi od 50 godina	50 i više godina	Ukupno
Trup	2	7	9
Gornji ekstremiteti	1	4	5
Donji ekstremiteti	0	2	2
Vlasište	0	5	5
Koža lica	1	0	1
Ukupan broj pacijenata	4	18	22

Kod slučajeva sa superficialno širećim melanomom test nije uočio značajne razlike u povezanosti lokalizacije samog melanoma i dobi pacijenta jer je $P = 0,3$ (χ^2 test) (tablica 8).

Tablica 8. Razdioba lokalizacije melanoma i dobi pacijenata superficijalno širećeg melanoma.

Lokalizacija	Mladi od 50 godina	50 i više godina	Ukupno
Trup	3	8	11
Gornji ekstremiteti	0	3	3
Donji ekstremiteti	0	1	1
Vlasište	0	1	1
Koža lica	1	0	1
Ukupan broj pacijenata	4	13	17

Najviše je melanoma u uzorku debljine više od 4 milimetra, što pripada četvrtoj i posljednjoj razini infiltracije po Breslowu. Najmanje je melanoma debljine do 0,75 milimetara, odnosno melanoma koji pripadaju prvoj razini infiltracije. Test nije uočio značajnu razliku povezanosti jer je $P = 0,88$ (χ^2 test) (tablica 9).

Tablica 9. Razdioba razine infiltracije po Breslowu u odnosu na BRAF mutaciju.

Razina infiltracije po Breslowu	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
I	2	2	4
II	3	3	6
III	10	6	16
IV	11	11	22

Najviše je pacijenata iz ukupnog uzorka po klasifikaciji po Clarku u četvrtoj razini infiltracije u kojoj lezija zahvaća retikularni dermis. Test nije uočio povezanost jer je $P = 0,58$ (χ^2 test) (tablica 10).

Tablica 10. Razdioba razine infiltracije po Clarku u odnosu na BRAF mutaciju.

Razina infiltracije po Clarku	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
I	0	0	0
II	1	2	3
III	10	4	14
IV	9	11	20
V	6	5	11

Fisherovim egzaktnim testom uočeno je da nema statistički značajne razlike u povezanosti prisutnosti ulceracije i prisutnosti mutacije jer je $P = 0,56$ (tablica 13).

Tablica 11. Razdioba ulceracije i BRAF mutacije.

Ulceracija	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupno
Da	16	11	27
Ne	10	11	21

Usporedbom prisutnosti limfovaskularne (tablica 12) i perineuralne invazije (tablica 13), Mann-Whitney test je uočio da nema statistički značajne povezanosti između prisutnosti invazija i prisutnosti BRAF mutacije jer su $P = 0,27$ (limfovaskularna invazija) i $P = 0,22$ (perineuralna invazija).

Tablica 12. Razdioba limfovaskularne invazije i BRAF mutacije.

Limfovaskularna invazija	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
Da	4	2	6
Ne	22	20	42
Ukupno	26	22	48

Tablica 13. Razdioba perineuralne invazije i BRAF mutacije.

Perineuralna invazija	Pozitivna BRAF mutacija	Negativna BRAF mutacija	Ukupan broj pacijenata
Da	2	1	3
Ne	24	21	45
Ukupno	26	22	48

Raspon neparametrijskih podataka o mitotskom indeksu je od 0 do 41 mitoza na milimetar kvadratni. Mann-Whitney testom uočeno je da nema statistički značajne razlike mitotskog indeksa kod pacijenata pozitivnih i negativnih na BRAF mutaciju jer je $P = 0,74$.

Unutar neparametrijskog raspona podataka od 0 do 87% ekspresije Ki67, Mann-Whitney testom uočeno je da nema statistički značajne razlike u odnosu na prisutnost, odnosno odsutnost BRAF mutacije jer je $P = 0,17$.

5. RASPRAVA

U istraživanje je bilo uključeno 48 pacijenata, od kojih je 35 muškaraca i 13 žena, koji su u dvanaestogodišnjem razdoblju bili operirani na KBC-u Osijek i na čijim je uzorcima napravljena molekularna analiza BRAF mutacije. Uočena je značajna povezanost spola i prisutnosti BRAF mutacije, posebice kod žena. Jedanaest od trinaest žena bilo je negativno na BRAF mutaciju, kao i jedanaest muškaraca.

Melanomi u uzorku češći su kod starije populacije, što je očekivan rezultat s obzirom da je starenje jedan od ključnih faktora rizika nastanka i razvoja brojnih bolesti pa tako i melanoma (17). Testom nije uočena povezanost prisutnosti BRAF mutacije i dobi pacijenta.

Isto tako, gotovo su sve lokalizacije u uzorku češće u starijoj dobnoj skupini. Iznimno su melanomi kože lica prisutni samo kod dobne skupine mlađe od 50 godina i to kod muške populacije. U prijašnjim je istraživanjima dokazano da je najčešća dob muškaraca s melanomom, kao posljedicom izlaganja štetnim UV zrakama, upravo do 50 godina života (18, 19). Testom je uočena značajna povezanost lokalizacije i dobi pacijenta. Najčešće su lokalizacije grupe ispitanika starijih od 50 trup i gornji ekstremiteti, odnosno dijelovi tijela koji nisu učestalo izloženi UV zračenju. Kako se u uzorku ispitanika pojavio i broj pacijenata mlađih od 50 godina s melanomom lokaliziranim na koži lica, pretpostavka je da je razlog tomu činjenica da mladi više vremena provode na otvorenom uz kontinuirano izlaganje UV zračenju, često bez upotrebe sredstava sa zaštitnim faktorima, kao i činjenica da koriste usluge solarija i tretmane za umjetno tamnjenje. Istraživanja su pokazala i da od melanoma, koji su posljedice ovog tipa izlaganja UV zračenju, u većem postotku obolijevaju žene. Broj melanoma u mlađoj dobnoj skupini u svijetu raste s obzirom da sve veći broj žena upotrebljava neki oblik umjetnog tamnjenja (20). No ipak, u ovom su uzorku žene gotovo u potpunosti starije životne dobi. Na ovakav je rezultat utjecao ograničeni uzorak pacijenata.

Najveći broj operiranih tumora iz uzorka odgovara veličini promjera 1 do 2 centimetra (20 pacijenata), od čega je 12 pozitivno na BRAF mutaciju. Četiri je od deset pacijenata, čiji je tumor promjera manjim od 1 centimetra, pozitivno, kao i 10 od 18 pacijenata s promjerom tumora većim od 2 centimetra. Test nije uočio povezanost između ovih dvaju obilježja.

Najmanje je melanoma u uzorku u prvoj razini infiltracije po Breslowu, dok melanom još nije invadirao područje izvan epidermisa te je veća vjerojatnost da je bolest u ranijem stadiju s boljom prognostičkom slikom za pacijenta. Najviše je pacijenata u uzorku u posljednjem

stadiju klasifikacije, što ukazuje na teži oblik bolesti s lošijom prognozom za pacijenta. Debljina tumora po Breslowu, kao i ulceracija, povećava se s dobi pacijenta, vjerojatno zbog kasne dijagnoze. Također, moguće je da je s dobi imunitet osobe slabiji, što u konačnici rezultira agresivnijim oblikom tumora (17). Nije uočena značajna povezanost prisutnosti mutacije i debljine infiltracije.

Najviše je pacijenata iz ukupnog uzorka po klasifikaciji po Clarku u četvrtoj razini infiltracije u kojoj lezija zahvaća retikularni dermis. Svaka razina predstavlja dublju invaziju u slojeve kože od prethodne pa tako i veći rizik od metastaziranja i rezultira lošijom prognozom za pacijenta (16).

Istraživanje je pokazalo da je najviše pacijenata s nodularnim i superficijalno širećim melanomom, što odgovara i dosadašnjim svjetskim istraživanjima. Najčešća je lokalizacija nodularnog melanoma na trupu i to kod skupine starije od 50 godina, pri čemu nije uočena povezanost lokalizacije u odnosu na dob. U uzorku od 17 superficijalno širećih melanoma 11 ih je pozitivno na BRAF mutaciju (s najčešćom lokalizacijom na trupu, kod skupine starije od 50 godina), kao i dva od šest nevoidnih melanoma i jedan primjer akralno lentiginoznog. Histološki rijetkim melanomima pripada dezmoplastični melanom, na što ukazuje i njegova rijetka prisutnost u uzorku (21).

Više je od polovine melanoma u uzorku ulcerirano te su za stadij viši i ozbiljniji od melanoma bez ulceracije.

Većinski, kod pacijenata u uzorku nisu prisutne niti perineuralna invazija (čija prisutnost ili odsutnost ne utječu na stadij bolesti i njenu prognozu) niti limfovaskularna invazija. Ako je LVI negativna, manja je mogućnost da se melanom proširio u limfne čvorove ili metastazirao (16).

Testom nije uočena povezanost mitotskog indeksa i Ki67 proteina s prisutnošću ili odsutnošću BRAF mutacije.

Neznatno više od polovine pacijenata u uzorku pozitivno je na BRAF mutaciju. U nekima od dosadašnjih istraživanja BRAF se mutacija spominje kao značajan faktor u odgovoru na terapiju i lošiju prognostičku sliku za pacijenta. U ovom istraživanju prisutnost mutacije nije uočena kao poveznica s lošijim prognostičkim faktorima (veća infiltracija po Clarku, veća infiltracija po Breslowu, prisutne limfovaskularna i perineuralna invazija, veličina tumora,

prisutnost ulceracije, visoki Ki67 te veći broj mitozna), što bi rezultiralo i lošijim odgovorom na terapiju (22).

Ograničavajući faktor ovog istraživanja je mali uzorak koji može značajno utjecati na rezultate. Mali uzorci imaju nižu statističku vrijednost, što smanjuje vjerojatnost otkrivanja stvarne razlike među skupinama.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Neznatno više od polovine pacijenata iz uzorka ima pozitivan nalaz na BRAF mutaciju.
- Nije uočena povezanost prisutnosti BRAF mutacije i ostalih lošijih kliničko-patoloških obilježja poput razine infiltracije po Clarku i Breslowu te prisustva ulceracije, limfovaskularne i perineuralne infiltracije kao i mitotskog indeksa te razine ekspresije Ki67.
- Na svim je lokalizacijama (trup, gornji ekstremiteti, donji ekstremiteti i vlasište) melanom češći kod pacijenata starijih od 50 godina, osim kože lica koja je u uzorku prisutna kod mlađih od 50 godina.

7. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: U sklopu izrade završnoga rada provedeno je istraživanje čiji su ciljevi bili ispitati razlike u učestalosti melanoma s obzirom na dob i lokalizaciju na koži te učestalost BRAF mutacije u uzorku te odrediti kliničko-patološke karakteristike radi usporedbe BRAF pozitivnih i BRAF negativnih melanoma.

Nacrt studije: Istraživanje je presječno, a pri pisanju rada upotrijebljeni su povijesni podatci.

Materijali i metode: Istraživanje je provedeno na temelju postojeće medicinske dokumentacije na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek. Prikupljeni su podatci o dobi i spolu ispitanika te lokalizaciji i veličini promjene, histološkom podtipu melanoma, dubini infiltracije po Breslowu i Clarku i broju mitozu. Podatci su deskriptivno statistički obrađeni te uspoređeni s nalazom BRAF mutacije.

Rezultati: Obradom podataka iz arhive nije uočena povezanost prisutnosti BRAF mutacije s dobi, lokalizacijom, veličinom, razinom infiltracije po Breslowu i Clarku, mitozom, ulceracijom i razinom ekspresije Ki67. Test je uočio značajnu razliku u pojavnosti lokalizacije melanoma u odnosu na dob pacijenta.

Zaključak: Na svim je lokalizacijama (trup, gornji ekstremiteti, donji ekstremiteti i vlasište) melanom češći kod pacijenata starijih od 50 godina, osim kože lica koja je u uzorku prisutna kod mladih od 50 godina.

Ključne riječi: BRAF mutacija; Breslow; Clark; lokalizacija; melanom; mitoze; UV zračenje

8. SUMMARY

Clinicopathological characteristic of melanoma with BRAF mutation diagnosed at University Hospital Osijek

Objectives: As part of the final thesis, research was conducted with the objectives of examining the differences in melanoma frequency based on age and skin localization, the frequency of BRAF mutations in the sample, and determining the clinical and pathological characteristics for comparing BRAF-positive and BRAF-negative melanomas.

Study Design: The research is cross-sectional, and historical data was used in writing the thesis.

Materials and methods: The research was conducted based on existing medical documentation from the Department of Pathology and Forensic Medicine at the University Hospital Osijek. Data was collected on the age and gender of the participants, as well as the localization and size of the lesion, histological subtype of melanoma, depth of infiltration according to Breslow and Clark, and the number of mitoses. The data was descriptively statistically processed and compared with the BRAF mutation findings.

Results: Data analysis from the archive did not show any correlation between the presence of the BRAF mutation and age, localization, size, Breslow and Clark infiltration level, mitoses, ulceration, or the level of Ki67 expression. The test revealed a significant difference in the occurrence of melanoma localization in relation to the patient's age.

Conclusion: Melanoma is more common in patients over 50 in all localizations (trunk, upper limbs, lower limbs, and scalp), except for facial skin, found in patients younger than 50 in the sample.

Keywords: BRAF mutation; Breslow; Clark; localization; melanoma; mitosis; UV radiation

9. LITERATURA

1. Bertolotto C. Cutaneous and uveal melanoma: two different cancers in therapeutic needs. *Comptes Rendus Biologies*. 2021;344(3):219–31. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35786627/>. Datum pristupa: 21.6.2024.
2. Wakamatsu K, Ito S. Recent Advances in Characterization of Melanin Pigments in Biological Samples. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9):8305. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/9/8305>. Datum pristupa: 31.8.2024.
3. Tímár J, Ladányi A. Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(10):5384. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9140388/>. Datum pristupa: 31.8.2024.
4. Glavina A, Lončar Brzak, B. Maligni melanom kože i sluznica. Sonda: List studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2016.
5. Bezić J, Kuret S, Vrbičić B, Smolić J, Borić I, Škifić I, i sur. Clinicopathological Characteristics of BRAF V600E Mutated Melanomas in the Dalmatian Region of Croatia. 2019.
6. Meevassana J, Anothaisatapon K, Subbalekha S, Kamolratanakul S, Siritientong T, Ruangritchankul K, i sur. BRAF V600E Immunohistochemistry Predicts Prognosis of Patients with Cutaneous Melanoma in Thai population. *PRS Global Open*. 2022. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9592364/>. Datum pristupa: 31.8.2024.
7. Ramić S. Driver mutations in melanoma. *Libri Oncologici: Croatian Journal of Oncology*. 2018.

8. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997-2007. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32104259/>. Datum pristupa: 26.6.2024.
9. Googe PB, Theocharis S, Pergaris A, Li H, Yan Y, McKenna EF Jr, i sur. Theragnostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and Ki67 in BRAFV600-mutant metastatic melanoma (BRIM-3 trial). *Curr Probl Cancer*. 2022;46(3):100862. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35398635/>. Datum pristupa: 26.6.2024.
10. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, i sur. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008;5(6):e120. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18532874/>. Datum pristupa: 14.7.2024.
11. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*. 2011;5(2):124-36. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21482206/>. Datum pristupa: 14.7.2024.
12. Trindade FM, de Freitas MLP, Bittencourt FV. Dermoscopic evaluation of superficial spreading melanoma. *An Bras Dermatol*. 2021;96(2):139-147. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8007484/>. Datum pristupa: 14.7.2024.
13. Hall KH, Rapini RP. Acral Lentiginous Melanoma. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644539/>. Datum pristupa: 14.7.2024.
14. Bouceiro-Mendes R, Soares-de-Almeida L. Acral Amelanotic Melanoma. *Acta Med Port*. 2021;34(6):468.

15. Boada Garcia A, Quer Pi-Sunyer A, Richarz N, Jaka-Moreno A. Update on the Diagnosis and Management of Desmoplastic Melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2022;113(1):47-57. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35249710/>. Datum pristupa: 14.7.2024.
16. Puckett Y, Wilson AM, Thevenin C. *Cancer, Melanoma Pathology*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2020. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459367/>. Datum pristupa: 13.7.2024.
17. Ribero S, Stucci LS, Marra E, Marconcini R, Spagnolo F, Orgiano L, Picasso V, Queirolo P, Palmieri G, Quaglino P, Bataille V. Effect of Age on Melanoma Risk, Prognosis and Treatment Response. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(7):624-629.
18. Miligi L. Ultraviolet Radiation Exposure: Some Observations and Considerations, Focusing on Some Italian Experiences, on Cancer Risk, and Primary Prevention. *Environments.* 2020;7(2):10. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2076-3298/7/2/10>. Datum pristupa: 31.8.2024.
19. D'Ecclesiis O, Caini S, Martinoli C, Raimondi S, Gaiaschi C, Tosti G, et al. Gender-Dependent Specificities in Cutaneous Melanoma Predisposition, Risk Factors, Somatic Mutations, Prognostic and Predictive Factors: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2021;18(15):7945. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34360236/>. Datum pristupa: 31.8.2024.
20. Karagas MR. Use of Tanning Devices and Risk of Basal Cell and Squamous Cell Skin Cancers. *CancerSpectrum Knowledge Environment.* 2002;94(3):224–6. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11830612/>. Datum pristupa: 31.8.2024.

21. Castellani G, Buccarelli M, Arasi MB, Rossi S, Pisanu ME, Bellenghi M, Lintas C, Tabolacci C. BRAF Mutations in Melanoma: Biological Aspects, Therapeutic Implications, and Circulating Biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2023; 8;15(16):4026. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10452867/>. Datum pristupa: 31.8.2024.

22. Tas F, Erturk K. BRAF V600E mutation as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. *Dermatologic Therapy*. 2020;33:e13270.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Maja Golovrški

Datum i mjesto rođenja: 23. srpnja 2002., Nova Gradiška

Adresa: Bana Jelačića 3D, Nova Gradiška

Osnovnu (Osnovna škola Mato Lovrak) i srednju školu (Gimnazija Nova Gradiška) završila sam u Novoj Gradiški.

Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek upisala sam 2021. godine.

Aktivno govorim, čitam i pišem na engleskom jeziku.