

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Suzana Ožanić Bulić

**Utjecaj izraženosti E-kadherina i N-
kadherina u primarnom melanomu i
metastazama u limfnim čvorovima na
prognozu bolesti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju «Ljudevit Jurak» i u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC «Sestre milosrdnice», Zagreb

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Mirna Šitum

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Mirni Šitum, svojoj dragoj mentorici, te doc.dr.sc. Majdi Vučić na stručnoj pomoći i moralnoj podršci u provedbi ovog istraživanja. Također se zahvaljujem svim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju «Ljudevit Jurak», a osobito gospođi Jasni Matić na velikoj tehničkoj pomoći u izradi disertacije, kao i svojim dragim kolegama iz Klinike za kožne i spolne bolesti.

Ovaj rad je posvećen mojoj obitelji.

POPIS OZNAKA I KRATICA

E-kad	E-kadherin
N-kad	N-kadherin
PMK	primarni melanom kože
LN	limfni čvor
SSM	od engl. «superficial spreading melanoma»
NM	nodularni melanom
LMM	lentigo maligna melanom
ALM	akralni lentiginozni melanom
CDKN2A	od engl. «cycline-dependent kinase inhibitor 2A»
CDK4	ciklin ovisna kinaza 4
PTEN	od engl. «phosphatase and tensin homologue»
AJCC	od engl. «American Joint Cancer Comitee»
TIL	tumor-infiltrirajući limfociti
SLN	sentinel limfni čvor
CK1	kazein kinaza 1a
GSK3 β	glikogen sintaza kinaza 3 β
APC	od engl. «adenomatous polyposis colli protein»
LEF/TCF	od engl. «lymphoid enhancer factor-T-cell factor»
EMT	epitelno mezenhimalna tranzicija
ZEB1	od engl. «zinc finger E-box binding homeobox1»
WNT	od engl. «wingless-type mammary tumor virus integration site family»
MITF	od engl. «microphthalmia associated transcription factor»
CCND1	od engl. «cell-cycle mediator cyclin D1»

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Melanom	1
1.1.1. Epidemiologija melanoma	1
1.1.2. Etiologija melanoma i čimbenici rizika	1
1.1.3. Klinička slika melanoma	4
1.1.4. Klasifikacija melanoma	5
1.1.5. Prognostički čimbenici	10
1.2. Kadherini	17
1.2.1. Građa i funkcija kadherinsko-kateninskog sustava	18
1.2.1.1. E-kadherin	18
1.2.1.2. β -katenin	19
1.2.2. Regulacija kadherinsko-kateninskog sustava	20
1.2.3. Regulacija izraženosti E-kadherina	20
1.2.4. EMT	21
1.2.5. N-kadherin	23
1.2.6. WNT signalni put	24
1.2.7. Prognostička uloga kadherina u melanomu	26
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
2.1. Hipoteza	29
2.2. Ciljevi istraživanja	29
3. BOLESNICI I METODE	30
3.1. Bolesnici	30
3.2. Metode	30
3.2.1. Imunohistokemijska analiza	30
3.2.2. Procjena izraženosti E-kadherina i N-kadherina u primarnom melanomu kože i metastazama melanoma u limfnim čvorovima	31
3.3 Statistička obrada podataka	32
4. REZULTATI	33
5. RASPRAVA	70
6. ZAKLJUČCI	76
7. SAŽETAK	78
8. SUMMARY	80
9. LITERATURA	81
10. ŽIVOTOPIS	92

1 UVOD

1.1 MELANOM

1.1.1 Epidemiologija melanoma

Melanom je zloćudni tumor podrijetlom iz melanocita, izrazito agresivnog ponašanja i visokog potencijala metastaziranja. Premda čini samo 4% tumora kože, odgovoran je za 80% smrtnih ishoda od svih kožnih tumora, a samo 14% bolesnika s metastazama preživi pet godina (1). Melanom je isto tako drugi najčešći tumor u mlađoj populaciji, životne dobi 20-39 godina, stoga su pokušaji poboljšanja ishoda bolesti od velikog značaja za preživljenje bolesnika (2). Epidemiološki trendovi ukazuju na izraziti porast incidencije tankih (<1 mm) melanoma, što je povezano s poboljšanom prevencijom i dermatoskopskim otkrivanjem ranih promjena unutar samih nevusa (3). Usporedo s tim činjenicama nema pratećeg porasta mortaliteta ili incidencije debelih melanoma, što se objašnjava postojanjem podskupine sporo rastućih melanoma.

1.1.2 Etiologija melanoma i čimbenici rizika

Melanom je posljedica interakcije genetske predispozicije pojedinca i okoline u kojoj živi. Najznačajniji čimbenici rizika u nastanku melanoma su prethodno dijagnosticirani melanom u bolesnika, članovi obitelji oboljeli od melanoma, nevusi veći od 5 mm i prisutnost više od 50 dobroćudnih nevusa ili više od 5 atipičnih nevusa. Dodatne čimbenike rizika predstavljaju imunosupresija, osjetljivost kože na sunce (tip kože I i II prema Fitzpatricku) i izlaganje ultraljubičastim (UV) zrakama, osobito pojava opekline nakon intermitentne UV ekspozicije. Svaki je od navedenih čimbenika rizika u uskoj vezi s genetskom predispozicijom pojedinca ili stresnim čimbenicima iz okoline kojima je pojedinac izložen, a melanom je posljedica njihove interakcije tijekom života (1). Do 5% bolesnika s melanomom ima oboljelog člana uže obitelji, a u 25-40%

članova obitelji sklonih melanomu, genskom analizom su dokazane mutacije ciklin ovisne kinaze inhibitora 2A (CDKN2A) ili ciklin ovisne kinaze 4 (CDK4) (4). Produkti gena CDKN2A su tumor supresorski proteini p16 i p19, stoga mutacija gena CDKN2A (kromosom 9p21) povećava vjerojatnost pojave *de novo* melanoma ili melanoma u postojećem nevasu. Osim gena CDKN2A, važni geni u razvoju melanoma su ciklin ovisna kinaza 4 (CDK4) i ciklin D1 (CCND1), promotori proliferacije stanica, te onkogeni N-RAS i BRAF. Osobito je kod akralnih melanoma zapažena amplifikacija gena CCND1 i prekomjerna izraženost proteina ciklin D1 (5). Stoga se brojna istraživanja danas bave ulogom onkogeni u poremećaju regulacije proliferacije stanica, ali i apoptoze u melanomu. Produkti onkogeni su razni citokini, čimbenici rasta i njihovi receptori, te proteini uključeni u signalne putove koji dovode do diobe stanica. Novija istraživanja su isto tako usmjerena na gene, poput BCL-2, koji inhibirajući apoptozu stanica pokazuju svoj onkogeni učinak (6).

U 25-50% bolesnika sa sporadičnim melanomom, odnosno negativnom obiteljskom anamnezom, mutacijom je inaktiviran PTEN lokus na kromosomu 10. PTEN je tumor-supresorski gen, homolog fosfataze i tenzina, produkti kojeg smanjuju prijenos signala u stanici djelujući na čimbenike rasta koji koriste fosfatidil inozitol fosfat (PIP) kao unutarstanični signal. U prisustvu PTEN-a, razina PIP-a je niska, a posljedica je inhibicija proliferacije stanica (1). Stoga mutacija CDKN2A ili PTEN predstavlja samo jedan molekularni korak na putu razvoja melanoma, no izravno povećava vjerojatnost maligne alteracije nevasa ili *de novo* pojave melanoma.

Ultraljubičasto svjetlo (UV) ima brojne učinke na kožu uključujući fotostarenje, imunosupresivno djelovanje, oštećenje DNA i tamnjenje kože. Tamnjenje kože je obrambeni proces koji obuhvaća sintezu melanina u melanocitima, prijenos melanina u keratinocite u kojima melanin apsorbira energiju UV svjetla i štiti kožu od oštećenja (7). Konstitucijska pigmentacija kože predstavlja evolucijski mehanizam zaštite od sunčevih zraka (UV), za razliku od fakultativne pigmentacije koja pruža samo skromnu zaštitu (SPF 2) od štetnih UV zraka, dovodeći istovremeno do trajnog oštećenja DNA. Na molekularnoj razini,

izlaganje UV svjetlu pojačava pigmentaciju kože vezanjem α -melanocitnog stimulirajućeg hormona (α -MSH) na njegov receptor, melanokortin receptor 1 (MC1R). Time dolazi do prijenosa signala u stanicu, posljedica kojeg je pojačana izraženost enzima ključnih u proizvodnji melanina. Osobe svijetle puti često imaju polimorfizme gena MC1R, a time i smanjenu aktivnost samog MC1R (8). Novootkrivena molekulska veza između oštećenja DNA i tamnjenja putem p53/MC1R signalnog puta jasno pokazuje da je posljedica namjernog tamnjenja, bilo kojim izvorom UV zraka, trajno oštećenje DNA gena (9).

Klinička zapažanja poput potpune ili djelomične regresije melanoma, pojave depigmentacija nalik vitiligu i halo nevusa, kao i učestalija pojava melanoma u imunosuprimiranih bolesnika, upućuju na činjenicu da je melanom imunogeni tumor (10). Spoznaje o molekulskim karakteristikama melanomskih antigena prepoznatih od strane autolognih T-limfocita ili protutijela, dovele su do velikog pomaka u razumijevanju prepoznavanja i odbacivanja tumora od strane imunološkog sustava domaćina. Glavni, do sada otkriveni melanomski antigeni se mogu podijeliti u tri skupine: mutirani antigeni (npr. mutirani p16, produkt gena CDKN2A), tumor specifični antigeni zajednički melanomu i karcinomima (npr. Mage-1,-3, S100 β) i diferencijacijski antigeni (npr. tirozinaza, gp100, MelanA/Mart-1). Izraženost navedenih antigena može se pratiti *in situ*, na razini proteina, uporabom monoklonskih protutijela. Navedeni tumorski proteini se prerađuju u stanici i prezentiraju na površini melanomske stanice kao MHC/peptidni kompleksi koje CD8+ citotoksični T-limfociti prepoznaju i nakon aktivacije ubijaju otpuštanjem citotoksičnih granula perforina i granzima B ili aktivacijom FAS/TNF putova. CD8+ stanice su glavne efektorske stanice specifičnog imunološkog odgovora usmjerenog na stanice melanoma. Isto tako ključnu ulogu u imunološkom odgovoru imaju i CD4+ pomagačke T-stanice kao i protutijela. Aktivacija specifičnih melanomskih CD8+ T-limfocita ovisi o migraciji dendritičkih stanica, profesionalnih antigen prezentirajućih stanica, na površini kojih je došlo do izraženosti melanomskih antigena, od mjesta primarnog tumorskog sijela do regionalnih limfnih čvorova. U limfnim čvorovima se tumorske stanice prezentiraju CD8+ T-limfocitima u prisustvu kostimulacijskih molekula, a

zajedno dovode do aktivacije citotoksičnih CD8+ T-limfocita. Često dolazi do pokretanja mehanizama koji omogućavaju tumoru da izbjegne imunološki odgovor organizma, poput gubitka tumor-specifičnih antigena, gubitka molekula MHC razreda I, ali i sekrecije citokina koji inhibiraju imunološki odgovor, poput IL-10 i TGF-beta (11). Stoga uvid u imunološki odgovor domaćina na melanomske antigene predstavlja inovativni pristup u liječenju melanoma.

1.1.3 Klinička slika melanoma

Primarni melanom kože (PMK) dijelimo na površinsko šireći melanom (SSM – engl. superficial spreading melanoma), nodularni melanom (NM), lentigo maligna melanom (LMM) i akralni lentiginozni melanom (ALM). Pojedini oblici se razlikuju ovisno o histološkom načinu rasta tumorskih stanica, anatomskoj lokalizaciji tumora i stupnju oštećenja stanica UV zrakama. Premda nije poznat utjecaj vrste melanoma na prognozu bolesti, molekulske analize su pokazale razlike u načinima stanične smrti, izraženosti onkogeni, amplifikaciji gena i učestalosti BRAF mutacija u četiri glavne histološke vrste melanoma (12).

Površinsko šireći melanom je najčešći oblik melanoma, a obuhvaća 60 do 70% svih primarnih melanoma kože. Javlja se najčešće u osoba životne dobi od 30 do 50 godina, uglavnom na koži trupa kod muškaraca, a na donjim ekstremitetima kod žena. Tumor je uglavnom veći od 6 mm, asimetričnog izgleda i u razini kože. U patohistološkoj slici tijekom spore, radialne faze rasta prevladavaju pagetoidno raštrkani, atipični melanociti u epidermisu, a potom može uslijediti vertikalna faza rasta, uz pojavu pigmentirane papule ili nodusa na površini kože. SSM se najčešće pojavljuje na mjestima intermitentne, pojačane UV ekspozicije. Nodularni melanom se javlja u 15-30% oboljelih od melanoma, na bilo kojem dijelu tijela, uz nešto veću učestalost kod muškaraca, osobito na koži trupa. Karakteriziran je brzim rastom tumorske mase, posljedica koje je pojava debelih, ulceriranih melanoma s lošom prognozom. U histološkoj slici se vidi vertikalna faza rasta tumora. LMM obuhvaća 5-15% svih primarnih melanoma kože. Najčešće se vidi na koži kronično oštećenoj djelovanjem UV

zraka, kao što su lice, vrat i ruke, u osoba svijetle puti, uglavnom nakon navršene 65. godine života. Karakteriziran je sporim rastom *in situ* promjene koja je obično veličine 1-3 cm a raste tijekom 10-15 godina. Histološki se radi o dominantno junkcijskoj konfluirajućoj proliferaciji melanocita uz širenje na okolne adneksalne strukture, a često je u preparatu prisutna solarna elastoza. Akralni lentiginozni melanom (ALM) obuhvaća 5-10% melanoma, a uglavnom je lokaliziran na dlanovima, tabanima, ali i subungvalno, osobito u osoba u sedmom desetljeću života. Najčešći je oblik melanoma u osoba tamne puti, a zbog kasne dijagnoze često ima lošu prognozu. Rijetki oblici melanoma su dezmozoplastični ili neurotropni melanom, melanom sluznica, maligni plavi nevus (od engl. blue nevus) i melanom u gigantskom kongenitalnom melanocitičnom nevusu. Amelanotični melanom čini manje od 5% melanoma, a klinički oponaša nepigmentirane karcinome kože ili druge dobroćudne kožne promjene. Zbog izrazito slabe diferencijacije stanica, izostaje sinteza melanina, što otežava njegovo rano otkrivanje.

1.1.4 Klasifikacija melanoma

Pri postavljanju dijagnoze melanoma neophodno je provesti određivanje proširenosti bolesti, tzv. staging, u kojem ključnu ulogu ima histološka evaluacija melanoma. Staging melanoma se radi prema AJCC (American Joint Cancer Comitee) kriterijima koji dijele melanom u četiri stadija. Stadij I i II čini lokalizirani melanom, stadij III obuhvaća regionalne metastaze, a stadij IV udaljene metastaze. Svaki stadij koristi TNM klasifikaciju. Stadij I tumora obuhvaća bolesnike s primarnim melanomom kože debljine ≤ 1 mm, bez metastaza. Dalje se stadij I dijeli na IA (T1a N0 M0) u koji se ubrajaju bolesnici s tumorom debljine ≤ 1 mm, bez ulceracije na površini i bez invazije retikularnog dermisa ili potkožnog masnog tkiva (Clarkov stupanj II ili III) i bez mitoz. Stadij IB (T1b ili T2a N0 M0) obuhvaća bolesnike s tumorom debljine ≤ 1 mm, ulcerirane površine ili stupnja invazije po Clarku IV ili V (T1b) ili bolesnike s melanomom debljine 1,01 do 2,0 mm, bez ulceracije na površini i ≥ 1 mitozom na mm^2 . Stadij II obuhvaća

bolesnike debljeg primarnog tumora, bez metastaza. Stadij IIA (T2b ili T3a N0 M0) obuhvaća bolesnike čiji je primarni tumor debljine 1,01 do 2,0 mm ulcerirane površine (T2b) ili bolesnike čije je primarni tumor debljine 2,01 do 4,0 mm bez ulceracije na površini (T3a). Stadij IIB (T3b ili T4a N0 M0) obuhvaća bolesnike čiji je primarni tumor debljine 2,01 do 4,0 mm ulcerirane površine (T3b) ili bolesnike čiji je primarni tumor deblji od 4,0 mm bez ulceracije (T4a). Stadij IIC (T4b N0 M0) obuhvaća bolesnike čiji je primarni melanom ulcerirane površine i debljine preko 4,0 mm. U stadiju III dolazi do širenja melanoma u regionalne limfne čvorove i/ili su prisutne *in transit* ili satelitske metastaze. Stadij IIIA (T1-4a N1a ili N2a M0) obuhvaća bolesnike bilo koje debljine primarnog melanoma bez ulceracije, mikrometastaze su prisutne u 1 do 3 čvora, a dijagnosticirane su biopsijom sentinel čvora ili elektivnom limfadenektomijom. Stadij IIIB (T1-4b N1a ili N2a M0, T1-4a N1b ili N2b M0 ili T1-4a/b N2c M0) obuhvaća bolesnike bilo koje debljine primarnog tumora, ulcerirane površine, u kojih su mikrometastazama zahvaćena 1 do 3 čvora ili bolesnike bilo koje debljine primarnog melanoma bez ulceracije, a u kojih su makroskopskim metastazama zahvaćena 1 do 3 čvora što je zabilježeno tijekom kliničkog pregleda ili u radiološkom nalazu, a potvrđeno histološki terapijskom limfadenektomijom ili bolesnike s nodalnim metastazama uz ekstrakapsularno širenje tumorske mase. Isto tako se u stadij IIIB ubrajaju bolesnici bilo koje debljine primarnog melanoma sa ili bez ulceracije, a u kojih su dokazane *in transit* ili satelitske metastaze, no bez zahvaćenosti limfnih čvorova metastazama. Stadij IIIC (T1-4b N1b M0, T1-4b N2b M0 ili bilo koji T N3 M0) obuhvaća bolesnike bilo koje debljine primarnog melanoma ulcerirane površine, a kod kojih su makroskopskim metastazama zahvaćena 1 do 3 limfna čvora (N1b ili N2b) ili bolesnike bilo koje debljine primarnog tumora s ili bez ulceracije na površini i s 4 ili više metastazama zahvaćena limfna čvora, limfna čvora mutnog izgleda ili zahvaćena *in transit* ili satelitskim metastazama u prisustvu metastatskog čvora ili čvorova (N3). Stadij IV tumora označava širenje melanoma na udaljene lokalizacije, uključujući kožu, potkožno masno tkivo, limfne čvorove i druge organe. Stadij IV je podijeljen na tri stupnja ovisno o M statusu. M1a (bilo koji T, N) obuhvaća bolesnike bilo koje

debljine primarnog tumora, s ili bez ulceracije, s ili bez zahvaćenosti limfnih čvorova, ali s udaljenim metastazama na koži, u potkožnom masnom tkivu ili u limfnim čvorovima i urednim vrijednostima laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu. M1b (bilo koji T, N) obuhvaća bolesnike istih kriterija kao M1a, ali koji imaju metastaze u plućima i uredne vrijednosti LDH. M1c (bilo koji T, N) obuhvaća bolesnike s istim kriterijima kao M1a, ali koji imaju metastaze u bilo kojem visceralnom organu i uredne vrijednosti LDH ili bolesnike s udaljenim metastazama bez obzira na lokalizaciju, no s povišenim vrijednostima LDH.

Novi AJCC staging sustav iz 2009. godine razlikuje se od prethodnog po nekoliko kriterija. U bolesnika s lokaliziranim melanomom, debljina tumora, broj mitozâ (histološki definirane kao mitoze/mm²) i ulceracija su najvažniji prognostički čimbenici. Broj mitozâ zamjenjuje stupanj invazije po Clarku kao primarni kriterij u definiciji T1b melanoma. U bolesnika s regionalnim metastazama, N kategorija je definirana brojem metastatskih čvorova, veličinom tumorske mase i ulceracijom površine primarnog melanoma kože. U svrhu staginga, svi bolesnici s mikroskopskim nodalnim metastazama su, bez obzira na veličinu tumorske mase, klasificirani u stadij III. U ovu skupinu su osobito uključene mikrometastaze otkrivene imunohistokemijskim metodama, korištenjem biljega poput HMB-45, Melan-A/MART-1 i S-100 proteina. Na temelju multivarijantnih analiza bolesnika s udaljenim metastazama, dvije glavne komponente u definiciji M kategorije ostaju lokalizacija udaljenih metastaza (ne-visceralne metastaze, metastaze u plućima, metastaze u svim drugim visceralnim organima) i povišene vrijednosti laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu (13).

Ukratko, revidirani AJCC sustav staginga za melanom se temelji isključivo na prikupljenim podacima iz AJCC baze podataka, a odraz je poboljšanog razumijevanja bolesti. TNM klasifikacija melanoma je u skladu sa sedmim izdanjem AJCC staging priručnika definirana u Tablici 1, a pojedine staging skupine su definirane u Tablici 2 koja objedinjuje kliničku i patološku klasifikaciju melanoma (13). Klinička klasifikacija obuhvaća mikro staging primarnog melanoma i kliničku ili radiološku obradu kojom se isključuje, odnosno potvrđuje

postojanje metastaza. Prema dogovorenom algoritmu koristi se nakon što je primarni melanom u cijelosti odstranjen, te nakon učinjene kliničke procjene o prisutnosti lokalnih i udaljenih metastaza. Patološka klasifikacija obuhvaća mikrostaging primarnog melanoma i patohistološki nalaz regionalnih limfnih čvorova nakon biopsije sentinel limfnog čvora ili potpune limfadenektomije.

Tablica 1. TNM klasifikacija melanoma prema American Joint Committee on Cancer - AJCC, 2009.g. (13)

T klasifikacija	Debljina tm (mm)	Ulceracija
Tis	NP	NP
T1	≤ 1,00	a: Bez ulceracije i mitoze < 1/mm ² b: S ulceracijom ili mitoze ≥ 1/mm ²
T2	1,01-2,00	a: Bez ulceracije b: S ulceracijom
T3	2,01-4,00	a: Bez ulceracije b: S ulceracijom
T4	> 4,00	a: Bez ulceracije b: S ulceracijom
N klasifikacija	Br. metastatskih limfnih čvorova	Metastaze limfnih čvorova
N0	0	NP
N1	1	a: Mikrometastaze* b: Makrometastaze [†]
N2	2-3	a: Mikrometastaze* b: Makrometastaze [†] c: In-transit metastaze/sateliti bez metastazama zahvaćenih limfnih čvorova
N3	≥ 4 metastatska čvora ili zamućeni čvorovi ili in-transit metastaze/sateliti i metastatski čvorovi	

M klasifikacija	Lokalizacija	LDH u serumu
M0	Bez udaljenih metastaza	NP
M1a	Udaljene metastaze na koži, u potkožnom masnom tkivu ili u limfnim čvorovima	Uredne vrijednosti
M1b	Plućne metastaze	Uredne vrijednosti
M1c	Ostale visceralne metastaze	Uredne vrijednosti
	Bilo koja udaljena metastaza	Povišene vrijednosti
<p>Kratice: NP, nije primjenjivo; LDH, laktat dehidrogenaza; Tis, tumor <i>in situ</i></p> <p>*Mikrometastaze - dijagnosticirane nakon biopsije sentinel limfnih čvorova.</p> <p>†Makrometastaze - patohistološki potvrđene klinički vidljive metastaze melanoma u limfnom čvoru.</p>		

Tablica 2. Klinička i patološka klasifikacija melanoma (13)

	Klinička klasifikacija				Patološka klasifikacija		
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Svi T	N>N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
				IIIC	T1-4a	N2c	M0
					T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
	Svi T	N3	M0				
IV	Svi T	Svi N	M1	IV	Svi T	Svi N	M1

1.1.5 Prognošički čimbenici

Rizik od lokalnog recidiva melanoma je velik čak i u bolesnika s adekvatno provedenom kirurškom terapijom, stoga je identifikacija nezavisnih prognošičkih čimbenika uz staging pri postavljanju dijagnoze prioritet mnogih kliničkih ispitivanja (14). Poznato je devet nezavisnih prognošičkih čimbenika za maligni

melanom: Breslow debljina tumora, Clarkov stupanj invazije, ulceracija površine tumora, infiltracija tumora limfocitima, prisustvo mikrosatelitskih promjena, stupanj vaskularne i/ili limfocitne invazije, broj mitozna, dob bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze i spol.

Debljina tumora po Breslowu

Dubina invazije tumora, nazvana po Breslowu, mjeri se optičkom kamerom u milimetrima od vrha zrnatog sloja epidermisa do najudaljenijih malignih stanica, odnosno najveće dubine do koje tumor dopire (15). Debljina ulceriranih melanoma se mjeri od dna ulceracije. Za tumore koji tvore ovojnice oko adneksa, debljina invazije se ne mjeri, osim u slučaju kada se melanom širi na susjedni retikularni dermis, Breslow se mjeri na uobičajeni način. U slučaju histološke regresije, mjeri se debljina rezidualnog melanoma. Isto tako se ne mjeri debljina mikrosatelitskih lezija. Postoje četiri stupnja po Breslowu. U stupanj I pripadaju tumori debljine do 0,75 mm, u stupanj II debljine 0,76-1,5 mm, stupanj III debljine 1,51-4,0 mm, a svi tumori deblji od 4 mm pripadaju stupnju IV (16). Prema AJCC klasifikaciji u TNM stagingu se koriste debljine tumora od 1,0 mm, 2,0 mm i 4,0 mm kao granica između pojedinih stadija. Melanom debljine ≤ 1 mm smatra se melanomom niskog rizika metastaziranja, a melanom > 1 mm visokog rizika metastaziranja. U skladu s time najbolju prognozu imaju bolesnici u prvom stadiju, 79-83% desetogodišnje preživljenje, a najlošiju u četvrtom stadiju 3-16% desetogodišnje preživljenje (17).

Clarkov stupanj invazije

Prema Clarkovoj klasifikaciji postoji pet stupnjeva melanoma. Stupanj I obuhvaća tumore ograničene na epidermis (melanoma *in situ*), stupanj II tumore koji infiltriraju gornji dio papilarnog dermisa, stupanj III tumore koji ispunjavaju papilarni dermis, stupanj IV tumore koji zahvaćaju retikularni dermis, a u stupnju V tumorska masa prodire u potkožno masno tkivo (16). Clarkov stupanj invazije

dermisa danas se smatra manje pouzdanim pokazateljem prognoze melanoma, stoga se koristi samo u definiciji T1b melanoma kada se broj mitoza ne može odrediti u T1 melanomu bez ulceracije na površini (17).

Ulceracija površine melanoma

Ulceracija površine tumora ima prognostičko značenje, a definirana je gubitkom intaktnog epidermisa iznad većeg dijela primarnog melanoma kože. Osim izgledom epidermisa, postojanje ulceracije se potvrđuje i mikroskopski kao gubitak pune debljine epidermisa uz prisutnost reaktivnih promjena poput fibrinoznog eksudata ili akantozne priležećeg epidermisa, na temelju kojih razlikujemo pravu ulceraciju od artefakta (17). Bolesnici s ulceriranim melanomom imaju isto preživljenje kao bolesnici s melanomom bez ulceracije, ali debljeg primarnog tumora (svrstani su u viši T razred). Prisutnost ulceracije se stoga smatra lošim prognostičkim znakom.

Infiltracija tumora limfocitima

Melanom je često prožet tumor infiltrirajućim limfocitima (TIL), uglavnom citotoksičnim T-limfocitima, koji su rezultat imunološkog odgovora organizma na izrazito imunogene stanice melanoma. Tumor infiltrirajući limfociti i njihovi produkti imaju ključnu ulogu u T-stanicama potaknutoj regresiji melanoma i važan su prediktor preživljenja. Prisustvo TIL ne označava samo povoljan prognostički čimbenik, već predstavlja temelj mogućeg imunološkog nadzora tumora i imunoterapijske strategije (18) Infiltracija tumora limfocitima se označava ovisno o gustoći infiltrata kao oskudan, srednje gusti i gusti infiltrat limfocita. Multivarijatne analize debljine tumora, broja mitoza i TIL su pokazale da su upravo debljina tumora i TIL značajni nezavisni prognostički čimbenici za melanom.

Mitotska aktivnost melanoma

Broj mitozata je značajan nezavisni prognostički čimbenik u skupini bolesnika s tankim i debelim melanomima. Označava se kao broj mitozata na kvadratni milimetar velikog vidnog polja u dijelu tumora s najvećom mitotskom aktivnošću. Upravo podatak o mitotskoj aktivnosti tumora omogućava precizniji staging melanoma i točniju definiciju rizičnih kategorija za bolesnike u kliničkim ispitivanjima (19). Mitotska aktivnost se prati isključivo u vertikalnoj fazi rasta melanoma. Prisutnost više od 6 mitozata na mm^2 smatra se visokim mitotskim indeksom, a ukazuje na veću proliferativnu sposobnost tumora i time lošiju prognozu. Mitotski indeks je uvršten kao prognostički čimbenik u AJCC klasifikaciju iz 2009. godine. Razlika u stadiju T1a i T1b je osim u prisustvu ulceracije i u broju mitozata, T1a stadij ima <1 mitoze / mm^2 , dok T1b stadij ima ≥ 1 mitoze / mm^2 (13).

Satelitske lezije i *in transit* metastaze

Satelitske lezije su važan prognostički čimbenik za melanom. Mikrosateliti su otočići tumora u dermisu ili potkožnom masnom tkivu, promjera većeg od 0,05 mm, a odvojeni su od primarnog melanoma urednim kolagenom debljine najmanje 0,3 mm (tj. zdravom stromom). Isto tako ne smiju biti odvojeni od glavne tumorske mase područjem skleroze tumora u regresiji (20). *In transit* metastaze su diskontinuirani otočići tumora udaljeni više od 2 cm od primarnog tumora. Nema razlike u preživljenju između skupina bolesnika s mikrosatelitima i *in transit* metastazama (21). Mikro ili makrosatelitske promjene i *in transit* metastaze smatraju se intralimfatičkim metastazama i nepovoljan su prognostički čimbenik (22). Mikrosateliti stoga ukazuju na povećanu vjerojatnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima u oboljelih od melanoma.

Regresija tumora

Melanom je tumor sklon regresiji upravo zbog visokog imunogenog potencijala. U histološkom nalazu melanoma u regresiji nedostaju atipični melanociti u epidermisu i dermisu. U dermisu se vidi fibroza, infiltrati limfocita u uskom kontaktu s tumorskim stanicama i melanofazi. Rijetka je potpuna regresija melanoma, no upravo se time može objasniti postojanje metastaza bez primarnog tumora u pojedinih bolesnika (23). U slučaju potpune regresije melanoma ili regresije tumorske mase za više od 75%, prognoza bolesti je lošija, osobito kod tankih melanoma. Spontana regresija se najčešće javlja tijekom radijalne faze rasta tumora, što omogućava pojavu sljedeće, vertikalne faze rasta tumora, s obzirom da je tumor izbjegao obrambeni imunološki mehanizam bolesnika (21).

Angiolimfatična invazija i angiotropizam

Infiltracija limfnih i krvnih žila s tumorskim stanicama rijetko se vidi u melanomu, no s obzirom da ukazuje na povećani metastatski potencijal tumora, neophodno ju je navesti u patohistološkom nalazu (24).

Perineuralna infiltracija

Perineuralna infiltracija je obično prisutna u dezmoplastičnih melanoma, javlja se ispod glavne tumorske mase, a povezana je s visokim postotkom lokalnih recidiva (25).

Histološka vrsta melanoma

Histološka vrsta melanoma (SSM, NM, LMM i ALM) se ne smatra značajnim prognostičkim čimbenikom za melanom. Ponovno je izuzetak

dezmoplastični melanom s ili bez neurotropizma zbog specifičnog biološkog ponašanja i kliničkog ishoda (26).

Biopsija sentinel limfnog čvora

Biopsija sentinel limfnog čvora (SLN) danas se primjenjuje u oboljelih od melanoma debljine ≥ 1 mm. Premda se biopsijom SLN smanjuje rizik recidiva u limfnim čvorovima, visok morbiditet nakon zahvata često nije opravdan pozitivnim utjecajem na preživljenje. Limfadenektomija nakon pozitivne biopsije SLN produžuje preživljenje bez pojave bolesti (engl. disease free survival), no ne utječe na ukupni mortalitet. Prema kliničkim ispitivanjima, od svih bolesnika s melanomom srednje debljine i klinički urednim limfnim čvorovima, 80-85% će imati uredan histološki nalaz nakon biopsije SLN (27). Samo će se u približno 20% SLN pozitivnih bolesnika nakon disekcije naći pozitivni limfni čvorovi. Stoga će 96% bolesnika s melanomom debljine 1-2 mm biti nepotrebno izloženo disekciji limfnih čvorova, a kod 12-14% će se pojaviti barem jedna od postoperativnih komplikacija poput limfedema, neuralnih ispada i boli (2). Iz navedenog se može zaključiti da biopsija SLN ima pozitivan učinak samo na preživljenje skupine bolesnika s mikroskopskim metastazama u limfnim čvorovima i opravdano se koristi kao pomoćna metoda u stagingu bolesnika sa srednje debelim melanomom i povećanim rizikom od metastaza u limfnim čvorovima.

Dob bolesnika

Od preostalih prognostičkih čimbenika potrebno je spomenuti dob bolesnika. U većini istraživanja uočena je lošija prognoza melanoma u bolesnika starije životne dobi u trenutku postavljanja dijagnoze. Razlog je vjerojatno u tome što se starenjem povećava incidencija drugih čimbenika koji negativno utječu na ishod bolesti. Isto tako je uočena veća debljina tumora, prisustvo ulceracije, ali i regresije u melanomu osoba starije životne dobi (28). Dob kao prognostički

čimbenik ima različito značenje kod djece, mlađi od 10 godina češće umiru od melanoma u usporedbi s djecom starijom od 10 godina (29).

Spol bolesnika

Prognoza melanoma je lošija kod muškaraca, osobito u stadiju bolesti I ili II. To je dijelom objašnjeno većim postotkom akralnih melanoma s lošijom prognozom, ali i kasnijom dijagnozom tumora koji su tada već u uznapredovaloj fazi rasta (21). Protektivni učinak ženskog spola još uvijek nije do kraja razjašnjen. Prema nekim objašnjenjima žene se javljaju ranije na pregled stoga je debljina melanoma manja u trenutku postavljanja dijagnoze. Drugi autori objašnjavaju bolju prognozu kod žena zbog različite anatomske lokalizacije melanoma kod muškaraca i žena (trup nasuprot ekstremiteta) (21).

Anatomska lokalizacija melanoma

U skladu s rezultatima brojnih ispitivanja melanom na koži ekstremiteta ima bolju prognozu od melanoma na trupu. U nekoliko preglednih članaka su prikazane razlike u preživljenju bolesnika s melanomom uzevši u obzir 24 različite lokalizacije na koži trupa i ekstremiteta. Premda su srednji ili donji dio leđa, supramamarne i mamarne regije povezane s većim mortalitetom u usporedbi s melanomom lokaliziranim na koži gornjeg ili srednjeg abdomena, nije zabilježena statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika iz obje skupine, čak niti u kombinaciji s drugim nezavisnim prognostičkim čimbenicima. Stoga se anatomska lokalizacija melanoma danas ne smatra nezavisnim prognostičkim čimbenikom za melanom (30).

1.2 KADHERINI

U bolesnika s melanomom, kao i u oboljelih od drugih karcinoma, uočena je povezanost izraženosti različitih gena s prognozom bolesti u histološki identičnih tumora, stoga je većina ispitivanja usmjerena na identifikaciju proteina izraženost kojih bi mogla utjecati na prognozu bolesti, neovisno o poznatim kliničkim kriterijima. To se osobito odnosi na identifikaciju specifičnih molekula i njihov utjecaj na metastaziranje tumora, kao i usmjeravanje terapijskih postupaka prema ovim čimbenicima. Invazija i metastatsko širenje melanoma je dijelom posljedica promjena u adheziji i komunikaciji između neoplastičnih i normalnih stanica u njihovoj neposrednoj okolini. Keratinociti kontroliraju rast melanocita na više načina, izvanstaničnom komunikacijom putem parakrinih čimbenika rasta, unutarstaničnim prijenosom signala i međustaničnom komunikacijom preko adhezivnih molekula koje povezuju dvije stanice ili stanicu sa stromom, te putem gap spojeva (31).

Stanice melanoma mogu izbjeći keratinocitima reguliranu kontrolu rasta na nekoliko načina, smanjenjem izraženosti transmembranskih proteina odgovornih za komunikaciju i adheziju s keratinocitima (npr. E-kadherin), povećanjem izraženosti receptora i signalnih putova koji se ne nalaze na melanocitima, a važni su u interakcijama stanica melanoma međusobno, ali i s fibroblastima (npr. N-kadherin i Mel-CAM) i gubitkom veze s bazalnom membranom zbog promijenjene izraženosti integrina u izvanstaničnom matriksu. Upravo kadherini određuju lokalizaciju melanocita u koži (32). Na primjeru mišjeg modela je pokazano da melanociti migriraju u epidermis u kojem se izraženost E-kadherina povećava 200 puta. Potom dolazi do pada E-kadherina, a melanociti napuštaju epidermis i migriraju u folikule dlaka i dermis. U folikulu dlaka dolazi do povećane izraženosti P-kadherina uz nizak ili odsutan E-kadherin, dok je u dermisu izražen samo N-kadherin na melanocitima (33). Kod ljudi je E-kadherin prisutan na površini keratinocita i melanocita, N-kadherin je prisutan u fibroblastima i endotelnim stanicama, a placentarni P-kadherin je izražen u bazalnom sloju epidermisa (34-36). Izraženost klasičnih kadherina (E, N i P-kadherin) je u

organizmu tkivno specifična, stanično specifična, ali i ovisna o razvojnem putu stanica tijekom embriogeneze. Ostali članovi kadherinske obitelji obuhvaćaju dezmosomalne kadherine poput dezmozokolina i dezmozogleina.

Izraženost kadherina se razlikuje u pojedinim vrstama nevusa, ali i u melanomu. Površinski dijelovi nevusa pokazuju heterogenu membransku E-kadherinsku imunoreaktivnost, kod junkcijskih nevusa je prisutna heterogena ili difuzna citoplazmatska E-kadherinska aktivnost, dok stanice melanoma, uz nekoliko izuzetaka, gube E-kadherinsku imunoreaktivnost (37-39). Stoga se smatra da sustav kadherina ima ključnu ulogu u razvoju melanoma i njegova metastatskog potencijala.

1.2.1 Građa i funkcija kadherinsko-kateninskog sustava

1.2.1.1 E-kadherin

E-kadherin je transmembranska stanična adhezijska glikoproteinska molekula prisutna u većini tkiva koja preko Ca^{++} ovisnih homofilnih veza sudjeluje u stvaranju međustaničnih pričvrstnih spojeva vežući se za izvanstaničnu domenu E-kadherinske molekule druge stanice. Sastoji se od izvanstaničnog veznog dijela, transmembranskog dijela, te citoplazmatske domene. Izvanstanična domena se sastoji od 5 ponovljenih jedinica od 110 aminokiselina, a čini lateralne dimere na površini stanice koji u interakciji s dimerima susjedne stanice stvaraju zatvaraču slične strukture (40). Transmembranska domena se veže za p120ctn, uloga kojeg u kadherinsko-kateninskom kompleksu nije potpuno jasna, no vjerojatno doprinosi unakrsnom povezivanju kadherina i stabilizaciji dimera (41). Citoplazmatska domena E-kadherinske molekule se preko karboksi-terminalnog dijela veže za β -katenin ili γ -katenin, poznat i kao plakoglobin. Oba ova proteina se preko amino-terminalnog dijela α -katenina vežu za aktinske filamente citoskeleta dajući mehaničku stabilnost stanici. Upravo je α -katenin ključan za vezanje na F-aktin, što predstavlja kritičan proces u koordinaciji dinamike aktina u stanici. Vezanje β -katenina i E-kadherinskog citoplazmatskog nastavka se

ostvaruje putem armadillo ponavljajućih sljedova. Afinitet se za ovu ključnu interakciju povećava fosforilacijom nekoliko serinskih ostataka kadherinskog nastavka, a smanjuje fosforilacijom β -katenina (42). Strukturno, kadherini i katenini čine visoko organizirane komplekse koji povezuju susjedne stanice i njihove citoskeletne mreže. Pojačana izraženost kadherina u stanicama sisavaca dovodi do povećanja međustanične adhezije (43), a poremećaj funkcije E-kadherina dovodi do gubitka međustaničnih veza. Pored ključne uloge u stvaranju pričvrtnih spojeva u stanici i očuvanju apikobazalne polarizacije stanice, E-kadherin ima ulogu regulatora različitih procesa u stanici, poput proliferacije, migracije, apoptoze i održavanja polariteta stanice. E-kadherin upravlja ovim procesima u stanici slanjem signala preko glavnog medijatora β -katenina. Stoga E-kadherin posredno, preko β -katenina, predstavlja negativan regulator aktivnog WNT (wingless-type mammary tumor virus integration site family) signalnog puta.

1.2.1.2 β -katenin

Uz ulogu u kadherinsko-kateninskom kompleksu, β -katenin se u stanici veže na brojne druge molekule tvoreći komplekse neovisne o kadherinima. Ovisno o unutarstaničnoj lokalizaciji, β -katenin djeluje u epitelnim stanicama na dva načina. U staničnoj membrani predstavlja važnu komponentu pričvrtnih spojeva vežući E-kadherin i aktinski citoskelet preko α -katenina. Slobodni se β -katenin u citosolu brzo razgrađuje u spoju s multiproteinskim degradacijskim kompleksom koji se sastoji od serin/treonin kinaza CK1 (kazein kinaza 1a), GSK3 β (glikogen sintaza kinaza 3 beta), produkta tumor supresorskog gena APC (protein adenomatozne polipoze kolona) i strukturnog proteina aksina ili konduktina (44). Navedeni razgradbeni kompleks ciljano djeluje na β -katenin razgrađujući ga u proteosomima putem CK1- i GSK3 β - ovisne fosforilacije N-terminalnih serinskih/treoninskih ostataka (45-51). Stabilizacija citoplazmatskog β -katenina WNT signalnim putem dovodi do njegovog nakupljanja u jezgri,

spajanja u kompleks s LEF/TCF (od engl. lymphoid enhancer factor-T-cell factor) transkripcijskim faktorima i transaktivacije ciljnih gena (52, 53). Upravo je ovaj signalni mehanizam β -katenina uključen u regulaciju sudbine stanica tijekom embrionalnog razvoja. Poremećena aktivacija ovog transaktivacijskog puta može pridonijeti širenju karcinoma potičući proliferaciju stanica (54).

1.2.2 Regulacija kadherinsko-kateninskog sustava

Kadherinima posredovana adhezijska sposobnost stanica se mijenja tijekom fizioloških zbivanja u stanici poput tkivnog remodeliranja, migracije stanica ili citokineze. Osim što se izraženost kadherina mijenja, može doći i do promjene u vrsti izraženih kadherina, npr. gubitak E-kadherina i pojava N-kadherina (55). Na kadherinsko-kateninski sustav utječu brojne molekule, između ostalog članovi rho obitelji malih GTP-aza, regulatora aktinskog citoskeleta. Njihovom aktivacijom dolazi do povećanja količine vezanog E-kadherina i β -katenina, dok blokiranje članova rho obitelji dovodi do odvajanja kadherina iz pričvrstnih spojeva (56, 57). Kadherinima posredovana adhezija stanica je isto tako pod snažnim utjecajem tirozin kinaza. Aktivacijom v-src kinaze dolazi do pucanja međustaničnih veza. Osim djelovanjem na pričvrstne spojeve, adhezijska sposobnost stanica se mijenja i fosforilacijom tirozina u β -kateninskom kompleksu, nakon koje dolazi do odvajanja α -katenina iz kompleksa. U fiziološkim uvjetima fosforilacija tirozina potiče stvaranje kadherinskih veza između stanica, dok povećana fosforilacija tirozina u onkogeno aktiviranim tirozin kinazama dovodi do poremećaja adhezije stanica (46).

1.2.3 Regulacija izraženosti E-kadherina

Tumorske stanice pokazuju čitav niz fenotipskih promjena u usporedbi s normalnim stanicama. Promjene u međustaničnim vezama prate tumorsku dediferencijaciju, uzrokujući slabiju povezanost tumorskih stanica (58). Jedan od razloga agresivnog ponašanja tumora je i smanjenje izraženosti E-kadherina, a

njegovim gubitkom dolazi do pucanja pričvrtnih spojeva i odvajanja tumorskih stanica od glavne tumorske mase. Izraženost E-kadherina je regulirana promjenama u genima, epigenetskom inaktivacijom i transkripcijskim utišavanjem gena CDH1, produkt kojeg je E-kadherinska molekula. Somatske mutacije gena CDH1 su zabilježene u karcinomu dojke, jajnika, endometrija i želuca (59-61). Drugi način gubitka izraženosti E-kadherina u tumorskim stanicama je hipermetilacija promotorske regije gena CDH1 (62, 63). Premda su ovi mehanizmi opisani u brojnim ispitivanjima, najčešće dolazi do inhibicije E-kadherina na transkripcijskoj razini, odnosno utišavanja izraženosti gena CDH1 različitim transkripcijskim represorima. Represori transkripcije E-kadherina su povezani s razvojem brojnih karcinoma. Najčešće ulaze u interakciju s E-boxovima lokaliziranim u proksimalnom dijelu promotorske regije gena CDH1. Cink-finger transkripcijski čimbenici Snail, Slug, ZEB-1 i smad-interacting protein (SIP-1) se vežu za jedan od tri E-box promotora E-kadherina i suprimiraju njegovu izraženost (64-66).

Mehanizam smanjene izraženosti E-kadherina u malignom melanomu još uvijek nije do kraja razjašnjen. Poznato je da hipermetilacija promotorske regije gena CDH1 ne utječe na smanjenje izraženosti E-kadherina u melanomu. Vjerojatno se radi o inhibiciji transkripcije E-kadherina jednim od represora transkripcije. Upravo su značajne razine Snail mRNA otkrivene u svim stanicama melanoma, ali ne i u melanocitima, što je dokaz njegove uloge u razvoju melanoma (67). Pojačana izraženost Snail-a u tumorima je isto tako povezana s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom i korelira s nestankom pričvrtnih spojeva, morfološkim promjenama i povećanim migratornim i invazivnim sposobnostima tumorskih stanica (68).

1.2.4 Epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT)

Epitelno mezenhimalna tranzicija je razvojni proces od najvećeg značaja u različitim koracima embriogeneze. Za razliku od fiziološke EMT, tijekom tumorogene EMT stanice gube epitelni fenotip i poprimaju mezenhimalne

karakteristike, postaju vretenastog izgleda, dolazi do pucanja međustaničnih veza i poremećaja kadherinsko-kateninskog kompleksa. Stanice gube apiko-bazalnu polarizaciju i odvajaju se od glavne tumorske mase invadirajući susjednu stromu (69). Stoga je aktivacija EMT ključan događaj koji omogućava stanicama epitelnih tumora invazivno ponašanje i diseminaciju (70). Geni koji sudjeluju u regulaciji EMT u melanocitima koristan su nezavisni prognostički čimbenik za melanom. EMT je od osobitog značaja za melanom, budući u fiziološkim uvjetima predstavlja ranu fazu razvoja melanocita. Prekursori melanoblasta podrijetlom iz neuralnog grebena tijekom embriogeneze prolaze EMT kako bi se odvojili od neuralnog grebena i migrirali kroz embrionalni mezenhim na putu do dermo-epidermalne granice. Potom dolazi do mezenhimalno epitelne tranzicije, obrnutog procesa od EMT, posljedica koje je interakcija melanocita s okolnim keratinocitima. Stoga upravo migracija melanocita predstavlja jednu od rijetkih, embrionalno programiranih EMT u biologiji metazoa (71).

EMT započinje djelovanjem raznih čimbenika iz staničnog mikro okoliša poput TNF α (engl. tumor necrosis factor alpha), TGF β (engl. transforming growth factor β) i čimbenika rasta hepatocita (engl. hepatocyte growth factor), a koje proizvode same tumorske stanice ili okolne zdrave stanice kao odgovor na prisustvo tumorskog tkiva. Njihovim djelovanjem dolazi do pojačane izraženosti represora transkripcije poput članova obitelji basic helix-loop-helix (bHLH), twist obitelji, snail1 i snail2 iz snail obitelji, te članova zinc finger homeobox obitelji ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox1) i ZEB2 (72). Navedeni inhibitori transkripcije su unutarstanični medijatori EMT, a djeluju ulazeći u interakciju s E-box-ovima u proksimalnom dijelu promotorske regije gena CDH1 posljedica koje je gubitak izraženosti E-kadherina. Na njihovu važnost ukazuje sve veći broj novootkrivenih ciljnih gena koji imaju važnu ulogu u održavanju polariteta epitelnih stanica, apoptozi i održavanju strukture bazalne membrane. Tako ZEB1 inhibira izraženost čimbenika odgovornih za apiko-bazalnu polarizaciju stanica, osobito Lgl2 koji je snižen u kolorektalnom karcinomu i karcinomu dojke (73). Represori transkripcije, osobito ZEB1 i snail, su ključni u metastaziranju tumora ne samo zbog inhibicije izraženosti E-kadherina, već i zbog sposobnosti inhibicije

mikroRNA (miRNA) obitelji čiji članovi potiču diferencijaciju epitela (74). Gubitkom funkcionalnog E-kadherina, a time i međustaničnih kontakata u pričvrstnim spojevima, dolazi do odvajanja tumorskih stanica od glavne tumorske mase, stanice postaju mobilne i u dodiru s izvanstaničnim matriksom metastaziraju.

1.2.5 N-kadherin

Sposobnost metastaziranja je izravno povezana s pojavom mezenhimalnog fenotipa nakon prolaska stanica kroz EMT. Gubitak E-kadherina tijekom tumorogene EMT izravno dovodi do povećane aktivnosti NF κ B i povećane izraženosti N-kadherina u stanicama melanoma. (75). Promjena u vrsti kadherina omogućuje stanicama melanoma izravnu interakciju s drugim N-kadherinskim stanicama poput fibroblasta i endotelnih vaskularnih stanica. Time je ostvarena interakcija tumorskih stanica sa stanicama domaćina, a koja prethodi migraciji i invaziji melanoma u okolna tkiva. N-kadherin omogućava stanicama melanoma komunikaciju sa susjednim fibroblastima preko gap veza (39). N-kadherin isto tako povećava afinitet tumorskih stanica za endotel krvnih žila. Prolaskom kroz endotel dolazi do hematogenog rasapa tumorskih stanica, ali i migracije u okolne strukture. Protutijela na N-kadherin *in vitro* usporavaju transendotelnu migraciju melanomskih stanica (76). Migratorni fenotip N-kadherina potiče dinamičnu ravnotežu u vezanju tumorskih stanica sa stanicama domaćina, pri čemu dolazi do vezanja, ali i odvajanja stanica od primarnog tumora, ali i od okolnih fibroblasta i endotelnih stanica. Zabilježeno je da se interakcijom stanica melanoma i okolnog endotela pojačava izraženost N-kadherina u melanomu. Budući su migrirajuće tumorske stanice okružene sa svih strana endotelnim stanicama, porast N-kadherina vjerojatno potiče stvaranje heterofilnih veza između stanica (77). Stoga upravo gubitak E-kadherina, uz pojavu N-kadherina predstavlja ključni događaj u prijelazu iz radijalne u vertikalnu fazu rasta melanoma, invaziji okolnih tkiva kao i širenju tumora u regionalne limfne čvorove i udaljene organe (77).

Premda se u metastatskim stanicama melanoma očekuje pojačana izraženost N-kadherina, Kreizenbeck i sur. (14) su paradoksalno pokazali da je preživljenje najveće u skupini bolesnika s visokim N-kadherinom i umjereno izraženim E-kadherinom (14). Time se objašnjava postojanje dviju vrsta N-kadherin pozitivnih melanoma: EMT pozitivni, metastaziranju sklони melanomi i dobro diferencirani tumori čije su stanice nalik prekursorskim stanicama iz neuralnog grebena. U prilog gore navedenoj podjeli govore i proteomska ispitivanja melanoma rezultati kojih potvrđuju postojanje epiteloidnih melanoma i melanoma iz neuralnog grebena (78).

1.2.6 WNT signalni put

Tijekom tumorom aktivirane EMT dolazi do specifičnih morfoloških i molekulskih promjena u stanici, od kojih je osobito značajan gubitak E-kadherina. Pored uloge u regulaciji međustanične adhezije, E-kadherin je važan regulator WNT (wingless-type mammary tumor virus integration site family) signalnog puta djelujući preko njegova središnjeg dijela β -katenina (74). Slobodni se β -katenin u citosolu brzo razgrađuje kada WNT signalni put nije aktivan. β -katenin u citosolu stvara multiproteinski kompleks sa CK1, GSK3 β , APC i aksinom. β -katenin se potom razgrađuje u proteosomima putem CK1 i GSK3 β ovisne fosforilacije N-terminalnih serin/treoninskih ostataka (74).

Aktivacijom WNT signalnog puta dolazi do inhibicije razgradnje β -katenina i njegova nakupljanja u jezgri stanica gdje regulira izraženost ciljnih gena. Produkti gena WNT su WNT glikoproteini koji djeluju kao ligandi u aktivaciji receptorima posredovanih signalnih putova važnih u kontroli diferencijacije, proliferacije i pokretljivosti stanica (79). Isto tako je potrebno naglasiti njihovu ulogu tijekom razvoja stanica podrijetlom iz neuralnog grebena, npr. melanocita. Vežanjem WNT molekula na serpentine frizzled receptore, dolazi do aktivacije kanonskog WNT signalnog puta i prijenosa signala u jezgru stanice. Aktiviraju se LRP5/6 koreceptori koji prenose signal u citoplazmu, inhibirajući GSK3 β (80, 81), enzim koji predstavlja negativni regulator WNT puta. β -katenin se stoga nakuplja

u citoplazmi, a zatim dolazi do njegove translokacije u jezgru. U jezgri djeluje kao transkripcijski čimbenik u kompleksu s HMG-box proteinima iz TCF/LEF obitelji (82). TCF/LEF molekule ulaze u interakciju s DNA promotorskih regija ciljnih gena preko njihovih HMG-boxova prepoznajući sljedove parova baza T/A T/A CAAAG (83). Stoga djelovanje TCF/LEF tijekom regulacije transkripcije ciljnih gena ovisi o razini β -katenina u jezgri. U odsutnosti β -katenina u jezgri, dolazi do regrutacije različitih drugih proteina sa sposobnošću potiskivanja transkripcije, poput članova groucho/TLE obitelji proteina, koji služe kao posredničke molekule u regrutaciji histonskih deacetilaza, dovodeći do inhibicije transkripcije ciljnih gena kondenzacijom kromatina. Suprotno tome, nakupljanje β -katenina u jezgri potiskuje groucho/TLE proteine, tvoreći komplekse s TCFovima. β -katenin pruža transaktivacijsku domenu svojim C-završetkom, no isto tako može ući u interakciju s CBP/p300 ili BRG1 dovodeći do relaksacije kromatina i tako započeti transkripciju. U vertebrata postoji najmanje jedan WNT signalni put neovisan o β -kateninu, a koji ponekad aktivno blokira prijenos signala preko β -katenina (84). Oba WNT signalna puta sudjeluju u karcinogenezi, a osobito se alternativni put aktiviran proteinom WNT5A povezuje s metastazama melanoma (85-87). Profiliranje izraženosti gena u melanomu kože (cDNA microarray) ukazuje na povećanu izraženost WNT5A/Frizzled u pojedinim skupinama melanoma agresivne prirode (88). Onkogeni učinak β -katenina se postiže djelovanjem kompleksa β -katenin/LEF/TCF na ciljne gene dovodeći do povećane transkripcije ciklina D1, MITF, MYC i drugih onkogenih čiji promotori sadrže vezna mjesta za LEF/TCF. Povećana razina nuklearnog β -katenina povećava izraženost MITF (microphthalmia associated transcription factor) i CCND1 (cell-cycle mediator cyclin D1), a oni dovode do proliferacije i preživljenja tumorskih stanica svojim onkogenim učinkom. MITF je bazični helix-loop-helix leucinski protein zatvarač (bHLHzip) koji prepoznaje i ulazi u interakciju s E-box promotorskim sljedovima kanonskog WNT-a (89-91). MITF je glavni regulator razvoja, diferencijacije, migracije i preživljenja melanocita, ali utječe i na transkripciju melanocitnog specifičnog gena silver homologue (SILV) i melana-A (MLANA), odgovornih za diferencijaciju melanocita, odnosno pigmentaciju kože

(92, 93). Prekomjerna izraženost MITF može dovesti do transformacije primarnih kultura melanocita, što dodatno govori u prilog njegovoj onkogenoj ulozi (1). MITF je isto tako značajan prognostički čimbenik koji omogućava otkrivanje cirkulirajućih stanica melanoma, osobito u kombinaciji s tirozinazom (94). Produkt gena CCND1 je ciklin D1 protein (CD1) čija je povećana izraženost zabilježena kod akralnog lentiginoznog melanoma (95).

β -katenin može ući u jezgru neovisno o LEF/TCF kompleksu i regulirati stanične funkcije.

WNT signalni put je isto tako povezan s epitelno mezenhimalnom tranzicijom (EMT) stanica izravnom aktivacijom transkripcijskih represora E-kadherinskog gena CDH1 iz obitelji snail2 ili indirektnom aktivacijom transkripcijskog faktora ZEB1 putem drugih WNT ciljnih gena (npr. COX2 ili IGF1). Zabilježena je COX-2 ovisna inhibicija E-kadherina. Metabolit COX2 prostaglandin E2 (PGE2) potiče izraženost snail1 i ZEB1 (96) odgovornih za pokretanje EMT. Iz toga možemo zaključiti da postoji pozitivna povratna sprega između E-kadherina, β -katenina i ZEB1 u stanicama karcinoma, što je dokazano na modelu kolorektalnog karcinoma. Od velikog je značenja činjenica da se tumorske stanice različito ponašaju ovisno da li se radi o stanicama u samoj tumorskoj masi ili metastazi. Stanice na tumorskoj fronti poprimaju mezenhimalni fenotip (EMT), dok u središnjim dijelovima metastaza stanice ponovno poprimaju epitelna svojstva (MET), dolazi do ponovne izraženosti E-kadherina i uspostavljanja pričvrstnih spojeva. Upravo ponovna lokalizacija β -katenina u staničnoj membrani dovodi do gašenja WNT signalnog puta i diferencijacije epitelnih stanica (97).

1.2.7 Prognostička uloga kadherina u melanomu

Zbog otpornosti melanoma na dostupnu farmakološku terapiju i velikog potencijala metastaziranja, većina će bolesnika s metastazama podleći bolesti. Mogućnost lokalnog recidiva je velika, čak i u bolesnika s lokaliziranim tumorom i adekvatno provedenom kirurškom terapijom, stoga je identifikacija nezavisnih

prognostičkih čimbenika uz staging bolesti pri postavljanju dijagnoze, prioritet mnogih kliničkih ispitivanja (14).

Premda niti jedna od molekula kadherinskog sustava nema pojedinačno neovisnu prognostičku vrijednost, analize više molekula zajedno u kombinaciji s poznatim prognostičkim čimbenicima pokazale su značajan utjecaj na preživljenje oboljelih od melanoma. Tako je uočena loša prognoza u skupini bolesnika velike debljine tumora po Breslowu i slabo izraženog ili odsutnog E-kadherina, upravo zbog velikog invazivnog potencijala navedenih tumora (98). Protektivan učinak E-kadherina je zabilježen u brojnim ispitivanjima, no uglavnom nije dosegao statistički značajne vrijednosti u pojedinačnim analizama ($p = 0,10$). Gubitak E-kadherina u većini ispitivanja bio je povezan s lošim ishodom bolesti. S obzirom na različitu izraženost N-kadherina i ishod bolesti, smatra se da postoje dvije vrste melanoma kod kojih je povećana izraženost N-kadherina. Radi se ili o EMT-pozitivnom, metastazama sklonom melanomu ili o dobro diferenciranom tumoru s povoljnom prognozom. Za razliku od melanoma, u drugim tumorima, poput karcinoma prostate, dokazana je nezavisna prognostička vrijednost E-kadherina. Isto tako se gubitak E-kadherina, uz istovremeno povećanu izraženost N-kadherina, pokazao kao značajan prediktor progresije bolesti i specifičnog mortaliteta u oboljelih od karcinoma prostate, ali i nekim drugim vrstama karcinoma (99). Usprkos brojnim istraživanjima, još uvijek nije moguće predvidjeti ishod bolesti u oboljelih od melanoma. Morfološki standardi poput debljine tumora i stanja limfnih čvorova i dalje ostaju najpouzdaniji prognostički čimbenici, bez obzira na sve dosadašnje pokušaje pronalaska novih tkivnih biljega. Uvođenje biopsije sentinel čvora je dovelo do poboljšanja utvrđivanja metastatskog potencijala melanoma. Unatoč tome, u bioptatu sentinel čvora 75-90% bolesnika se ne nađe tumorskih stanica, stoga je bolesnik mogao izbjeći potencijalno nepotrebnu operaciju, a čak 25% bolesnika s negativnim sentinel limfnim čvorom će s vremenom biti uvršteno u kasniji stadij bolesti s lošijom prognozom. Upravo ove činjenice upućuju na potrebu za preciznijim određivanjem vjerojatnosti metastaziranja tumora u trenutku postavljanja dijagnoze. U melanomu je uočena povezanost izraženosti različitih gena s

prognozom bolesti u histološki identičnih tumora. Stoga se smatra opravdanim pokušaj pronalaska kliničko patoloških prognostičkih modela s molekulskim biljezima karakterističnim za pojedinu podvrstu tumora. To se osobito odnosi na proteine kod kojih bi se na temelju razlika u izraženosti mogao točnije definirati ishod bolesti. Melanom i dalje predstavlja paradoks u skupini solidnih tumora. Radi se o tumoru za koji su dostupni najbolji prognostički čimbenici, ali uz još uvijek slabo razumijevanje njihovog biološkog značenja (100).

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 Hipoteza

Hipoteza ovog istraživanja je da je izraženost E-kadherina i N-kadherina u stanicama primarnog melanoma kože (PMK) koji je metastazirao u regionalne limfne čvorove snižena u odnosu na PMK koji nije metastazirao. Izraženost E-kadherina je snižena u PMK, a povišena u metastazi tog istog melanoma u limfnom čvoru, a izraženost N-kadherina je povišena u PMK, a snižena u pratećoj nodalnoj metastazi. Bolesnici sa sniženom izraženošću E-kadherina, a povišenom izraženošću N-kadherina imaju lošiju prognozu bolesti.

2.2 Ciljevi istraživanja

Na temelju postavljene hipoteze ciljevi ovog istraživanja su:

1. Imunohistokemijski odrediti izraženost E- i N-kadherina u stanicama PMK sa i bez metastaza u limfne čvorove;
2. Usporediti izraženost navedenih biljega u primarnom tumoru i pratećim metastazama u limfnim čvorovima;
3. Usporediti izraženost E- i N-kadherina s tradicionalnim prognostičkim čimbenicima (debljina tumora prema Breslowu, ulceracija površine melanoma, broj mitozna, infiltracija tumora limfocitima, stupanj invazije po Clarku, TNM stadij, dob i spol bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze);
4. Odrediti povezanost izraženosti E- i N-kadherina u PMK s vremenom preživljenja bez znakova bolesti i s ukupnim preživljenjem bolesnika s PMK.

3 BOLESNICI I METODE

3.1 Bolesnici

U istraživanju je korišten arhivski materijal dobiven kirurškim odstranjenjem primarnih melanoma kože u razdoblju od 01.01.2001. do 31.12.2006. godine u Klinici za kožne i spolne bolesti ili u Klinici za kirurgiju KBC «Sestre milosrdnice». Patohistološka dijagnoza melanoma kao i dijagnoza metastaza u limfne čvorove postavljena je u Kliničkom zavodu za patologiju «Ljudevit Jurak» KBC «Sestre milosrdnice». Analizirano je ukupno 84 primarna melanoma kože, od kojih je 40 imalo metastazu u regionale limfne čvorove, a 44 je bilo bez metastaze.

3.2 Metode

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Dodatni rezovi tkiva analizirani su imunohistokemijskom metodom.

3.2.1 Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu izraženosti E-kadherina korišteno je primarno protutijelo na E-kadherin (monoklonsko protutijelo, clone NCH-38, code M3612, razrjeđenje 1:100, Dako, Danska), a za imunohistokemijsku analizu izraženosti N-kadherina korišteno je primarno protutijelo na N-kadherin (monoklonsko protutijelo, clone 6G11, code M3613, razrjeđenje 1:100, Dako, Danska). Imunohistokemijska analiza primarnih tumora i metastaza u limfnim čvorovima na E-kadherin i N-kadherin učinjena je LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za

imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu MSIP (od engl. «Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase») protokola. Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo dojke, a kao negativna kontrola izostavljeno je primarno protutijelo. Uzorci su analizirani svjetlosnim mikroskopom, a reakcija antigen-antitijelo vizualizirana je diaminobenzidinom (DAB) kao smeđe obojenje u preparatima kontrastno obojenim hemalaun eozinom.

3.2.2 Procjena izraženosti E-kadherina i N-kadherina u primarnom melanomu i metastazama u limfnim čvorovima

Rezultati imunohistokemijske analize za E-kadherin i N-kadherin prikazani su semikvantitativno određivanjem imunohistokemijskog indeksa bojenja uzimajući u obzir intenzitet reakcije i postotak imunoreaktivnih stanica na cijelom odabranom rezu. Intenzitet bojenja (IB) označen je kao: 0, za odsutnost reakcije; 1, za slabo izraženu reakciju; 2, za umjereno izraženu reakciju; 3 za jako izraženu reakciju. Postotak imunoreaktivnih stanica (PRS) označen je kao: 0, nema reaktivnih stanica; 1, do 10% pozitivnih stanica; 2, 10-50% pozitivnih stanica; 3, više od 50% pozitivnih stanica. Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) na E-kadherin i IIB na N-kadherin dobiven je kao umnožak intenziteta bojenja (IB) i postotka reaktivnih stanica (PRS): $IIB=IR \times PRS$, a iznosi od 1 do 9. U analizi izraženosti E- i N-kadherina 0 je predstavljala odsustvo reakcije, IIB od 1 do 4 predstavlja nisku izraženost E- i N-kadherina, dok IIB 6 i 9 predstavlja visoku izraženost E- i N-kadherina (99).

Analizirano je membransko i citoplazmatsko obojenje tumorskih stanica, a kao kontrolna skupina korišten je intenzitet bojanja melanocita najudaljenijeg zdravog epidermisa na istom patohistološkom prerezu.

Imunohistokemijsku analizu preparata učinio je patolog koji nije bio upoznat s kliničkim i patohistološkim podacima, kao niti s identitetom bolesnika.

3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. U analizi raspodjele podataka koristio se Smirnov-Kolmogorovljev test te su se shodno rezultatima podaci analizirali odgovarajućim testovima. Kategorijske varijable su prikazane kroz apsolutne vrijednosti i učestalosti te su razlike između skupinama analizirane X^2 testom. Razlike između kvantitativnih vrijednosti u odnosu na skupine s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima analizirane su Mann-Whitney U testom, a same vrijednosti prikazane kroz medijane i odgovarajuće interkvartilne raspone. Izračunati su faktori korelacije pojedinih kliničkih varijabli s izraženosti pojedinih kadherina (ordinalna i nominalna korelacija). Log rank test i Kaplan-Meier krivuljom preživljenja se pokušalo uvidjeti na univarijatni utjecaj izraženosti reakcije N i E kadherina na smrtni ishod. Coxovom regresijskom analizom se analizirao utjecaj pojedinih kliničkih varijabli i reakcije N i E kadherina u multivarijatnom okružju na nastanak smrtnog ishoda, odnosno recidiva. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi i grafičkom prikazu korištena je programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 19.0.0.1 (www.spss.com).

4 REZULTATI

U istraživanju su analizirana 84 uzorka tkiva bolesnika s primarnim melanomom kože i 40 uzoraka tkiva limfnih čvorova bolesnika s metastazama melanoma u regionalnim limfnim čvorovima (LN). Za svakog bolesnika su prikupljeni i analizirani sljedeći podaci: dob, spol, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, broj pozitivnih limfnih čvorova, debljina tumora po Breslowu, Clarkov stupanj invazije, TNM klasifikacija, infiltracija tumora limfocitima (TIL), broj mitozna, imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za E-kadherin i N-kadherin, ulceracija površine tumora i recidiv bolesti. U tablici 3 je prikazana raspodjela ispitanika po prethodno navedenim kliničko-patološkim karakteristikama.

Tablica 3. Opisna statistika ispitivanih varijabli (n=84)

Ispitivani klinički, histološki i laboratorijski parametri		Frekvencija	Učestalost (%)
Spol	Muški	36	42,9%
	Ženski	48	57,1%
Dob: skupine	<65 godina	40	47,6%
	>=65 godina	44	52,4%
Limfni čvorovi pozitivni	Ne	44	52,4%
	Da	40	47,6%
Breslow klasifikacija	< 0,75 mm	11	14,1%
	0,76 - 1,5 mm	14	17,9%
	1,6 - 4,0 mm	30	38,5%
	> 4 mm	23	29,5%
Clark klasifikacija	2	13	16,5%
	3	23	29,1%
	4	33	41,8%
	5	10	12,7%
Tx	1	20	25,6%
	2	11	14,1%
	3	24	30,8%
	4	23	29,5%
Nx	0	43	53,1%
	1	19	23,5%
	2	8	9,9%
	3	11	13,6%
Infiltracija limfocitima	Nema infiltrata	1	1,2%
	Oskudan infiltrat	14	16,9%
	Srednje gusti infiltrat	41	49,4%
	Gusti infiltrat	27	32,5%
Broj mitozama/mm ²	Bez mitozama	6	7,2%
	Jedna mitoza	1	1,2%
	2 - 5 mitozama	41	49,4%
	6 i više mitozama	35	42,2%
Smrt	Ne	58	69,0%
	Da	26	31,0%
Recidiv	Ne	56	67,5%
	Da	27	32,5%

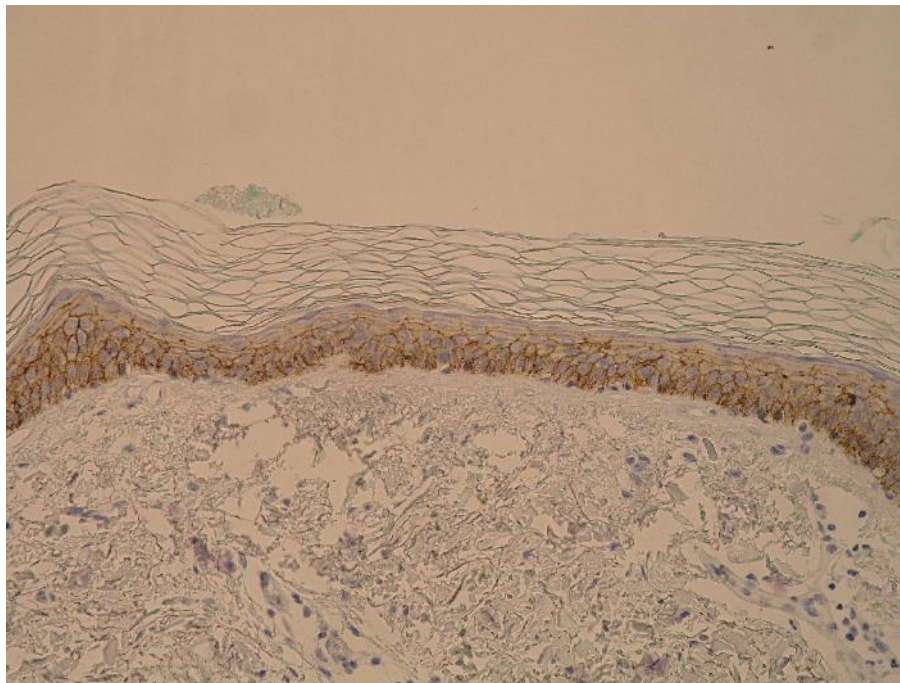
Rezultati imunohistokemijskom analizom određene izraženosti E- i N-kadherina u PMK s i bez metastaza u limfne čvorove (LN) prikazani su u tablici 4. Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) je prikazan kao umnožak intenziteta reakcije i postotka reaktivnih stanica, a iznosi od 1 do 9. U analizi izraženosti E- i N-kadherina 0 je predstavljala odsustvo reakcije, IIB od 1 do 4 predstavlja nisku izraženost E- i N-kadherina, dok IIB 6 i 9 predstavlja visoku izraženost E- i N-kadherina (99). U svim istraživanim uzorcima su E- i N-kadherini bili izraženi.

Tablica 4. Opisna statistika izraženosti reakcije na E-kadherin i N-kadherin

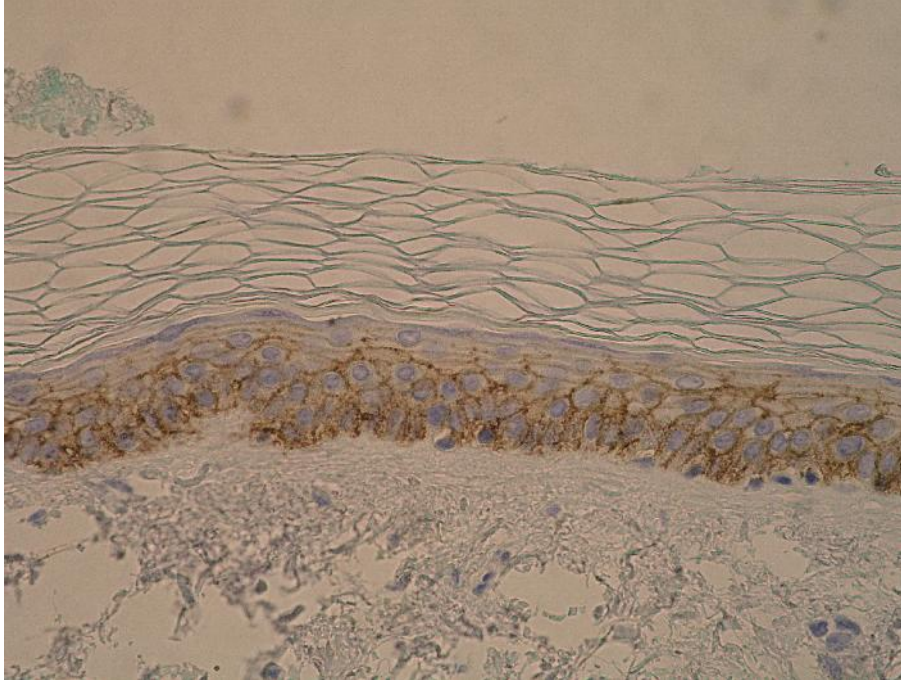
Učestalost izraženosti reakcije na E i N-kad		Frekvencija	Učestalost (%)
IIB E-kad: primarni melanom	Slabo izražena reakcija (1-4)	28	33,3%
	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	56	66,7%
IIB N-kad: primarni melanom	Slabo izražena reakcija (1-4)	77	91,7%
	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	7	8,3%
IIB E-kad: limfni čvor	Slabo izražena reakcija (1-4)	29	72,5%
	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	11	27,5%
IIB N-kad: limfni čvor	Slabo izražena reakcija (1-4)	14	35,0%
	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	26	65,0%
IIB E-kad: melanociti	Slabo izražena reakcija (1-4)	1	1,2%
	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	82	98,8%
IIB N-kad: melanociti	Slabo izražena reakcija (1-4)	82	100,0%
	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	0	0,0%
Kratice: IIB, imunohistokemijski indeks bojenja; E-kad, E-kadherin; N-kad, N-kadherin			

IIB 0 odsustvo reakcije
IIB 1-4 niska izraženost E- i N-kadherina
IIB 6 i 9 visoka izraženost E- i N-kadherina

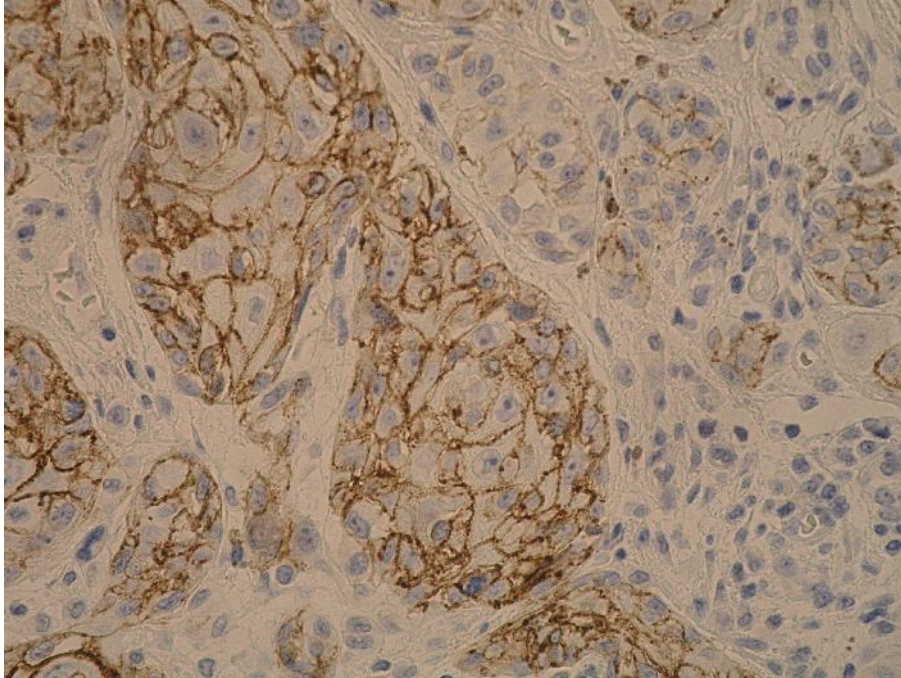
Primjeri imunohistokemijske reakcije na glikoproteine E-kadherin i N-kadherin u PMK i metastazi melanoma u limfnom čvoru, prikazani su na slikama 1-9.



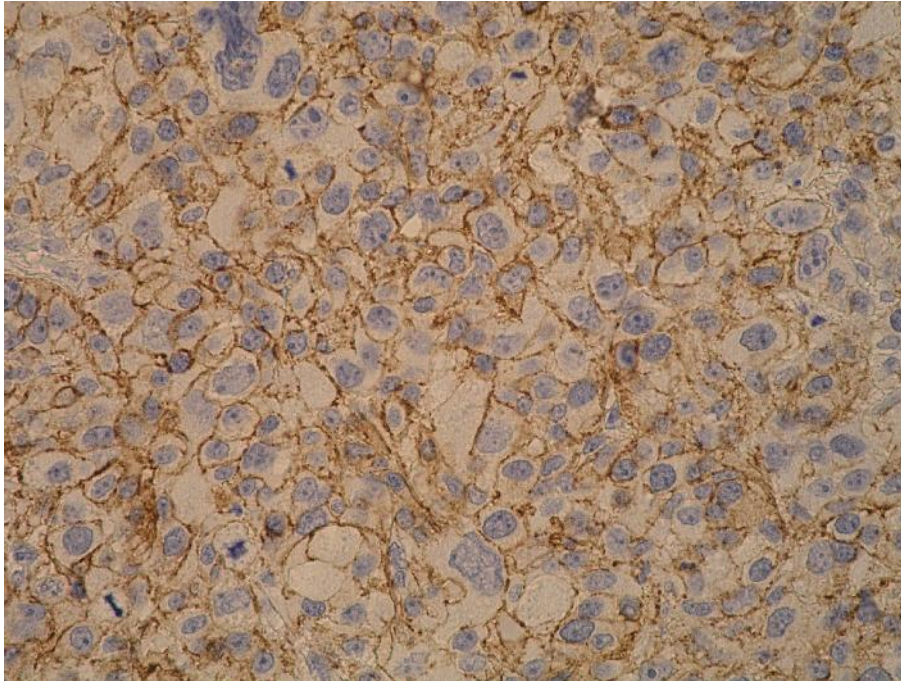
Slika 1. Imunohistokemijsko bojenje s anti E-kadherin protutijelom. Visoka izraženost E-kadherina u melanocitima i keratinocitima zdravog epidermisa: pretežno membranska reakcija (200x).



Slika 2. Imunohistokemijsko bojenje s anti E-kadherin protutijelom. Visoka izraženost E-kadherina u stanicama primarnog melanoma bez metastaza u LN (200x).



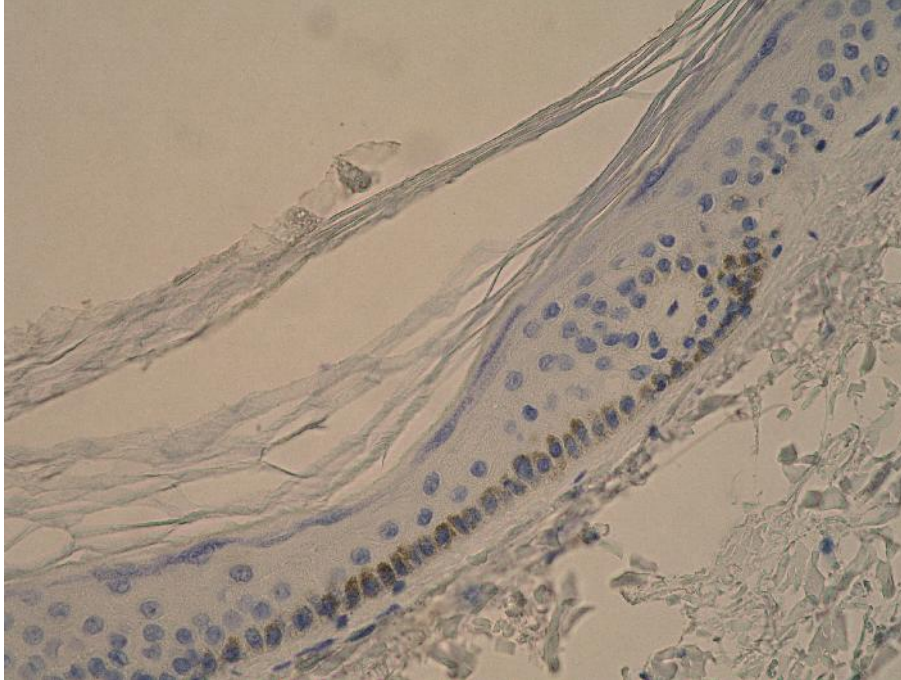
Slika 3. Visoka izraženost E-kadherina u gnjezdima tumorskih stanica PMK uz invazivno širenje melanoma. E-kadherin pozitivna gnjezda u stromi bez reakcije (400x).



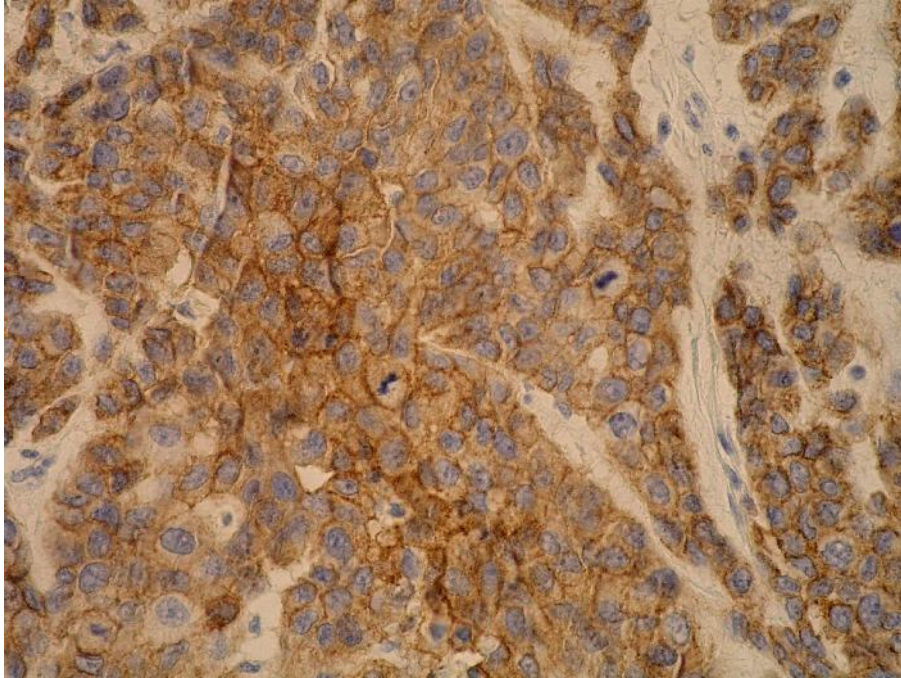
Slika 4. Niska izraženost E-kadherina u metastazi melanoma u limfnom čvoru, pretežno membranskog, a manjim dijelom i citoplazmatskog tipa (400x).



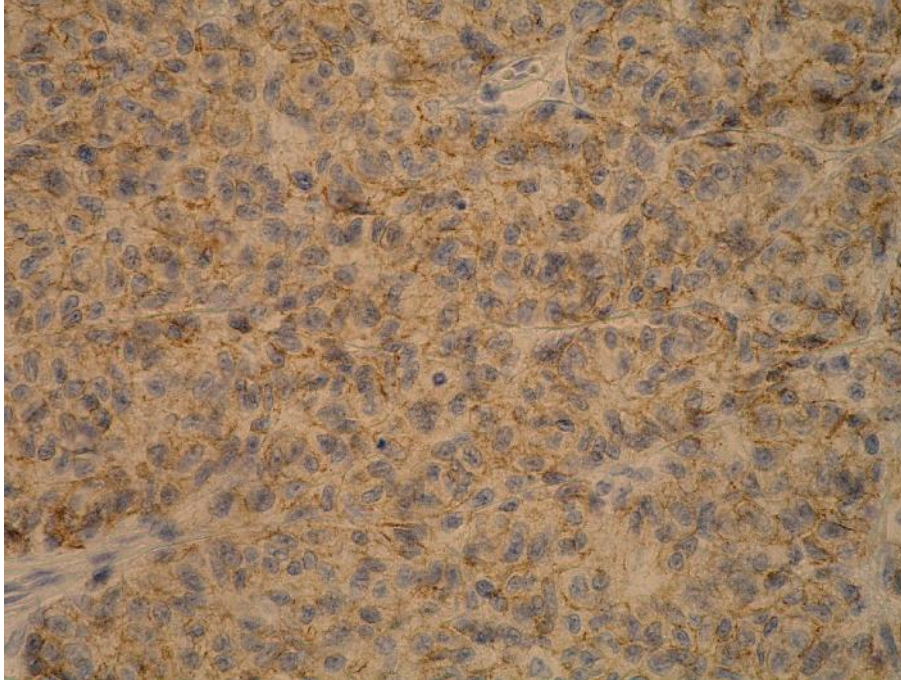
Slika 5. Umjerena izraženost E-kadherina, membranskog tipa reakcije u metastazi melanoma u limfnom čvoru (100x).



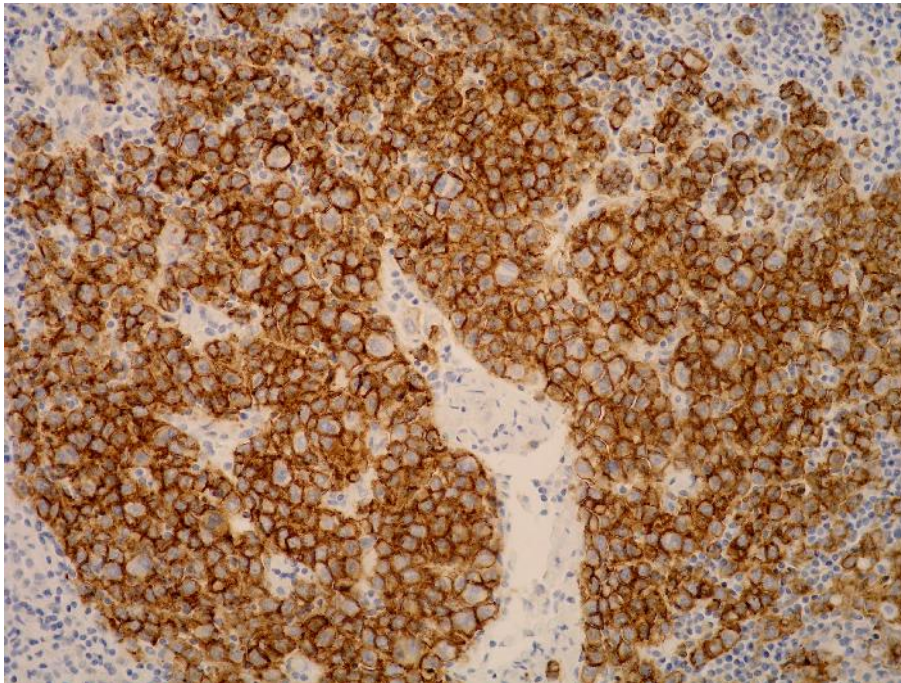
Slika 6. Imunohistokemijsko bojenje s anti N-kadherin protutijelom. Izraženost N-kadherina u vidu slabe citoplazmatske reakcije u bazalnim keratinocitima i melanocitima zdrave kože (400x).



Slika 7. Imunohistokemijsko bojenje s anti N-kadherin protutijelom. Izraženost N-kadherina u PMK s metastazom u LN uglavnom citoplazmatskog, a manje membranskog tipa (400x).



Slika 8. Imunohistokemijsko bojenje s anti N-kadherin protutijelom. Izraženost N-kadherina u PMK u vidu nježne membranske reakcije (400x)



Slika 9. Izraženost N-kadherina u metastazi melanoma u LN u vidu jake membranske reakcije (200x).

Tablica 5. Opisna statistika – usporedba kvantitativnih vrijednosti (Mann-Whitney U test) između skupina primarnih melanoma sa i bez metastaza u LN

	LN pozitivni	N	Srednja vrijednost	SD	Min	Max	Percentile			P
							25.	50. (Medijan)	75.	
Dob (godine)	Ne	52	64,48	17,91	26,00	96,00	53,25	63,50	78,75	0,552
	Da	46	67,30	14,33	35,00	90,00	55,00	72,50	78,25	
Breslow (mm)	Ne	51	2,17	2,15	0,40	12,00	0,77	1,20	3,00	<0,001
	Da	40	4,58	3,80	0,24	20,00	2,11	3,25	6,00	
Broj mitoz/a/mm ²	Ne	52	2,23	0,70	0,00	3,00	2,00	2,00	3,00	0,128
	Da	45	2,36	0,88	0,00	3,00	2,00	3,00	3,00	
Vrijeme do smrti (mjeseci)	Ne	52	89,43	28,25	2,90	127,00	90,25	97,50	104,75	<0,001
	Da	46	35,92	31,51	1,77	116,00	9,26	24,63	51,50	
Vrijeme do recidiva (mjeseci)	Ne	52	86,19	33,35	2,00	126,00	89,25	97,50	104,75	<0,001
	Da	46	23,50	26,40	1,00	116,00	6,30	12,40	35,50	
Ukupno vrijeme praćenja (mjeseci)	Ne	52	90,63	28,62	2,00	127,00	91,25	98,00	106,50	<0,001
	Da	46	35,59	31,75	1,00	116,00	9,00	24,50	51,50	

Skupine bolesnika s primarnim melanomom kože s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima ne razlikuju se značajno po dobi i broju mitoz/a, dok se u svim ostalim promatranim varijablama nalaze značajne razlike. U skupini s pozitivnim LN imamo značajno veći Breslow (deblji primarni melanom), kraće vrijeme do smrti i recidiva, te kraće vrijeme ukupnog praćenja.

Tablica 6. Opisna statistika – razlike između skupina sa i bez metastaza u LN u odnosu na spol (χ^2 test)

			Spol		Ukupno
			Muški	Ženski	
LN pozitivni	Ne	N	23	29	52
		%	44,2%	55,8%	100,0%
	Da	N	19	27	46
		%	41,3%	58,7%	100,0%
Ukupno	N	42	56	98	
	%	42,9%	57,1%	100,0%	
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	0,085	1	0,770		
N	98				

Ispitanici se također ne razlikuju značajno po spolu. U prethodnoj tablici se ne razlikuju ni po dobi pa možemo zaključiti da su usporedne skupine kontrolirane po dobi i spolu.

Tablica 7. Opisna statistika – razlike između skupina sa i bez metastaza u LN u odnosu na Breslow klasifikaciju (χ^2 test)

			Breslow klasifikacija				Ukupno
			< 0,75 mm	0,76 - 1,5 mm	1,6 - 4,0 mm	> 4 mm	
LN pozitivni	Ne	N	12	15	17	7	51
		%	23,5%	29,4%	33,3%	13,7%	100,0%
	Da	N	3	2	18	18	41
		%	7,3%	4,9%	43,9%	43,9%	100,0%
Ukupno		N	15	17	35	25	92
		%	16,3%	18,5%	38,0%	27,2%	100,0%
	Vrijednost	df	P				
Pearsonov χ^2	19,351	3	<0,001				
N	92						

Između skupina bolesnika s primarnim melanomom kože sa i bez metastaza u regionalnim LN utvrđena je statistički značajna razlika u debljini tumora prema klasifikaciji po Breslowu ($p < 0,001$). Kod primarnih melanoma bez metastaza u limfni čvor najveći udio tumora bio je unutar Breslow III stadija, dok je kod melanoma s metastazama u limfnom čvoru većina tumora bila stadij IV.

Tablica 8. Opisna statistika – razlike između skupina sa i bez metastaza u LN u odnosu na Clark klasifikaciju (χ^2 test)

			Clark klasifikacija				Ukupno
			2	3	4	5	
LN pozitivni	Ne	N	12	21	16	2	51
		%	23,5%	41,2%	31,4%	3,9%	100,0%
	Da	N	4	9	19	10	42
		%	9,5%	21,4%	45,2%	23,8%	100,0%
Ukupno		N	16	30	35	12	93
		%	17,2%	32,3%	37,6%	12,9%	100,0%
	Vrijednost	df	P				
Pearsonov χ^2	13,647	3	0,003				
N	93						

Utvrđena je statistički značajna razlika u stupnju invazije tumora prema Clarkovoj klasifikaciji ($p < 0.003$). Vidljivo je da je najveći broj tumora bez metastaza u limfnom čvoru bio unutar skupine Clark III, dok je kod melanoma s metastazama većina tumora bila stadija IV po Clarku.

Tablica 9. Opisna statistika – razlike između skupina sa i bez metastaza u LN u odnosu na T klasifikaciju (X^2 test)

			T klasifikacija				Ukupno
			1	2	3	4	
LN pozitivni	Ne	N	21	10	13	7	51
		%	41,2%	19,6%	25,5%	13,7%	100,0%
	Da	N	4	4	15	18	41
		%	9,8%	9,8%	36,6%	43,9%	100,0%
Ukupno	N	25	14	28	25	92	
	%	27,2%	15,2%	30,4%	27,2%	100,0%	
	Vrijednost	df	P				
Pearsonov X^2	18,24	3	<0,001				
N	92						

Između skupina primarnih melanoma kože sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima utvrđena je statistički značajna razlika u T stadiju ($p < 0,001$). Većina tumora bez metastaza bila je u T1 stadiju, dok su tumori koji su metastazirali u regionalne limfne čvorove bili u T4 stadiju.

Tablica 10. Opisna statistika – razlike između skupina sa i bez metastaza u LN u odnosu na tumor infiltrirajuće limfocite (χ^2 test)

			Tumor infiltrirajući limfociti				Ukupno
			Nema infiltrata	Oskudan infiltrat	Srednje gusti infiltrat	Gusti infiltrat	
LN pozitivni	Ne	N %	0 0,0%	10 19,2%	27 51,9%	15 28,8%	52 100,0%
	Da	N %	1 2,2%	8 17,8%	19 42,2%	17 37,8%	45 100,0%
Ukupno		N %	1 1,0%	18 18,6%	46 47,4%	32 33,0%	97 100,0%
	Vrijednost	df	P				
Pearsonov χ^2	2,245	3	0,523				
N	97						

Između skupina primarnih melanoma sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost i količinu TIL ($p=0,523$).

Tablica 11. Opisna statistika – razlike između skupina bez i sa metastazama u LN u odnosu na broj mitozu (χ^2 test)

			Mitotski indeks (br. mitozu/mm ²)				Ukupno
			Bez mitozu	Jedna mitozu	2 - 5 mitozu	6 i više mitozu	
LN pozitivni	Ne	N	2	2	30	18	52
		%	3,8%	3,8%	57,7%	34,6%	100,0%
	Da	N	4	0	17	24	45
		%	8,9%	,0%	37,8%	53,3%	100,0%
Ukupno		N	6	2	47	42	97
		%	6,2%	2,1%	48,5%	43,3%	100,0%
	Vrijednost	df	P				
Pearsonov χ^2	6,649	3	0,084				
N	97						

Između skupina primarnih melanoma sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na mitotski indeks (p=0,084).

Tablica 12. Opisna statistika – razlike između skupina bez i sa metastazama u LN u odnosu na smrtni ishod (χ^2 test)

			Smrt		Ukupno
			Ne	Da	
LN pozitivni	Ne	N	43	9	52
		%	82,7%	17,3%	100,0%
	Da	N	25	21	46
		%	54,3%	45,7%	100,0%
Ukupno		N	68	30	98
		%	69,4%	30,6%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	9,232	1	0,002		
N	98				

Između skupina primarnih melanoma sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na smrtni ishod ($p=0,002$).

Tablica 13. Opisna statistika – razlike između skupina sa i bez metastaza u LN u odnosu na recidive (χ^2 test)

			Recidiv		Ukupno
			Ne	Da	
LN pozitivni	Ne	N	43	7	50
		%	86,0%	14,0%	100,0%
	Da	N	21	24	45
		%	46,7%	53,3%	100,0%
Ukupno	N	64	31	95	
	%	67,4%	32,6%	100,0%	
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	16,668	1	<0,001		
N of Valid Cases	95				

Između skupina primarnih melanoma sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na recidiv melanoma ($p < 0,001$).

Korelacije između prognostičkih čimbenika

Tablica 14. Korelacijski koeficijenti između pojedinih kliničkih varijabli i izraženosti reakcije na E-kadherin i N-kadherin u primarnom tumoru, metastazi u limfnom čvoru i melanocitima

		IIB E-kad: primarni melanom	IIB N-kad: primarni melanom	IIB E-kad: limfni čvor	IIB N-kad: limfni čvor	IIB E-kad: melanociti	IIB N-kad: melanociti
Breslow (mm)	Korelac. koef. rho	-0,028	0,244	0,209	0,290	-0,173	-0,183
	P	0,812	0,032	0,236	0,096	0,135	0,119
	N	77	77	34	34	76	74
Clark klasifikacija	Korelac. koef. rho	0,023	0,210	0,120	0,042	-0,016	-0,093
	P	0,843	0,063	0,485	0,806	0,886	0,423
	N	79	79	36	36	78	76
Tx	Korelac. koef. rho	-0,048	0,306	0,189	0,296	-0,167	-0,172
	P	0,676	0,006	0,276	0,084	0,146	0,139
	N	78	78	35	35	77	75
Nx	Korelac. koef. rho	0,206	0,104	-0,115	0,111	0,049	-0,032
	P	0,065	0,356	0,493	0,506	0,666	0,783
	N	81	81	38	38	80	78
Infiltracija limfocitima	Korelac. koef. rho	0,142	-0,069	0,243	0,334	0,038	-0,061
	P	0,200	0,537	0,137	0,038	0,735	0,594
	N	83	83	39	39	82	80
Broj mitoz / mm²	Korelac. koef. rho	0,090	0,104	0,106	-0,080	-0,119	-0,155
	P	0,418	0,348	0,520	0,627	0,289	0,169
	N	83	83	39	39	82	80
Ulceracija	Korelac. koef. rho	-0,079	0,030	0,216	-0,061	-0,107	-0,155
	P	0,473	0,786	0,181	0,709	0,334	0,168
	N	84	84	40	40	83	81
Broj poz LN	Korelac. koef. rho	0,119	0,112	-0,120	0,081	0,073	-0,096
	P	0,305	0,336	0,462	0,619	0,535	0,420
	N	76	76	40	40	75	73
Dob (godine)	Korelac. koef. rho	-0,260	0,000	-0,182	-0,055	0,032	0,032
	P	0,017	0,999	0,260	0,736	0,772	0,777
	N	84	84	40	40	83	81
Spol	Nomin. korel. (eta)	-0,021	-0,143	-0,066	-0,269	-0,127	0,110
	P	0,846	0,195	0,687	0,093	0,253	0,327
	N	84	84	40	40	83	81

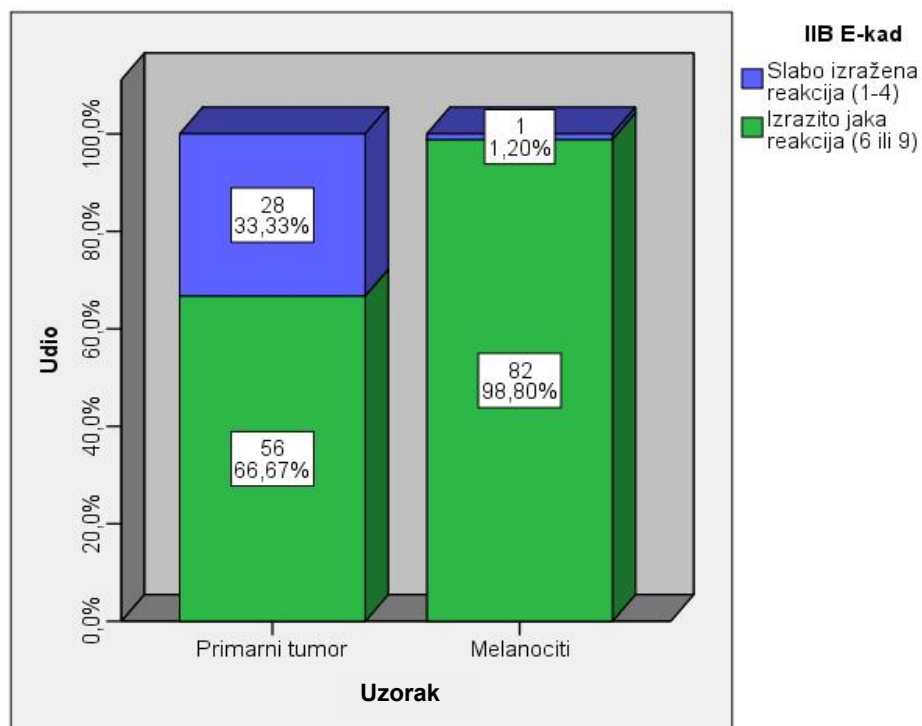
U PMK značajna je pozitivna korelacija između izraženosti N-kadherina i Breslow-a i T stadija. Visoka izraženost N-kadherina povezana je s većim vrijednostima Breslow-a i T klasifikacije. E-kadherin je negativno povezan s dobi: što su pacijenti bili mlađi, to je bila veća izraženost E-kadherina u primarnom melanomu. U metastazama u limfnom čvoru postoji pozitivna korelacija izraženosti N-kadherina s većim stupnjem infiltracije tumora limfocitima. Značajne korelacije s izraženosti E- i N-kadherina u melanocitima nema.

Razlike izraženosti E- i N-kadherina po skupinama

Tablica 15. Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože u odnosu na melanocite (X^2 test)

			IIB E-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-4)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni melanom	N %	28 33,3%	56 66,7%	84 100,0%
	Melanociti	N %	1 1,2%	82 98,8%	83 100,0%
Ukupno		N %	29 17,4%	138 82,6%	167 100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov X2	30,032 ^a	1	<0,001		
N	167				

U primarnom melanomu kože značajno je češća niska izraženost E-kadherina (IIB 1-4) u odnosu na melanocite ($p < 0,001$).

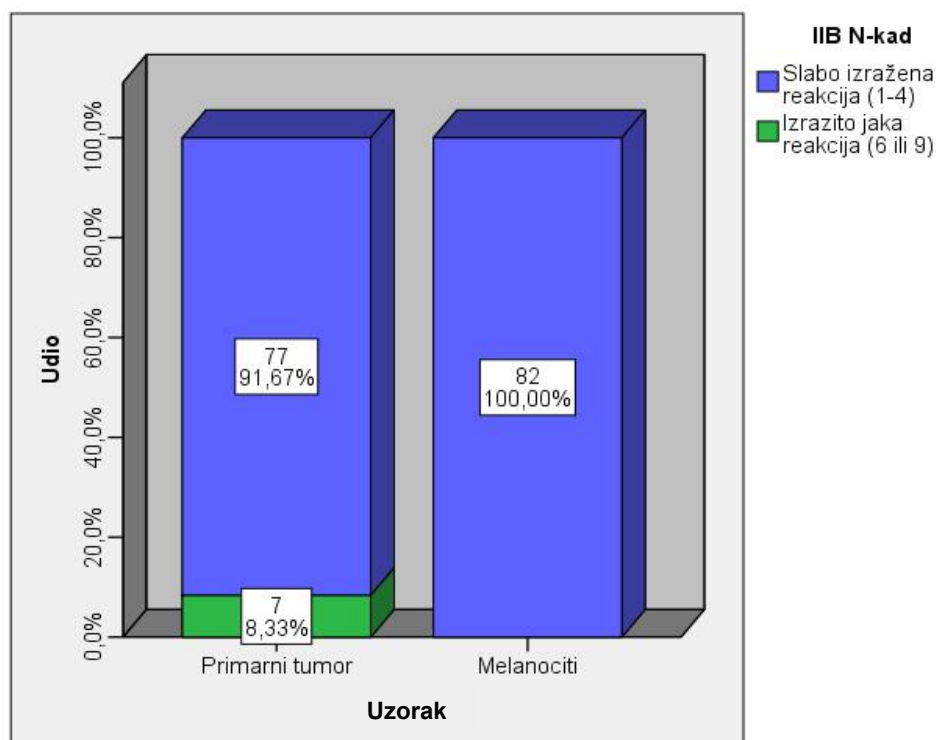


Slika 10. Izraženosti E-kadherina u PMK u odnosu na melanocite.

Tablica 16. Izraženosti N-kadherina u primarnom melanomu kože u odnosu na melanocite (χ^2 test)

			IIB N-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-4)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni melanom	N	77	7	84
		%	91,7%	8,3%	100,0%
	Melanociti	N	82	0	82
		%	100,0%	0,0%	100,0%
Ukupno		N	159	7	166
		%	95,8%	4,2%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	7,13	1	0,008		
N	166				

U primarnom melanomu kože je značajno češća visoka izraženost N-kadherina (IIB 6 ili 9) u odnosu na melanocite ($p=0,008$).

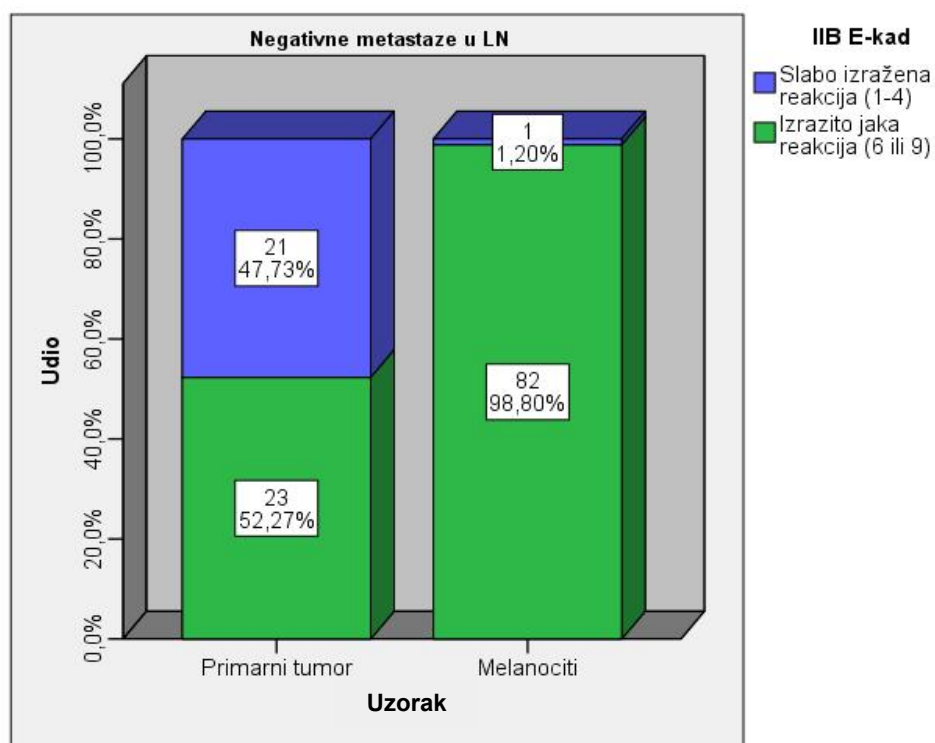


Slika 11. Izraženosti N-kadherina u PMK u odnosu na melanocite.

Tablica 17. Izraženosti E-kadherina u primarnom melanomu kože s negativnim metastazama u odnosu na melanocite (X^2 test)

Negativne metastaze u LN			IIB E-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-4)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni tumor	N %	21 47,7%	23 52,3%	44 100,0%
	Melanociti	N %	1 1,2%	82 98,8%	83 100,0%
Ukupno		N %	22 17,3%	105 82,7%	127 100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov X^2	43,45	1	<0,001		
N	127				

U primarnom melanomu kože bez metastaza u LN značajno je češća niska izraženost E-kadherina (IIB 1-4) u odnosu na melanocite ($p < 0,001$).

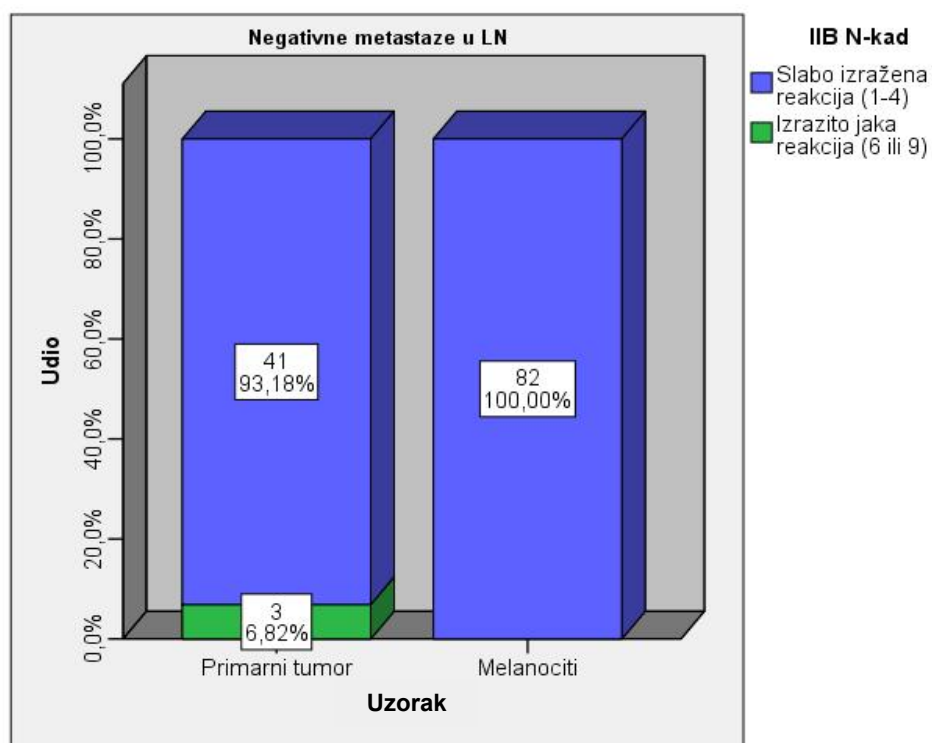


Slika 12. Izraženosti E-kadherina u PMK bez metastaza u LN u odnosu na melanocite.

Tablica 18. Izraženosti N-kadherina u primarnom melanomu kože bez metastaza u LN u odnosu na melanocite (χ^2 test)

Negativne metastaze u LN			IIB N-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-4)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni tumor	N	41	3	44
		%	93,2%	6,8%	100,0%
	Melanociti	N	82	0	82
		%	100,0%	0,0%	100,0%
Ukupno		N	123	3	126
		%	97,6%	2,4%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	5,72	1	0,017		
N	126				

U primarnom melanomu kože bez metastaza u LN značajno je češća visoka izraženost N-kadherina (IIB 6 ili 9) u odnosu na melanocite.

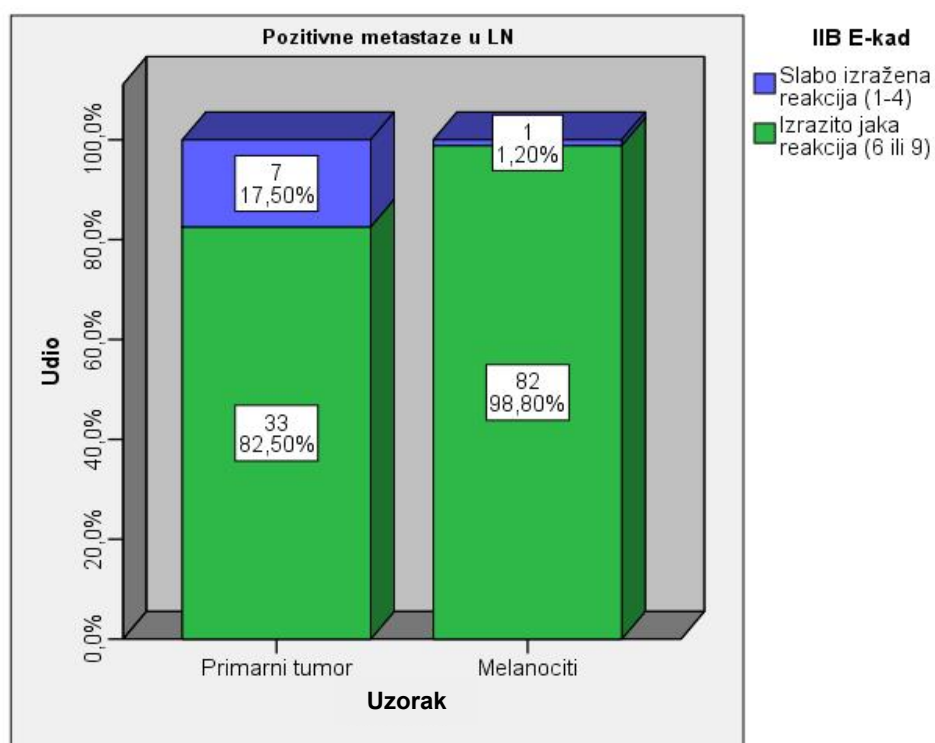


Slika 13. Izraženosti N-kadherina u PMK bez metastaza u regionalnim LN u odnosu na melanocite.

Tablica 19. Izraženosti E-kadherina u primarnom melanomu kože s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima u odnosu na melanocite (χ^2 test)

Pozitivne metastaze u LN			IIB E-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-4)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni tumor	N %	7 17,5%	33 82,5%	40 100,0%
	Melanociti	N %	1 1,2%	82 98,8%	83 100,0%
Ukupno		N %	8 6,5%	115 93,5%	123 100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	11,78	1	0,001		
N	123				

U primarnom melanomu kože s metastazama u LN značajno je češća niska izraženost E-kadherina (IIB 1-4) u odnosu na melanocite ($p=0,001$).

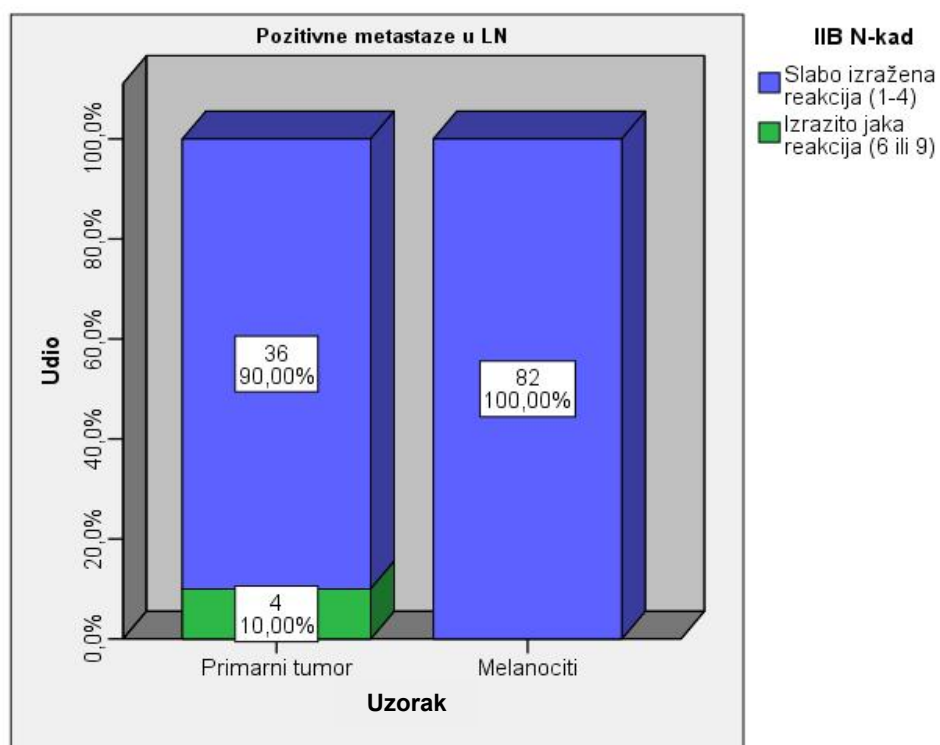


Slika 14. Izraženosti E-kadherina u PMK s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima u odnosu na melanocite.

Tablica 20. Izraženosti N-kadherina u primarnom melanomu kože s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima u odnosu na melanocite (χ^2 test)

Pozitivne metastaze u LN			IIB N-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-4)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni tumor	N %	36 90,0%	4 10,0%	40 100,0%
	Melanociti	N %	82 100,0%	0 0,0%	82 100,0%
Ukupno		N %	118 96,7%	4 3,3%	122 100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	8,47	1	0,004		
N	122				

U primarnom melanomu kože s metastazama u LN značajno je češća visoka izraženost N-kadherina u odnosu na melanocite.

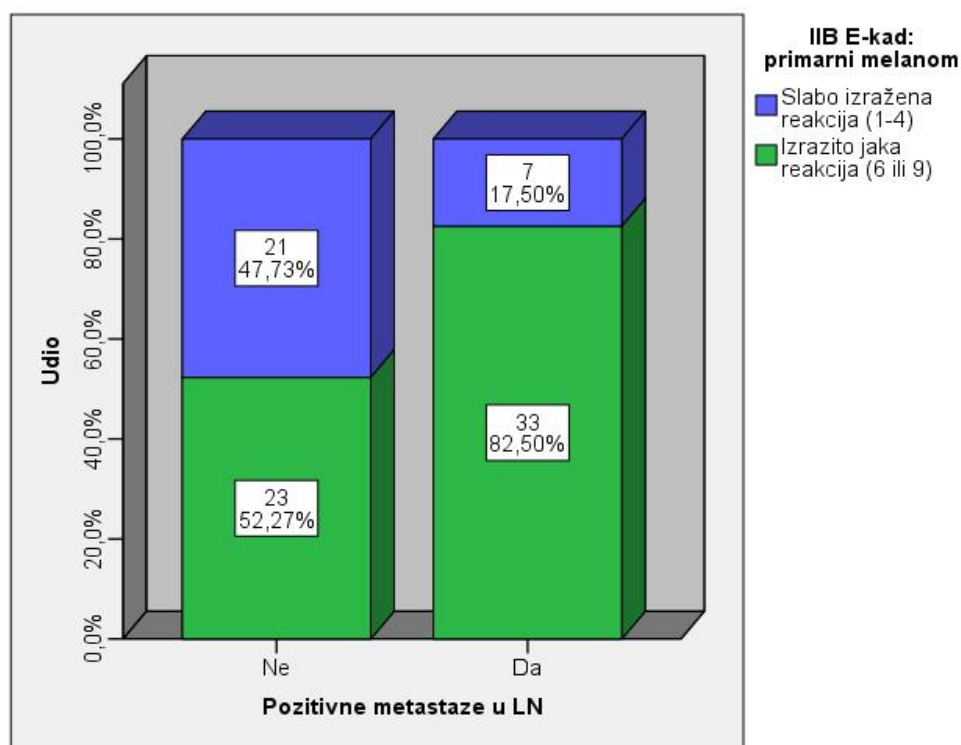


Slika 15. Izraženosti N-kadherina u PMK s metastazama u regionalnim LN u odnosu na melanocite.

Tablica 21. Izraženost E-kadherina u PMK s metastazama u regionalnim LN i primarnom melanomu bez metastaza u regionalnim LN (X^2 test)

			IIB E-kadherin: primarni melanom		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-6)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
LN pozitivni	Ne	N	21	23	44
		%	47,7%	52,3%	100,0%
	Da	N	7	33	40
		%	17,5%	82,5%	100,0%
Ukupno		N	28	56	84
		%	33,3%	66,7%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov X^2	8,615	1	0,003		
N	84				

Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože s metastazama u LN značajno je viša u odnosu na izraženost u primarnom melanomu bez metastaza u LN ($p=0,003$).

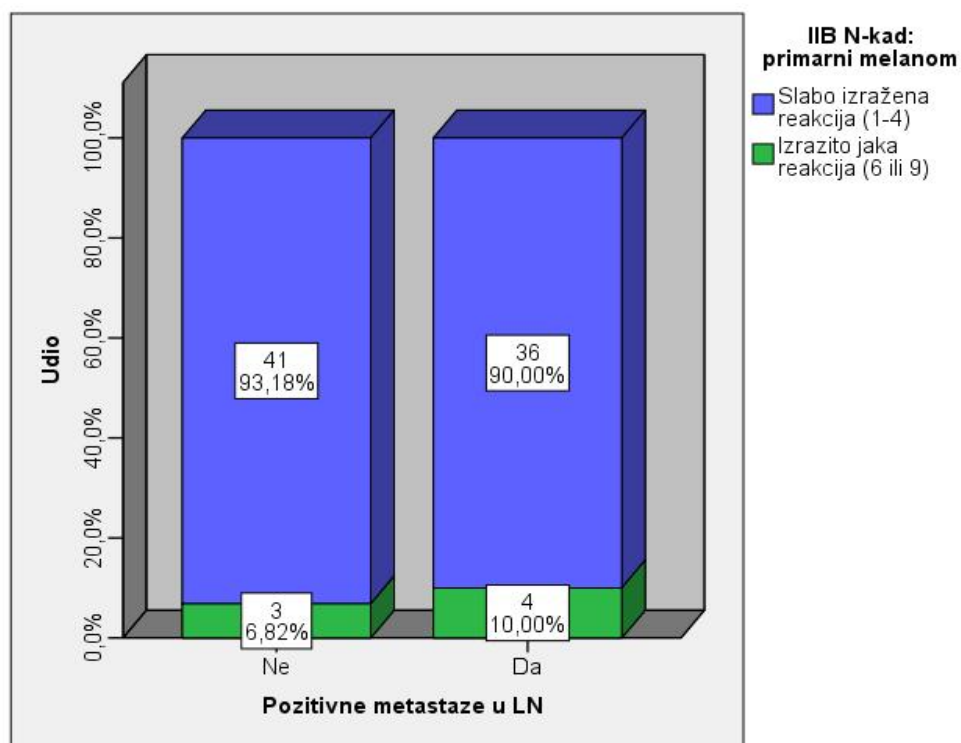


Slika 16. Izraženost E-kadherina u PMK s metastazama u LN i u PMK bez metastaza u LN.

Tablica 22. Izraženost N-kadherina u primarnom melanomu kože s metastazama u LN i primarnom melanomu bez metastaza u LN (χ^2 test)

			IIB N-kadherin: primarni melanom		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-6)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
LN pozitivni	Ne	N	41	3	44
		%	93,2%	6,8%	100,0%
	Da	N	36	4	40
		%	90,0%	10,0%	100,0%
Ukupno		N	77	7	84
		%	91,7%	8,3%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov χ^2	0,278	1	0,598		
N	84				

Nema značajne razlike u izraženosti N-kadherina u primarnom melanomu kože sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima ($p=0,598$).

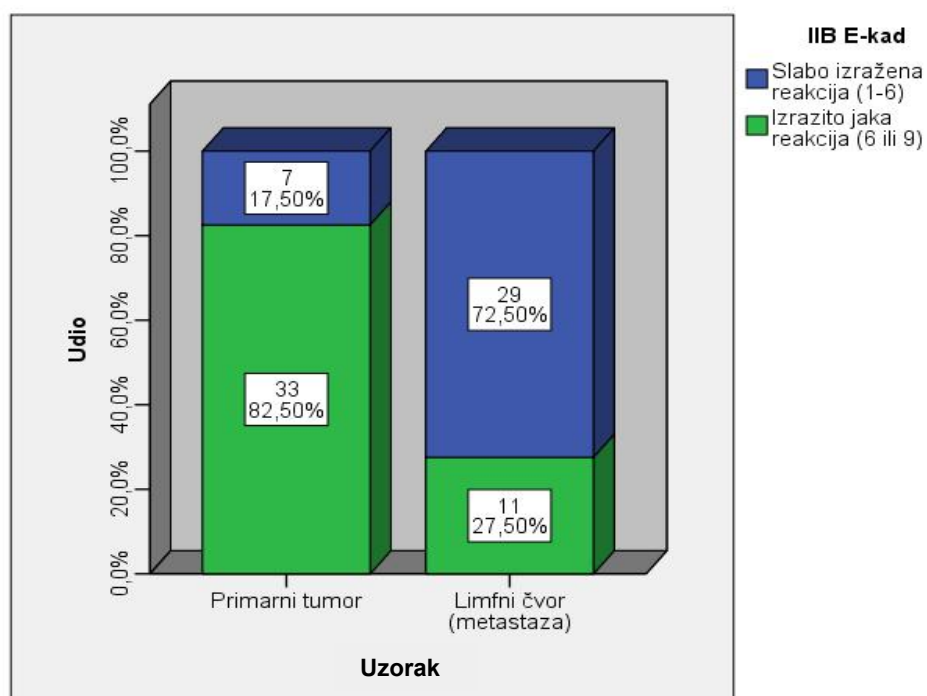


Slika 17. Izraženost N-kadherina u PMK sa i bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

Tablica 23. Izraženost E-kadherina u PMK ispitanika s pozitivnim LN u odnosu na izraženost E-kadherina u metastazi melanoma u regionalnom LN (n=40) (X^2 test)

			IIB E-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-6)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni tumor	N	7	33	40
		%	17,5%	82,5%	100,0%
	Limfni čvor (metastaza)	N	29	11	40
		%	72,5%	27,5%	100,0%
Ukupno		N	36	44	80
		%	45,0%	55,0%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov X^2	24,44	1	<0,001		
N	80				

U ispitanika s pozitivnim LN značajno je češća visoka izraženost E-kadherina (IIB 6 ili 9) u PMK u odnosu na izraženost E-kadherina u metastazi istog melanoma u LN ($p < 0,001$).

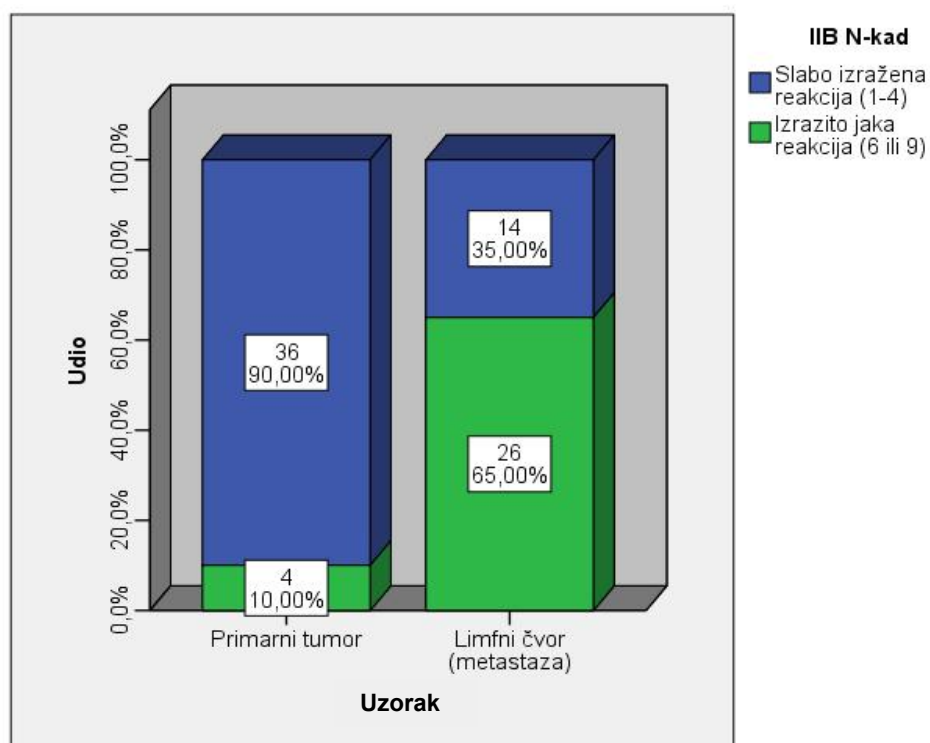


Slika 18. Izraženost E-kadherina u PMK ispitanika s pozitivnim LN u odnosu na izraženost E-kadherina u metastazi istog melanoma u regionalnim LN.

Tablica 24. Izraženost N-kadherina u PMK ispitanika s pozitivnim LN u odnosu na izraženost N-kadherina u metastazi istog melanoma u regionalnim LN (n=40) (X² test)

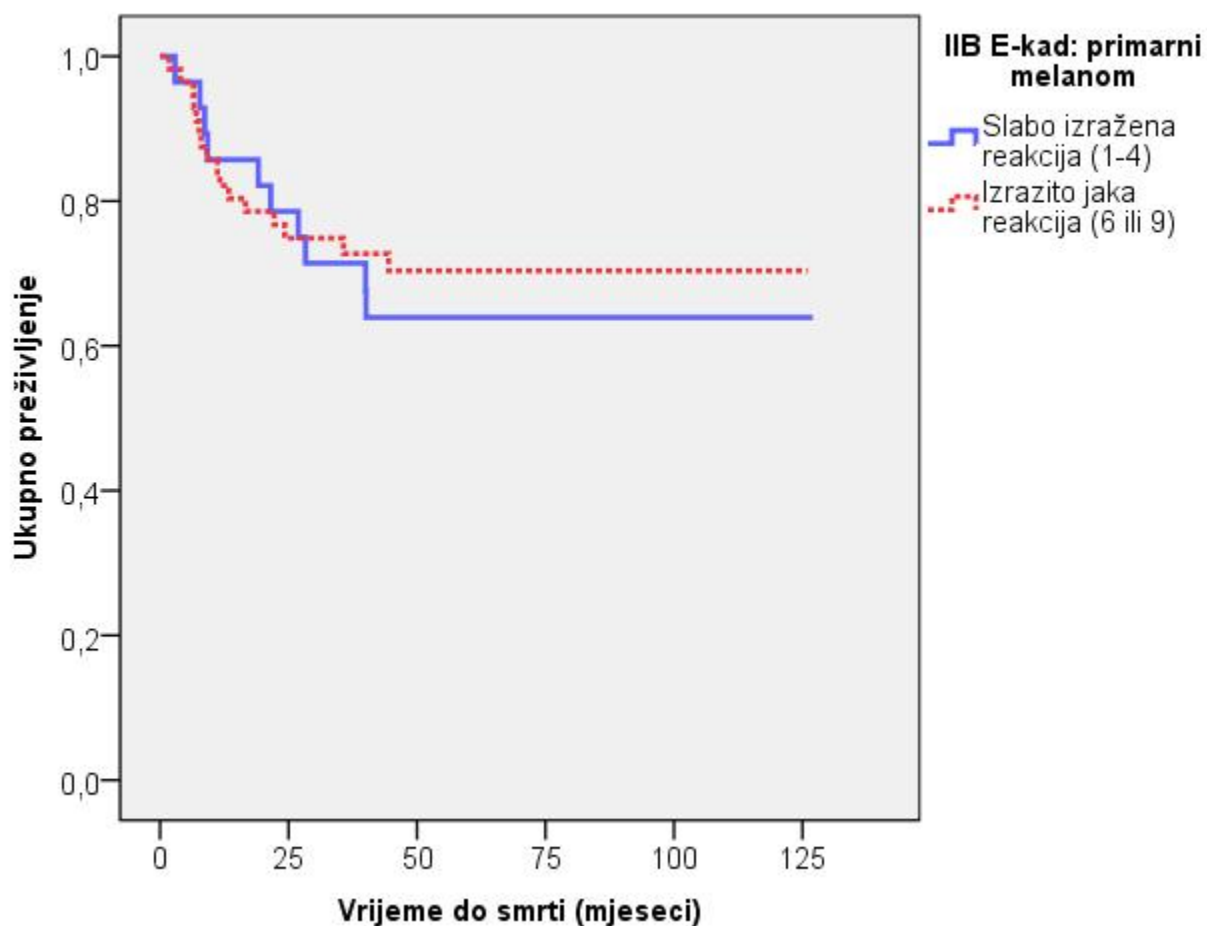
			IIB N-kadherin		Ukupno
			Slabo izražena reakcija (1-6)	Izrazito jaka reakcija (6 ili 9)	
Uzorak	Primarni tumor	N	36	4	40
		%	90,0%	10,0%	100,0%
	Limfni čvor (metastaza)	N	14	26	40
		%	35,0%	65,0%	100,0%
Ukupno		N	50	30	80
		%	62,5%	37,5%	100,0%
	Vrijednost	df	P		
Pearsonov X ²	25,81	1	<0,001		
N	80				

U ispitanika s PMK i pozitivnim LN značajno je češća visoka izraženost N-kadherina u metastazi u odnosu na primarni melanom (p<0,001).



Slika 19. Izraženost N-kadherina u PMK bolesnika s pozitivnim LN (n=40) u odnosu na izraženost N-kadherina u metastazi istog melanoma u LN.

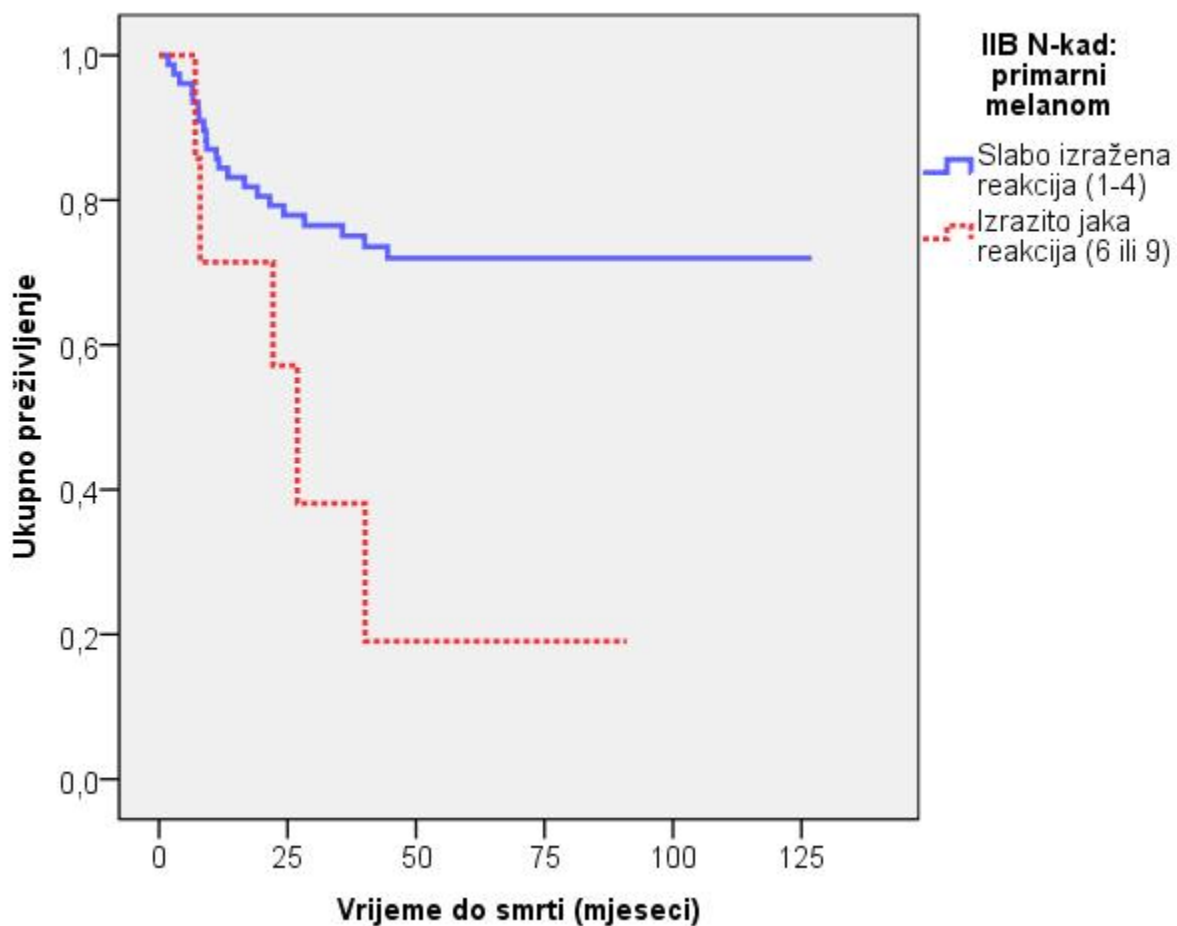
Krivulje preživljenja u odnosu na izraženost kadherina



	X2 test	df	P
Log Rank (Mantel-Cox)	0,169	1	0,681

Slika 20. Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože u odnosu na smrtni ishod (krivulja preživljenja prema Kaplan-Meieru).

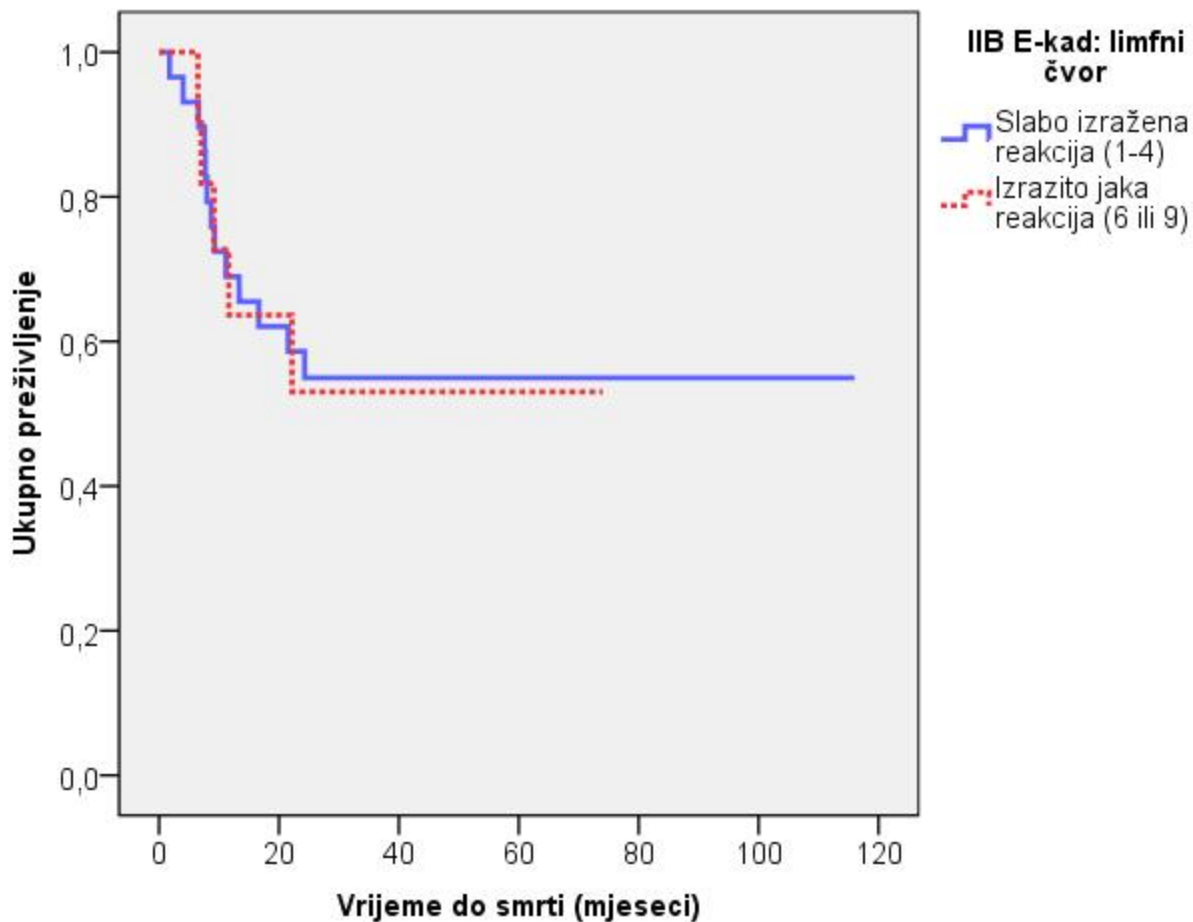
Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože u odnosu na smrtni ishod nije pokazala značajnu razliku u preživljenju ($p=0,681$).



	X2 test	df	P
Log Rank (Mantel-Cox)	6,66	1	0,010

Slika 21. Izraženost N-kadherina u primarnom melanomu kože u odnosu na smrtni ishod (krivulja preživljenja prema Kaplan-Meieru).

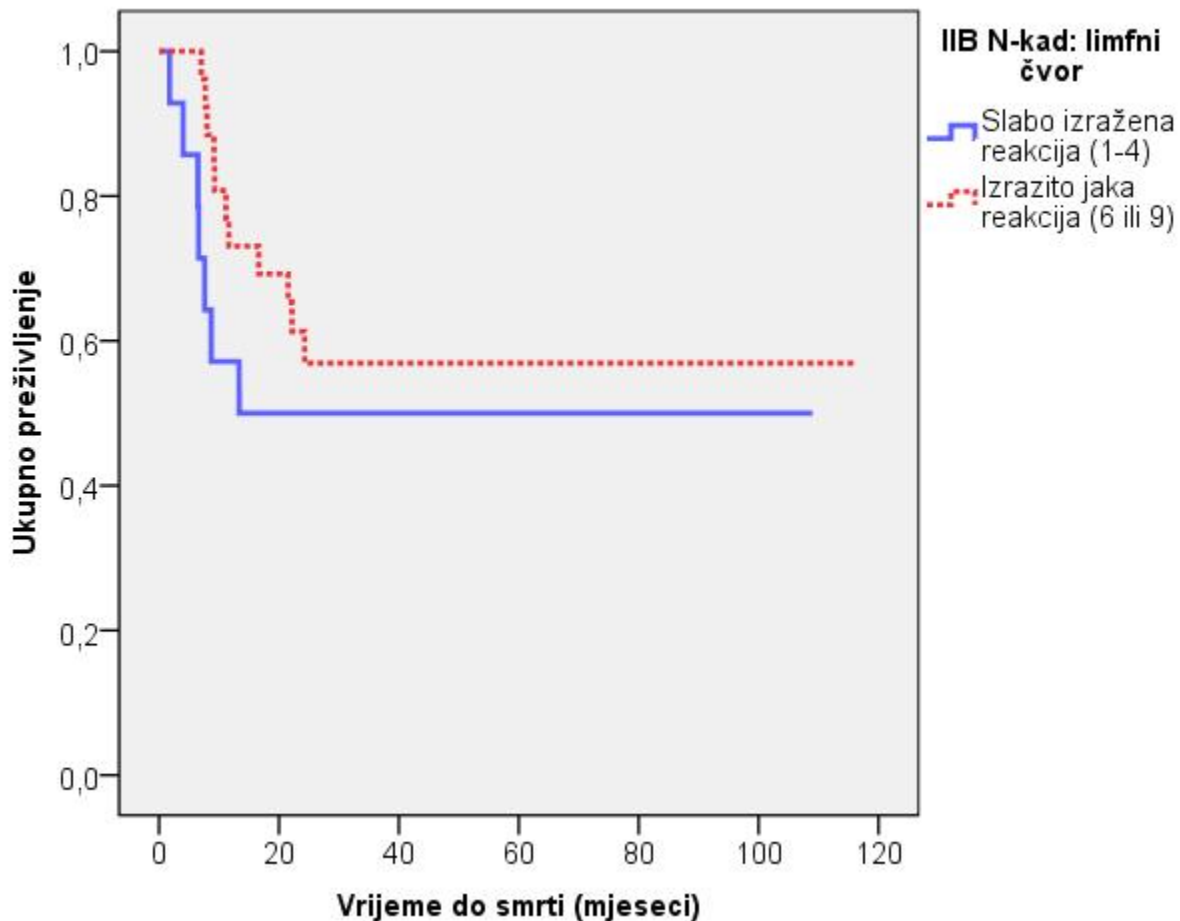
Izraženost N-kadherina u PMK u odnosu na smrtni ishod pokazala je značajnu razliku u preživljenju ($p=0,010$): ispitanici koji imaju visoko izražen N-kadherin (IIB 6 ili 9) u primarnom tumoru češće umiru ($p=0,010$).



	X2 test	df	P
Log Rank (Mantel-Cox)	0,003	1	0,956

Slika 22. Izraženost E-kadherina u metastazama u limfnim čvorovima u odnosu na smrtni ishod (krivulja preživljenja prema Kaplan-Meieru).

Izraženost E-kadherina u metastazi primarnog melanoma kože u limfnom čvoru u odnosu na smrtni ishod nije pokazala značajnu razliku u preživljenju ($p=0,956$).



	X2 test	df	P
Log Rank (Mantel-Cox)	0,828	1	0,363

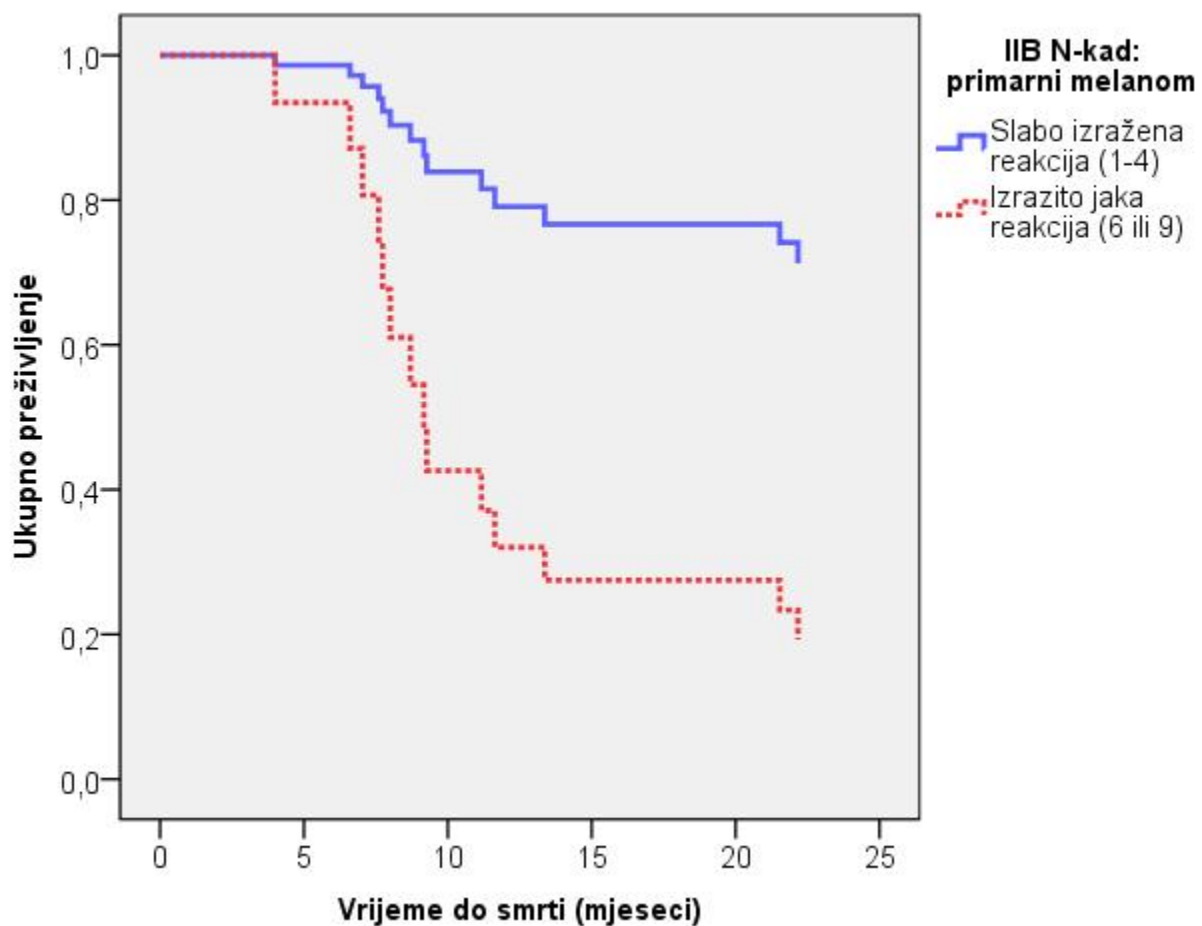
Slika 23. Izraženost N-kadherina u metastazama u limfnim čvorovima u odnosu na smrtni ishod (krivulja preživljenja prema Kaplan-Meieru).

Izraženost E- i N-kadherina u metastazama PMK u limfnim čvorovima u odnosu na smrtni ishod nije pokazala statistički značajnu razliku u preživljenju ispitanika ($p=0,956$ za E-kadherin, odnosno $p=0,363$ za N-kadherin). Identični podatci su dobiveni i za recidiv bolesti.

Tablica 25. Predikcija smrtnog ishoda u odnosu na vrijeme praćenja (Cox proportional hazards regression)

	B	SE	Wald	P	OR	95,0% CI	
						Donji	Gornji
IIB N-kad: primarni melanom, izrazito jaka reakcija (6 i 9)	1,58	0,78	4,08	0,043	4,86	1,05	22,52
IIB E-kad: primarni melanom, izrazito jaka reakcija (6 i 9)	-0,90	0,96	0,88	0,347	0,41	0,06	2,66
IIB E-kad: limfni čvor, izrazito jaka reakcija (6 i 9)	-0,37	0,85	0,19	0,662	0,69	0,13	3,68
IIB N-kad: limfni čvor, izrazito jaka reakcija (6 i 9)	-0,73	0,80	0,82	0,365	0,48	0,10	2,33
Dob (godine)	-0,01	0,02	0,18	0,670	0,99	0,95	1,03
Ženski spol	0,35	0,71	0,25	0,620	1,42	0,35	5,73
Breslow	1,07	0,71	2,29	0,130	2,91	0,73	11,59
Nx	0,44	0,43	1,07	0,301	1,55	0,67	3,58
Broj mitozā/ mm ²	0,22	0,44	0,26	0,612	1,25	0,53	2,93
Ulceracija	0,04	0,68	0,00	0,956	1,04	0,27	3,93

Jedini značajni prediktor, kontroliran na ostale varijable uključene u Coxov regresijski model preživljenja, je visoka izraženost N-kadherina u primarnom melanomu. Ispitanici koji imaju visoko izražen N-kadherin (IIB 6 ili 9) imaju 4,86 puta veću šansu umrijeti u odnosu na one koji imaju nisko izražen N-kadherin, a kontrolirano na ostale varijable u modelu. Ostali analizirani kliničko-patološki čimbenici (tablica 25) nisu pokazali prediktivnu vrijednost u odnosu na smrtni ishod.

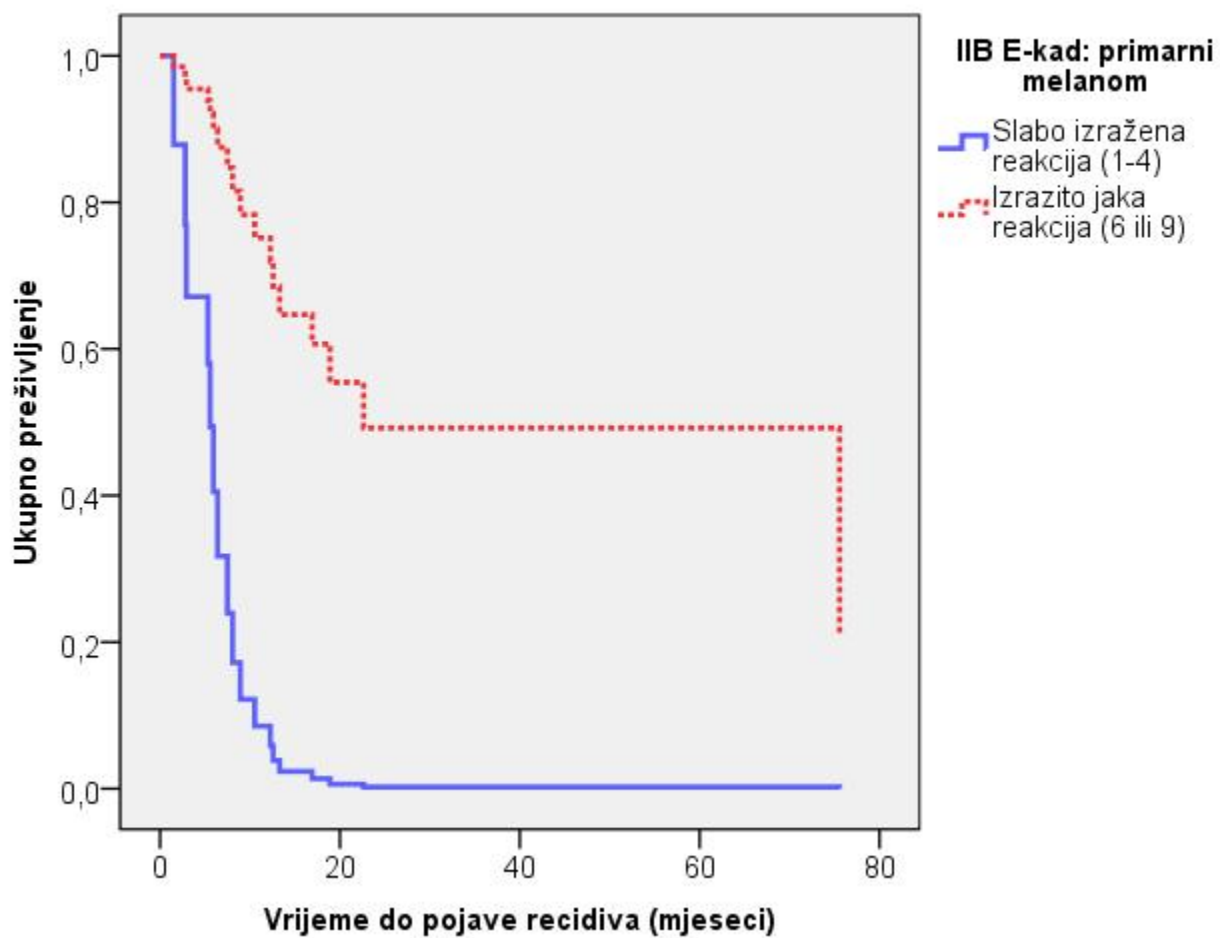


Slika 24. Predikcija smrtnog ishoda u odnosu na vrijeme praćenja (Cox proportional hazards regression).

Tablica 26. Predikcija nastanka recidiva u odnosu na vrijeme praćenja (Cox proportional hazards regression)

	B	SE	Wald	P	OR	95,0% CI	
						Donji	Gornji
IIB N-kad: primarni melanom, izrazito jaka reakcija (6 i 9)	0,37	0,85	0,19	0,665	1,44	0,27	7,57
IIB E-kad: primarni melanom, niska izraženost	2,15	1,00	4,59	0,032	8,61	1,20	61,71
IIB E-kad: limfni čvor, visoka izraženost (6 i 9)	1,00	0,73	1,84	0,175	2,71	0,64	11,43
IIB N-kad: limfni čvor, visoka izraženost (6 i 9)	-0,22	0,57	0,15	0,702	0,80	0,26	2,45
Dob (godine)	-0,01	0,02	0,49	0,482	0,99	0,95	1,03
Ženski spol	1,48	0,70	4,50	0,034	4,38	1,12	17,17
Breslow	0,30	0,40	0,56	0,453	1,35	0,61	2,99
Nx	0,05	0,40	0,01	0,906	1,05	0,48	2,28
Broj mitozā/ mm ²	0,18	0,39	0,21	0,648	1,19	0,56	2,57
Ulceracija	-0,24	0,76	0,10	0,755	0,79	0,18	3,49

U predikciji recidiva, najjači značajni prediktor je niska izraženost E-kadherina u primarnom tumoru. Ispitanici koji imaju nisko izražen E-kadherin u primarnom tumoru imaju 8,61 puta veću šansu za recidiv melanoma. Također značajan je i spol: žene imaju 4,38 puta veću šansu za recidiv od muškaraca, kontrolirano u odnosu na ostale varijable u modelu, dok ostali analizirani kliničko-patološki čimbenici (tablica 26) nisu pokazali prediktivnu vrijednost u odnosu na DFS (disease free-survival).



Slika 25. Predikcija nastanka recidiva u odnosu na vrijeme praćenja (Cox proportional hazards regression).

5 RASPRAVA

Izrazito agresivno ponašanje i visoki metastatski potencijal, uz otpornost na postojeću farmakološku terapiju, stavlja bolesnike s melanomom, a posebice s metastazama melanoma, u skupinu s visokim rizikom za smrtni ishod. Premda su morfološki standardi poput debljine tumora i stanja limfnih čvorova i dalje najpouzdaniji prognostički čimbenici, većina ispitivanja danas se bavi proučavanjem i pronalaskom novih, o kliničkim kriterijima neovisnih, tkivnih biomarkera i njihovim utjecajem na prognozu bolesti. To se osobito odnosi na identifikaciju specifičnih molekula uključenih u proces metastaziranja melanoma, kao i usmjeravanje terapijskih postupaka prema ovim čimbenicima. Znanje o invazivnosti i metastatskom potencijalu melanoma, ali i drugih zloćudnih epitelnih tumora značajno se povećalo posljednjih desetljeća.

Ključan proces u tumorskoj invaziji je epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT) u kojoj epitelne stanice gube svoju epitelnu diferenciranost i stječu mezenhimalni fenotip, a karakterizirana je smanjenjem funkcionalnog E-kadherina (58). Tako je nađeno da je smanjena izraženost E-kadherina povezana s invazivnim fenotipom i uznapredovalim tumorskim stadijem kod mnogih tumora, poput karcinoma prostate, želuca, kolona i dojke (101). Gubitak funkcionalnog E-kadherina uzrokuje poremećaj u međustaničnim kontaktima, pucanje pričvrstnih spojeva i odvajanje tumorskih stanica od glavne tumorske mase. Tumorske stanice postaju mobilne, a u kontaktu s izvanstaničnim matriksom metastaziraju. Gubitak E-kadherina aktivacijom NFκB dovodi do povećane izraženosti N-kadherina (75), a upravo N-kadherin omogućava metastatsko širenje melanoma interakcijom melanomskih stanica sa drugim stanicama na površini kojih je izražen N-kadherin, poput dermalnih fibroblasta i stanica vaskularnog endotela (102). Promjena u izraženosti E-kadherina i N-kadherina (engl. «switch») predstavlja ključni događaj u prijelazu iz radijalne u vertikalnu fazu rasta melanoma, invaziji okolnih tkiva kao i širenju melanoma u regionalne limfne čvorove i udaljene organe.

Pored opisane uloge u stvaranju pričvrtnih spojeva, E-kadherin sudjeluje i u održavanju diferencijacije epitela svojom ulogom negativnog regulatora β -katenina, glavnog medijatora aktivnog WNT signalnog puta, vezanjem β -katenina u pričvrtnim spojevima čime se inhibira lokalizacija β -katenina u jezgri i aktivacija WNT ciljnih gena. Gubitkom E-kadherina dolazi do nakupljanja β -katenina u jezgri i izvršenja programa aktivacije ciljnih gena, povezujući EMT s WNT signalnim putem (74). Budući je WNT signalni put povezan s EMT izravno preko aktivacije represora transkripcije E-kadherina iz obitelji snail2, ali i posredno, aktivacijom ZEB1 preko drugih WNT ciljnih gena, ovi procesi čine krug pozitivne povratne sprege u dediferencijaciji invazivnih tumorskih stanica (74). Čini se dakle, da bi se manipulacijom regulacijskih putova izraženosti E-kadherina moglo ponovno uspostaviti normalnu epitelnu diferencijaciju i spriječiti metastaziranje zloćudnih tumora. Takvo isključivanje i ponovno uključivanje izraženosti E-kadherina vidljivo je u normalnim procesima embriogeneze i u metastazama karcinoma dojke i nekih drugih karcinoma koji često pokazuju veću izraženost E-kadherina nego njihovi primarni tumori (101). Za razliku od navedenih karcinoma, izgleda da je u metastaziranju melanoma ključan događaj «switch» između E- i N-kadherina u korist N-kadherina. Imunohistokemijska istraživanja su potvrdila povećanu izraženost N-kadherina, ali i ostalih molekula koje sudjeluju u metastaziranju melanoma, poput lumikana, gliplikana, osteonektina (SPARC), metaloproteinaza i integrina (103). Važnost promjene u izraženosti E- i N-kadherina pokazana je u *in vitro* istraživanjima u kojima je nakon transfekcije staničnih linija melanoma s N-kadherinom došlo do značajne morfološke transformacije tumorskih stanica. Stanice epiteloidnog oblika su poprimile oblik sličan fibroblastima, dok je ponovno uspostavljanje izraženosti E-kadherina u stanicama melanoma uzrokovalo smanjenje izraženosti endogenog N-kadherina, uz smanjenje malignog potencijala melanoma (104).

Povezanost EMT s upalom u staničnom mikro okolišu i metatazama u limfnim čvorovima opisana je u preglednom članku Wu i sur. $\text{TNF}\alpha$ i $\text{TGF}\beta$ su glavni proinflamatorni citokini koji izravno induciraju izraženost $\text{NF}\kappa\text{B}$, glavnog signalnog puta tijekom upalnih procesa u stanici. $\text{NF}\kappa\text{B}$ potiče izraženost Snail1 i

ZEB, pokretača EMT, što ima za posljedicu smanjenu izraženost E-kadherina i povećanu izraženost N-kadherina (105).

Pećina-Šlaus i sur. (106) su pokazali da je izraženost E-kadherina značajno smanjena u svim uzorcima melanoma u odnosu na izraženost u okolnoj zdravoj koži (106). Zaključili su da promjene u izraženosti E-kadherina i β -katenina imaju važnu ulogu u nastanku melanoma, te stoga predstavljaju važne molekulske čimbenike u praćenju progresije bolesti. Analizom ostalih parametara, nije nađena korelacija između izraženosti E-kadherina i stupnja invazije tumora po Clarku, no zabilježena je značajna razlika u izraženosti β -katenina u različitim stupnjevima po Clarku. U velikom broju melanoma je zabilježena membranska izraženost β -katenina koju Rimm i sur. (14) objašnjavaju pojačanom izraženošću N-kadherina u stanicama melanoma koji svojom citoplazmatskom domenom veže β -katenin (107).

Istraživanje Kreizenbeck i sur. (14) je pokazalo da gubitak E-kadherina korelira s lošom prognozom melanoma, dok je indukcija N-kadherina pozitivno utjecala na ukupno preživljenje što je u suprotnosti sa očekivanom lošijom prognozom melanoma nakon EMT (14). Ovi rezultati su na neki način potvrdili i proširili istraživanja Bittner i sur. (78), te Onken i sur. (108) koji su analizirajući cDNA klasificirali melanome na epiteloidne i melanome podrijetlom iz neuralnog grebena. Iz navedenog se može zaključiti da s obzirom na različitu izraženost N-kadherina i ishod bolesti, postoje dvije vrste melanoma, EMT-pozitivni, metastazama skloni melanomi i EMT-negativni, dobro diferencirani tumori s povoljnom prognozom.

U istraživanju Attis i sur. (109) zabilježena je snažna pozitivna korelacija između pojačane izraženosti N-kadherina u dezmoplastičnom melanomu i sklonosti stvaranju udaljenih metastaza. Za razliku od toga, u dezmoplastičnih melanoma niskog potencijala metastaziranja, N-kadherin je bio negativan ili tek mjestimično blago izražen iz čega zaključuju da izraženost N-kadherina predstavlja koristan marker u razlikovanju dezmoplastičnih melanoma visokog metastatskog potencijala (109).

Andersen i sur. (110) su analizirali izraženost S100A4 i E-kadherina u primarnim melanomima sa i bez metastaza, te usporedili njihovu izraženost s kliničko patološkim parametrima. Pokazali su izravnu korelaciju E-kadherina sa debljinom primarnog tumora, te otkrili da bolesnici sa slabo izraženim E-kadherinom imaju kraće vrijeme do pojave bolesti. Budući da S100A4 isto tako ukazuje na agresivni fenotip melanoma, kombinacija ove dvije varijable predstavlja potencijalni prognostički čimbenik u bolesnika s melanomom koji nije metastazirao (110).

Proučavajući *in vitro* izraženost E-kadherina u melanomu, Danen i sur. (38) su pokazali da je E-kadherin izražen u staničnim kulturama melanocita i stanica nevusa, nedostaje u stanicama invazivnog, metastatskog melanoma, ali se isto tako rijetko vidi u ranoj fazi tumorskog rasta *in situ* melanoma (38)

Razlika u izraženosti E-kadherina i N-kadherina u PMK koji nije metastazirao i metastatskom melanomu do sada nije opisana, osim kod dezmoplastičnog melanoma (109), kao niti razlika u izraženosti E-kadherina i N-kadherina u PMK i metastazama u limfnim čvorovima. Protektivan učinak E-kadherina je zabilježen u brojnim ispitivanjima, no uglavnom nije dosegao statistički značajne vrijednosti u pojedinačnim analizama ($p = 0,10$) (14).

U ovom je istraživanju po prvi puta pokazana statistički značajno viša izraženost N-kadherina u PMK u odnosu na melanocite epidermisa. Isto tako je potvrđena statistički značajno viša izraženost N-kadherina u metastazi melanoma u limfnom čvoru u odnosu na izraženost u PMK. Kako je upravo N-kadherin čimbenik koji omogućava metastaziranje melanoma svojim vezanjem na N-kadherinsku molekulu fibroblasta i endotelnih stanica, kao i susjednih stanica melanoma, visoka izraženost N-kadherina ukazuje na agresivno ponašanje melanoma i lošiju prognozu bolesti. Zabilježeno je i statistički značajno smanjenje izraženosti E-kadherina u PMK u odnosu na melanocite, ali i daljnje značajno smanjenje izraženosti E-kadherina u metastazi melanoma u limfnom čvoru u odnosu na PMK. Iz toga možemo zaključiti da se melanom ponaša različito od drugih epitelnih tumora. Ulogu reekspirmiranog E-kadherina u metastazi melanoma preuzima N-kadherin, što se tumači podrijetlom melanocita iz stanica

neuralnog grebena i njihovom urođenom sklonosti epitelno mezenhimalnoj tranziciji (EMT). N-kadherinska molekula se veže homotipnim vezama za susjednu melanomsku stanicu, ali se isto tako jednakim afinitetom veže za N-kadherinsku molekulu fibroblasta i endotelnih stanica i omogućava metastaziranje melanoma. Premda smo očekivali da će se izraženost E- i N-kadherina razlikovati kod primarnih melanoma kože sa i bez metastaza u LN, nismo dobili statistički značajnu razliku u izraženosti N-kadherina između PMK s i bez metastaza ($p=0,598$). Dok je za E-kadherin zabilježena statistički značajna ($p=0,003$) viša izraženost E-kadherina u primarnom melanomu s metastazama u LN, u odnosu na melanom koji nije metastazirao u LN. Obzirom na dinamičko stanje izraženosti E- i N-kadherina u samom tumoru ovisno da li se gleda preparat dobiven iz sredine tumora ili s njegove fronte moguće je da bi se različita izraženost dobila da su se odvojeno analizirali različiti dijelovi primarnog tumora. Uspoređujući podatke izraženosti E-kadherina u PMK i pratećoj metastazi u LN, dobili smo statistički značajno višu izraženost E-kadherina u PMK u odnosu na izraženost u pratećoj metastazi u LN (X^2 test, $p<0,001$), a što je u skladu s lošijom prognozom bolesnika s melanomom i nisko izraženim E-kadherinom. Isto tako je zabilježena statistički značajno viša izraženost N-kadherina u metastazi u LN u odnosu na PMK (X^2 test, $p<0,001$), čime smo i imunohistokemijski pokazali da dolazi do promjene u izraženosti E- i N-kadherina u samoj metastazi u odnosu na PMK.

Premda niti jedna od molekula kadherinskog sustava nema pojedinačno neovisnu prognostičku vrijednost, analize više molekula zajedno u kombinaciji s poznatim prognostičkim čimbenicima pokazale su značajan utjecaj na preživljenje oboljelih od melanoma. Tako je uočena loša prognoza u skupini bolesnika velike debljine tumora po Breslowu i slabo izraženog ili odsutnog E-kadherina, upravo zbog velikog invazivnog potencijala navedenih tumora (98).

U ovom je istraživanju po prvi puta analizirana povezanost izraženosti E-kadherina i N-kadherina sa tradicionalnim kliničkim i patohistološkim čimbenicima. Izraženost N-kadherina značajno je i pozitivno korelirala s T stadijem melanoma prema AJCC klasifikaciji (13) i debljinom tumora po

Breslowu. Utvrđena je i negativna korelacija E-kadherina s dobi ispitanika. Mlađi ispitanici su imali visoko izraženi E-kadherin, a što je u skladu s opaženom boljom prognozom melanoma u mladim bolesnika. Utvrđena je i pozitivna korelacija izraženosti N-kadherina u metastazi melanoma u limfnom čvoru s većim stupnjem TIL.

Izraženost N-kadherina u PMK pokazala je značajan utjecaj na preživljenje. Ispitanici koji imaju visoku izraženost N-kadherina (IIB 6 ili 9) imaju 4,86 puta veću šansu umrijeti u odnosu na one koji imaju nisku izraženost. Izraženost E-kadherina u PMK nije pokazala značajan utjecaj na preživljenje, kao niti izraženost E-kadherina i N-kadherina u metastazi melanoma u LN. Idenični podatci su dobiveni analizirajući utjecaj na pojavu recidiva melanoma. U predikciji recidiva, najjači značajni prediktor bila je niska izraženost E-kadherina u PMK. Ispitanici koji su imali nisku izraženost E-kadherina u PMK, imaju 8,61 puta veću šansu dobivanja recidiva. Spol se također pokazao značajnim čimbenikom predviđanja recidiva. Tako žene imaju 4,38 puta veću šansu dobivanja recidiva od muškaraca, kontrolirano na ostale varijable u modelu.

Dobivenim rezultatima potvrđeno je da u PMK i metastazi melanoma u limfnom čvoru dolazi do promjene u izraženosti E-kadherina i N-kadherina (engl. «switch»), a koju je moguće i imunohistokemijski dokazati. Izraženost N-kadherina raste s agresivnošću melanoma, stoga bi se upravo određivanjem N-kadherina mogao učiniti bolji odabir bolesnika koji bi imali koristi od agresivnijeg kirurškog liječenja, ali i pružila im se mogućnost sudjelovanja u kliničkim ispitivanjima novih lijekova za liječenje melanoma.

6 ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. E-kadherin i N-kadherin bili su izraženi u svim analiziranim uzorcima primarnog melanoma kože. Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože bila je značajno niža u odnosu na melanocite (X^2 test, $p < 0,001$), dok je izraženost N-kadherina u primarnom melanomu kože bila je značajno viša u odnosu na melanocite (X^2 test, $p = 0,008$).
2. Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu s metastazom u LN bila je značajno viša u odnosu na izraženost u primarnom melanomu bez metastaza u limfnim čvorovima (X^2 test, $p = 0,003$). Nije bilo značajne razlike u izraženosti N-kadherina u primarnom melanomu sa i bez metastaza u LN (X^2 test, $p = 0,598$).
3. Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože ispitanika bila je značajno viša u odnosu na izraženost u metastazi istog melanoma u LN (X^2 test, $p < 0,001$). Izraženost N-kadherina u primarnom melanomu ispitanika bila je značajno niža u usporedbi s izraženosti u metastazi istog melanoma u LN (X^2 test, $p < 0,001$).
4. Izraženost E-kadherina u primarnom melanomu kože nije pokazala značajan utjecaj na preživljenje (Kaplan Meier analiza, $p = 0,681$). Dok je izraženost N-kadherina u primarnom melanomu kože pokazala značajan utjecaj na preživljenje (Kaplan Meier analiza, $p = 0,010$): ispitanici koji imaju visoko izražen N-kadherin u primarnom melanomu češće umiru.
5. Izraženosti E-kadherina i N-kadherina u metastazi melanoma u LN nisu pokazale značajan utjecaj na preživljenje bolesnika (Kaplan Meier analiza, $p = 0,956$, odnosno $p = 0,363$). Identični su podatci dobiveni i za recidiv bolesti.
6. Visoka izraženost N-kadherina u primarnom melanomu bila je jedini značajni prediktor koreliran na ostale varijable uključene u Coxov regresijski model preživljenja ($p = 0,043$). Ispitanici s visoko izraženim N-

kadherinom imaju 4,86 puta veću šansu umrijeti u odnosu na ispitanike s nisko izraženim N-kadherinom.

7. Niska izraženost E-kadherina u primarnom melanomu bila je značajni prediktor recidiva (Cox proportional hazards regression, $p=0,032$). Ispitanici s nisko izraženim E-kadherinom imaju 8,61 puta veću šansu recidiva melanoma. Žene imaju 4,38 puta veću šansu recidiva melanoma od muškaraca (Cox proportional hazards regression, $p=0,034$).
8. Visoka izraženost N-kadherina u primarnom melanomu kože povezana je s većom debljinom tumora prema Breslowu (Spearmanov test korelacije, $p=0,032$) i višim stadijem T klasifikacije (Spearmanov test korelacije, $p=0,006$). Isto tako visoka izraženost N-kadherina u metastazi melanoma u LN povezana je s debljim melanomom (Spearmanov test korelacije, $p=0,096$) i višim T stadijem (Spearmanov test korelacije, $p=0,084$).
9. Skupine bolesnika s primarnim melanomom kože i pozitivnim LN imale su značajno deblji primarni melanom, kraće vrijeme do recidiva i smrti, te kraće vrijeme ukupnog praćenja (Mann-Whitney U test, $p<0,001$).

7 SAŽETAK

Primarni melanom kože (PMK) čini samo 4% tumora kože, no odgovoran je za 80% smrtnih ishoda od svih kožnih tumora. Mogućnost lokalnog recidiva je velika, čak i u bolesnika s adekvatno provedenom kirurškom terapijom, a zbog otpornosti melanoma na farmakološku terapiju, većina će bolesnika s metastazama podleći bolesti. Stoga je identifikacija nezavisnih prognostičkih čimbenika uz staging pri postavljanju dijagnoze, prioritet mnogih kliničkih ispitivanja. Kadherini su molekule odgovorne za komunikaciju i adheziju melanocita i keratinocita, a promjene u njihovoj izraženosti poput «switcha» između E- i N-kadherina upućuju na invazivno ponašanje melanoma.

Hipoteza ovog istraživanja je da je izraženost E-kadherina i N-kadherina u stanicama primarnog melanoma kože (PMK) koji je metastazirao u regionalne limfne čvorove snižena u odnosu na PMK koji nije metastazirao. Izraženost E-kadherina je snižena u PMK, a povišena u metastazi tog istog melanoma u limfnom čvoru, a izraženost N-kadherina je povišena u PMK, a snižena u pratećoj nodalnoj metastazi. Drugim riječima, bolesnici sa sniženom izraženošću E-kadherina, a povišenom izraženošću N-kadherina imaju lošiju prognozu bolesti. S obzirom na postavljenu hipotezu ciljevi ovog istraživanja su: imunohistokemijski odrediti izraženost E- i N-kadherina u stanicama PMK sa i bez metastaza u LN, usporediti izraženost navedenih biljega u primarnom tumoru i pratećim metastazama u LN, usporediti izraženost E- i N-kadherina s tradicionalnim prognostičkim čimbenicima i odrediti povezanost izraženosti E- i N-kadherina u PMK s vremenom preživljenja bez znakova bolesti i s ukupnim preživljenjem bolesnika s PMK.

Ovim su istraživanjem imunohistokemijski analizirana 84 uzorka PMK od kojih 44 primarna melanoma bez metastaza u LN i 40 primarnih melanoma s pozitivnim LN te su postavljeni slijedeći ciljevi: odrediti imunohistokemijski izraženost E- i N-kadherina u stanicama PMK s i bez metastaza u limfne čvorove, kao i usporediti izraženost navedenih biljega u primarnom tumoru i metastazama; usporediti izraženost E- i N-kadherina s tradicionalnim

prognostičkim čimbenicima (debljina tumora prema Breslowu, ulceracija površine melanoma, broj mitozâ, infiltracija tumora limfocitima, stupanj invazije po Clarku, TNM stadij, dob i spol bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze); odrediti povezanost izraženosti E- i N-kadherina s vremenom preživljenja bez znakova bolesti i s ukupnim preživljenjem bolesnika s melanomom.

E- i N-kadherin su bili izraženi u svim uzorcima PMK. Izraženost E-kadherina u PMK bila je značajno niža u odnosu na melanocite ($p < 0,001$), a N-kadherina viša u odnosu na melanocite ($p = 0,008$). Izraženost E-kadherina u PMK s metastazom u LN bila je značajno viša u odnosu na izraženost u PMK bez metastaza u limfnim čvorovima ($p = 0,003$). Nije bilo značajne razlike u izraženosti N-kadherina u PMK s pozitivnim LN i PMK s negativnim LN ($p = 0,598$). Izraženost E-kadherina u PMK ispitanika s pozitivnim LN bila je značajno viša u usporedbi s izraženosti u metastazi u LN ($p < 0,001$), a izraženost N-kadherina u PMK bila je značajno niža u usporedbi s izraženosti u metastazi melanoma u LN ($p < 0,001$). Izraženost N-kadherina u PMK pokazala je značajan utjecaj na preživljenje ($p = 0,010$). Niska izraženost E-kadherina u PMK bila je značajni prediktor recidiva ($p = 0,032$).

Dobivenim rezultatima potvrđeno je da u PMK i metastazi melanoma u limfnom čvoru dolazi do promjene u izraženosti E-kadherina i N-kadherina (engl. «switch»), a koju je moguće i imunohistokemijski dokazati. Izraženost N-kadherina raste s agresivnošću melanoma, stoga bi se upravo određivanjem N-kadherina mogao učiniti bolji odabir bolesnika koji bi imali koristi od agresivnijeg kirurškog liječenja.

8 SUMMARY

EXPRESSION OF E-CADHERIN AND N-CADHERIN IN PRIMARY CUTANEOUS MELANOMA AND NODAL METASTASES AS PROGNOSTIC MARKERS

Development of melanoma is a complex process influenced by growth factors and cytokines, as well as, interactions between malignant cells and benign surrounding cells. Cadherins are molecules involved in the intercellular communication and play a critical role in tumor formation and progression.

The aims of this study were to analyze E- and N-cadherin expression in cutaneous malignant melanoma and its metastases in regional lymph nodes, to compare E- and N-cadherin expression with traditional prognostic factors and to evaluate their relevance as prognostic markers for survival of melanoma patients. The expression was determined using monoclonal antibodies to E- and N-cadherin and calculating the intensity of reaction and percentage of positive cells. Significant difference in the expression of E-cadherin between melanocytes and melanoma cells, as well as primary cutaneous melanoma cells and metastasis was determined. E-cadherin expression was lower in melanoma compared to melanocytes ($p < 0,001$), and in metastasis of melanoma compared to primary tumor ($p < 0,001$). The results for N-cadherin indicated stronger expression in metastasis compared to primary melanoma ($p < 0,001$), and in primary melanoma compared to melanocytes ($p = 0,008$). There was no difference in expression of N-cadherin in primary melanoma with or without metastasis. Strong N-cadherin expression indicated poor outcome ($p = 0,010$). Low E-cadherin expression was related to higher recurrence rate of melanoma ($p = 0,032$).

The results in this study confirmed a switch in E- and N-cadherin expression during melanoma development and invasion. N-cadherin is a potential prognostic factor in patients with melanoma metastasis and poor outcome and could be used in selecting more aggressive treatment options for patient with melanoma metastasis.

Suzana Ožanić Bulić, Zagreb, 2011.

9 LITERATURA

1. Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of Disease Melanoma. *NEJM* 2006;355:51-65.
2. Jennings L, Murphy GM. Predicting outcome in melanoma: where are we now. *Br J Dermatol* 2009;161:496-503.
3. Argenziano G, Kittler H, Ferrara G i sur. Slow-growing melanoma: a dermoscopy follow-up. *Br J Dermatol* 2010;162:267-74.
4. Aitken J, Welch J, Duffy D i sur. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:446-52.
5. Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A i sur. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002;62:3200-6.
6. Polsky D, Cordon-Cardo C. Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 2003;22:3087-91.
7. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999;340:1341-8.
8. Frandberg PA, Doufexis M, Kapas S, Chhajlani V. Human pigmentation phenotype: a point mutation generates non-functional MSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:490-2.
9. Miller AJ, Tsao H. Insights into pigmentation and cancer. *Br J Dermatol* 2010; 162:22-8.
10. Nestle FO, Burg G, Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 1999;20:5-7.
11. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000;74:181-273.

12. Miracco C, Santopietro R, Biagioli M i sur. Different patterns of cell proliferation and death and oncogene expression in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1998;25:244-51.
13. Balch CM, Gershenwald JE, Soon SJ i sur. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
14. Kreizenbeck GM, Berger AJ, Subtil A, Rimm DL, Gould Rothberg BE. Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:949-58.
15. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8.
16. Roesch A, Volkenandt M. Melanoma. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M (Eds), Braun-Falco O (Edt emeritus). *Braun-Falco's Dermatology*. 3rd, completely rev. Edt. Heidelberg; Springer Medizin Verlag; 2009, str. 1416-32.
17. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ i sur. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-48.
18. Hussein MR. Lymphocytes and melanoma. *Br J Dermatol* 2005;153:18-21.
19. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF i sur. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 2003;97:1488-98.
20. Harrist TJ, Rigel DS, Day CL Jr i sur. Microscopic satellites are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer* 1984;53:2183-7.
21. Payette MJ, Katz M, Grant-Kels JM. Melanoma prognostic factors. *Clin Dermatol* 2009;27:53-74.
22. Rao UN, Ibrahim J, Flaherty LE, Richards J, Kirkwood JM. Implications of microscopic satellites of the primary and extracapsular lymph node spread

- in patients with high-risk melanoma: pathologic corollary of Eastern Cooperative Oncology Group Trial E1690. *J Clin Oncol* 2002;20:2053-57.
23. Pack GT, Miller TR. Metastatic melanoma with indeterminate primary site: report of two instances of long-term survival. *JAMA* 1961;176:55-6.
 24. Straume O, Akslan LA. Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanoma. *Cancer* 1996;78:1211–19.
 25. Quinn MJ, Crotty KA, Thompson JF i sur. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma: experience with 280 patients. *Cancer* 1998;83:1128–35.
 26. Hawkins WG, Busam KJ, Ben-Porat L i sur. Desmoplastic melanoma: a pathologically and clinically distinct form of cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2005;12:207–13.
 27. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS i sur. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005;41:2040–59.
 28. Chao C, Martin RC, Ross MI i sur. Correlation between prognostic factors and increasing age in melanoma. *Ann Surg Oncol* 2004;11:259-64.
 29. Jen M, Murphy M, Grant-Kels JM. Paediatric melanoma. *Clinics in Dermatol* 2009;27:529-36.
 30. Gillgren P, Brattstrom G, Frisell J i sur. Effect of primary site on prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. A study using a new model to analyse anatomical locations. *Melanoma Res* 2005;15:125-32.
 31. Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2005;18:150-9.
 32. Nishimura EK, Yoshida H, Kunisada T, Nishikawa SI. Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev Biol* 1999;215:155-6.
 33. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61:3819-25.

34. Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrest BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 1994;107:983-92.
35. Furukawa F, Fujii K, Horiguchi Y i sur. Roles of E- and P-cadherin in the human skin. *Microsci Res Tech* 1997;38:343-52.
36. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol* 1996; 1:188-94.
37. Scott GA, Cassidy L. Rac1 mediates dendrite formation in response to melanocyte stimulating hormone and ultraviolet light in a murine melanoma model. *J Invest Dermatol* 1998;111:243-50.
38. Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-Cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res* 1996;6:127-31.
39. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 2000;113:1535-42.
40. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD i sur. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995;374:327-37.
41. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner B. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 1998;141:779-89.
42. Perez-Moreno M, Fuch E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Developmental Cell* 2006;11:601-12.
43. Frixen UH, Behrens J, Sachs M i sur. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85.
44. Kikuchi A. Regulation of b-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:243-8.

45. van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Developmental Biology* 2002;244:1–8.
46. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M i sur. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280:596–9.
47. Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S i sur. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 1998;273:10823–6.
48. Amit S, Hatzubai A, Birman Y i sur. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002;16:1066–76.
49. Liu C, Li Y, Semenov M i sur. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837–47.
50. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M i sur. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO Journal* 1999;18:2401–10.
51. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:55–67.
52. Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:233-40.
53. Roose J, Clevers H. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1999;1424:23-37.
54. Ben-Ze'ev A, Geiger B. Differential molecular interactions of b-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:629-39.
55. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-55.
56. Braga VMM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. The small GTPases Rho

- and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1997;137:1421-31.
57. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of cell-cell adhesion by Rac and Rho small G-proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 1997;139:1047-59.
 58. Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384:6-11.
 59. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature Genetics* 1994;7:98–102.
 60. Oda T, Kanai Y, Oyama T i sur. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Nat Acad Sci* 1994;91:1858–62.
 61. Tamura G, Sakata K, Nishizuka S i sur. Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:1153–59.
 62. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000;275:2727–32.
 63. Lynch HT, Grady W, Lynch JF, Tsuchiya KD, Wiesner G, Markowitz SD. E-cadherin mutation-based genetic counseling and hereditary diffuse gastric carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;122:1–6.
 64. Hajra KM, Chen DY, Fearon E. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:1613-18.
 65. Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H, Foisner R. Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of b-catenin and upregulation of b-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol* 2000;148:173-88.
 66. Batlle E, Sancho E, Franci C i sur. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nat Cell*

- Biol 2000;2:84–9.
67. Poser I, Dominiguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff A. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves upregulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 2001;276:24661-6.
 68. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D i sur. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002;21:3241-6.
 69. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-54.
 70. Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med* 2007;13:535-41.
 71. Tucker RP. Neural crest cells: a model for invasive behaviour. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:173-7.
 72. Takahashi E, Funato N, Higashihori N, Hata Y, Gridley T, Nakamura M. Snail regulates p21(WAF/CIP1) expression in cooperation with E2A and Twist. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1136-44.
 73. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M i sur. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008;68:537-44.
 74. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, β -catenin and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:151-66.
 75. Kuphal S, Bosserhof AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* 2006;25:248-59.
 76. Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;38:351–64.
 77. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2005;16:4386-97.

78. Bittner M, Meltzer P, Chen Y i sur. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536–40.
79. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:619-27.
80. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K i sur. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signaling. *Nature* 2000;407:527-30.
81. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000;407:535–8.
82. Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J, Nusse R. The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes and Development* 1995;9:1087–97.
83. Clevers H, van de Wetering M. TCF/LEF factor earn their wings. *Trends in Genetics* 1997;13:485–9.
84. Chien AJ, Moon RT. WNTS and WNT receptors as therapeutic tools and targets in human disease processes. *Front Biosci* 2007;12:448–57.
85. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G i sur. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002;1:279–88.
86. Weeraratna AT, Becker D, Carr KM i sur. Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome. *Oncogene* 2004;23:2264–74.
87. Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P i sur. WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14:5825–32.
88. Carr KM, Bittner M, Trent JM. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. *Oncogene* 2003;22:3076-80.
89. Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol* 1994;14:7996-8006.

90. King R, Weilbaecher KN, McGill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for melanoma diagnosis. *Am J Pathol* 1999;155:731-8.
91. Carreira S, Liu B, Goding CR. The gene encoding the T-box factor Thx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* 2000;275:21920-7.
92. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 2003;163:333-43.
93. Baxter LL, Pavan WJ. Pmel17 expression is Mitf-dependent and reveals cranial melanoblast migration during murine development. *Gene Expr Patterns* 2003;3:703-7.
94. Samija I, Lukac J, Maric-Brozic J i sur. Prognostic value of microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase as markers for circulating tumor cells detection in patients with melanoma. *Melanoma Res* 2010;20:293-302.
95. Sauter ER, Yeo UC, von Stebb A i sur. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002;62:3200-6.
96. Dohadwala M, Yang SC, Luo J i sur. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-Cadherin: prostaglandin E2 induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 2006;66:5338-45.
97. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2005;5:744-9.
98. Tucci MG, Lucarini G, Brancorsini D i sur. Involvement of E-cadherin, β -catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2007;157:1212-16.
99. Gravadal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal

transition and is of strong and independent importance for the prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:7003-11.

100. Spatz A, Stock N, Batist G, van Kempen LC. The biology of melanoma prognostic factors. *Discov Med* 2010;10:87-93.
101. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003;5:217-22.
102. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M i sur. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Patol* 2000;156:1515-25.
103. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P i sur. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 2007;67:3450-60.
104. Krengel S, Groteluschen F, Bartsch S i sur. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell regression. *J Cutan Pathol* 2004;31:1-7.
105. Wu X, Takekoshi T, Sullivan A, Hwang ST. Inflammation and tumor microenvironment in lymph node metastasis. *Cancers* 2011;3:927-44.
106. Pecina-Slaus N, Zigmund M, Kusec V i sur. E-cadherin and beta-catenin expression patterns in malignant melanoma assessed by image analysis. *J Cutan Pathol* 2007;34:239-46.
107. Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154:325-9.
108. Onken MD, Ehlers JP, Worley La, Makita J, Yokota Y, Harbour JW. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res* 2006;66:4602-9.
109. Attis MG, Burchette JL, Selim MA, Pham T, Soler AP. Differential expression of N-cadherin distinguishes a subset of metastasizing desmoplastic melanomas. *Human Pathology* 2006;37:899-905.

110. Andersen K, Nesland JM, Hom R, Florens VA, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Modern Pathology* 2004;17:990-7.

10 ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 30. kolovoza 1971. godine. Osnovnu školu i Jezičnu gimnaziju završila sam u Zagrebu, a na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1996. godine s prosječnom ocjenom 4,3.

U listopadu 2001. godine započela sam specijalizaciju iz dermatovenerologije u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra «Sestre milosrdnice» u Zagrebu. Specijalistički ispit sam položila 2006. godine.

U listopadu 1999. godine upisala sam stručni poslijediplomski studij iz Kliničke farmakologije, a u rujnu 2003. godine stručni poslijediplomski studij iz Dermatovenerologije. Oba studija sam završila s prosječnom ocjenom 4,92.

Od kolovoza 2003. godine do lipnja 2004. godine bila sam na usavršavanju u Great Ormond Street Hospital, St. Thomas Hospital i The Royal London Hospital NHS Trust u Londonu pod mentorstvom dr. David Athertona, dr. David Paigea i dr. Jemima Mellerio.

U listopadu 2007. godine upisala sam Znanstveni poslijediplomski studij iz područja biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Članica sam Hrvatskog dermatovenerološkog društva HLZ-a i Britanskog dermatološkog društva (British Association of Dermatology). Autorica sam i koautorica više članaka i kongresnih priopćenja koji su objavljeni ili prihvaćeni za objavljivanje u indeksiranim časopisima od kojih je sedam u Current Contentsu.

Udana sam i majka dvoje djece.