

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Damir Homolak

**Uporabna vrijednost sadašnjih kriterija u
određivanju indikacije za biopsiju limfnog
čvora čuvara u bolesnika s primarnim
melanomom kože**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Damir Homolak

**Uporabna vrijednost sadašnjih kriterija u
određivanju indikacije za biopsiju limfnog
čvora čuvara u bolesnika s primarnim
melanomom kože**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

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

Voditelj rada: prof. dr.sc. Mirna Šitum, prim., dr. med.

Ovaj rad sam izradio uz nesebičnu podršku meni dragih ljudi.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr.sc. Mirni Šitum na stručnoj i moralnoj podršci tijekom izrade rada.

Zahvaljujem na pomoći svim kolegama patolozima Zavoda „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“, koji su mi ne samo omogućili pristup njihovim vrijednim bazama podataka, već su i odvojili svoje vrijeme kako bi mi pomogli u boljem razumijevanju zajedničkog problema.

Zahvaljujem sinovima Sandiju i Janu koji su svaki na svoj način doprinijeli završetku ovog projekta, kao i sestri dr. Lei Homolak i Damiru Kropfu na korisnim savjetima i tehničkoj podršci.

Ipak, najviše moram zahvaliti supruzi Ivi, koja je uvijek i u svakom smislu pomagala i bila uz mene.

Rad posvećujem svojoj majci.

Sadržaj

1	UVOD I SVRHA RADA	1
1.1	Primarni melanom kože	1
1.2	Epidemiologija.....	2
1.3	Patogeneza	3
1.4	Klasifikacija malignog melanoma	5
1.4.1	Melanoma superficiale / SSM	5
1.4.2	Melanoma nodulare / MN	8
1.4.3	Lentigo maligna melanoma / LMM	10
1.4.4	Melanoma acrolentiginosum / ALM	12
1.4.5	Ostali rjeđi kutani maligni melanomi	15
1.4.6	Perzistentni melanom i lokalne melanomske metastaze	20
1.5	Biopsija limfnog čvora čuvara i njezino značenje	21
1.6	Patohistološka analiza.....	24
1.7	AJCC – nova klasifikacija	27
1.7.1	T klasifikacija	29
1.7.2	N klasifikacija	29
1.7.3	M klasifikacija.....	30
1.7.4	Prognostičke implikacije po stupnjevima	31
1.8	Prognostički čimbenici	32
1.8.1	Dob	32
1.8.2	Spol.....	33
1.8.3	Lokalizacija	33
1.8.4	Debljina tumora po Breslowu	33
1.8.5	Razine prodora po Clarku	34
1.8.6	Volumen tumora.....	35
1.8.7	Oblik rasta tumora.....	35
1.8.8	Ulceracija	36
1.8.9	Broj mitoza	37

1.8.10	Faza rasta.....	37
1.8.11	Regresija.....	38
1.8.12	Limfocitni infiltrat.....	39
1.8.13	Vaskularizacija tumora.....	40
1.8.14	Angiotropizam.....	40
1.8.15	Vaskularna invazija.....	40
1.8.16	Histološki tip tumora.....	41
1.8.17	Tip tumorskih stanica.....	41
1.8.18	Dezmoplazija.....	42
1.8.19	Neurotropizam.....	43
1.8.20	Ostali patohistološki pokazatelji.....	43
1.9	Tumorski markeri.....	45
1.10	Svrha istraživanja.....	48
2	HIPOTEZA.....	49
3	CILJEVI RADA.....	50
4	MATERIJALI I METODE.....	51
4.1	Etički aspekti.....	51
4.2	Metode.....	51
4.3	Deskripcija – svi tumori.....	52
5	REZULTATI.....	57
5.1	Usporedba skupina ispitanika prema ishodu sentinel biopsije – svi tumori.....	57
5.2	Analiza dobivenih rezultata.....	60
5.3	Usporedba skupina ispitanika prema prisutnosti metastaza – svi tumori.....	62
5.4	Analiza dobivenih rezultata.....	65
5.5	Logistička regresija.....	66
5.6	Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za pozitivan ishod sentinela – svi tumori.....	72
5.7	Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za metastatski razvoj bolesti – svi tumori.....	78
5.8	Tanki tumori – deskripcija.....	82
5.9	Usporedba skupina ispitanika prema ishodu sentinel biopsije – tanki tumori.....	85

5.10	Usporedba skupina ispitanika prema metastatskom razvoju bolesti – tanki tumori..	93
5.11	Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za metastatski razvoj bolesti – tanki tumori	103
6	RASPRAVA.....	106
7	ZAKLJUČAK	114
8	KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....	116
9	KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU	117
10	LITERATURA.....	118
11	BIOGRAFIJA.....	134

POPIS OZNAKA I KRATICA

MM	lat. Melanoma Malignum
EAPC	engl. Estimated Annual Percent Change
PCM	engl. Primary Cutaneous Melanoma
CPD	engl. Cyclobutane Pyrimidine Dimer
CDKN2A	engl. Cycline Dependant Kinase inhibitor 2A
pRb	engl. Retinoblastoma protein
XP	lat. Xeroderma Pigmentosum
BRAF	najčešća mutacija kinaze kod melanoma; gen odgovoran za sintezu proteina B-Raf,
RAF	engl. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma - protein kinaza vezana uz retroviralne onkogene
MAP	engl. Mitogen Activated Protein
FAK	engl. Focal Adhesion Kinase
WHO	engl. World Health Organization
IARC	engl. International Agency for Research on Cancer
IAP	engl. International Academy of Pathology
EORTC	engl. European Organization for Research and Treatment of Cancer
SSM	engl. Superficial Spreading Melanoma
MIS	lat. Melanoma In Situ
TILS	engl. Tumor Infiltrating Lymphocytes
MN	lat. Melanoma Nodulare
S-100, HMB-45, Melan-A, MAGE-1, NKI / C-3	melanomski antigeni
MeCAM	engl. Melanoma Cell Adhesion Molecule
MITF	engl. Microphthalmia Transcription Factor
Ki-67, PCNA	proliferativni nuklearni antigeni
BCC	engl. Basal Cell Carcinoma
SCC	engl. Squamous Cell Carcinoma
LMM	lat. Lentigo Maligna Melanoma
LM	lat. Lentigo Maligna
ALM	lat. Melanoma Acrolentiginosum

AM	engl. Acral Melanoma
DM	lat. Melanoma Desmoplasticum
DNM	dezmoplastični neurotropni melanom
AgNOR	engl. silver (Ag) staining of Nucleolar Organizing Regions
SLNB	engl. Sentinel Lymph Node Biopsy
Tc99	tehnecij 99
RLND	engl. Radical Lymph Node Dissection
CLND	engl. Complete Lymph Node Dissection
AJCC	engl. American Joint Committee on Cancer
pTNM	primarni tumor (pT), regionalni limfni čvorovi (pN), udaljene metastaze (pM)
MSC	engl. Melanoma Staging Committee
IUCC	engl. International Union against Cancer
EDF	engl. European Dermatology Forum
EADO	engl. European Association of Dermatooncology
ESMO	engl. European Society of Medical Oncology
EORTC	engl. European Organization for Research and Treatment of Cancer
HE	engl. Hematoxylin - Eosin
IHC	imunohistokemijsko bojenje
RT-PCR	engl. Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
LDH	laktat dehidrogenaza
CSA	engl. Cross-Sectional Area
VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor
LYVE-1	limfatični endotelijalni hijaluronski receptor 1
CD31, CD34	vaskularni protein / razlikovni biljeg (CD - engl. cluster of differentiation)
MDM	engl. Minimal Deviation Melanoma
PTEH	paratumoralna epidermalna hiperplazija
MIA	engl. Melanoma Inhibitory Activity
ELISA	engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
LASA-P	engl. Lipid Associated Sialic Acid
IL	interleukin

TNF	engl. Tumor Necrosis Factor
DOPA	dihidroksifenilalanin
TRP	engl. Tyrosinase Related Protein
PAX	engl. paired box homeotic gene transcription factor
CGH	engl. Comparative Genomic Hybridization
FISH	engl. Fluorescent In Situ Hybridization
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
FNA	Fine-Needle Aspiration
MIS	lat. Melanoma In Situ
MSLT	engl. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial
OS	engl. Overall Survival
DFS	engl. Disease Free Survival
N	broj ispitanika
\bar{x}	aritmetička sredina
Med	medijan
Min	minimum
Max	maksimum
SD	standardna devijacija
OR	omjer šansi (engl. odds ratio)
AOR	standardizirani omjer šansi (engl. adjusted odds ratio)
CI	interval pouzdanosti
NA	neprimjenjivo (engl. not applicable)
cp	granični (engl. cutoff point)
χ^2	Pearsonov test za testiranje nulte hipoteze kod nezavisnih statističkih obilježja
<i>p- vrijednost</i>	empirijska razina signifikantnosti kojom se mjeri vjerojatnost odbacivanja nul-hipoteze

1 UVOD I SVRHA RADA

1.1 Primarni melanom kože

Maligni melanom (MM) je tumor srednje životne dobi, jedan je od najmalignijih tumora, nepredvidljivog je toka, a svojim kontinuiranim trendom porasta postao je ujedno i jedan od tumora s najvećim porastom incidencije. Nastaje od melanocitnih stanica, primarno najčešće zahvaća kožu, iako može nastati i od melanocitnih stanica drugih tkiva npr., oka (konjunktiva i uvea), meningealnih ovojnica i sluznica (probavni, genitalni trakt). Kako melanocita ima najviše u koži, tako je i primarni MM kože najčešće sijelo. Ovaj tumor pokazuje sklonost ranom limfogenom i hematogenom rasapu. Odgovoran je za oko 75% smrtnih ishoda povezanih s kožnim tumorima ¹.

Među najvažnije egzogene etiološke čimbenike ubrajamo ekspoziciju UV zračenju, a među endogenim su tip kože koji je obilježen reakcijom kože na Sunčevu svjetlost, sklonost opeklinama, obiteljska pojavnost melanoma kao i imunosupresija različite etiologije. Uloga ostalih mogućih etioloških čimbenika, kao, npr., različitih toksičnih supstanci, lijekova, hormona i slično, i dalje predstavlja predmet rasprava.

Liječenje MM-a, zahvaljujući naporima istraživača, novim tzv. „pametnim“ lijekovima i otkrivanju novih modaliteta liječenja, daje ohrabrujuće rezultate, ali i dalje predstavlja područje velikog izazova.

Dijagnosticiranje melanoma u ranoj fazi i javno-zdravstvene preventivne mjere predstavljaju i dalje najvažnije sredstvo u borbi protiv ove nepredvidive bolesti. Različite metode „screeninga“ opće populacije, posebice rizičnih skupina, promocija samopregleda (ABCDE-pravilo), edukacija bolesnika u smislu odgovornog ponašanja, te brojne preventivne akcije na svim razinama zdravstvene zaštite, značajno tome pridonose.

Veliki je doprinos postignut i uvođenjem novijih metoda rane detekcije zloćudnih pigmentnih tvorbi u prvom redu dermatoskopije, čime je poboljšana rana dijagnostika melanoma, a time i bitno bolja prognoza oboljelih.

Posebno je važna rana i točna patohistološka dijagnoza primarnog tumora, identifikacija limfnog čvora čuvara i praćenje onih bolesnika s većim rizikom nastanka metastaza. Prognoza dobivena „stagingom“ izuzetno je važna, jer predstavlja dobar temelj za daljnju strategiju,

praćenje bolesnika i izbor različitih oblika liječenja, omogućavajući ranu detekciju metastaza u pretkliničkoj fazi bolesti.

1.2 Epidemiologija

Epidemiološke studije pokazuju trend porasta incidencije i mortaliteta od MM. Broj oboljelih podvostručuje se svakih 10 – 15 god. Godišnje umire oko 48 000 ljudi. Stopa incidencije razlikuje se prema spolu, dobi, etničkoj skupini i regiji ²⁻⁶.

Melanom se najčešće javlja u osoba koje su manje zaštićene pigmentom melaninom i koje su izloženi UV zračenju, odnosno čija je DNA više izložena oštećenjima. Zato je melanom najučestaliji u osoba bijele rase, posebice onih svijetle puti, svijetle kose i očiju. Rjeđi je u pripadnika ostalih rasa, a najrjeđi u pripadnika crne rase kod kojih se najčešće javlja na područjima kože s manje pigmenta (dlanovi i tabani). U Europi je značajno učestaliji u pripadnika skandinavskih u odnosu na stanovnike mediteranskih zemalja. Rizik je povećan u osoba koje slabo tamne i na suncu najčešće razvijaju solarni eritem i opekline. Primijećeno je da je taj rizik višestruko veći u crvenokosih i plavokosih osoba ⁷⁻¹⁰.

Prije 40. godine života incidencija je veća u žena nego u muškaraca, no sa starijom dobi stopa rasta brže raste u muškaraca, a sporije u žena. Najčešće sjelo primarnog kutanog melanoma kože u žena su potkoljenice, a u muškaraca leđa. Porast mortaliteta ne prati porast incidencije, a razlog tome je vjerojatno i bolja dijagnostika tankih minimalno invazivnih melanoma. Stopa mortaliteta raste brže u muškaraca. Iako se ova diskrepanca porasta stope incidencije i mortaliteta u literaturi pripisuje ranoj detekciji tanjih lezija, ipak raste i broj debljih lezija – melanoma u kasnijoj fazi, što svjedoči i o snažnom biološkom potencijalu melanoma. Dakle, može se reći da se bez obzira na sve bolju i raniju dijagnostiku, ipak javlja i sve veći broj agresivnijih formi ^{3,11}.

Incidencija i mortalitet melanoma su izraženiji u zemljama veće insolacije, odnosno regijama gdje prevladava bijela populacija, dok je najmanje izražen u populacije azijskog i afričkog podrijetla. Na globalnoj razini melanom je 16., najčešće dijagnosticirani maligni tumor kod muškaraca i 15. kod žena. Stopa incidencije iznosi 12,3 / 100 000 za žene i 14,2 / 100 000 za muškarce. Čak 80% od ukupnog broja melanoma javlja se u bijele populacije Sjeverne Amerike, Australije, Novog Zelanda i Europe. U Europi je melanom na 16. mjestu u muškaraca i 8. mjestu u žena ¹². Incidencija u različitim europskim zemljama varira od 6,8 u Francuskoj do 15,9 / 100 000 u Norveškoj ¹³.

Kod nas MM kože čini oko 3% incidencije svih malignih tumora ².

Stopa incidencije melanoma u značajnom je porastu i pokazuje kod nas sličan trend kao u zemljama s niskom ili srednjom stopom incidencije. S incidencijom od 8,7 / 100 000 za muškarce i 7,0 / 100 000 za žene te uz mortalitet od 3,5 / 100 000 za muškarce i 1,8 / 100 000 za žene, Hrvatska zauzima 3. mjesto za muškarce i 4. mjesto za žene po visini stope mortaliteta u Europi. Hrvatska, kao i većina zemalja, ima veću incidenciju MM-a u muškaraca, kao i veću stopu mortaliteta³.

S obzirom da brojne epidemiološke studije upućuju na rastući trend MM-a, potrebno je naglasiti i važnost otkrivanja uzroka tih trendova, identificiranje posebno rizične populacije, te nužnost pokretanja svih preventivnih zdravstvenih akcija u smislu suzbijanja ove bolesti.

1.3 Patogeneza

Za nastanak PCM-a su odgovorna oštećenja DNA stanice, u prvom redu izazvana UV zračenjem. UVB zračenje (315 – 280 nm) neposredno oštećuje DNA stanice, tako što inducira spajanje pirimidinskih baza i nastanak ciklobutanskih pirimidin dimera (CPD), dok UVA zračenje (400 – 315 nm) uzrokuje nastanak timinskih dimera. Oštećenje DNA nastaje i stvaranjem slobodnih kisikovih radikala koji uzrokuju pucanje jednog od lanaca DNA, stvaranjem oksidiranih purina i pirimidina.

Novonastali CPD prilikom replikacije ili reparacije DNA uzrokuju netočne translacijske sinteze (najčešća, mutacija citozina u timin C>T) ili tranzicijske mutacije (CC>TT). Ova posljednja se naziva još i „UV fingerprint“ mutacija budući da do nje dolazi u stanicama kože izložene UV zračenju. Greške u popravku DNA nastale zbog djelovanja fotoprodukata izazivaju različite kromosomske aberacije (deleciju, inserciju ili translokaciju)¹⁴⁻¹⁵.

U nastanku melanoma, genetska predispozicija ima krucijalni značaj, stoga su genetska istraživanja bitno pridonijela razumijevanju nastanka kao i razlikovanju pojedinih tipova melanoma. Oko 10% svih melanoma su obiteljski melanomi. U ovoj grupi oko 40% ima deleciju na INK4a/ARF lokusu na kromosomu 9p21. Taj lokus kodira 2 važna regulatorna proteina: p16^{INK4a} i p14^{ARF}.

p16^{INK4a} regulira stanični ciklus (G1/S faza), djelujući kao ciklin ovisan inhibitor kinaze (CDKN2A) čime remeti fosforilaciju i inaktivaciju pRba (engl. retinoblastoma protein, a koji je ključan za kontrolu staničnog ciklusa).

p14^{ARF} ima također antiproliferativnu aktivnost budući da inhibira p53 (stanični zaštitni faktor). Inače normalna ekspresija p53 vodi u G2/M fazu staničnog ciklusa inducirajući apoptozu ili programiranu smrt stanice, npr. kao odgovor na DNA oštećenja nastala UV

zračenjem. Tako mutacija gena CDKN2A vodi do destabilizacije p53 (transkripcijskog faktora) koji je uključen u apoptozu stanice. Neke mutacije istog gena dovode do nastanka nefunkcionalnog inhibitora CDK4 (ciklin ovisne kinaze).

Otkriveno je da je mutacija gena CDKN2A i gena koji uzrokuje Xerodermu pigmentosum XP, povezana s češćom pojavnošću MM-a. Ove mutacije umanjuju sposobnost stanice da reparira vlastitu DNA. Mutacija CDKN2A kao i XP mutacija visoko je penetrantna, što znači da je velika vjerojatnost da nositelji ove mutacije i obole. U patogenezi tzv. obiteljskog melanoma koji je genetski heterogen, uključeno je više lokusa koji su identificirani na kratkom kraku prvog i devetog kromosoma, te dugom kraku dvanaestog kromosoma. Najodgovorniji gen je tzv. tumor supresor 1 (CDKN2A/MTS1), odnosno gen koji kodira p16INK4a (nisko molekularni protein koji inhibira CDK), a lociran je na p21 regiji humanog kromosoma 9.) Ostale mutacije imaju manji rizik, ali su češće. Ljudi s mutacijama na MC1R genu imaju, npr., 2 – 4 puta veću šansu da razviju melanom.

Otkriveno je da su neke rijetke mutacije kao i geni povezani s većom učestalošću melanoma. Mutacija MCR1R je vrlo česta; imaju je, naime, svi ljudi crvene kose, a što je povezano s većom incidencijom MM-a u ovoj skupini. Mutacija MDM2 SNP309 povezana je i s povećanim rizikom nastanka melanoma u mladim žena.

U sporadičnom melanomu, koji čini 90% svih melanoma kože, promjene na 9p21 su česte (iz čega slijedi inaktivacija INK4a/ARF proteina) ¹⁶.

Najizraženija mutacija kod sporadičnog melanoma je BRAF (V600E) mutacija (pripada obitelji RAF kinaza). Mutacije na domeni za BRAF kinazu, vode u aktivaciju MAP kinaza signalnog puta (kaskada: RAS/RAF/MEK/ERK), što se događa kod čak 47 – 66% melanoma. Kako čak 82% melanocitnih nevusa ima BRAF mutaciju, smatra se da je potreban i dodatni signal za indukciju maligne transformacije.

Drugi važan signalni put je: PI3K/PTEN/AKT. Nakon direktne aktivacije enzima PI3 kinaze neposredno (preko receptora za tirozin kinazu) ili posredno (preko RAS-a), ovaj enzim fosforilira fosfolipid PIP2 u PIP3. PIP3 stimulira AKT, što posljedično dovodi do blokade apoptoze budući da AKT aktivira Bcl-2, a što vodi u aktivaciju staničnog ciklusa (indukcija ciklina D1), povećanja translacije proteina (posredovane s mTOR) i povećanja razine telomeraze. Fosfataza PTEN koči ovaj put tako da konvertira PIP3 natrag u PIP2. Mutacije upravo PI3K i AKT su nerijetke kod melanoma, te je PTEN često inaktiviran (30 – 60%), bilo delecijom PTEN gena, bilo smanjenom ekspresijom ¹⁷.

Kontakt između tumorskih stanica i strome je važan u kontroli migracije, invazije i metastaziranja. Melanomske stanice izmiču kontroli keratinocita preko smanjenja transmembranskih proteina kao što je E-kadherin (koji je važan u komunikaciji s keratinocitima) ili povećanja drugih transmembranskih proteina kao što je N-kadherin (koji pospješuje interakciju između melanomskih stanica, i tumor infiltrirajućih fibroblasta). Interakcija s ekstracelularnim komponentama matriksa odvija se preko integrina kao što je $\alpha V\beta 3$ integrin. Kada se integrin veže za fibronektin, aktivira se FAK (engl. focal adhesion kinase), enzim koji produžuje preživljenje stanice, povećava proliferaciju, najčešće posredovanu MAP kinaza signalnim putem. Posljedica je indukcija metaloproteinaza matriksa, što vodi u degradaciju ekstracelularnog matriksa ¹⁶.

Centralni putevi diferencijacije još nisu do kraja istraženi, neki od njih su Wnt/ β -Catenin/MITF ili Notch signalni put. Pretpostavlja se da oba ova puta imaju ključne uloge u diferencijaciji neuroektodermalnih prekursorskih stanica, kao što su melanociti, te su stoga vjerojatno i oni uključeni u patogenezu melanoma ¹⁷.

Iako genetska priroda melanoma nije do kraja razjašnjena, kliničke posljedice su jasne. Prvi rođaci pacijenata kojima je dijagnosticiran melanom, morali bi biti upućeni na provođenje redovitih preventivnih godišnjih pregleda.

1.4 Klasifikacija malignog melanoma

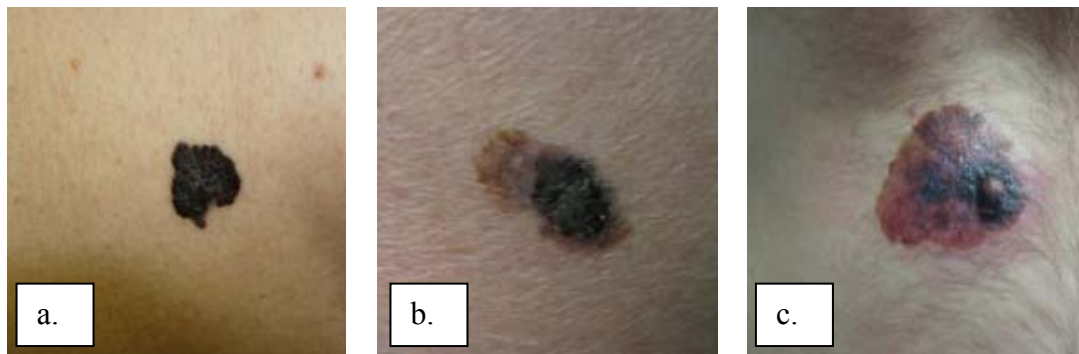
Postoji više podjela melanocitnih malignih tumora, koje, većinom, pored četiri osnovna tipa MM-a navode i neke rjeđe podtipove. Međutim, nedvojbeno u tim podjelama postoje i određeni nedostaci, odnosno neslaganja kako u etiološkim, patohistološkim, pa i prognostičkim značajkama pojedinih podskupina. Ovdje iznesena podjela melanocitnih tumora, službena je podjela prema radnoj skupini Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC), te sastavljena u suradnji s International Academy of Pathology (IAP), European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) i Dpt. of Pathology, University Hospital, Zürich, Switzerland ¹⁸.

1.4.1 Melanoma superficiale / SSM

Površinsko šireći melanom (engl. Superficial Spreading Melanoma – SSM) ili pagetoidni melanom je podtip MM-a u radikalnoj fazi rasta. Neoplastične stanice su veliki pojedinačni melanociti ili su raspoređene u skupine tzv. gnijezda, uklopljena među keratinocite. Uobičajeno se javlja na pokrivenim dijelovima tijela ¹⁹⁻²⁰.

SSM je najčešći podtip MM-a, čini čak oko 2/3 svih melanoma. Najčešće se javlja između 40. i 60. godine života. Razlike u incidenciji po spolovima nema. Iako se javlja na svim dijelovima tijela, predominantna lokalizacija kod žena su noge, a u muškaraca leđa. Znatno je češći kod osoba svijetle puti (po Fitzpatricku I – III). U anamnezi često se navode opekline u djetinjstvu, te intermitentno izlaganje suncu u odrasloj dobi.

Klinički se SSM u početnoj fazi očituje kao iregularno pigmentirana makula jasno ocrtanog, iregularnog ruba (Slika 3.a. i 3.b.). Amelanotički oblik SSM-a klinički nalikuje na Mb Bowen ili Mb Paget. Prijelaz iz radijalne u agresivniju vertikalnu fazu (Slika 3.c.), klinički se najčešće očituje pojavom papule, ponekad ulceracije i krvarenja. Rjeđe se mogu naći satelitski nodusi. Lezije su u pravilu asimptomatične.



Slika 3.a. – c. Različite kliničke prezentacije površinsko širećeg melanoma.

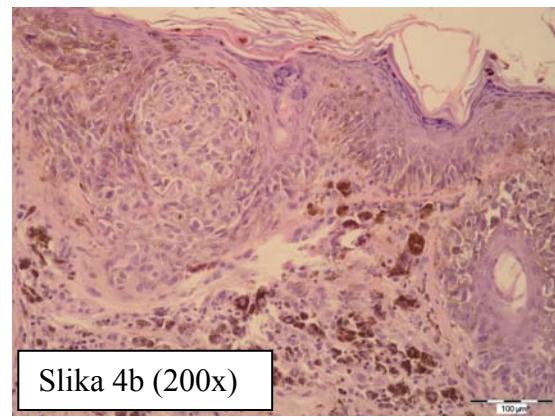
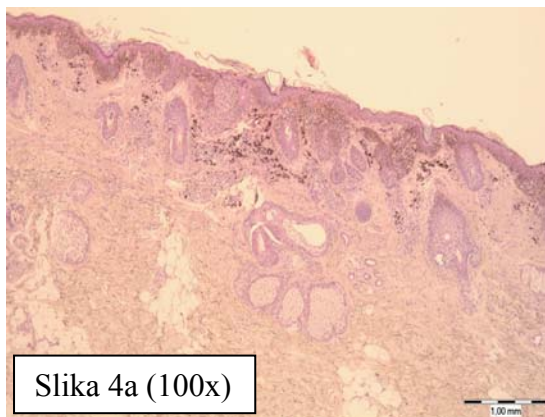
(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

U histološkoj slici prevladavaju atipični melanociti (velikih nukleusa i nukleolusa s blijedom citoplazmom), mitoze su uglavnom rijetke. Melanociti su raspoređeni pojedinačno ili u nakupinama tzv. gnijezdima, iregularno distribuirani. Infiltracija limfocita i melanofaga u tumoru nije rijetkost, a ponekad je jedini ključ dijagnoze. Limfocitni infiltrat, ako je prisutan, može biti smješten na bazi lezije ili infiltriran između stanica – tzv. TILS (tumor infiltrirajući limfociti). Ponekad je vidljiva regresija, djelomična ili rjeđe potpuna. Regresija u jednom dijelu melanoma (tzv. segmentalna regresija) očituje se potpunim odsustvom melanocita, dok se kod parcijalne regresije vidi bitno smanjen broj melanocita u odnosu na ostatak lezije. U području regresije nalaze se mase melanofaga (tzv. „tumorska melanoza“).

Površinsko šireći melanom najčešće ima mutacije BRAF onkogen na kromosomu 7q34²¹.

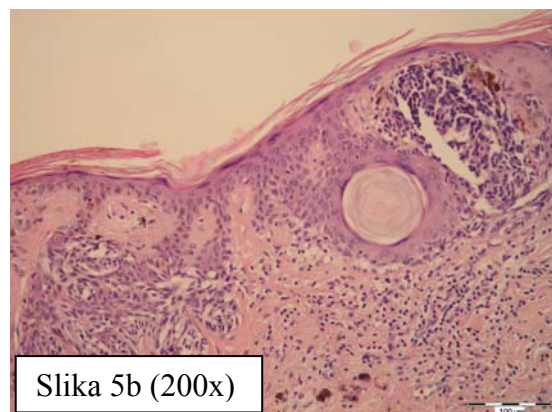
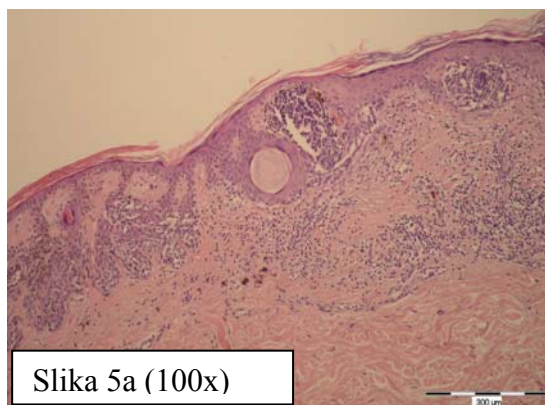
Diferencijalno dijagnostički najčešće se zamjeni za Bowenovu bolest, seboroičku keratozu ili displastični nevus.

Na slici 4.a. i 4.b. vide se atipični melanociti u bazalnim slojevima epidermisa i papilarnom dermisu. Epidermalno su gnijezda formirana od krupnih atipičnih melanocita s prominentnim jezgrama. Kod ovog tumora izmjerene su 2 mitoze / mm² u epidermisu, dok ih u dermisu nema. Tumor se pagetoidno širi unutar epidermisa. Dermalna su gnijezda značajno manja od epidermalnih. Na bazi tumora prisutni su srednje gusti infiltrati mononukleara i pigmentofaga. Izmjerena debljina ovog tumora iznosi 0,31 mm. Limfokapilarne invazije se ne nalazi.



Slika 4.a. i 4.b. Histološka slika površinsko širećeg melanoma SSM T1aNxMx , Cl II Br I. (Preuzeto s dopuštenjem iz originalne patohistološke baze Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“.)

Melanoma in situ (MIS) odnosi se na one melanome kod kojih je tumorska tvorba ograničena na epidermis. Tumor je građen od gnijezda i pojedinačnih melanocita, koji pokazuju atipije uz premoštavanje epidermalnih produljaka. Pagetoidno se širi. U dermisu je nerijetko prisutan upalni infiltrat i pigmentofagi (Slika 5.a. i 5.b.).

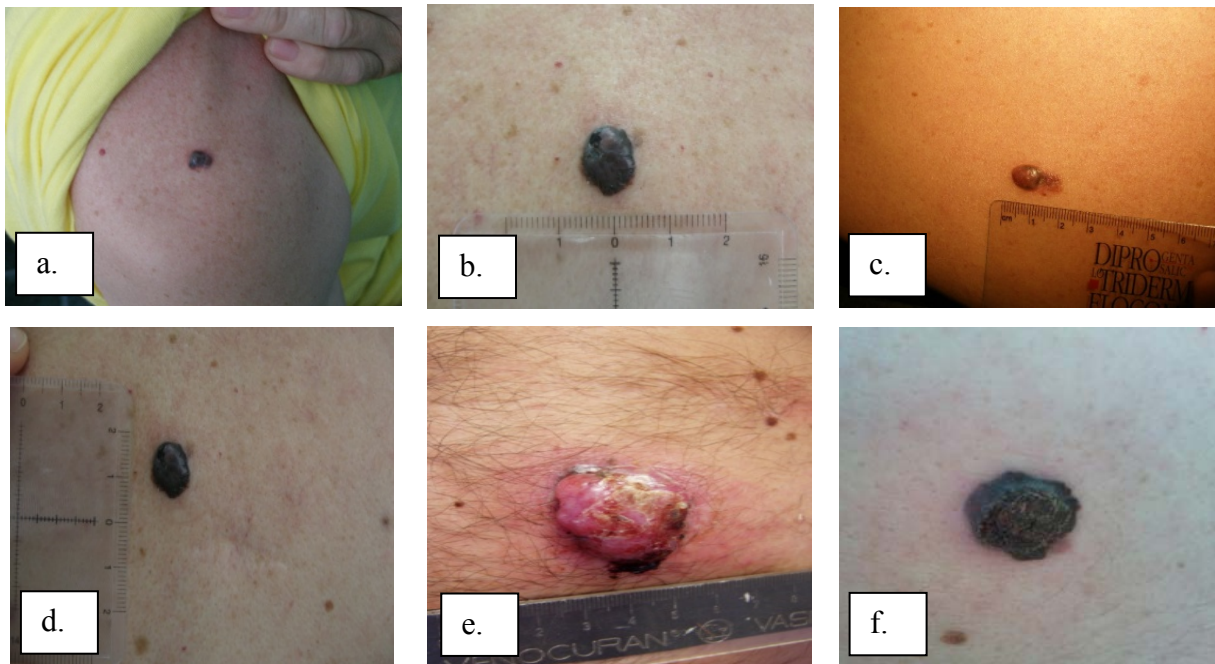


Slika 5.a. i 5.b. Histološka slika melanoma in situ MIS TisNxMx , Cl I. (Preuzeto s dopuštenjem iz originalne patohistološke baze Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“.)

1.4.2 *Melanoma nodulare / MN*

Nodularni melanom (NM) je podtip MM-a, koji čini oko 10 – 15% svih melanoma. Po definiciji ovaj tumor isključivo je u vertikalnoj fazi rasta. Za nastanak se smatraju odgovornim isti čimbenici kao i kod SSM-a. Javlja se na svim dijelovima tijela, ali najčešće lokalizacije su trup, glava i vrat, potkoljenice. Najčešće se javlja „de novo“. Postoje i hipoteze da ovaj podtip zapravo predstavlja brzu progresiju nekih drugih podtipova melanoma (SSM-a, LM-a, ALM-a), te da se radi o melanomu vertikalne faze rasta, kojoj je prethodila vrlo kratka faza horizontalnog širenja.

Klinički se NM najčešće očituje kao polipoidni tumor (papula, nodus ili plak), u većini slučajeva simetričnog je izgleda i dobro ograničen od okolne kože (Slika 6.a. – d.). Nerijetko se nađu ulceracije i kruste (Slika 6.f.). Obično je crne ili plave boje, no postoji i oblik amelanotičnog NM-a (Slika 6.e.).

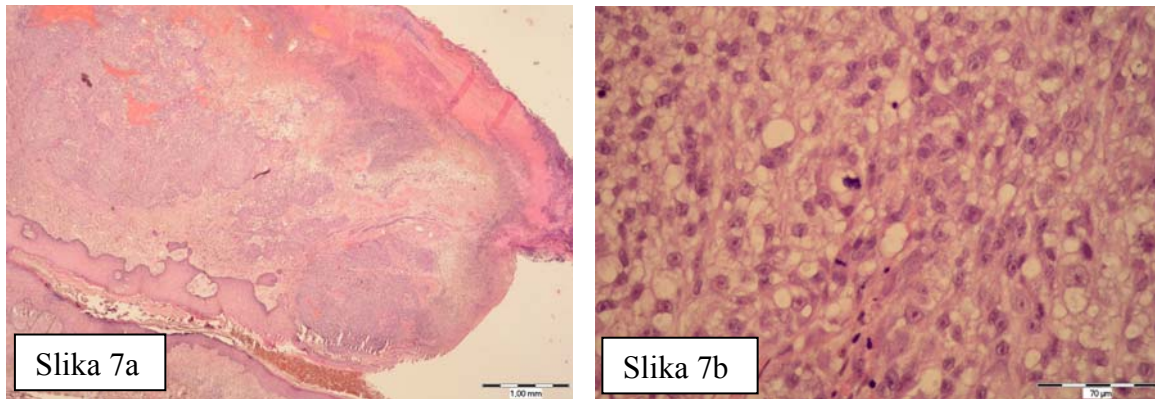


Slika 6.a. – f. Različite kliničke prezentacije nodularnog MM-a.

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

U histološkoj slici nalazimo stanjen epidermis, ponekad egzulceriran (Slika 7). Tumorske stanice mogu biti prisutne u epidermisu, no nikad ne prelaze granice dermalne komponente. Dermalnu komponentu čini nodus sastavljen od manjih gnijezda tumorskih stanica, koje su najčešće epiteloidne, ali mogu biti zastupljeni i drugi tipovi stanica (vretenaste stanice, male epiteloidne, gigantske mono i multinuklearne stanice, te različiti drugi tipovi). Iako se stanice naizgled doimaju monomorfno, često su vidljive povećane jezgre i prominentne jezgrice, koje

variraju veličinom i oblikom. Jezgra je povećana u odnosu na citoplazmu. U citoplazmi se nerijetko vide eozinofilne granule. Ponekad se vide i melaninske granule različite veličine. U amelanotičnoj varijanti NM-a nedostaje melanin. Okolna stroma može sadržavati različite mononuklearne stanične infiltrate, pa govorimo o fibroplaziji, prisutnim teleangiektazijama i melanofazima²²⁻²³.



Slika 7.a i b. Histološka slika nodularnog melanoma MN T4bNxMx, Cl IV Br IV.

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne patohistološke baze Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“.)

Na slici 7.a i 7.b. vidi se tumor građen od atipičnih melanocita koji se šire po epidermisu pojedinačno i u nakupinama, mjestimice sadrže zrnca melanina, probijaju bazalnu membranu i infiltriraju papilarni i retikularni dermis. Na površini se nalazi ulceriran epidermis, a na bazi guste trakaste nakupine limfocita. Debljina prikazanog tumora iznosila je 5,44 mm. Izmjereno je 8 mitozna / mm². Limfokapilarne i perineuralne invazija nisu uočene.

Većina ovih melanoma ima ekspresiju: S-100 proteina, HMB-45, Melan-A, MelCAM, MITF^{24, 25-26}. Za razliku od nevus stanica, melanomske stanice sadrže: Ki-67, PCNA, p53, cyclin D i p21WAF1. U invazivnijim formama dolazi do gubitka ekspresije CDKN2A i povećane ekspresije β 3 integrina²⁷⁻²⁸. Smatra se da dio (6 – 14%) NM-a pripada obiteljskim melanomima. Oko 20% ima mutaciju gena za CDKN2A (9p21 kromosom), a rjeđe za CDK4 (12q14 kromosom)²⁹.

Prognoza kod NM-a je često loša, ponajviše radi postavljanja dijagnoze u kasnijim fazama, najčešće tek kada tumor dosegne promjer od 1 cm³⁰.

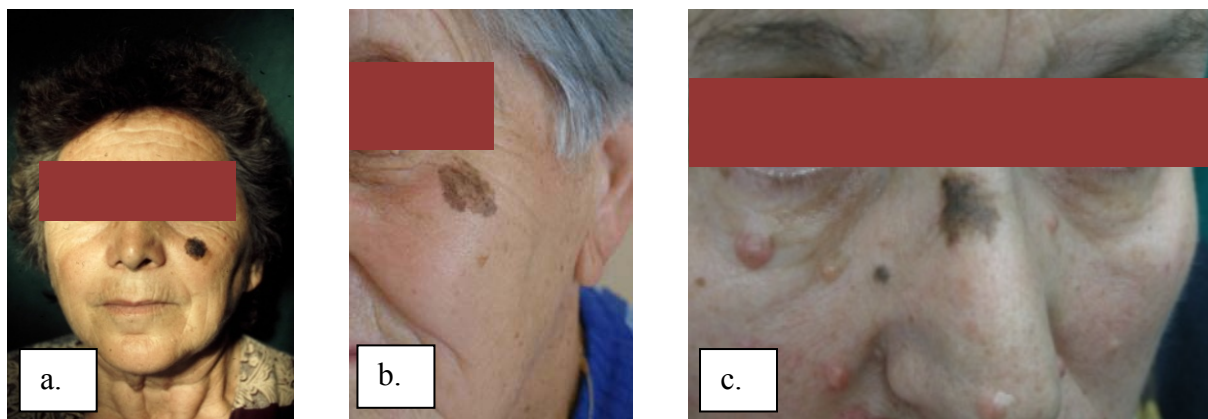
Diferencijalno dijagnostički najčešće treba imati na umu: pigmentirani bazocelularni karcinom (BCC) ili pigmentirani spinocelularni karcinom (SCC), iritiranu seboroičku keratozu, senilni angiomi, piogeni granulom i angiosarkom.

1.4.3 *Lentigo maligna melanoma / LMM*

Lentigo maligna melanom (LMM) je invazivni oblik lentigo maligna (LM), koji je njegov in situ oblik. Javlja se u oko 10% svih melanoma kože. Tipično se razvija na fotoekspoziranoj koži starijih ljudi (>60 godina), najčešće na licu, rjeđe na vratu, gornjem dijelu leđa i nadlakticama. U trenutku nalaza invazije tumorskih melanocita u dermis lentigo maligna (LM) nazivamo lentigo maligna melanom (LMM).

Prema spolu ne postoji razlika u učestalosti LMM-a na navedenim lokalizacijama, dok je kod ektrafacijalne lokalizacije veća učestalost na leđima kod muškaraca, dok je kod žena čak 80% ektrafacijalnih tumora locirano na nogama, predominantno potkoljenicama. Primijećeno je i da se ektrafacijalni LMM češće javlja kod nešto mlađe populacije, što upućuje na mogućnost da LMM nije isključivo povezan s kumulativnim efektima UV zračenja, kako se danas misli ³¹. LM je najučestaliji melanom lica i vrata. Neke studije su potvrdile da ne postoji povezanost s brojem nevusa (>60) kao kod drugih kutanih melanoma, već povezanost s povećanim brojem solarnih keratoza ³².

Klinički se LMM manifestira kao velika (>10 mm) pigmentirana, najčešće svijetlo-smeđa makula, iregularnih rubova, na fotoekspoziranoj koži starijih ljudi, često uz vidljiva okolna solarna oštećenja. S povećanjem lezije uobičajeno dolazi i do većih varijacija u pigmentaciji, te veće iregularnosti rubova (Slika 8.a. – c.).



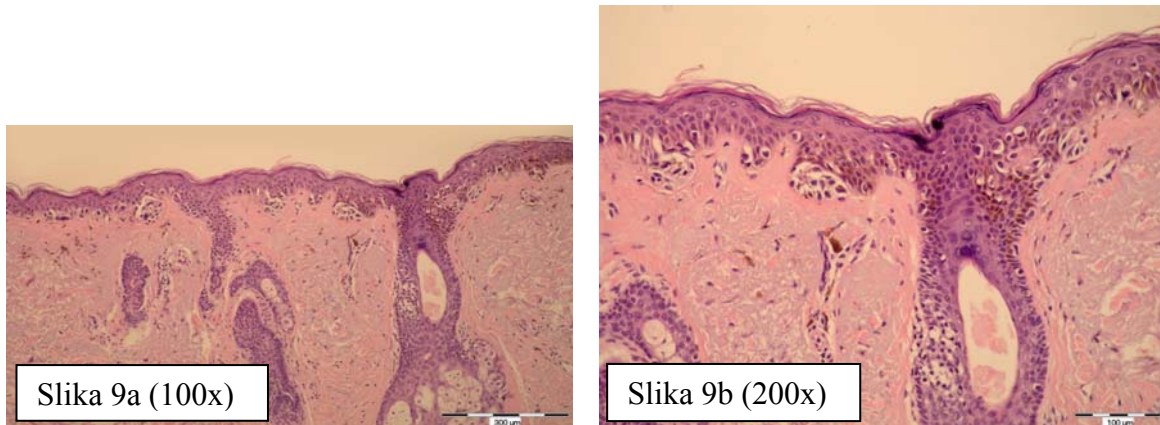
Slika 8.a. – c. Različite kliničke prezentacije lentigo maligna melanoma.

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

Histološku sliku čine linearne nakupine ili gnijezda tumorskih stanica uzduž epidermodermalne granice (tzv. junkcijska proliferacija atipičnih melanocita), ponekad uz zahvaćanje adnexa, odnosno stijenke zida dlačnog folikula i/ili žlijezda znojnica. Često se vide aktinička oštećenja – epidermalne atrofije, solarne elastoze, teleangiektazije.

Atipični melanociti pokazuju pleomorfizam – različite varijacije jezgre i citoplazme. Stanice imaju oblik multinuklearnih gigantskih stanica, tzv. „starburst“ tip stanica. U papilarnom dermisu, ispod LM-a često se nađe limfocitni infiltrat i fokalna fibroplazija. Ponekad se može uočiti regresija na lateralnim granicama tumora, koja se histološki očituje kao fibroza, hipervaskularizacija, uz moguće prisustvo melanofaga i limfocita. Regresija na lateralnim rubovima izuzetno je važna i smatra se indikacijom za reeksciziju, čak i ako se ne nalaze atipični melanociti³³.

Na slici 9.a. i b. prikazana tumorska tvorba građena je od nekoliko gnijezda atipičnih melanocita, mjestimice krupnijih jezgara i prominentnih nukleola, koja se nalaze u bazalnom sloju epidermisa, te plitko infiltriraju papilarni dermis. Tumorske stanice ispunjavaju bazalne i suprabazalne slojeve epidermisa, te se pagetoidno šire u više slojeve epidermisa. Mitoza nema. Debljina izmjenog tumora je bila 0,113 mm.



Slika 9.a. i b. Histološka slika lentigo maligna melanoma LMM T1aNxMx, Cl II Br I. (Preuzeto s dopuštenjem iz originalne patohistološke baze Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“.)

Kod izražene amelanoze u smislu diferencijalne dijagnostike potrebno je izvršiti dodatnu obradu u smislu isključenja SCC-a *in situ* i ektramamarnu Pagetovu bolest, što uključuje posebna bojenja i imunohistokemijske analize uključujući protutijela na citokeratine, melan-A, S-100, a ponekad je potrebna i daljnja obrada (CEA, BerEP4)³⁴.

Diferencijalno dijagnostički, kod LMM-a najčešće dolazi u obzir junkcijska melanocitna proliferacija (solarni lentigo) te pigmentirana aktinička keratoza.

Neka novija istraživanja ukazuju na moguće poremećaje u ekspresiji proliferacijskih i apoptotičkih markera u melanocita i keratinocita u solarne keratoze, što bi moglo pogodovati proliferaciji aberantnih melanocita u ranoj fazi razvoja melanoma.

LM rijetko pokazuje BRAF mutacije. Uočene su češće delecije na 13. i 10. kromosomu u odnosu na druge tipove melanoma³⁵⁻³⁷. Dugo se smatralo da ovaj histološki podtip melanoma ima bolju prognozu, što neke novije studije dovode u pitanje, dajući prioritet debljini i nekim drugim parametrima³⁸. Riječ je o melanomu duge radijalne faze rasta, te s obzirom da se radi o melanoma *in situ*, kompletna ekscizija se smatra kurativnom³⁹.

1.4.4 *Melanoma acrolentiginosum* / ALM

Oko 5% svih MM-a pripada skupini akrolentiginoznih melanoma.

ALM je MM, po definiciji lociran na relativno nepigmentiranoj koži, odnosno koži bez dlačnih folikula. Tipično se javlja na dlanovima i tabanima, te subungvalno. Iako bi se i MM sluznica mogao uklopiti u ovu definiciju, on se ipak opisuje kao zasebni entitet zbog bitno drukčijeg kliničkog toka. U literaturi se upotrebljavaju i drugi termini, kao akralni melanom ili akrolentiginozni melanom. Pojam akralnog melanoma (AM) je povezan sa anatomskom lokalizacijom i objedinjuje različite podtipove MM-a uključujući SSM i NM, dok je pojam akrolentiginozni melanom (ALM) povezan s tumorom koji ima histološku sličnost s LMM-om, a razvija se na akralnim lokalizacijama (Slika 10.a. – g.).



Slika 10.a. – g. Različite kliničke prezentacije akrolentiginoznog melanoma.

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

Postoji znatna razlika u pojavnosti ALM-a u različitim rasa (od 2% kod bijele, pa do čak 80% kod crne i žute rase). Razlog tome je izrazito mala incidencija melanoma neakralne

lokalizacije kod tamnolute populacije. Melanom ovog podtipa najčešći je melanom afroameričke populacije. Usto valja naglasiti da je incidencija melanoma ovog podtipa stabilna za razliku od dramatičnog porasta drugih podtipova melanoma. Pik incidencije je u sedmom desetljeću života slično kao LMM, dakle češće se javlja u starijoj dobi nego SSM i MN. Učestaliji je kod muškaraca⁴⁰⁻⁴¹.

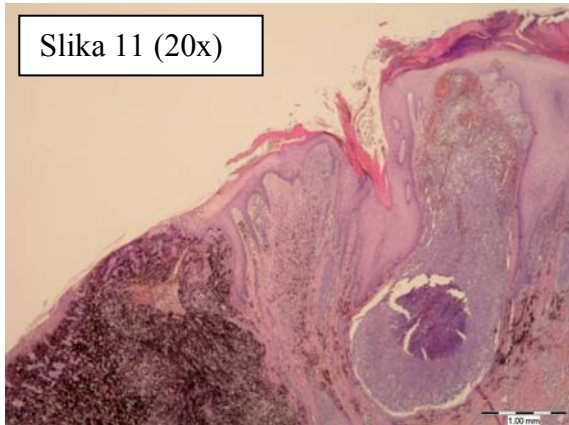
Akralni melanomi češći su na stopalima nego na šakama, a najčešća lokalizacija je plantarna strana prstiju stopala (Slika 10.a., e. i f.). Zanimljivo je da je za razliku od ALM-a, SSM češće smješten na dorzumima, dakle na fotoeksponiranijoj koži, dok se MN pojavljuje jednakom frekvencijom na svim lokalizacijama, što vjerojatno govori o etiološkom karakteru UV zračenja u nastanku pojedinih podvrsta MM-a. Može se, dakle, zaključiti da UV nema znatnu ulogu u nastanku ALM-a. Nokatna ploča spada u posebno česte lokalizaciju (obuhvaća čak 16 – 19% svih ALM-a) (Slika 10.b., c., d.)⁴⁰. Subungvalni melanomi su češći na šakama nego na stopalima⁴². Zanimljivo je da je uočena bitno veća pojavnost subungvalnih melanoma na palcu i velikom prstu stopala u odnosu na ostale prste, što može govoriti u prilog traumi kao etiološkom čimbeniku⁴³.

Klinička slika se razlikuje u ranoj radijalnoj fazi rasta, kada se ALM očituje kao pigmentirana makula, prema kasnijoj invazivnoj odnosno vertikalnoj fazi rasta, kada dolazi do promjene boje, nastanka papule, nodusa te ponekad i ulceracije. Subungvalni melanomi započinju najčešće kao crna ili smeđa diskoloracija nokta, sa mogućim zadebljanjem i destrukcijom nokta. Mahom se očituju kao uzdužna trakasta diskoloracija nokta, a na okolnoj koži se često nađe iregularna hiperpigmentirana makula (Hutchinsonov znak) (Slika 10c.). Neki pacijenti navode traumu koja je prethodila nastanku tumora⁴³.

Nažalost klinička prezentacija je često atipična i ALM se često zamijeni s drugim patološkim zbivanjima. Najčešće su to: veruka, kalus, gljivična infekcija (tinea nigra), subungvalni hematom, keratoakantom, ulkus koji ne cijeli, strano tijelo, urasli nokti i dr.⁴⁴.

Histološki nalaz se razlikuje u radijalnoj fazi, kada je izražena akantoza, zadebljanje kornealnog sloja, elongacija dermalnih papila, lentiginozna proliferacija atipičnih melanocita. Atipični melanociti su veliki, bizarnog izgleda jezgre, citoplazma je ispunjena melaninskim granulama, stanice često imaju dendritske nastavke. Tumorske stanice se ponekad šire unutar duktusa žlijezda znojnice. U vertikalnoj fazi dominiraju infiltrati vretenastih stanica s izraženom dezmoplastičkom reakcijom. Junkcijska je komponenta kod debljih tumora ispunjena gnijezdima tumorskih stanica^{40,43}.

Na slici 11. vidljiv je tumor građen od solidnih nakupina i gnijezda atipičnih melanocita prominentnih nukleola koji se nalaze u bazalnim i suprabazalnim slojevima epidermisa, većim dijelom u papilarnom i retikularnom dermisu. Ne zahvaća potkožno masno tkivo. Na prikazanom tumoru nađeno je 15 mitozu / mm². U citoplazmi pojedinih atipičnih melanocita vide se zrnca grubljeg, smeđeg pigmenta. Žarišno se nalazi ulcerirani epidermis. TIL-ovi su rijetki. Na bazi tvorbe vidi se vaskularna invazija. Debljina ovog tumora je bila 4,48 mm. Mikrosatelitoza, perineuralna invazija, tumorska regresija i pridruženi nevus nisu nađeni.



Slika 11. Histološka slika akrolentiginoznog melanoma ALM T4bNxMx Cl IV Br IV. (Preuzeto s dopuštenjem iz originalne patohistološke baze Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“.)

Imunohistološki nalazimo najčešće ekspresiju S-100 proteina, HMB 45 (korelira s količinom melanina - svi HMB negativni tumori su amelanotični) i MART-1 (melan-A)⁴⁵.

Genomske studije pokazale su amplifikacije pojedinih gena, kao, npr., gena za cyclin D. Najčešće su amplifikacije locirane na kromosomu 11q13 (u čak 50% slučajeva). U nekim radovima navode se i amplifikacije FISH gena. Znatno su manje zastupljene mutacije BRAF onkogeno nego što je to kod melanoma trupa, što govori o različitoj genetskoj podlozi ALM-a i ostalih melanoma, neovisno o histološkoj slici³⁶.

Prognoza ALM-a je općenito loša, a razlog je, po nekima, u relativno zakašnjoj dijagnostici, odnosno u tome da su lezije već značajno zadebljane u trenutku postavljanja dijagnoze. Neki drugi smatraju da se ipak radi o agresivnom tipu melanoma, bez obzira na debljinu. Brojne studije govore o znatno češćem metastaziranju u odnosu na neke druge forme MM-a, a bolje preživljenje ostalih tipova povezuje s njihovom ranijom dijagnostikom⁴⁶. U svakom slučaju postoje i dalje kontradikcije vezane uz ALM i njegov prognostički značaj, a što je vjerojatno povezano i s različitim definiranjem ALM-a u pojedinim studijama⁴⁷.

Diferencijalna dijagnostika je slična kao kod SSM-a i NM-a, a kod subungvalne lokalizacije, odnosno prstiju dolazi u obzir hematom i tinea nigra.

1.4.5 Ostali rjedi kutani maligni melanomi



Slika 12.a.– k. Kliničke slike nekih rijetkih oblika melanoma.

- a) nevoidni melanom, b) maligni „blue nevus“, c) „blue nevus like melanoma“,
 d) amelanotični melanom, e) melanom u dječjoj dobi, f) melanom u gigantskom kongenitalnom nevusuu, g) melanom medijalnog oćnog kuta, h) akrolentiginozni melanom, i) varijanta površinskoširećeg melanoma u vertikalnoj fazi rasta

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

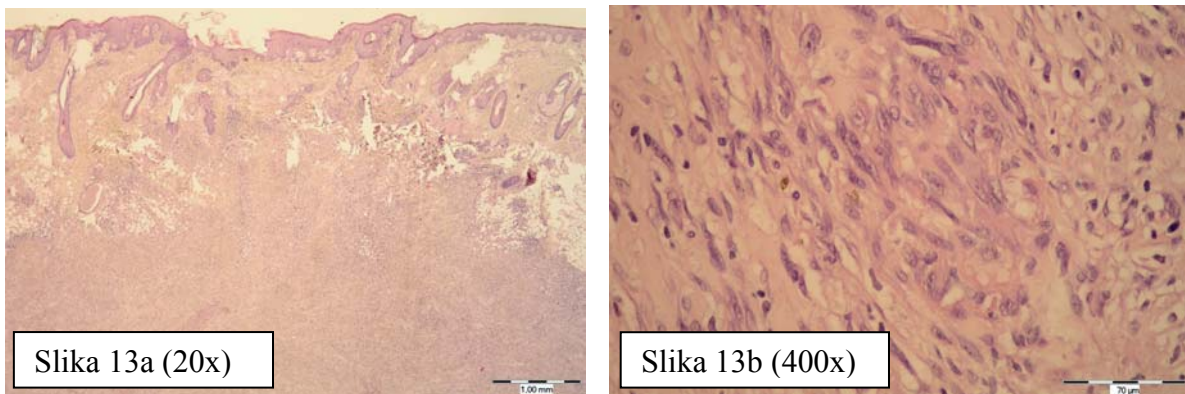
1.4.5.1 Melanoma desmoplasticum / DM

Dezmoplastični melanom (DM) je tumor vretenastih stanica razdvojenih kolagenim vlaknima, odnosno uklopljenima u fibroznu stromu. Pokazuje različiti stupanj citoplazmatske atipije, celularnosti i stromalne fibroze. Neurotropizam je vrlo čest u ovih tumora i tada se oni nazivaju dezmoplastični neurotropni melanomi (DNM). Pojavljuje se u oko 1 – 4% svih

MM-a, nešto više kod muškaraca. Najčešće se javlja na fotoekspoziranoj i katkad ozračenoj koži, a najčešća lokalizacija su glava i vrat ⁴⁸⁻⁴⁹.

Klinički se ovaj melanom najčešće očituje kao bezbolni plak, papula ili nodus. U približno polovice slučajeva ne nalazimo nikakve pigmentacije. Najčešće se u ovoj varijanti zamijeni za BCC, dermatofibrom ili ožiljak. Pigmentirane lezije su gotovo uvijek udružene s LM-om ili SSM-om. U oko 17% slučajeva javlja se s ulceracijom ⁵⁰. Najčešće prodire u dublje strukture kože, a zbog neurotropizma fokusi mogu biti i udaljeni od glavne tumorske mase. Neurotropizam pokazuju tek lezije deblje od 1.5 mm i Clark razine 4 ili 5. Tumorske stanice rasporedom oponašaju izgled živca (tzv. neuralna transformacija).

Histološki tumor je građen od vretenastih stanica koje nalikuju fibroblastima, uobičajeno su nepigmentirane i raspoređene između kolagena. Prisutan je različit stupanj stromalne fibroze. Distribucija tumorskih vretenastih stanica varira od rasporeda u snopove do difuzne distribucije. Često je zahvaćen subkutis, a ponekad i fascija. Epidermis može biti zadebljan ili stanjen. Na periferiji tumora tipično su prisutni manji otoci limfocita i plazma stanica. Ponekad su ti limfomatoidni otočići ključni za postavljanje dijagnoze. Atipija tumorskih stanica varira u smislu različitih varijacija jezgre i citoplazme, često je vidljiva udruženost sa solarnom elastozom. Vaskularna invazija je rijetka. Mitotički indeks varira. Debljina i prodor najbolje se određuju S-100 bojenjem ⁵¹⁻⁵².



Slika 13.a. i b. Histološka slika dezoplastičnog melanoma (recidiv).

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne patohistološke baze Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“.)

Tumorska tvorba prikazana na slici 13.a. i b. nalazi se u dermisu i potkožnom masnom tkivu. Građena je od mitotски aktivnih vretenastih stanica, hiperkromatskih anizokariotskih jezgara, koje su uklopljene u dezoplastičnu vezivnu stromu.

Inače svi podtipovi melanoma mogu imati dezmoplastična područja, a proporcija dezmoplazije je bitna kod postavljanja dijagnoze DM⁵³.

Diferencijalna dijagnoza obuhvaća dezmoplastični nevus koji ima perineuralno širenje, no histološki nedostaju: asimetrija, mitotska aktivnost, nuklearna atipija i limfoidni infiltrati. Sličnost s DM-om nalazimo i kod nezrelih ožiljaka, posebice nakon reekscizije, dermatofibroma, fibrosarkoma, malignog fibroznog histiocitoma, malignih tumora ovojnice perifernog živca i leiomiosarkoma. U dijagnostici ovih tumora od neprocjenjive je pomoći imunohistokemija.

Karakteristično nema BRAF mutacija ili rijetko i to samo na fotoeksponiranoj koži⁵⁴.

Prognoza je lošija u odnosu na konvencionalne melanome. Iako široka lokalna ekscizija predstavlja terapiju izbora, u nekim slučajevima se i radioterapija pokazala efikasnom metodom liječenja⁵⁵.

1.4.5.2 Melanom nalik plavom madežu / *Blue nevus like melanoma*

Ovaj tip MM-a je pridružen tzv. plavom nevusu (engl. „blue nevus“) ili mu samo nalikuje. Riječ je o izuzetno rijetkom podtipu PCM-a, koji se predominantno javlja u bijelaca između 20. – 60. godine. Nešto je češći u žena. Najčešća lokalizacija je glava, slijede leđa i ekstremiteti, mahom natkoljenice. U većini slučajeva MM je povezan s prethodno prisutnim „blue nevusom“. U većini slučajeva riječ je o naglom rastu tumorske tvorbe, promjeni boje i prisustvu ulceracije. Lezija je tipično veliki crni nodus, promjera oko 2 cm (Slika 12. c.).

Histološki, riječ je o dermalnom melanomu, kod kojega se u 80% slučajeva nalazi pridružen „blue nevus“. Kod ovog melanoma najčešće su vidljive dvije komponente tumorske mase: benigna i maligna. Uobičajena je nagla tranzicija iz „blue nevusa“ u melanomski nodus ili noduse (Slika 12. b.).

Diferencijalno dijagnostički potrebno je razlikovati ovaj tumor od nekih klinički sličnih lezija. U prvom redu to je atipični celularni „blue nevus“ čije su karakteristike na granici celularnog „blue nevusa“ i melanoma pridruženog „blue nevusu“. Druga klinički slična lezija također benignog toka je tzv. „large plaque“ ili gigantski celularni „blue nevus“ sa subkutanim celularnim nodusima. Međutim i metastatski melanom može imati kliničku sličnost s nevoidnim melanomom. To su tzv. „blue nevus like“ metastaze. I animalni melanom, rijetka varijanta izrazito agresivnog PCM-a, može se klinički zamijeniti s ovim tipom melanoma. Njegovo su obilježje pigmentirani epiteloidni melanociti smješteni uzduž dlačnih folikula koji zahvaćaju čitav dermis i prodiru u subkutano masno tkivo⁵⁶⁻⁵⁸.

1.4.5.3 Melanom nastao iz gigantskog kongenitalnog nevusa

Kongenitalni nevus javlja se u oko 1% populacije. Rizik nastanka melanoma u odnosu na ostalu populaciju procjenjuje se većim za oko 5 – 20%. Maligna transformacija kongenitalnog gigantskog nevusa pojavljuje se bimodalno. Većina pacijenta doživi malignu transformaciju do dobi od 10. godina, dok se drugi pik incidencije javlja u odrasloj dobi. Najčešće se javlja na trupu, glavi i vratu, no moguće su i sve druge lokalizacije. Po definiciji, kongenitalni gigantski nevus obuhvaća one kongenitalne nevuse s promjerom većim od 20 cm, odnosno obuhvaćanjem površine tijela s više od 2%. Klinički se očituje asimetričnim nodusom ili plakom, različite boje od plavocrne, crvenkaste ili boje mesa (Slika 12.f.). Ponekad se klinički očituje kao cistična lezija. Melanom je jedini tumor koji se javlja unutar kongenitalnog gigantskog nevusa te svaku sumnjivu tvorbu unutar nevusa treba biopsirati.

Histološki, tumor je asimetričan, oštro demarkiran od ostalog dijela nevusa. Ako je lociran površinski, dovodi do izravnjanja dermalnih papila i nerijetko do ulceracija. Intraepidermalna komponenta obično se sastoji od epiteloidnih pigmentnih stanica. Širenje tumora je najčešće pagetoidno. Tumorske stanice dermalne komponente obično formiraju noduse. Stanice imaju prominentne jezgre. Moguća je pojava nekroza. Maligne stanice ne sazrijevaju, već poput struna infiltriraju okolno tkivo nevusa. Mitoze kao i limfocitna infiltracija su česti. U vertikalnoj fazi rasta nodusi mogu sadržavati različite tipove stanica varijabilne pigmentacije.

Diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir različiti proliferativni čvorovi. Komparativna genomska hibridizacija pokazuje slične aberacije kao i melanomi koji nastaju neovisno o nevusu. Proliferativni nodusi nastali rano u djetinjstvu ne pokazuju kromosomske aberacije, što potvrđuje njihovu benignu narav⁵⁹.

1.4.5.4 Melanom dječje dobi

Melanomi dječje dobi su oni koji se javljaju prije puberteta. Dijelimo ih na: *in utero* ili kongenitalne melanome, infantilne melanome do navršene prve godine života i melanome koji nastaju od navršene prve godine života do puberteta. Izrazito su rijetki, s incidencijom oko 0,4% svih melanoma. U dobi do 20 godina incidencija je oko 2%. Kliničke osobine slične su onima u odrasloj dobi. U predpubertalnoj dobi toliko su rijetki da se na njih rijetko posumnja. Najčešća klinička slika je nagli rast pigmentirane lezije, krvarenje, pojava palpabilnog nodusa, ulceracije, promjena boje i gubitak jasnih granica lezije (Slika 12. e.). U dječjoj dobi je češća i udruženost s boli i svrbežom. Izuzetno je bitna dob bolesnika, s obzirom da se PCM u pravilu ne javlja ispod 2 godine života. Posebnu pozornost pri kliničkom pregledu treba obratiti na atipične nodularne proliferacije i „Spitz nevus“. Posebno

je važno ne predijagnosticirati suspektne lezije u ovoj dobi, kao i ne zanemariti sumnjive. Svaku leziju koja u potpunosti ne zadovoljava kriterije za melanom treba se smatrati biološki nedeterminiranom i provesti adekvatno praćenje.

Melanomi dječje dobi dodatno se mogu podijeliti na: konvencionalne melanome, melanome malih stanica i melanome koji simuliraju „Spitz nevus“.

Diferencijalno dijagnostički potrebno je razlučiti kongenitalne i druge nevuse koji pokazuju pagetoidnu melanocitozu, lentiginozne melanocitne proliferacije, atipične melanocitne nodularne proliferacije, „Spitz nevus“⁶⁰.

1.4.5.5 Nevoidni melanom

Nevoidni melanom je podtip MM kože koji svojom kliničkim, ali i histološkim obilježjima nalikuje običnom složenom ili intradermalnom nevusu (Slika 12a.). Ispunjen je malim melanomskim stanicama ili može nalikovati „Spitz nevusu“ i tada je ispunjen srednje velikim ili velikim tumorskim melanocitima. Za razliku od atipičnih nevusa, ova skupina MM-a prodire u dublje slojeve dermisa i ima maligni potencijal. Riječ je o rijetkom podtipu koji se javlja u oko 1 – 2% svih MM-a. Rijetki su, pa demografski profil nije dobro određen. Najčešće se javljaju u mlađoj i srednjoj životnoj dobi, s blagom predominacijom ženskog spola. Distribucija lezija najčešća je na trupu i proksimalnim dijelovima ekstremiteta, posebice nogu⁶¹. Klinički se očituje kao papulonodularna lezija (promjera 5 – 10 mm). Boja može varirati. Inflamacija je česta. Poneki bolesnici navode preegzistirajuću makulu iz koje se razvije solitarna papula. Palpatorno, lezije su mekane i bezbolne. Ovaj tip melanoma može nastati iz klinički normalne kože, preegzistirajućeg nevusa ili lentigo promjene.

Histološki je riječ o tumoru bez većeg intraepidermalnog širenja tumorskih stanica, sa relativno simetričnim profilom. Rubovi su oštro demarkirani. Uobičajeno se viđa prodor tumorskih stanica u dermis koje međusobno poprimaju oblik plahti. Neke lezije imaju samo velike nakupine ili gnijezda tumorskih stanica u dermisu. Uobičajeno su veća gnijezda u dubljim slojevima. U većini tumora prisutne su multiple mitoze, što je proporcionalno veličini tumora. Nevoidni melanomi mogu zahvaćati dio ili cijeli preegzistirajući nevus. Tumorske stanice najčešće su sitne s hiperkromatskim jezgrama, no mogu biti i srednje do velike. Uobičajeno su blijedih citoplazmi. Lezije su najčešće ograničene, polipoidne ili verukozne.

Imunoprofil nevoidnog melanoma može biti HMB-45 i pozitivan i negativan, dok su melan A i Ki-67 pozitivni kroz cijelu leziju. PCNA ne predstavlja pouzdan čimbenik, a AgNOR se koristi u diferencijaciji prema benignim lezijama⁶².

Prediktivni čimbenici prognoze nevoidnog melanoma su u prvom redu debljina i mitotski indeks. Smatra se da prediktivnu ulogu ima i nazočnost velikih stanica. Neki autori smatraju da je prognoza nevoidnog melanoma slična prognozi konvencionalnih melanoma, no za sada je relativno malo pacijenata uključeno u studije.

1.4.6 Perzistentni melanom i lokalne melanomske metastaze

Perzistentni melanom je pojam koji se odnosi na lokalni recidiv melanoma nakon nepotpune ekscizije primarnog kutanog melanoma. Epidemiološke i etiološke značajke odgovaraju onoj primarnog melanoma. Najčešće mjesto recidiva su glava i vrat, vjerojatno zbog loše definiranih rubova, najčešće su to amelanotične varijante, lentigo maligna melanom i dezmoplastični melanom (Slika 14a. – e.).

Klinički se recidiv očituje kao makula varijabilne pigmentacije, u blizini ili u kontaktu s ožiljkom nakon primarne ekscizije. U slučaju nodusa najčešće se govori o dermalnoj invaziji dezmoplastičnog melanoma.

Histološki izgled recidiva odgovara onom primarno ekscidiranog tumora.

Iako rijetko, diferencijalno dijagnostički treba pomišljati i na to da pigmentacija ili novonastali nodus u blizini postoperativnog ožiljka mogu biti i novonastali tumor, dermatofibrom ili pigmentirani bazaliom. Klinički je puno važnija distinkcija između perzistentnog melanoma zbog inkompletne ekscizije i drugih formi metastatskog melanoma. Metastatski melanom povezan s ožiljkom nakon primarne ekscizije uobičajeno se prezentira kao brzo rastuća papula ili nodus u podležecem dermisu (bez pigmentacije na površini), a ponekad kao multiple brzo rastuće i vrlo slične lezije udaljene od primarnog ekscizata. Histološki metastaze koje su pridružene ožiljku imaju potpuno ista obilježja kao i kutane metastaze udaljene od primarnog ekscizata ⁶³.

Prognoza kod perzistentnog melanoma se procjenjuje na potpuno isti način kao i kod primarnog melanoma, pri čemu debljina predstavlja najvažniji pojedinačni prognostički čimbenik. Za razliku od perzistentnog melanoma, recidiv bolesti u smislu kutanih metastaza koje su posljedica sistemske metastatske bolesti ima znatno lošiju prognozu ⁶⁴.



Slika 14. a – e. Perzistentni melanom i lokalne melanomske metastaze.

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

1.5 Biopsija limfnog čvora čuvara i njezino značenje

Sentinel čvor je prvi drenažni limfni čvor ili čvorovi na putu drenaže iz područja primarne lokalizacije tumora. Negativni status sentinel limfnih čvorova isključuje prisustvo metastaza i unutar drugih limfnih čvorova unutar istog regionalnog limfatičkog bazena.

Cabanes je prvi 70-ih godina prošlog stoljeća upotrijebio izraz „sentinel node“ kako bi indicirao limfni čvor koji ima najveću vjerojatnost prisutnosti metastatskih stanica iz primarne tumorske lezije. Cabanes je, za razliku od kasnije prihvaćenog Mortonovog koncepta, smatrao da je riječ o fiksnoj anatomskej lokalizaciji.

Ocem metode smatra se, ipak, Donald Morton koji je 1992. u „John Wayne Cancer Institute“ uspješno izvršio prvo mapiranje limfnih čvorova pomoću metilenskog modrila. Mortonova grupa opisala je limfatičko mapiranje upotrebom boja (modrila) u smislu identifikacije bazena limfnih čvorova koji su pod rizikom razvoja metastaza iz primarnog melanoma trupa ⁶⁵.

Već sljedeće, 1993. godine, Alex i suradnici su za mapiranje limfnog puta prvi iskoristili radioizotop ⁶⁶. Tako je u zadnjem desetljeću prošloga stoljeća započelo razdoblje primjene

nove metode koja je ne samo istisnula radikalnu disekciju, već se ubrzo – uz debljinu primarnog tumora – pokazala najvažnijom kliničkom informacijom u „stagingu“ MM-a kože.

Danas postupak SLNB (engl. sentinel lymph node biopsy) uključuje sljedeće. Limfoscintigrafskim metodama i vitalnim bojama preoperativno se određuje put limfne drenaže i određuje pozicija obrambenog ili prvog drenažnog limfnog čvora. Bolesniku se aplicira intradermalno oko ožiljka radiokoloid: Tehnecij 99 (Tc99) sumporni koloid 1mCi/ml i obavi se prvo preoperativno snimanje gama-kamerom. Potom se, po učinjenoj limfoscintigrafiji ponovno preoperativno intradermalno injicira u područje oko ožiljka oko 1 ml vitalne boje (isosulfan blue ili methylene blue), a područje oko lezije se lagano izmasira čime se potiče limfna drenaža. Uporabom gama-kamere identificira se lokacija najveće radioaktivnosti tzv. „hot spot“, odnosno lokacija sentinel limfnog čvora u koji je prvo došlo do limfne drenaže iz područja primarnog tumora. Iznad tzv. vruće točke učini se incizija, koja se planira tako da dozvoljava, eventualno, kasnije potrebnu totalnu disekciju. Vizualnu pomoć pri određivanju sentinel limfnog čvora ili čvorova daje markacija tzv. „plavih čvorova“ i plavo-obojenih puteva limfne drenaže, što se potom ponovo i intraoperativno potvrđuje uporabom ručne gama-kamere. Kada se ovako dvostrukim testom identificiraju sentinel čvorovi, pristupa se ekstirpaciji svih čvorova sa znatnom radioaktivnošću. Radioaktivnost se ponovo mjeri i *ex-vivo*.

Svi limfni čvorovi markirani plavom bojom ili oni čija radioaktivnost prelazi ili je jednaka zračenju limfnog čvora najviše izmjerene radioaktivnosti („hottest node“), smatraju se visoko suspektim, te se također ekstirpiraju i upućuju na daljnju patohistološku evaluaciju.

Disekcija se nastavlja sve dok se radioaktivnost cijelog nodalnog bazena izmjerena gama-kamerom ne smanji na 10% najviše izmjerene radioaktivnosti ekstirpiranog čvora.

Po završenoj ekstirpaciji sentinel limfnog čvora/čvorova učini se i široka reekscizija postoperativnog ožiljka (sa širokim rubovima 1–3 cm, ovisno o veličini primarnog tumora).

Nekako paralelno sa etabliranjem sentinel biopsije krajem prošlog stoljeća bitno su poboljšane i tehnike patohistološke evaluacije regionalnih limfnih čvorova, te je tako Cohrain uveo tehniku serijske sekcije limfnih čvorova i imunohistokemijsko bojenje upotrebom antitijela^{13,67-68}.

Svi protokoli praćenja bolesnika oboljelih od primarnog MM-a kože, orijentirani su ka ranoj detekciji metastaza. S obzirom da primarni MM kože većinom metastazira u regionalne limfne čvorove, te da je stanje lokoregionalnih limfnih čvorova najvažniji pojedinačni

prognostički čimbenik, posebna pozornost posvećena je procjeni te regije, a za što se koriste različite dijagnostičke metode. SLNB je postao etablirani metod u evaluaciji nodalnih metastaza s niskim rizikom postoperativnih komplikacija⁶⁹.

SLNB omogućava identificaciju subkliničkih metastaza u limfne čvorove, koristeći proceduru s minimalnim morbiditetom. Ne tako davno, jedina objektivna metoda procjene proširenosti tumora bila je radikalna disekcija limfnih čvorova (engl. Radical Lymph Node Dissection – RLND), koja je imala visoku stopu komplikacija (20 – 30%) i danas je u većini slučajeva zamijenjena SLNB-om kao alternativnom i pouzdanom metodom.

SLNB omogućava precizan „staging“, određuje prognozu, te omogućava dobar probir bolesnika za kompletnu disekciju limfnih čvorova i, konačno, pomaže pri izboru adekvatne terapije. Ova metoda omogućuje vrijednu prognostičku informaciju doprinoseći ranoj terapijskoj limfadenektomiji i ujedno pruža dobru osnovu za identifikaciju onih bolesnika koji su kandidati za različite adjuvantne modalitete liječenja⁷⁰⁻⁷¹.

Međutim, iako se SLNB pokazao kao važan prognostički alat za melanome I i II stupnja te tumore srednje debljine (1 – 4 mm) i dalje postoje rasprave i kontroverze oko ove metode. Njezini kritičari smatraju kako SLNB nije dokazao znatan terapijski benefit u smislu hitne kompletne disekcije limfnih čvorova kod bolesnika s pozitivnim sentinel čvorom. Naime, nije dokazano da CLND, učinjen odmah po pozitivnom SLNB-u, ima korist u smislu boljeg preživljenja u odnosu na one bolesnike kod kojih je kompletna disekcija učinjena tek po klinički manifestnim nodalnim metastazama. Postoje i kritike na račun prognostičke vrijednosti metode, s obzirom da postoji i niz drugih kliničkih informacija (npr. status limfatičkih puteva, dob, komorbiditet...) koje su neophodne u smislu cjelovite slike. Također, neki navode i vrlo nepovoljne omjere „cost-benefit“ analize kod tankih tumora (<1,2 mm) kod većine bolesnika. Drugi negiraju i njezin pozitivan psihološki efekt u smislu boljeg informiranja bolesnika, te kvalitetnije zajedničke odluke o strategiji liječenja. Neki čak smatraju da metodu sentinel biopsije ne bi trebalo promovirati kao standardni postupak, već u skladu s individualnom evaluacijom i odlukom pacijenta⁷²⁻⁷⁵.

Relativne kontraindikacije za primjenu SLNB-a su prisustvo sistemske bolesti, klinički suspekti limfni čvorovi kada FNA (engl. fine-needle aspiration) ima prednost pred SLNB-om i kod ekstenzivnih rekonstruktivnih zahvata nakon široke primarne ekscizije. Iako se u literaturi ne navodi kao kontraindikacija, neki smatraju da se postupak SLNB ne smije ponavljati.

1.6 Patohistološka analiza

Tijekom ovog istraživanja, postupak patohistološke analize ekscizata primarnog MM-a kože, eksciziranih limfnih čvorova i reekscizata ožiljka izvršen je u Zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ KBC „Sestre milosrdnice“. Standardni postupak obuhvaća sljedeću obradu.

Preparati se prvo opisuju makroskopski, a zatim se pristupa obradi u smislu daljnje evaluacije, a u cilju otkrivanja mogućih rezidua. Preparati se boje standardnim histološkim bojenjem, hemalaun-eozinom te mikroskopski analiziraju. Pored ovih, tzv. standardnih bojenja, provodi se i imunohistokemijska analiza u smislu otkrivanja mikrometastaza. Pri analizi sentinel limfnog čvora, on se nareže na tanke odsječke debljine oko 2 mm, koji se uklapaju u parafinske blokove. Iz svakog bloka se analizira 9 rezova: 6 bojenih hemalaun-eozinom, a 3 bojena imunohistokemijski (S-100, HMB-45; Melan-A).

Ako se utvrdi postojanje mikrometastaza ili metastaza u limfne čvorove, pristupa se totalnoj limfadenektomiji zahvaćene regije.

Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu predložilo je u listopadu 2012., na 5. hrvatskom kongresu patologa i sudskih medicinara, protokol za pregled uzorka kod bolesnika s melanomom kože, a koji je temeljen na smjernicama AJCC/UICC TNM-a, 7. Izdanje⁷⁶.

Postupnik obuhvaća analizu uzorka koja bi trebala predstavljati standardizirani algoritam, s ciljem unificiranja rada svih patoloških institucija u RH. Predloženi postupnik obuhvaća:

Opis uzorka

Način uzimanja uzorka

- biopsija („shave“, „punch“ ili incizijska biopsija)
- ekscizija
- reekscizija
- limfadenektomija
- limfadenektomija, sentinel čvor (ovi)
- limfadenektomija, regionalni čvorovi
- ostalo

Makroskopski opis

- veličina uzorka i veličina tumora
- pigmentacija tumora (uniformna, iregularna)
- rub tumora (regularan, iregularan)
- satelitski čvorovi (prisutni, odsutni)
- ulceracija (prisutna, odsutna)

Histološki podtip

- melanom, neklasificirani
- površinsko šireći melanom
- nodularni melanom
- lentigo maligna melanom
- akralno-lentiginozni melanom
- dezmoplastični i/ili dezmoplastično neurotropni melanom
- melanom nastao u „blue nevasu“
- melanom nastao u gigantskom kongenitalnom nevasu
- melanom dječje dobi
- nevoidni melanom
- drugo

Maksimalna debljina primarnog melanoma po Breslowu (specificirana u mm)

Razine po Breslowu

- I ≤ 0.75 mm
- II 0.76 – 1.50 mm
- III 1.51 – 3.99 mm
- IV ≥ 4.0 mm

Anatomska razina po Clarku

- I (melanom in situ)
- II (melanom prisutan, ali ne ispunjava niti se širi u papilarni dermis)
- III (melanom ispunjava i širi se u papilarni dermis)
- IV (melanom invadira retikularni dermis)
- V (melanom invadira potkožje)

Ulceracija (prisutna, odsutna)

Periferni rubovi

- ne mogu se odrediti
- nezahvaćeni melanomom (udaljenost od perifernog melanoma do najbližeg perifernog ruba u mm)
- zahvaćeni melanomom (*in situ* / invazivnim melanomom)

Baza

- ne može se odrediti
- nezahvaćena melanomom (udaljenost melanoma od baze u mm)
- zahvaćena melanomom

Mitotski indeks (vertikalna faza rasta)

- specificirati broj mitoza na mm²

Mikrosatelitoza (prisutna/ odsutna)

Limfo-vaskularna invazija (prisutna/ odsutna)

Perineuralna invazija (prisutna/ odsutna)

Tumor infiltrirajući limfociti

- odsutni
- prisutni, rijetki
- prisutni, gusti

Tumorska regresija

- odsutna
- prisutna, parcijalna (< 75% tumora)
- prisutna, ekstenzivna (> 75% tumora)

Faza rasta

- radijalna
- vertikalna

Limfni čvorovi

- broj pregledanih sentinel limfnih čvorova
- ukupan broj pregledanih limfnih čvorova (sentinel i ne-sentinel)
- broj limfnih čvorova s metastazama

Pridruženi nevus

- odsutan
- prisutan; specificirati (displastičan, stečeni, kongenitalni, drugi)

Klinički podaci

- dob
- lokalizacija
- ostale napomene (trajanje, prethodni melanomi i zahvati, obiteljska anamneza)

Patološki stadij (pTNM)

- primarni tumor (pT)
- regionalni limfni čvorovi (pN)
- udaljene metastaze (pM)

1.7 AJCC – nova klasifikacija

Američka radna skupina za rak (American Joint Committee on Cancer – AJCC), s posebnom radnom grupom za melanom (Melanoma Staging committee – MSC), na temelju evaluacije velikih serija bolesnika uvela je kriterije stupnjevanja primarnog MM-a kože. AJCC klasifikacija melanoma temeljena je prvenstveno na TNM sustavu, ali s dodatnim prediktivnim kliničkim i patohistološkim parametrima. Ova klasifikacija, predstavlja dobar okvir za prognozu i pristup liječenju. Metoda stratifikacije bolesnika u prognostičke razrede kontinuirano se preispituje i revidira s ciljem da uključivanje novih kriterija omogući što bolji i individualizirani postupak liječenja i praćenja bolesnika. Prethodna klasifikacija iz 2002. prihvaćena je od brojnih međunarodnih organizacija među kojima treba istaknuti: International Union against Cancer (IUCC), European Dermatology Forum (EDF), European Association of Dermatologists (EADO), European society of Medical Oncology (ESMO), European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Klasifikacija je prihvaćena i koristi se kao osnovni algoritam praćenja bolesnika u gotovo svim međunarodnim centrima za liječenje MM-a.

Temeljem kliničke i patohistološke evaluacije oko 60 000 pacijenata Melanoma Staging committee (MSC) predložilo je reviziju klasifikacije iz 2002. Nova, revidirana sedma edicija „Staging Manual“ publicirana je krajem 2009., a stupila je na snagu početkom 2010. godine.

Kako su brojne studije dokazale važnost statusa regionalnih limfnih čvorova kao najvažnijeg prognostičkog čimbenika kod bolesnika s primarnim kutanim melanomom, on ostaje i nadalje ključni parametar.

Sustav je temeljen na TNM klasifikaciji, a u izradi pojedinih kriterija u stupnjevanju bolesti korištene su statističke obrade velikih, međunarodno prikupljenih baza podataka.

Tako „Melanoma Staging database“ predstavlja najveću međunarodnu kooperativnu bazu koja omogućava reviziju i klasifikaciju „staging“ kriterija temeljenu na dokazima. Tijekom 2008. prikupljeno je čak 38 918 prospektivnih podataka: 30 946 za melanome stupnja I, II i III i 7972 stupnja IV.

Podjela prema stadijima nije promijenjena u novoj revidiranoj verziji. Bolesnici se mogu podijeliti u 4 klinička i patohistološka stadija (tablica 1).

Stupanj 0 predstavlja melanom *in situ*, I i II stupanj bolesnike s lokaliziranom bolesti, III stupanj uključuje bolesnike sa zahvaćenim limfnim čvorovima, dok su IV-im stupnjem obuhvaćeni bolesnici sa proširenom bolešću u udaljene organe.

Tablica 1. Klasifikacija melanoma – stadiji (prema: AJCC Seventh edition 2010.)⁷⁶

Klinički stadij*				Patohistološki stadij**			
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	Bilo koji T	Bilo koji N	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
					T1–T4a/b	N2c	M0
				IIIC	T1–4b	N1b	M0
					T1–4b	N2b	M0
					T1–4b	N2c	M0
					Bilo koji T	N3	M0
IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1	IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

* Klinički stadiji uključuju stupnjevanje prema patohistološkim parametrima primarnog tumora i kliničko /radiološku evaluaciju regionalnih i udaljenih metastaza.

** Patološki stadiji uključuju stupnjevanje prema patohistološkim parametrima primarnog tumora i patološku evaluaciju limfnih čvorova (SLNB ili kompletna limfadenektomija). Izuzetak su stadij 0 i IA koji ne zahtijevaju patohistološku evaluaciju limfnih čvorova.

Tablica 2. – Stadiji melanoma kože

(prema: AJCC Seventh edition 2010.)⁷⁶

Stadij 0	Melanoma <i>in situ</i>
Stadij IA	<1,0 mm; bez ulceracije, mitotički indeks <1 na mm ²
Stadij IB-II	<1,0 mm; s ulceracijom ili mitotički indeks > ili = 1 na mm ² ili >1,0 mm; s klinički negativnim limfnim čvorovima
Stadij III	Klinički pozitivni limfni čvorovi ili <i>in transit</i> metastaze*
Stadij IV	Udaljene metastaze

**In transit* metastaze – metastaze između primarnog tumora i mjesta prvog limfnog čvora.

AJCC klasifikacija temeljena na TNM kriterijima obuhvaća sljedeće:

1.7.1 T klasifikacija

Osnovni parametri T-klasifikacije su debljina po Breslowu i ulceracija. Debljina kao primarni parametar stratificirana je u razrede: <1mm; 1–2 mm; 2–4 mm; >4 mm. Ulceracija je sekundarni parameter. U novoj verziji iz 2010., osnovna promjena je uvođenje mitotskog indeksa (izražen u broju mitotičkih ćelija/mm²) kao novog parametra, koji je ujedno istisnuo invaziju po Clarku. Multivarijantnom analizom na gotovo 5 000 T1 melanoma debljina, mitotski indeks i ulceracija pokazali su puno snažniju prediktivnu vrijednost, dok razine prodora po Clarku – nakon uvođenja ovih parametara – nisu pokazale statističku važnost.

Tablica 3. – T stadiji melanoma kože (primarni tumor)

(prema: AJCC Seventh edition 2010.)⁷⁶

Klasifikacija	Debljina (mm)	
T0		Primarni tumor nije nađen
Tis	NA	Melanoma <i>in situ</i>
T1	≤ 1,00	a: bez ulceracije, mitotski indeks < 1/mm ² b: sa ulceracijom ili mitotski indeks ≥ 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

1.7.2 N klasifikacija

Primarna odrednica N-klasifikacije je broj metastatski promijenjenih limfnih čvorova. Sekundarna odrednica je metastatski volumen: mikroskopske vs. makroskopske metastaze. SLNB je preporučan kao standardna procedura za stupanj Ib. i II. *In transit*/satelitske metastaze su uključene u N klasifikaciju bez metastatski promijenjenih čvorova. Promjena u N klasifikaciji je u tome što se mikroskopske nodalne metastaze detektiraju standardnim bojenjem hematoxylin – eosinom (HE) ili imunohistokemijskim bojenjem (IHC), dok je u prijašnjoj verziji samo HE standardno bojenje bilo prihvaćeno pri detekciji metastaza.

Prva razlika u odnosu na prethodnu verziju je u tome da je, kao dostatan uvjet za postavljanje dijagnoze metastaza, dovoljno i samo IHC bojenje ako je detektiran barem jedan od markera: HMB-45; Melan-A ili MART-1, a stanice imaju maligne morfološke osobine. Iako se o tome

razmatralo RT-PCR evaluacija limfnih čvorova za sada nije prihvaćena kao metoda detekcije metastaza.

Druga promjena: veličina tumorske mase nije više bitna u postavljanju dijagnoze nodalne metastaze. Tako su nekad samo tumorski agregati veći od 0,2 mm zadovoljavali definiciju, dok prema sadašnjoj N klasifikaciji, tumorski infiltrat neovisno o veličini koji zadovoljava histološke ili imunohistokemijske kriterije, ulazi u kategoriju N+.

Tablica 4. – N stadiji melanoma kože (status limfnih čvorova)

(prema: AJCC Seventh edition 2010.)⁷⁶

N	Broj metastatski promijenjenih limfnih čvorova	Nodalne metastaze
N0	0	NA
N1	1	a: Mikrometastaze* b: Makrometastaze**
N2	2–3	a: Mikrometastaze* b: Makrometastaze** c: <i>In transit</i> metastaze/satelitoza bez metastatskih čvorova
N3	4 ili više metastatskih čvorova, ili srasli čvorovi, ili <i>in transit</i> metastaze/sateliti s metastatskim čvorovima	

* Mikrometastaze – nakon sentinel limfadenektomije i kompletne nodalne disekcije regije.

** Makrometastaze – klinički pozitivne nodularne metastaze potvrđene limfadenektomijom ili postoji ekstrakapsularno širenje.

1.7.3 M klasifikacija

U M klasifikaciji nije bilo promjena. Sijelo udaljenih metastaza kao i povišena laktat dehidrogenaza (LDH) predstavljaju i dalje dominantne komponente. Klasifikacija ističe razliku u prognozi između kutanih, nodalnih i drugih visceralnih metastaza (M1a, b, c)

Povišen LDH bez obzira na lokaciju udaljene metastaze ima najgoru prognozu, klasa M1c. Rezultati analize AJCC-a, prema Melanoma Staging Database na bolesnicima stupnja IV, pokazuju stopu jednogodišnjeg preživljenja od 32% kod povišenog LDH dok ona iznosi čak 65% u slučaju normalne razine LDH u bilo kojem stupnju. Ovo je dokaz velike važnosti LDH u prognostičkom smislu.

Novi “staging” određen je za metastaze okultnog primarnog tumora. Za razliku od prethodne klasifikacije koja je melanomske metastaze nepoznatog primarnog tumora koje nastaju u limfnom čvoru, koži ili subkutanom tkivu u odsutnosti udaljenih metastaza svrstavala u stupanj IV; nova klasifikacija ih svrstava u stupanj III.

Tablica 5. – M stadiji melanoma kože (udaljene metastaze)

(prema: AJCC Seventh edition 2010.)⁷⁶

M	Sijelo	Serumska LDH
M0	Bez udaljenih metastaza	NA
M1a	Udaljene kožne, subkutane ili nodalne metastaze	Normalna
M1b	Plućne metastaze	Normalna
M1c	Sve druge visceralne metastaze	Normalna
	Bilo koje udaljene metastaze	Povišena

1.7.4 Prognostičke implikacije po stupnjevima

Za stupnjeve I i II debljina i ulceracija primarnog tumora su dominantni parametri. Mitotski indeks je uveden kao novi značajan prediktivni parametar, zamijenivši razine prodora po Clarku. Prognostički značaj: 10-godišnje preživljenje iznosi od najvećeg 93% za Ia. skupinu, do 39% za IIC. skupinu melanoma.

Za III stupanj melanoma najznačajniji je prediktivni čimbenik broj tumorskih nodusa i veličina u vrijeme “staginga” (mikroskopske vs makroskopske metastaze), prisustvo ulceracije primarnog tumora i njegova debljina. 5-godišnje preživljenje je u granicama od 78% za IIa. stupanj, 59% za stupanj IIIb. i 40% za stupanj IIIc.

Stupanj IV nema podstupnjeve, iako postoje određene razlike između M1a, M1b i M1c kategorije. Međutim, s obzirom da je riječ općenito o vrlo lošoj prognozi kategorizacija prema prognozi nije preporučena u stupnju IV bolesti.

Melanoma task force AJCC-a uključio je 5000 bolesnika s tankim tumorima u analizu. Temeljeno na njihovim rezultatima mitotski indeks se pokazao kao drugi najvažniji neovisni prediktor ishoda sentinela. Za neulcerirane tanke melanome bez mitotičke aktivnosti 10-godišnje preživljenje je iznosilo 95%, dok je u onima s jednom ili više mitotičkih stanica/mm², 10-godišnje preživljenje iznosilo znatno manje, odnosno 88%. Istovremeno je utvrđena prognostička manjkavost razina prodora po Clarku, te je ona stoga nakon čak 40 godina prvi put izbačena iz klasifikacije. Mitotski indeks zajedno s ulceracijom istisnuo je Clark IV u smislu

determinacije T1a vs T1b stupnja. Tako je T1b prema novoj klasifikaciji definiran debljinom ≤ 1 mm i prisustvom ulceracije ili povišenog mitotskog indexa ($\geq 1/\text{mm}^2$).

Dakle, u novoj klasifikaciji najznačajnije promjene su uvedene u prvom stupnju, odnosno u klasifikaciji tankih melanoma ($<1\text{mm}$.) Kao najvažniji prognostički čimbenici, istaknuti su debljina, mitotski indeks i prisutnost ulceracija. Mitotski indeks je prihvaćen kao primarni faktor u "stagingu" T1b melanoma umjesto razina prodora po Clarku, koji je, s obzirom na nedostatnu prediktivnu vrijednost, izbačen u ovoj klasifikaciji. Ipak, u onim slučajevima kada mitotski indeks ne može biti precizno određen, potrebno je uzeti u obzir razinu prodora po Clarku. Tako Clark razina IV (odnosno invazija u retikularni dermis) ima snagu kategorizirati tanki melanom iz stupnja T1a u stupanj T1b^{68,76}.

1.8 Prognostički čimbenici

Proučavanje parametara prognoze bolesti, odnosno prognoze ishoda biopsije limfnog čvora čuvara, sa željom za što boljim probirom bolesnika, započelo je kad i uvođenje same metode. Pored debljine tumora koja se od uvođenja sentinel biopsije nametnula kao opće prihvaćen i pouzdan prognostički parametar, pri postavljanju indikacije za SLNB, tijekom vremena neki drugi patohistološki i klinički parametri postali su ne samo predmet interesa, već novi kriteriji pri postavljanju indikacije za SLNB, posebice kod tzv. tankih primarnih melanoma kože. Tako neki autori smatraju da postoji značajna razlika u biološkom ponašanju melanoma različite debljine, posebice onih tankih između 1 i 2 mm, po Breslowu⁷⁷⁻⁸².

Nameće se pitanje kolika je zaista njihova prediktivna vrijednost, te da li ovi, neki drugi patohistološki i klinički parametri ili njihova kombinacija daju pouzdanu informaciju u smislu ishoda sentinel biopsije, pojave recidiva, odnosno tijeka i ishoda same bolesti, što predstavlja i glavnu zadaću naše studije.

U ovom poglavlju izneseni su svi do sada proučavani klinički i patohistološki prediktivni čimbenici⁸³.

1.8.1 Dob

Incidencija MM povezana je s dobi, no ta povezanost se razlikuje od modela koji je karakterističan za sve ostale maligne tumore. MM, za razliku od svih ostalih malignih tumora uključujući i nemelanomske tumore kože, znatno je češći u srednjoj životnoj dobi. Prema podacima dobivenim iz „Cancer Research, UK“, trend incidencije po dobi počinje stabilno rasti nakon 20. god. starosti, te doseže vrhunac za oba spola oko 85. god. U mlađoj dobi je incidencija veća kod žena. Muškarci imaju sve veću incidenciju nakon 60. god. života. Omjer

muškaraca i žena u dobi od 20 do 24 god. bio je 4:10, u dobi od 60 do 64 god. se izjednačava, a u dobi iznad 85. god. incidencija je značajno veća u muškaraca u omjeru čak 17:10¹¹. Većina studija koje su proučavale dob kao prediktivni čimbenik prognoze upućuje na povezanost starije dobi s većom vjerojatnosti loše prognoze. Tome vjerojatno pridonosi i komorbiditet, ali i veća izraženost ili učestalost ostalih čimbenika rizika u starijoj populaciji kao debljina tumora, ulceracija, regresija ili veći udio muških pacijenata. Čini se da je utjecaj dobi nepovoljan čimbenik i kod djece, odnosno da je bolja prognoza mlađih pacijenata no postoje studije u kojima se tvrdi da dob u djece ima različito značenje^{74,84-85}.

1.8.2 Spol

Mnoge studije ističu bitno povoljniji tijek bolesti kod žena u odnosu na muškarce, iako se to pravilo odnosi uglavnom na bolesnike ispod 75 godina starosti. Za bolesnike iznad, prognoza se za oba spola izjednačava⁸⁶⁻⁸⁷.

Ovakve rezultate neki objašnjavaju ranijim postavljanjem dijagnoze kod žena, s obzirom da se žene, u pravilu, javljaju na pregled ranije nego muškarci. Drugi povezuju promjene s agresivnijim formama melanoma u muškaraca, što potkrepljuje i činjenica da su melanomi trupa (koji su biološki agresivniji) češći u muškaraca u odnosu na melanome ekstremiteta koji su češći u žena.

1.8.3 Lokalizacija

Mnoge studije ističu lošiju prognozu lezija na trupu, pogotovo u odnosu na ekstremitete. Iako je u nekim studijama lokalizacija tumora pokazala povezanost s preživljenjem, općenito nije prihvaćena kao nezavisni čimbenik rizika⁸⁸. Prema nekim studijama, distalnije locirani tumori na ekstremitetima imali su lošiju prognozu⁸⁹. Prema nekim autorima, glava i vrat imaju lošiju prognozu u odnosu na druge lokalizacije⁹⁰.

Gilgrena i autori⁹¹ proučavali su utjecaj na preživljenje kod 24 različite anatomske lokalizacije PCM-a. Istraživanje je pokazalo znatno veći mortalitet kod tumora na srednjem i donjem dijelu leđa, te supramamarno i mamarno u odnosu na ostale lokalizacije.

1.8.4 Debljina tumora po Breslowu

Debljina tumora po Breslowu je debljina od vrha granularnog sloja, ili, u slučaju da je površina ulcerirana, od baze ulkusa do najdubljeg dijela tumorske invazije, koristeći se kalibriranim okularnim mikrometrom. Adneksalna dermalna invazija se ne mjeri, osim u slučaju kada je to jedina tumorska masa. Mjerenje se u tom slučaju vrši od unutarnje površine

lumena adneksalne žlijezde ili njezina duktusa ili u slučaju zahvaćanja dijelova dlake, od unutarnjeg dijela vanjske ovojnice korijena dlačnog folikula.

Korelaciju malignog potencijala, u smislu preživljenja i debljine tumora uočio je Breslow 1970.,⁹². Otada su brojne studije etablirale ovaj parametar kao najvažniji nezavisni čimbenik prognoze, dok je tek nedavno kao drugi prepoznat mitotski indeks.

U literaturi se mogu pronaći i brojne rasprave vezane uz razrede po Breslowu, koji su postavljeni u sljedeće okvire: < 0,76; 0,76 – 1,50; 1,51 – 2,25; 2,26 – 3,0; > 3,0. Naime statističkim metodama utvrđena je bolja stratifikacija: <1,0 mm; 1,1 – 2,0; 2,01 – 4,0 i > 4,0 mm, koja je i inkorporirana u AJCC staging 2001.⁹³. No, s obzirom na praćenje velikog broja bolesnika tijekom duljeg vremena, originalna klasifikacija po Breslowu je još aktualna.

Karakousis i suradnici⁹⁴ proučavali su korelaciju 5-godišnjeg preživljenja s porastom debljine tumora za 1 mm, koja je za muškarce iznosilo 80%, a za žene 94% kod tumora debljine 1 mm. Ova studija ukazala je na progresivno smanjivanje 5-godišnjeg preživljenja s porastom debljine tumora. Novije slične studije potvrdile su ove rezultate⁹³.

Ipak, još je Breslow zapazio da nije riječ o apsolutnom kriteriju, te da neki tanki tumori manji i od 0,75 mm metastaziraju, dok neki bolesnici s vrlo debelim tumorima imaju izrazito dugo vrijeme preživljenja.

Sve to implicira upletenost multiplih prognostičkih čimbenika koji pojedinačno i u međusobnoj korelaciji povećavaju rizik pojave mikrometastaza kod tankih tumora⁹⁵.

1.8.5 Razine prodora po Clarku

Anatomske razine invazije definirao je Clark još 1969.,²⁰. One uključuju 5 stupnjeva, kako slijedi:

- I – intraepidermalni melanom (melanoma in situ)
- II – prisutnost tumorskih stanica u papilarnom dermisu
- III – tumorske stanice u papilarnom dermisu s prodiranjem u dublje slojeve između papilarnog i retikularnog dermisa
- IV – prisustvo tumorskih stanica u retikularnom dermisu
- V – zahvaćanje subkutanog tkiva.

Od prihvaćanja ove podjele, brojne su se studije bavile dokazivanjem korelacije razina invazije tumora po Clarku. Univarijantne, kao i multivarijantne analize prilagođene za dob, anatomsku lokalizaciju i prisustvo ulceracije, pokazale su slične trendove korelacije.

Međutim, prognostička snaga ovog parametra nije dovoljno „jaka“ u poređenju s prediktivnom snagom debljine tumora kao nezavisnog čimbenika.

Neke studije svjedoče o značajnijoj uporabnoj vrijednosti ovog parametra kod tankih tumora ($\leq 1,0$ mm). U ovoj skupini melanomi III – V stupnja invazije po Clarku imaju čak 3,5 puta veći relativan rizik od smrti u odnosu na razinu II po Clarku ⁹⁶.

Kako su brojne studije pokazale njegovu nisku prediktivnu vrijednost, lošu reproducibilnost i subjektivnost pri procjeni, u posljednjoj AJCC klasifikaciji, razine prodora po Clarku istisnute su, prvi put nakon 40 godina, iako su u prijašnjoj klasifikaciji uz debljinu predstavljali primarni parametar “staginga”, posebice tankih tumora. Tako su razine prodora u trenutno važećoj AJCC “staging” klasifikaciji iz 2010. prihvaćeni samo kod vrlo tankih lezija, ispod 1 mm po Breslowu i to samo u određenim situacijama.

Što se tiče tumora debljih od 1 mm, drugi prediktivni čimbenici kao što su ulceracija, spol, i anatomska lokalizacija, imaju znatniju prediktivnu vrijednost ⁹³.

1.8.6 Volumen tumora

Ovaj parametar je ispitivao još Clark, procjenjujući volumen pomoću maksimalnih površina presjeka tumora ili engl. CSA. Tadašnja istraživanja su pokazala da je volumen manje bitan prediktivni čimbenik u odnosu na debljinu tumora ili anatomske razine prodora ⁹².

Međutim, neke novije studije pokazale su da površina presjeka tumora (CSA) ima znatnu razliku u odnosu na pojavu metastaza kao i sveukupnog preživljenja, tako što je veća incidencija metastaza proporcionalna većim površinama tumora ⁹⁷.

U nekim drugim studijama, korištenjem preciznijih metoda mjerenja volumena tumora ustanovljena je prediktivna snaga slična debljini tumora po Breslowu, po nekima, čak i važnija od debljine ⁹⁸.

Čini se da je riječ samo o preciznosti tehnika mjerenja i izračuna, koje, međutim, zahtijevaju dodatni angažman i vrijeme te se stoga ovaj parametar ne koristi u kliničkoj praksi.

1.8.7 Oblik rasta tumora

Različite forme tumora (polipoidni, verukozni polusferični, oblik plaka i dr.) različitog su profila presjeka. U nekim starijim studijama proučavana je njihova prognostička vrijednost.

Lezije u razini kože pokazale su bolje preživljenje od eleviranih lezija, a najlošije preživljenje je bilo kod nodularno-polipoidnog tipa tumora ⁹⁹.

Polipoidni ili pedunkulozni oblik melanoma predstavlja varijantu NM-a obilježenu egzofitičnim načinom rasta. Ovu varijantu čini nodus koji se nalazi na peteljkastoj osnovi povezan s podležecom kožom. Nodularni dio je ispunjen melanomskim stanicama i često ulceriran, dok je peteljkasta osnova tipično bez tumorskih stanica. Ovaj oblik ima posebno lošu prognozu za razliku od nepolipoidnih tumora (10-godišnje preživljenje manje od 40%). Ovi tumori su najčešće vrlo debeli i egzulcerirani.

Verukozni melanomi imaju prominentnu epidermalnu hiperplaziju uz različite stupnjeve hiperkeratoze, parakeratoze ili akantoze. S obzirom na karakterističan vanjski izgled hiperplaziju i papilomatoznu građu, često je neadekvatno izmjerena debljina ovih tumora i time je tumačena njihova veća agresivnost u odnosu na ostale konvencionalne oblike melanoma ¹⁰⁰⁻¹⁰¹.

U svakom slučaju, osim polipoidnog tipa lezije, limitirano je prognostičko značenje vezano uz tip lezije.

1.8.8 Ulceracija

Ulceracija predstavlja prekid kontinuiteta epidermisa. Pretpostavlja se da nastaje zbog brzog rasta tumora i posljedične ishemije. Stoga je ulceracija dobar pokazatelj agresivnosti tumora, što su dokazale i brojne studije ¹⁰²⁻¹⁰³. Uz debljinu, ulceracija je najvažniji prediktor preživljenja ⁹³, te je stoga 2002. AJCC klasifikacija dopunjena s ulceracijom kao novim kriterijem „staginga“.

Prisustvo ulceracije uvjetovano je i drugim faktorima. Tako su neke studije pokazale da pojava ulceracija znatno raste s debljinom tumora.

Po nekima, ulceracija se pokazala kao važan prediktor u debelih lezija (>4mm ili Clark IV)¹⁰⁴, no brojne studije svjedoče o znatnoj prediktivnoj vrijednosti i u tankih lezija ¹⁰⁵⁻¹⁰⁶, dok je, po nekima, u vrlo tankih lezija (<0,76 ili < 1mm) taj značaj upitan. Postoje studije, prema kojima, kod starijih bolesnika sa srednjim i debelim lezijama ovaj čimbenik gubi prediktivnu vrijednost ¹⁰⁷.

Postoje zanimljive studije koje ispituju zahvaćenost lezije ulceracijom, kroz omjer promjera ulceracije i promjera kompletne vertikalne faze rasta. Navedeno istraživanje je pokazalo da je

kod zahvaćenosti više od 2%, ulceracija bila značajan prediktor sentinel biopsije, dok je kod više od 5%, ulceracija bila znatan prediktor sveukupnog preživljenja ¹⁰⁸.

1.8.9 Broj mitoza

Broj mitoza je čimbenik kojim se procjenjuje proliferativni status tumora. Mitotska stopa ili mitotski indeks izražava se kao najveći broj mitoza po mm² unutar tumorske mase. U većini patohistoloških laboratorija mitoze su se povijesno izražavale brojem na 10 velikih vidnih polja (1 mm² korelira sa 3 do 10 velikih vidnih polja). U većini tumorskih lezija mitoze su koncentrirane u jednom dijelu lezije, koji se naziva vrućim točkama (engl. „hot spot“). To je dio u kojem se započinje brojanje ¹⁰⁹.

Gimmotty i autori su potvrdili čak 7,7 puta češći metastatski ishod bolesti u lezija sa mitozama u odnosu na lezije bez mitoza ¹⁰⁵.

Brojne studije proučavale su ovaj čimbenik prognoze i multivarijantnim analizama dokazivale mitotski indeks kao superiorni prediktivni čimbenik ¹¹⁰⁻¹¹¹. Neki istraživači ipak smatraju da se mitotski indeks nije uspio dokazati kao neovisni prognostički čimbenik već je njegova prognostička važnost tek u kombinaciji s drugim čimbenicima (npr. debljina tumora, ulceracije) ¹¹²⁻¹¹³.

Postoje studije s različitim rezultatima u smislu prognostičke snage ovog parametra. Neki smatraju da se njegovo prognostičko značenje mijenja ovisno o debljini lezije te da je značajniji kod tanjih lezija. Neki su mišljenja da ga treba koristiti u kombinaciji s debljinom i tu kombinaciju nazivaju „prognostički indeks“ ¹¹⁴⁻¹¹⁵.

1.8.10 Faza rasta

Radijalna faza rasta odnosi se na tumore primarno u epidermisu, uz uvjet da nakupine tumorskih stanica u papilarnom dermisu ne smiju biti veće od onih u epidermisu, te uz odsustvo mitoza.

Vertikalna faza rasta obilježena je agregatima melanomskih stanica u dermisu, s tim da barem jedna nakupina ili tzv. „gnijezdo“ mora biti veće od najveće nakupine u epidermisu. Drugi uvjet su prisutne mitoze tumorskih stanica u dermisu kao indikator proliferativne aktivnosti tumora. Više studija demonstrirale su lošiju prognozu kod vertikalne faze rasta ¹⁰⁵, neke studije pokazale su dvojbene rezultate, dok se u drugima preferira prediktivni značaj faze rasta samo kod debljih tumorskih lezija.

Prediktivni značaj faze rasta na ishod sentinel biopsije, pokazao je kontradiktorne rezultate, a neke studije čak negiraju njegov značaj primjenom univarijantne i multivarijantne analize.

1.8.11 Regresija

Regresija predstavlja posljedicu djelovanja imunološkog sustava domaćina na tumorske stanice, pri čemu se tumorsko tkivo zamjenjuje fibrozom, degenerativnim melanocitima, melanofagima, limfocitnim infiltratom i teleangiektazijama. U području kompletne regresije maligne stanice su odsutne, kako u dermisu tako i u epidermisu (Slika 15. a.–c.),^{109,113}. Neke studije demonstrirale su lošu prognostičku vrijednost ovog parametra, posebice kod tankih tumora^{95,116}. Čini se da prisustvo regresije bitno skraćuje i period bez vidljivih znakova bolesti (engl. disease free interval)¹¹⁷.

Studije koje su uspoređivale prediktivnu vrijednost regresije u korelaciji s ishodom sentinel biopsije, ne ukazuju na regresiju kao važan prognostički čimbenik¹¹⁸⁻¹¹⁹.

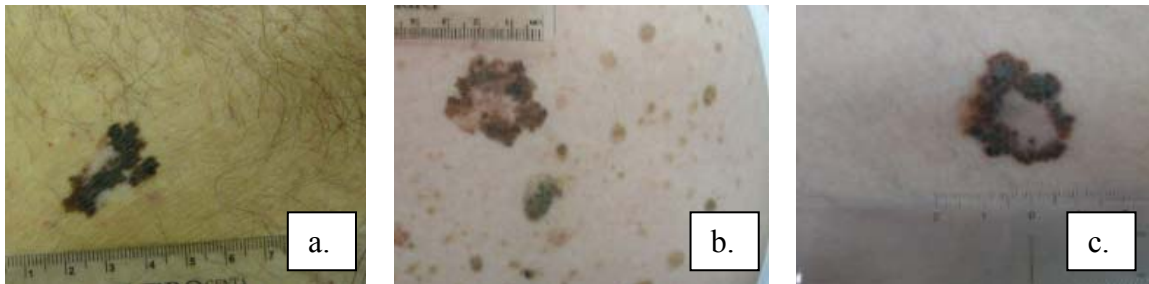
Ovi rezultati o uporabnoj vrijednosti regresije kao prediktora sentinel biopsije – ne ohrabruju.

Ipak, postoje i studije koje su pokazale kako regresija uz debljinu znatno poboljšava prediktivnu vrijednost obje varijable, pa se ta kombinacija pokazala kao dobar neovisni prognostički čimbenik¹²⁰.

Uporaba ovog čimbenika prognoze je dvojbeno. Mogući razlog su i različiti kriteriji pri uključivanju regresije u studijske grupe. Tako neki autori u analizu uključuju samo potpunu regresiju, drugi uključuju i parcijalnu, dok je za neke već i faza interakcije tumorskih stanica i stanica domaćina zadovoljila kriterije uključivanja bolesnika u studiju. Mogući razlog kontradiktornih rezultata je možda i u tome što je regresija nerijetko u interakciji s nekim drugim čimbenicima rizika. Neki istraživači smatraju da je interakcija metastatskih stanica sa stanicama domaćina u limfnim čvorovima zapravo okidač regresije ili pojačava već prisutnu regresiju u primarnom tumoru. Postoje promišljanja da je regresija u uskoj korelaciji sa vaskularnošću tumora. To potkrepljuje činjenica da melanomi koji u radijalnoj fazi nemaju regresiju imaju znatno slabije izraženu vaskularnost od melanoma u regresiji¹²¹⁻¹²².

Neki centri, kao npr. Melanoma center-University of California, preporučaju rutinski SLNB i u slučajevima kada je tumor tanji od 1mm, a regresija veća od 50%.

Čini se da još uvijek nedostaju standardni kriteriji po kojima bi se regresija u analizama izdvojila od drugih stromalnih reakcija, te ostaje na budućim istraživanjima da otkriju pravu uporabnu vrijednost ovog čimbenika prognoze.



Slika 15. a – c. Kliničke slike melanoma u regresiji.

(Preuzeto s dopuštenjem iz originalne baze fotodokumentacije Klinike za kožne i spolne bolesti KBC „Sestre milosrdnice“.)

1.8.12 Limfocitni infiltrat

Tumor infiltrirajući limfociti (TIL) predstavljaju odgovor imunološkog sustava domaćina. Uobičajena je podjela na :

Gust infiltrat: difuzni infiltrat uzduž vertikalne faze rasta ili prisustvo (90%) infiltrirajućih limfocita duž tumorske baze.

Rijedak infiltrat: čini samo nekoliko fokalnih infiltrata.

Odsutan infiltrat: nedostatak limfocita infiltriranih s tumorskim stanicama, prisutni samo perivaskularno.

Metoda procjene infiltrata podložna je, nažalost, subjektivnoj procjeni.

Općenito se smatra da je prisustvo limfocitnog infiltrata povoljan prognostički čimbenik o čemu svjedoče brojne studije, a što je potvrđeno i u novijim studijama uporabom imunohistokemijskih boja¹²³⁻¹²⁵.

Postoje, međutim, i druge studije koje nisu dokazale korelaciju TIL-a i prognoze, pa čak i neke koje upućuju na loš prediktivni značaj limfocitne infiltracije¹²⁶.

Objašnjenje ovakve kontradikcije možda leži u činjenici da su neke od studija uključivale pacijente s tumorima i radijalne i vertikalne faze rasta dok su druge proučavale prognostičku važnost samo u tumora vertikalne faze rasta.

Drugo moguće objašnjenje je da je TIL u preuskoj korelaciji s drugim prognostičkim čimbenicima, što utječe na prognostičku signifikantost TIL-a kao nezavisnog čimbenika.

Kao treće, moguće je da su T-limfociti koji infiltriraju tumor inaktivni, te su stoga neki autori proučavali aktivacijski status TIL-a, kako bi determinirali njegov značaj. Štovište, postoje teorije o mogućem djelovanju tumora na imunokompetenciju domaćina¹²⁵.

U svakom slučaju riječ je o metodi kojoj je osnovni prigovor subjektivnost, a što se tiče prognostičke vrijednosti i korelacije s drugim čimbenicima, ostaje na novim studijama da istraže njezinu vrijednost.

1.8.13 Vaskularizacija tumora

Angiogeneza je nužna za rast tumora. Potiče ju VEGF (engl. vascular endothelial growth factor). Na histološkom preparatu vaskularnost možemo mjeriti kvantitativno (broj krvnih žila) i kvalitativno (promjer krvnih žila). Također, imunohistokemijskom analizom parafinskih rezova za LYVE-1 (limfatični endotelijalni hijaluronski receptor 1) i CD31, CD34 (vaskularni proteini) može se odrediti peritumoralna zahvaćenost.

Postoje i dalje različita mišljenja u vezi vrijednosti ovog čimbenika u prognozi bolesti. Iako se nije pokazao kao dobar neovisan prognostički čimbenik, uočena je izraženija aktivnost pri prijelazu iz radijalne u vertikalnu fazu rasta tumora, te povećana koncentracija u procesima limfo-angiogeneze i metastaziranja¹²⁷⁻¹²⁸. Povećana vaskularnost – prema brojnim studijama – indikator je loše prognoze¹²⁹⁻¹³¹, dok ju neki autori smatraju značajnom samo kod tankih tumora¹³²⁻¹³³.

1.8.14 Angiotropizam

Angiotropizam ili ekstravaskularno migratorno metastaziranje je histopatološka manifestacija koja predstavlja prijanjanje tumorskih stanica uz vanjski sloj krvnih i limfnih žila poput manžete, no bez intravaskularnog prodora. Naziva se još i angiotumorskim kompleksom. O ovom fenomenu se zna odavno, međutim tek nekoliko radova govori o njemu kao važnom indikatoru visokog metastatskog potencijala¹³⁴⁻¹³⁵. Neki radovi govore o prisutnosti angiotropizma isključivo u metastatskim lezijama, te posebice o povezanosti sa *in transit* i satelitskim metastatskim lezijama¹³⁶⁻¹³⁷.

1.8.15 Vaskularna invazija

Vaskularna invazija predstavlja prisutnost tumorskih stanica unutar lumena krvnih žila. Brojne studije svjedoče o vaskularnoj invaziji kao negativnom prognostičkom pokazatelju u svim aspektima¹³⁸. Vaskularna invazija, nakon pozitiviteta limfnih čvorova, pokazala se kao najznačajniji čimbenik agresivnosti kod debelih tumora¹³⁹.

1.8.16 Histološki tip tumora

Postoje 4 osnovna tipa tumora, čije su glavne histološke karakteristike sljedeće.

Površinsko šireći melanom ili engl. superficial spreading melanoma (SSM), čini oko 70 do 80% svih PCM-a. Histološki je obilježen normalnim ili zadebljanim epidermisom te prisustvom pojedinačnih melanocita u gornjem epidermisu s predominacijom atipičnih epiteloidnih stanica.

Nodularni melanom (NM). Javlja se u oko 15–30% slučajeva, a histološki se očituje prisustvom nodularne dermalne komponente atipičnih melanocita. Intraepidermalna komponenta je ograničena na manje od tri dermalne papile.

Lentigo maligna melanom (LMM) javlja se u 4–15% slučajeva, loše je ograničen od okolne kože. Histološki je karakteristično prisutan atrofični epidermis, solarna elastoza, hiperplazija atipičnih melanocita (u bazalnom sloju epidermisa), uz najčešće predominaciju vretenastih melanocita i uz čestu nuklearnu atipiju.

Akro-lentiginozni melanom (ALM) obuhvaća 2–8% svih melanoma bijele populacije, no dominantni je melanom tamnoputog stanovništva s udjelom od 29–72% (Afroamerikanci, Azijci, Hispanoamerikanci) ¹⁴⁰. Javlja se isključivo na akralnim lokalizacijama, histološki ne nalazimo epidermalnu atrofiju, a unutar epidermisa prevladavaju pojedinačni tumorski melanociti (uglavnom vretenastog oblika) u odnosu na nakupine stanica, tzv. gnijezda.

Prema većini, značajno je lošija prognoza ALM-a i NM-a u odnosu na SSM i LM ¹⁴¹⁻¹⁴². Međutim postoje i drukčiji rezultati, za koje se nagađa da su najvjerojatnije posljedica različitih kriterija pri postavljanju dijagnoze histoloških podtipova MM-a ¹²⁰.

Neke studije dovode u pitanje ovako strogu podjelu, smatrajući da PCM može imati mnoštvo različitih formi kao dio spektruma, bez jasnog razgraničenja. Neke studije u svojim rezultatima nisu uspjele dokazati povezanost prognoze s različitim podtipovima tumora, dok druge pokazuju oprečne rezultate ¹⁴³.

1.8.17 Tip tumorskih stanica

Stanice PCM-a pokazuju široku varijabilnost, no najčešće prevladava jedan tip.

Amelanotični melanom je rijetka varijacija, s incidencijom oko tek 1,8% ¹⁴⁴. Većina autora zagovara lošiju prognozu, no procjenu otežava činjenica da su amelanotične lezije najčešće otkrivene u podmakloj fazi, kada je većinom riječ o debljim lezijama. Postoje i studije koje opovrgavaju lošiju prognozu amelanotičnih tumora ¹⁴⁵.

Melanom vretenastih stanica ili engl. „spindle cell melanoma“. Riječ je o histološkoj varijanti u kojoj prevladavaju vretenaste stanice u oskudnoj stromi ¹⁴⁶. Neke studije sugeriraju bolju prognozu u odnosu na tumore u kojima prevladavaju epiteloidne stanice ¹⁴⁷.

Spitzoidni melanomi sastavljeni su od povećanih epiteloidnih stanica i prisutnih fuziformnih melanocita. Čini se, da u slučaju dovoljno dugog praćenja bolesnika, ova varijanta – koja je najčešća u dječjoj dobi – ipak nema, kako se mislilo, bolju prognozu u odnosu na ostale konvencionalne tipove melanoma ¹⁴⁸.

„Singlet ring cell“ melanomi prezentiraju se stanicama u kojima je jezgra pomaknuta prema periferiji, zbog prisutnosti velike vakuole unutar citoplazme, a koju čini akumulacija vimentin pozitivnih intermedijarnih filamenata ¹⁰⁰. Kako su ove stanice najčešće nađene u metastatskom melanomu, njihova prisutnost najčešće je znak loše prognoze ¹⁴⁹.

Melanomi minimalne devijacije (MDM-engl. minimal deviation melanoma) sastavljeni su od tumorskih stanica koje se minimalno razlikuju od normalnih nevus stanica. Neke studije upućuju na bolju prognozu, sugerirajući da prisustvo ovog tipa stanica predstavlja ranu fazu, odnosno tranziciju iz benignog nevusa u melanom ¹⁵⁰.

Nevoidni melanom rijedak je oblik melanoma koji nalikuje složenom ili dermalnom nevusu i pokazuje visok metastatski potencijal ¹⁵¹.

Melanom malih stanica (engl. small cell melanoma) sastoji se uglavnom od malih stanica. Ovaj tip tumora ima izraženu agresivnost ¹⁵².

1.8.18 Dezmoplazija

Dezmoplastični melanom je izrazito rijedak. Najčešće se javlja na solarno degeneriranoj koži, no za razliku od klasičnih oblika, u 10-ak godina kasnijoj životnoj dobi. Histološki prevladavaju fuziformni melanociti uklopljeni u kolagenu stromu. Variraju od predominantno fibroznih tumora do onih s izraženim neuralnim strukturama. Pokazuje tendenciju ka amelanotičnim formama. S obzirom na kliničku i patohistološku sličnost s benignim strukturama (ožiljci, dermatofibromi), ali i malignim strukturama (fibrosarkomi, neuralni tumori), diferencijalna dijagnostika predstavlja izazov. Brojne provedene studije, no na relativno malom broju bolesnika (s obzirom da je riječ o izrazito rijetkom tumoru), suočavaju nas s različitim rezultatima. U početku se naglašavala agresivna narav ovog tipa melanoma, što je kasnije opovrgavano. Konačno, s obzirom na veliki prognostički značaj debljine, neke studije su uspoređivale metastatski potencijal DM-a i ostalih melanoma debljine veće od 4 mm, u kojima nije ustanovljena veća agresivnost DM-a u odnosu na druge, tzv., debele

tumore ¹⁵³. Novije studije ukazale su na različit prognostički značaj različitih tipova DM-a. Naime, DM se može podijeliti u dvije podgrupe. Jedna, u kojoj prevladava stromalna komponenta i javlja se u više od 80% tumora – tzv. čista forma. U drugoj – tzv. kombiniranoj varijanti, naglašena je celularna komponenta bez stromalne fibroze, odnosno dezmoplazija ispunjava tumor u 10 do 50%. Kombinirani DM pokazao je višestruko veći rizik smrtnosti i metastatskog potencijala ¹⁵⁴. Tzv. čisti DM pokazao je, prema studijama, sličan mortalitet kao i drugi konvencionalni tipovi melanoma iste debljine ¹⁵⁵. Prema nekim autorima DM ima općenito lošiju prognozu, no kod debljih tumora prisutnost dezmoplazija predstavlja povoljan prognostički čimbenik ^{153,156}.

1.8.19 Neurotropizam

Neurotropizam je sklonost ka tumorskoj infiltraciji živčanih vlakana. Neurotropni melanomi podrazumijevaju peri i endoneuralne varijante s ili bez dezmoplazije ¹⁵⁷. Oni su izuzetno rijetka skupina koja čini tek oko 1% svih melanoma ¹⁵⁸. Međutim, neurotropni tumori su nerijetka varijanta dezmoplastičnih melanoma, te tu podskupinu nazivamo dezmoplastični neuralni melanom (DNM) ¹⁰¹.

Neurotropizam predstavlja, prema studijama, loš prognostički znak ^{50,157}. Tome treba pridodati i činjenicu da su DNM češće veće debljine (>1,5mm), višeg stupnja invazije po Clarku i povišenog mitotskog indeksa u trenutku dijagnosticiranja. Češći su kod muškaraca i u starijoj dobi, a nerijetko su u trenutku otkrivanja već prisutne metastaze. Ovi tumori imaju visok postotak lokoregionalnih recidiva, za što je odgovorna njihova veća debljina i dubina prodora, loše definirani rubovi, tendencija amelanotičkim formama, kao i infiltracija i ekstenzija unutar živčanih ovojnica.

1.8.20 Ostali patohistološki pokazatelji

Stanična atipija. Iako su rijetke studije dokazale da je izraženija stanična atipija, a posebice u kombinaciji s povišenim mitotskim indeksom povezana s većim metastatskim potencijalom tumora, ovaj parametar nije od velikog značaja ¹⁰¹. Naime, i neke dobroćudne tvorevine, poput „Spitz nevusa“, mogu imati izraženu atipiju. Stoga ovaj čimbenik ima tek ograničenu vrijednost i to samo u kombinaciji s drugim patohistološkim parametrima.

Udruženost MM-a s preegzistirajućim melanocitnim nevusom

Pretpostavlja se da je otprilike četvrtina PCM-a povezana s prethodno postojećim nevusom. Neke studije dokazale su bolju prognozu kod tumora koji su nastali na nevusu od onih koji su se razvili *de novo* ¹⁵⁹⁻¹⁶⁰. Druge pak studije to opovrgavaju, demonstrirajući da prisustvo

koegzistirajućeg madeža nema efekt na prognozu^{88,126}. Neke studije impliciraju da tumori koji nastaju na nevusu imaju veću debljinu od tumora koji nastaju *de novo*, povezujući to s lošijom prognozom, što nije potvrđeno¹⁶¹.

Može se zaključiti da sveukupni podaci u literaturi daju tek ograničenu prognostičku vrijednost ovom parametru.

Paratumoralna epidermalna hiperplazija (PTEH) razmatrana je kao moguć prognostički pokazatelj. PTEH definiran je kao razlika između debljine najdublje paratumorske epidermalne penetracije i debljine priležećeg normalnog epidermisa¹⁶². Prisustvo PTEH-a pokazalo se kao povoljan prognostički čimbenik. Pseudoepiteliomatozna hiperplazija je reaktivna epitelna proliferacija koja nastaje kao odgovor na različite stimulanse, kao što je infekcija, trauma i sl., za razliku od PTEH-a. Pseudoepiteliomatozna hiperplazija u melanoma je izrazito rijetka i nema prognostički značaj¹⁶³.

Satelitske i *in transit* metastaze

Satelitske metastaze predstavljaju nakupine tumorskog tkiva, promjera najmanje 0,05 mm i odvojene su od primarnog tumora normalnim tkivom u radijusu 2 cm ili manje.

In transit metastaze su odvojene od glavnog tumora više od 2 cm. Uobičajeno se nalaze u intralimfatičkim putevima između primarnog tumora i regionalnih limfnih čvorova¹⁶⁴.

Brojne studije zagovaraju loš prognostički značaj, što se čini razumljivim s obzirom da *in transit* kao i satelitske metastaze predstavljaju ranu manifestaciju sistemske bolesti¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. Postoji neslaganje autora oko prognostičke vrijednosti ovog parametra kod tumora različite debljine. Naime, u nekim studijama se tvrdi da ovaj parametar ima prediktivnu vrijednost samo kod tumora debljine veće od 1,5 mm¹⁶⁷. Drugi autori smatraju da je njihova prognostička vrijednost tek kod debelih tumora (>4 mm)¹³⁹, dok treća skupina to opovrgava navodeći ipak važnost i kod tankih tumora (<0,75 mm)⁹⁵. U svakom slučaju udružen s debljinom po Breslowu, prema mnogima je ovaj parametar znatnije povezan s regionalnim nodalnim metastazama od izoliranog faktora debljine¹⁶⁸. Prema provedenim studijama, općenito se može zaključiti da je vrlo mala razlika u prognostičkoj vrijednosti mikrosatelitoze i *in transit* metastaza¹⁶⁹⁻¹⁷⁰, a kako je dokazan njihov nedvojbeno nepovoljan značaj obje su ove forme regionalne metastatske bolesti uvrštene u nove AJCC staging kriterije.

1.9 Tumorski markeri

Melanomski antigeni su skupina molekula koji nastaju prije svega kao produkt tumorskih melanocita ili kao reakcija organizma na tumor. Predstavljaju imunološki potencijal tumora, a kao dijelovi tumora mogućnost targetiranja monoklonskim protutjelima što je novo svjetlo u razvoju biološke terapije. U užem smislu ovaj pojam se odnosi na one antigene koji potiču imunološki odgovor domaćina. Melanomske markere možemo podijeliti u tri skupine:

Markeri diferencijacije – oni su indikatori sinteze melanina i time služe u diferencijaciji melanocitnih od nemelanocitnih promjena. Ovi markeri su prisutni u svim melanocitnim lezijama, uključujući i one benigne, a prisutni su i u većini primarnih melanoma. Ipak, u metastazama melanoma njihova ekspresija je smanjena.

Markeri progresije uključuju ključne molekule u procesu metastaziranja, kao što su proliferacija, migracija stanica i degradacija matriksa. Ovi markeri prisutni su u fazama progresije tumora. Oni potiču od neoplastičnih stanica ili strome i služe kao target u različitim kliničkim intervencijama.

Ostali markeri obuhvaćaju sve ostale markere koji ne pripadaju u prve dvije skupine.

Općenito, tumorski markeri su proizvod samog tumora ili nastaju kao reakcija organizma na tumor. Teoretski, njihova najveća korist bila bi u mogućnosti probira. U tom smislu se najviše ispituje mutacija u genu CDKN2A, no za sada ne postoji marker koji bi služio u rutinskom probiru zdrave populacije¹⁷¹.

Danas se najviše koriste markeri u smislu potvrde dijagnoze. U tu svrhu se najviše koriste markeri za imunohistokemijsku dijagnostiku. Rutinski se koriste HMB-45 protutjela specifična za protein gp100, te protutjela za protein S-100. S-100 protein je prisutan kod svih melanoma, ali i nekih drugih tumora, dok gp100 ima visoku specifičnost za melanome, međutim manju osjetljivost od S-100 pa ga nije moguće detektirati u svim slučajevima. Od ostalih imunohistokemijskih markera koristi se tirozinaza i MITF, koji su važni u razlikovanju melanocitnih od nemelanocitnih lezija. Neki ispitivani markeri su pokazali čak dobru korelaciju sa stupnjem progresije tumora, ali za sada se ne koriste u rutinskom radu¹⁷²⁻¹⁷⁵. Neki tumorski markeri se danas primjenjuju za potvrdu dijagnoze i kod praćenja bolesnika u smislu provjere uspješnosti terapije, odnosno u smislu ranog otkrivanja metastaza ili recidiva. U tu se svrhu koriste serumski markeri i određivanje cirkulirajućih tumorskih stanica.

LDH spada u serumske markere, no ona nije specifičan marker za melanom, već se javlja i kod nekih drugih malignoma i patoloških zbivanja, te se ne može koristiti u probiru bolesnika.

No, LDH je dobar pokazatelj progresije bolesti, što su potvrdila brojna istraživanja, pa se koristi u algoritmima praćenja bolesnika, a uvršten je 2010. i u AJCC klasifikaciju kao dodatni prognostički čimbenik udaljenih metastaza (M stadij). LDH se u nekim studijama pokazao i kao bolji indikator loše prognoze u usporedbi MIA i S-100.

S-100 protein je serumski marker. Povišena koncentracija (točnije serumska frakcija S-100b) uočava se u podmaklim stadijima bolesti. To je protein čija je primarna funkcija vezanje kalcija, čime prvenstveno služi u prijenosu signala u stanici. S-100 je u studijama pokazao dobre rezultate u praćenju bolesnika u smislu terapijskog odgovora te predikciji recidiva.

Protein MIA, čija se serumska aktivnost mjeri ELISA testom, pokazao se, također, kao dobar indikator u smislu pojave udaljenih metastaza i praćenju terapijskog odgovora¹⁷⁶⁻¹⁷⁷.

Od ostalih serumskih markera u fazi istraživanja dobre rezultate pokazali su: kompleks tumorskog antigena TA-90 i IgG protutjela (TA-90 IC, engl. TA-90 immune complex); LASA-P, te melaninski metabolit 5-S cisteinildopa (5SCD). U bolesnika na terapiji interferonom ispitivani su citokini IL- β (interleukin 1 β), IL1 α (interleukin 1 α) IL-6 (interleukin 6) i TNF - α . Bolesnici na terapiji interferonom su imali snižen VEGF¹⁷⁸.

Kao mogući prognostički marker danas se ispituje i prisutnost melanomskih stanica u cirkulaciji, uz pretpostavku da cirkulirajuće melanomske stanice znače veću vjerojatnost razvoja metastatske bolesti ili recidiva. Iako se već duže razmišljalo o primjeni ove metode praćenja, s obzirom na lošu osjetljivost primjenjivanih metoda, te da se zapravo ne zna pravi metastatski potencijal cirkulirajućih stanica, ova metoda u praksi nije zaživjela. Danas primjenom metode lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja RT-PCR, metoda detekcije cirkulirajućih tumorskih stanica je dobila potrebnu osjetljivost. Smith i suradnici, prvi su detektirali cirkulirajuće stanice primjenom mRNA za tirozinazu koja je specifičan biljeg za melanom. Tirozinaza je inače enzim koji služi u sintezi melanina. On katalizira pretvorbu tirozina u dihidroksifenilalanin (DOPA) i pretvorbu DOPA-e u dopakinon. Metoda se pokazala visoko specifična i dovoljno osjetljiva, omogućavajući detekciju već od 1–10 melanomskih stanica na 10⁷ limfocita, odnosno 1–10 tumorskih stanica u 10 ml periferne krvi¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Pored tirozinaze i neke druge molekule pokazale su da njihova prisutnost u krvi znači povezanost s prisustvom cirkulirajućih melanomskih stanica. Njihova detekcija mjerena istom metodom, odnosno RT-PCR-om, pokazala je da Melan-A/MART-1, MIA, MAGE-3, TRP-2 i

PAX-3 imaju zadovoljavajuće nizak prag osjetljivosti i visoku specifičnost, te ih je, kao tirozinazu, moguće koristiti kao markere prisustva melanomskih cirkulirajućih stanica¹⁸².

Brojne studije svjedoče o povezanosti prisustva cirkulirajućih melanomskih stanica s povećanim rizikom recidiva kao i s kraćim preživljenjem, no neki autori navode i oprečne rezultate, odnosno negiraju prognostički značaj prisutnih cirkulirajućih stanica tumora¹⁸²⁻¹⁸³. U literaturi se navode kontradiktorni rezultati. U gotovo svim istraživanjima potvrđen je određeni udjel bolesnika za koje je utvrđeno da su tirozinaza negativni, a da su u tom trenutku imali klinički potvrđene metastaze. Postoji više mogućih objašnjenja. Neki smatraju da tumori intermitentno otpuštaju melanomske stanice u cirkulaciju¹⁸⁴. Drugo objašnjenje je da u nekoj fazi tumorskog rasta dolazi do smanjene ekspresije tirozinaze u melanomskim stanicama¹⁸⁵. Kako se radi o imunogeničnom tumoru, moguće je i da je uklanjanje tumorskih stanica posljedica specifične imunološke reakcije organizma¹⁸⁶.

No, kako god, neki radovi u kojima su određivane cirkulirajuće melanomske stanice metodom RT-PCR-a govore o dobroj prediktivnoj vrijednosti ovog tumorskog markera.

Nove metode, u prvom redu razvoj tzv. komparativne genomske hibridizacije (CGH) i fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), te sve veći razvoj i primjena genomike i proteomike, omogućile su daljnja istraživanja u području melanomskih markera, kako u smislu dijagnostike, tako i u smislu praćenja i prognoze stanja bolesnika. Studije temeljene na integraciji podataka dobivenih CGH metodom s analizama mutacija onkogenih uključenih u patogenezi melanoma, nude ohrabrujuće rezultate čak i u smislu mogućnosti izrade novih molekularnih klasifikacija melanoma, koje bi bile bolje (preciznije) determinirane u odnosu na konvencionalnu podjelu melanoma, prvenstveno u prognostičkom smislu. Utvrđena je značajna povezanost BRAF ili NRAS mutacija sa UV ekspozicijom, dok su KIT mutacije najčešće prisutne kod melanoma nastalih na fotoneeksponiranim područjima kože ili tek kod neznatnog izlaganja suncu. BRAF mutacije su prisutne kod 50% melanoma (od kojih otprilike polovica ima manjak PTEN-a). NRAS mutacije prisutne su kod 20% melanoma, gotovo isključivo s divljim tipom BRAF-a. Danas se rutinsko određivanje BRAF-a i NRAS-a koristi u molekularnoj klasifikaciji melanoma koja pomaže pri izboru bolesnika pogodnih za ciljnu terapiju¹⁸⁷.

Ove nove metode imale su neprocjenjivu implikaciju i na razvoj novih lijekova (biološka terapija) temeljenih na targetiranju tumorskih markera monoklonskim protutijelima.

1.10 Svrha istraživanja

Do uvođenja nove AJCC klasifikacije debljina tumora po Breslowu više od 1 mm predstavljala je jedini opće prihvaćeni parametar za postavljanje indikacije za SLNB. Prema klasifikaciji iz 2010., uzeti su u obzir i neki novi patohistološki parametri (broj mitozu, prisutnost ulceracije). No, uzevši u obzir činjenicu da je otprilike 80% učinjenih biopsija negativno¹⁸⁸, sve je evidentnija potreba za boljim probirom bolesnika, kandidata za SLNB. S druge strane nameće se pitanje da li brojni nepotrebno učinjeni operativni zahvati uz sve pridružene intra i postoperativne rizike, kao i nepotrebni stres za bolesnika, te financijski trošak, premašuju korist od biopsije limfnog čvora čuvara. Ovo se posebice odnosi na takozvane tanke primarne melanome do 1,5 mm, gdje smo ponekad u dilemi da li uzeti u obzir i neke druge kriterije pri odluci o sentinelu. S druge strane, nameće se i pitanje kakav stav zauzeti kod tzv. debelih primarnih melanoma kože, čija debljina po Breslowu prelazi 4 mm, s obzirom na njihov visoki metastatski potencijal, te da li bi rezultat preživljenja bio čak povoljniji ako se odmah primijeni postupak elektivne regionalne disekcije.

Danas još uvijek nemamo dovoljno pouzdan prognostički parametar koji bi implementirali u redovito kliničko praćenje bolesnika s primarnim MM kože, te reducirali broj nepotrebnih SLNB-a, uz istovremeno zadovoljavajuću razinu sigurnosti. Nameće se potreba uvođenja novih dodatnih isključujućih ili uključujućih kriterija pri postavljanju indikacije za sentinel biopsiju.

Postavlja se i pitanje o vrijednosti same metode sentinel biopsije u pojedinim grupama bolesnika, u odnosu na ostale prognostičke čimbenike, te da li je potrebno postaviti nove kriterije, ili pronaći „ključ“ pomoću kojeg bi interakcija sadašnjih parametara mogla biti prognostički značajnija.

Iako nove molekularne studije daju obećavajuće rezultate, trenutno dostupni klinički i patohistološki podaci ostaju i dalje ekonomski najisplativiji i najjednostavniji način procjene rizika metastatskog širenja bolesti, dostupan svim bolesnicima.

Svrha ovog istraživanja je pronaći jednostavan i siguran put u praćenju i evaluaciji bolesti, koristeći rutinski određivane kliničke i patohistološke parametre, čime bi se poboljšala učinkovitost metode.

2 HIPOTEZA

Hipoteza: Debljina tumora po Breslowu primarnog ekscizata melanoma kože ne predstavlja dostatan parametar pri postavljanju indikacije za sentinel biopsiju limfnog čvora čuvara.

3 CILJEVI RADA

Ciljevi rada:

1. Istražiti prognostičku korelaciju debljine PCM-a i ostalih dostupnih patohistoloških i kliničkih parametara s ishodom biopsije i pojavom recidiva bolesti.
2. Usporediti biološki potencijal tzv. tankih (< 1,5mm) i ostalih PCM-a.
3. Identificirati bolesnike pod povećanim rizikom recidiva u ranoj fazi bolesti.
4. Ispitati mogućnosti bolje selekcije bolesnika za primjenu SLNB-a uvođenjem novih indikatora rizika (temeljenih na kombinaciji trenutno dostupnih kliničkih i patohistoloških parametara) te utjecati na korekciju protokola praćenja odnosno tijekom bolesti i krajnji ishod liječenja. Na taj način neposredno bismo utjecali na smanjivanje broja nepotrebnih biopsija, poboljšali kvalitetu života bolesnika i smanjili troškove liječenja.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 *Etički aspekti*

Identitet svih ispitanika čiji su podaci korišteni tijekom istraživanja dio su baze podataka Referentnog centra za MM ministarstva zdravlja RH, tajni su i tijekom istraživanja zaštićeni šifriranjem. Osobni podaci pacijenata, osim dobi i spola nisu se koristili u istraživanju.

Svi postupci primijenjeni u obradi i liječenju ovih bolesnika su standardni, u skladu s dobrom kliničkom praksom i u skladu s trenutno prihvaćenim protokolima liječenja i praćenja bolesnika oboljelih od primarnog melanoma kože u RH.

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC „Sestre milosrdnice“ i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2 *Metode*

Za testiranje normalnosti uzoraka u ovom radu korištena je **Lillieforsova modifikacija Kolmogorov-Smirnovljevog testa**. **Studentov t-test** korišten je za uspoređivanje očekivanja dva nezavisna uzoraka uzeta iz iste, normalno distribuirane, populacije.

Za testiranje jednakosti hipoteza korištene su različite modifikacije χ^2 testa (Pearsonov, Fisherov egzaktni test, Fisherov egzaktni test s Monte Carlo aproksimacijom za p -vrijednost).

Od ostalih statističkih metoda u radu je korištena **logistička** kao i **stupnjevita logistička regresija**. Kako su primjenom ovih metoda kao rezultat dobivene originalne matematičke formule koje predstavljaju bitan doprinos u predikciji ishoda (SLNB, metastatski ishod), o ovim metodama kao i metodologiji novih izračuna rizika više je objašnjeno u poglavlju Rezultati.

U radu je korišten i **ANOVA** test – statistički test kojim se mjere razlike u očekivanjima skupina ispitanika, koji testira se jesu li očekivanja grupa za određeni ishod jednaka. Nadalje, ako je ANOVA pokazala da postoje razlike u očekivanjima grupa, **Tukeyevim testom** izvršeno je uspoređivanje svih parova grupa.

Gdje god je u radu korišten statistički test, uvijek je naglašeno o kojem se testu radi.

4.3 Deskripcija – svi tumori

Svi ispitanici:

Analizirali smo povijesti bolesti svih bolesnika s primarnim melanomom kože koji su hospitalizirani u RC za melanom MiZRH u Klinici za kožne i spolne bolesti, KBC „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od 6 god. i to od 1. siječnja 2005. – 31. prosinca 2010., te čija je patohistološka dijagnostika ili revizija nalaza kao i analiza metastatski promijenjenih limfnih čvorova učinjena u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ KBC „Sestre milosrdnice“.

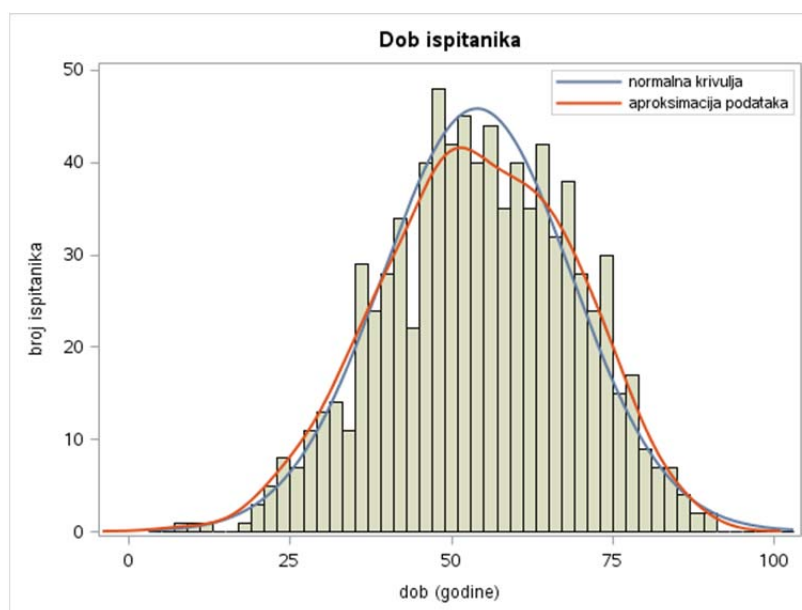
U ispitivanom razdoblju hospitalizirana su 844 bolesnika s primarnim kutanim melanomom od kojih 386 (45,73%) muškaraca i 458 (54,26%) žena, od čega je za 839 pacijenata zabilježena dob.

Prosječna dob bolesnika iznosila je 54,01 godinu (min. 7; max 90).

Tablica 6. Dob bolesnika i debljina tumora

	N	\bar{X}	SD	Med	Min	Max	25%	75%
Dob (god.)	839	54,01	14,26	54	7	90	44	65
Debljina po Breslowu (mm)	763	2,23	2,72	1,23	0,11	40	0,65	2,9

Iz podataka za donji i gornji kvartil vidi se da je 50% svih bolesnika bilo u dobi između 44 i 65 godina.

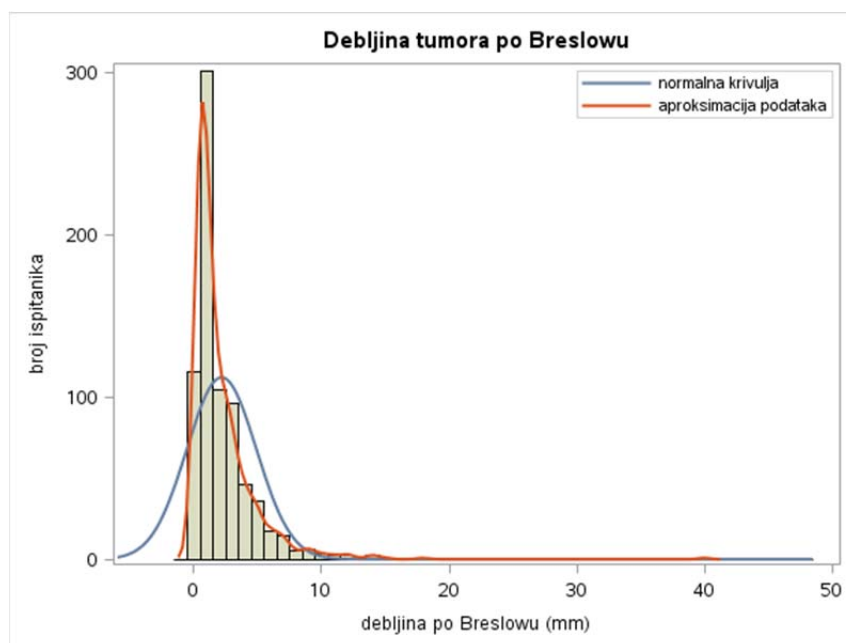


Slika 16. Distribucija bolesnika po dobi.

Distribucija bolesnika po dobi skoro prati Gaussovu krivulju (ili drukčije rečeno raspodjelu normalne slučajne varijable, označeno plavo na Slici 16.), pri čemu se aritmetička sredina i medijan gotovo podudaraju. Odstupanje od normalnosti (crvena krivulja aproksimacije podataka) najuočljivije je u dobi od pedesete do šezdesete godine života.

Testiranje na normalnost izvršeno je Lillieforsovom verzijom Kolmogorov-Smirnovljevog testa, pri čemu je p -vrijednost bila manja od 0,01, što pokazuje da se dob bolesnika ipak ne ponaša kao normalna slučajna varijabla.

Prosječna debljina tumora po Breslowu iznosila je 2,23 mm, (min. 0,11 mm; max. 40,0 mm), pri čemu je medijan iznosio 1,23 mm. 50% tumora bilo je debljine od 0,65 mm do 2,9 mm.



Slika 17. Distribucija debljine tumora.

Distribucija debljine tumora po Breslowu dosta očito ne prati Gaussovu krivulju (plava krivulja na Slici 17.). Odstupanje od normalnosti (crvena krivulja predstavlja aproksimaciju podataka) je vrlo veliko. Testiranje na normalnost izvršeno je Lillieforsovom verzijom Kolmogorov-Smirnovljevog testa, pri čemu je p -vrijednost bila manja od 0,01, što pokazuje da se debljina tumora po Breslowu ne ponaša kao normalna slučajna varijabla.

Sentinel biopsija učinjena je kod 484 (57,34%) pacijenta, od kojih je pozitivan sentinel čvor pronađen u 122 (14,45%) bolesnika.

Kod 205 (24,28%) bolesnika došlo je do progresije metastatske bolesti, u smislu pozitiviteta regionalnih ili udaljenih limfnih čvorova, prisutnosti kutanih ili udaljenih visceralnih metastaza.

Analizirali smo povezanost ishoda sentinel biopsije i pojavnosti metastaza s kliničko-patohistološkim parametrima: dob, spol, lokalizacija primarnog tumora, tip, debljina tumora, razina prodora po Clarku, te s ostalim dostupnim patohistološkim parametrima primarnog ekscizata: ulceracija, regresija, mitotski indeks, prisutnost limfokapilarne invazije, limfocitnog infiltrata te mikrosatelitoza.

Debljina tumora po Breslowu je reklasificirana, prema novoj podjeli od I do IV te izražena u mm debljine i stupnjevima T1–T4 prema TNM klasifikaciji ¹⁸⁹.

Posebno smo analizirali takozvane tanke tumore, na način da smo ih stratificirali u podskupine: manje od 0,5; 0,5 – 0,75; 0,76 – 1,0; 1,01 – 1,25 i 1,26 – 1,5 mm.

Mitotski indeks (broj mitoza po mm²), podijelili smo u 4 skupine:

bez mitoza

jedna mitoza / mm²

dvije do pet / mm²

više od pet mitoza / mm².

Limfocitnu infiltraciju, kategorizirali smo također, kako slijedi:

bez limfocitne infiltracije

oskudna infiltracija

srednje gusta infiltracija

gusta infiltracija.

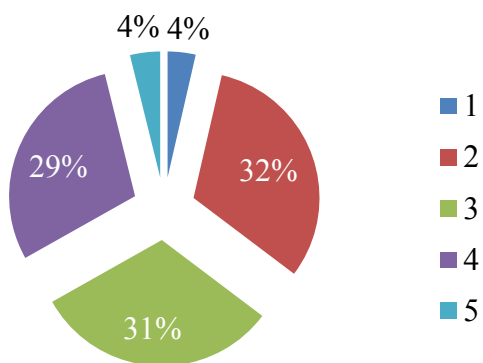
Tablica 7. Kliničke i patohistološke karakteristike bolesnika uključenih u studiju

		n	% ukupni	% validni	% kumul.
Spol (N = 844)	muškarci	386	45,73	45,73	45,73
	žene	458	54,27	54,27	100,00
Lokalizacija (N = 841)	glava i vrat	68	8,06	8,09	8,09
	trup sprijeda	111	13,15	13,20	21,28
	trup straga i glutealno	327	38,74	38,88	60,17
	ruka i rame	130	15,40	15,46	75,62
	noga i kuk	176	20,85	20,93	96,55
	uška, subungv. i prsti	16	1,90	1,90	98,45
	oko	3	0,36	0,36	98,81
	nepoznato primarno sijelo	10	1,18	1,19	100,00

		n	% ukupni	% validni	% kumul.
Tip (N = 599)	MIS	20	2,37	3,34	3,34
	SSM	369	43,72	61,60	64,94
	NM	150	17,77	25,04	89,98
	LMM	32	3,79	5,34	95,33
	ALM	19	2,25	3,17	98,50
	nevoidni melanom	8	0,95	1,34	99,83
	dezmoplastični	1	0,12	0,17	100,00
Klasifikacija po Clarku (N = 751)	1	27	3,20	3,60	3,60
	2	238	28,20	31,69	35,29
	3	237	28,08	31,56	66,84
	4	220	26,07	29,29	96,14
	5	29	3,44	3,86	100,00
Klasifikacija po Breslowu (N = 763)	I	220	26,07	28,83	28,83
	II	206	24,41	27,00	55,83
	III	211	25,00	27,65	83,49
	IV	126	14,93	16,51	100,00
T stupanj prema TNM klasifikaciji (N = 401)	T1a	70	8,29	17,46	17,46
	T1b	134	15,88	33,42	50,87
	T2a	90	10,66	22,44	73,32
	T2b	27	3,20	6,73	80,05
	T3a	9	1,07	2,24	82,29
	T3b	13	1,54	3,24	85,54
	T4a	18	2,13	4,49	90,02
	T4b	40	4,74	9,98	100,00
Tanki tumori (mm) (N = 426)	<0,5	116	13,74	27,23	27,23
	0,5–0,75	104	12,32	24,41	51,64
	0,76–1	111	13,15	26,06	77,70
	1,01–1,25	58	6,87	13,62	91,31
	1,26–1,5	37	4,38	8,69	100,00
Ulceracija (N = 408)	ne	322	38,15	78,92	78,92
	da	86	10,19	21,08	100,00
Limfokapilarna infiltracija (N = 398)	ne	391	46,33	98,24	98,24
	da	7	0,83	1,76	100,00
Regresija (N = 398)	ne	394	46,68	98,99	98,99
	da	4	0,47	1,01	100,00
Broj mitoz (N = 418)	bez mitoz	81	9,60	19,38	19,38
	1	127	15,05	30,38	49,76

		n	% ukupni	% validni	% kumul.
	2–5	147	17,42	35,17	84,93
	više od 5	63	7,46	15,07	100,00
Limfocitna infiltracija (N = 412)	nema	16	1,90	3,88	3,88
	oskudna	70	8,29	16,99	20,87
	srednje gusta	156	18,48	37,86	58,74
	gusta	170	20,14	41,26	100,00
Mikrosatelitoza (N = 408)	ne	383	45,38	93,87	93,87
	da	25	2,96	6,13	100,00

Klasifikacija po Clarku



Slika 18. Raspodjela bolesnika prema razinama po Clarku.

U ovom radu, razina statističke značajnosti izabrana je na $\alpha = 0,05$, znači da je interval pouzdanosti bio 95%.

Za obradu podataka korišten je programski paket SAS 9.4.

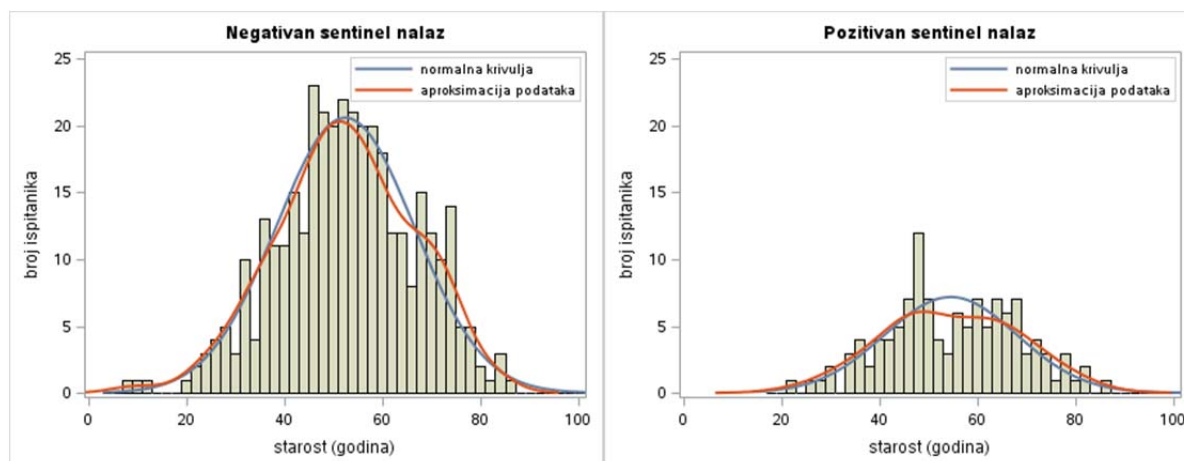
5 REZULTATI

5.1 Usporedba skupina ispitanika prema ishodu sentinel biopsije – svi tumori

Tablica 8. a. i b. Karakteristične vrijednosti testirane grupe bolesnika

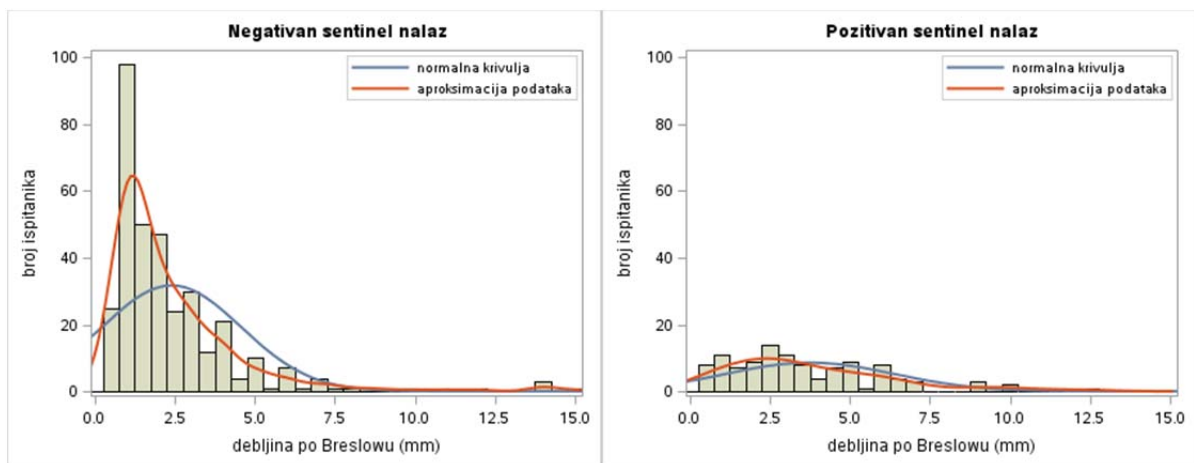
	Negativni (362)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	7	44	52	62	85	52,41	14,04
Debljina po Breslowu (mm)	0,32	1,03	1,7	3	15	2,40	2,17

	Pozitivni (122)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	21	46	55	65	85	54,54	13,48
Debljina po Breslowu (mm)	0,27	1,8	3	5	12,6	3,74	2,62



Slika 19. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnih ishoda sentinel biopsije.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza je li očekivanje dobi pacijenata s negativnim sentinelom jednako očekivanju dobi pacijenata s pozitivnim sentinelom. Dobivena je p -vrijednost 0,1458, što znači da na razini značajnosti od 5% ne možemo odbaciti tu hipotezu, tj. statistički nema bitne razlike u očekivanjima dobi pacijenata s negativnim i pozitivnim sentinelom.



Slika 20. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnih vrijednosti debljina tumora kod negativnog (a.) i pozitivnog (b.) ishoda sentinel biopsije.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza jesu li očekivanja debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim sentinelom i pacijenata s pozitivnim sentinelom jednaka. Dobivena je p -vrijednost 0,0001, što znači da na razini značajnosti od 5% tu hipotezu odbacujemo, tj. statistički je značajna razlika u očekivanju debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim i pozitivnim sentinelom.

Tablica 9. Usporedba nominalnih i ordinalnih varijabli

		neg	%	poz	%	p-vrijednost
Spol (N = 484)	muškarci	162	70,13	69	29,87	0,0277
	žene	200	79,05	53	20,95	
Lokalizacija (N = 484)	glava i vrat	29	90,63	3	9,38	0,0235
	trup srijeda	43	65,15	23	34,85	
	trup straga i glutealno	130	70,65	54	29,35	
	ruka i rame	59	81,94	13	18,06	
	noga i kuk	92	77,97	26	22,03	
	uška, subungv. i prsti	8	80,00	2	20,00	
	oko	1	100,00	0	0,00	
	nepoznato primarno sijelo	0	0,00	1	100,00	
Tip (N = 359)	MIS	2	66,67	1	33,33	0,0002
	SSM	169	80,86	40	19,14	
	NM	74	58,73	52	41,27	
	LMM	5	100,00	0	0,00	

		neg	%	poz	%	p-vrijednost
	ALM	9	81,82	2	18,18	
	nevoidni melanom	2	50,00	2	50,00	
	dezmoplastični	1	100,00	0	0,00	
Klasifikacija po Clarku (N = 443)	1	1	33,33	2	66,67	<0,0001
	2	55	84,62	10	15,38	
	3	150	84,75	27	15,25	
	4	122	68,54	56	31,46	
	5	8	40,00	12	60,00	
Klasifikacija po Breslowu (N = 458)	I	25	75,76	8	24,24	<0,0001
	II	137	90,73	14	9,27	
	III	127	72,57	48	27,43	
	IV	56	56,57	43	43,43	
T stupanj prema TNM klasifikaciji (N = 226)	T1a	10	71,43	4	28,57	<0,0001
	T1b	37	86,05	6	13,95	
	T2a	66	84,62	12	15,38	
	T2b	20	80,00	5	20,00	
	T3a	6	75,00	2	25,00	
	T3b	7	58,33	5	41,67	
	T4a	8	57,14	8	42,86	
	T4b	14	43,75	18	56,25	
Ulceracija (N = 228)	ne	128	82,05	28	17,95	0,0001
	da	42	58,33	30	41,67	
Limfokapilarna infiltracija (N = 484)	ne	164	75,58	53	24,42	0,5746
	da	4	100,00	0	0,00	
Regresija (N = 221)	ne	168	76,02	53	23,98	NA
	da	0	NA	0	NA	
Broj mitozu (N = 231)	bez mitozu	15	75,00	5	25,00	0,0348
	1	46	90,20	5	9,80	
	2–5	83	73,45	30	26,55	
	više od 5	31	65,96	16	34,04	
Limfocitna infiltracija (N = 232)	nema	7	87,50	1	12,50	0,0495
	oskudna	27	60,00	18	40,00	
	srednje gusta	63	75,90	20	24,10	
	gusta	78	81,25	18	81,25	
Mikrosatelitoza (N = 230)	ne	163	77,62	47	22,38	0,0314
	da	11	55,00	9	45,00	

Za testiranje hipoteza korišten je Pearsonov egzaktni χ^2 test kad god su svi podaci, odnosno očekivane vrijednosti svih podataka (na ovo upozori softver) u odgovarajućoj tablici veći ili jednaki 5, a u ostalim slučajevima korišten je Fisherov egzaktni test. Kod velikih tablica (tip, lokalizacija, klasifikacija po Clarku i T-stupanj), kad je broj mogućnosti vrlo velik, s Monte Carlo aproksimacijom za p -vrijednost.

5.2 Analiza dobivenih rezultata

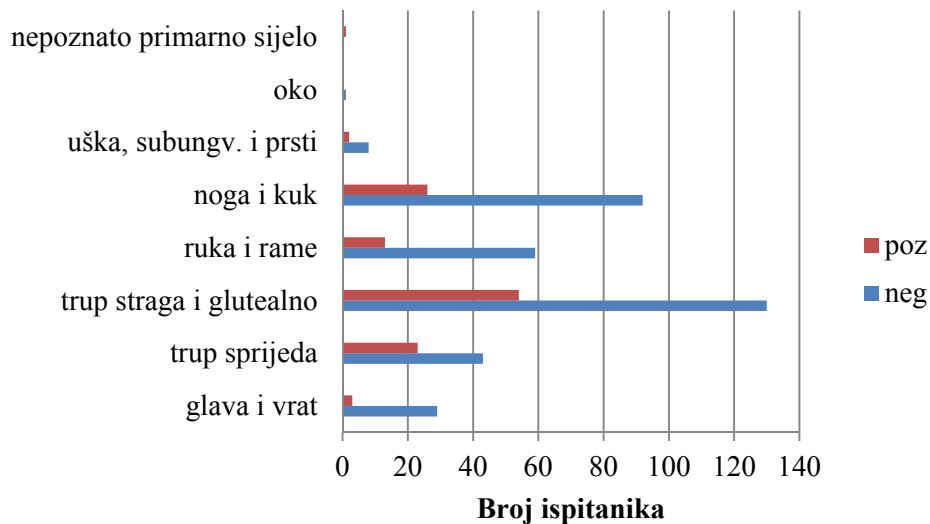
Prva p -vrijednost za spol pokazuje statistički značajnu razliku u očekivanju pozitivnog i negativnog sentinela kod muškaraca i žena, jer je p -vrijednost ($p = 0,0277$) manja ili jednaka 0,05.

Dokazali smo statistički bitnu razliku ovisno o tipu melanoma ($p = 0,0002$). Tako su nodularni i nevoidni melanom pokazali veći stupanj agresivnosti, u smislu znatno češćeg pozitiviteta limfnog čvora čuvara u odnosu na druge tipove MM-a.

Sukladno očekivanju, tumori višeg stupnja po Breslowu ($p < 0,0001$), imali su češće pozitivan sentinel limfni čvor. Jedina iznimka su vrlo tanki tumori stupnja I po Breslowu.

Slično je i kod razina po Clarku ($p < 0,0001$), imali su češće pozitivan sentinel limfni čvor. Ponovno iznimka su tumori Clark razine I, ali tu je vjerojatno riječ o vrlo malom uzorku od samo 3 tumora. Deblji tumori kao i tumori s prodorom u dublje slojeve kože povezani su s većom vjerojatnosti pozitivnog ishoda sentinel biopsije.

Lokalizacija tumora statistički se pokazala kao važan prediktivni faktor ishoda sentinel biopsije ($p = 0,0235$). U promatranoj skupini pacijenata bilo je 34,85% pozitivnih ishoda za lokalizaciju tumora na trupu sprijeda od ukupnog broja dijagnosticiranih melanoma ove lokalizacije, odnosno 29,35% za trup straga (uključujući i glutealnu regiju), te 22,03% pozitivnog ishoda kod lokalizacije primarnog tumora na nozi i kuku. Slijedila je akralna lokalizacija (uška, subungvalno i prsti) s 20,00%, te glava i vrat s 9,38% pozitivnog ishoda sentinel biopsije u primarnog melanoma kože ovih lokalizacija.



Slika 21. Distribucija ishoda sentinel biopsije prema lokalizaciji.

Što se tiče patohistoloških parametara, statistički značajnu povezanost s pozitivnim ishodom sentinel biopsije pronašli smo kod prisutnosti ulceracije ($p < 0,0001$), povišenog mitotskog indeksa ($p = 0,0348$) i prisutnosti mikrosatelitoza ($p = 0,0314$). Prisutnost limfocitne infiltracije pokazala je statistički bitnu razliku između skupina u smislu povezanosti s ishodom sentinel biopsije ($p = 0,0495$) i to tako što smo kod gušće limfocitne infiltracije pronašli manji postotak pozitivnih sentinel limfnih čvorova, što bi moglo upućivati na povoljniju prognozu u smislu prisutnosti limfocitne infiltracije.

Prisutnost limfokapilarne invazije nije pokazala povezanost s ishodom SLNB ($p = 0,5746$) u našoj promatranoj skupini bolesnika.

U promatranom uzorku potvrđena je regresija u primarnom ekscizatu u samo 4 bolesnika, međutim ni u jednog od njih nije rađena biopsija sentinel limfnog čvora, što nam je onemogućilo daljnju statističku analizu ovog parametra.

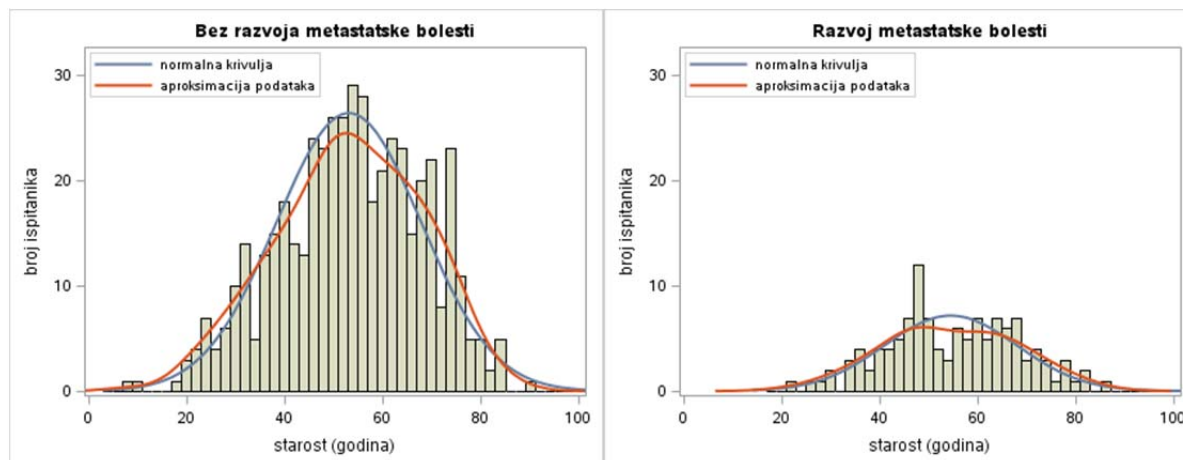
5.3 Usporedba skupina ispitanika prema prisutnosti metastaza – svi tumori

Tablica 10. a. i b. Karakteristične vrijednosti testirane grupe bolesnika

	Negativni (488)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	7	43	53	64	89	53,15	14,76
Debljina po Breslowu (mm)	0,11	0,5	0,89	1,47	18	1,37	1,78

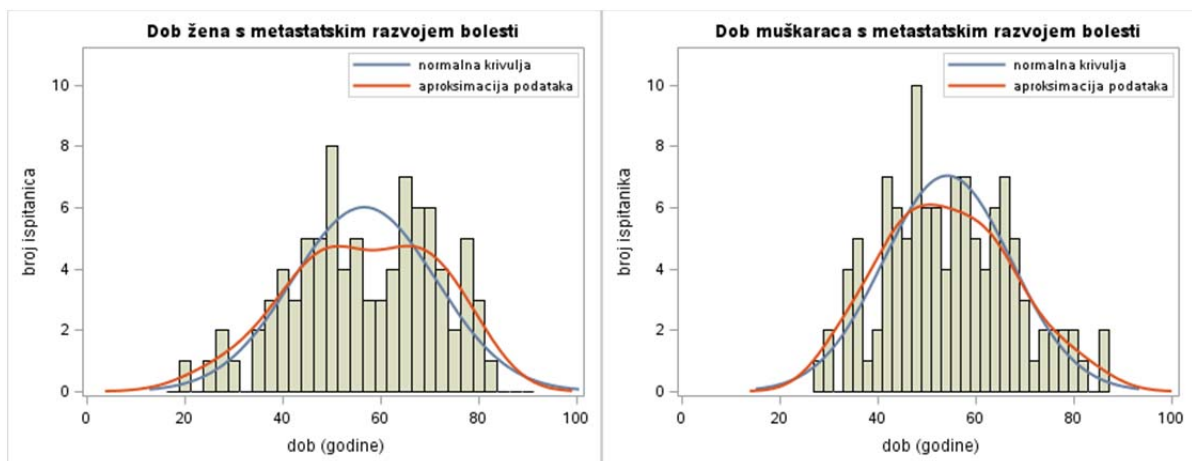
	Pozitivni (205)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	21	45	55	65	86	55,32	13,76
Debljina po Breslowu (mm)	0,27	2	3	5	40	4,03	3,82

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza je li očekivanje dobi pacijenata s negativnim metastazama jednako očekivanju dobi pacijenata s pozitivnim metastazama. Dobivena p -vrijednost 0,0733 znači da na razini značajnosti od 5% ne možemo odbaciti hipotezu, tj. statistički nema znatne razlike u očekivanjima dobi pacijenata s negativnim i pozitivnim metastazama.



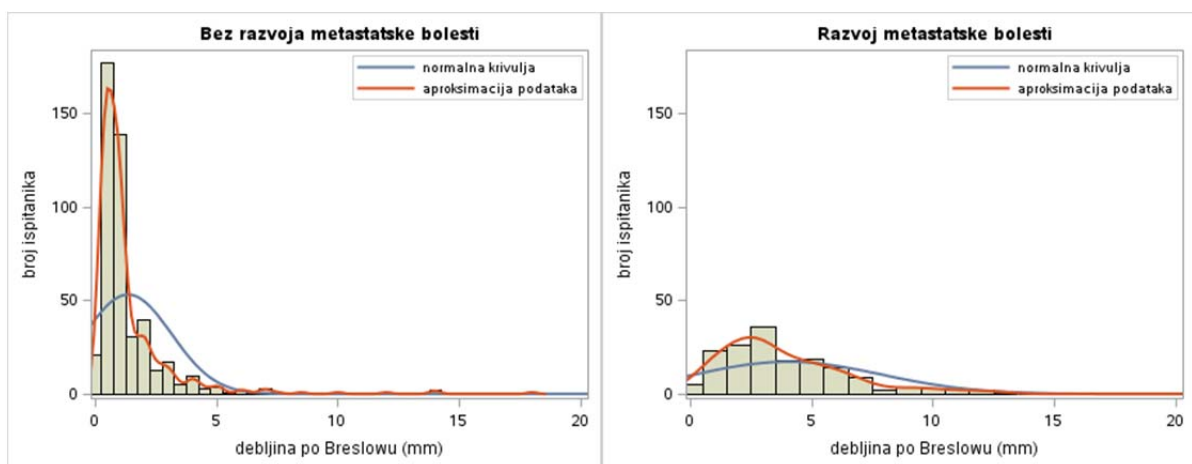
Slika 22. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnog metastatskog ishoda prema dobi bolesnika.

Posebno, na slici 22.a. s razvojem metastatske bolesti primjećuje se bitni pad razvoja metastatske bolesti u dobi bolesnika od 52 do 56 godina, pri čemu je važan utjecaj spola na razvoj bolesti (Slika 23.).



Slika 23. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnog metastatskog ishoda prema dobi kod žena (a.) i muškaraca (b.).

Na slici 23. vidi se da je kod žena došlo do bitnog pada razvoja bolesti, dok kod muškaraca taj pad nije značajan.



Slika 24. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnih vrijednosti debljina tumora kod negativnog (a.) i pozitivnog (b.) metastatskog ishoda.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza jesu li očekivanja debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim metastazama i pacijenata s pozitivnim metastazama jednaka. Dobivena je p -vrijednost $< 0,0001$, što znači da na razini značajnosti od 5% tu hipotezu odbacujemo, tj. statistički je značajna razlika u očekivanju debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim i pozitivnim metastazama.

Tablica 11.a. Usporedba nominalnih i ordinalnih varijabli

		neg	%	poz	%	p- vrijednost
Spol (N = 694)	muškarci	195	62,70	116	37,30	<0,0001
	žene	294	76,76	89	23,24	
Lokalizacija (N = 692)	glava i vrat	44	84,62	8	15,38	<0,0001
	trup srijeda	59	63,44	34	36,56	
	trup straga i glutealno	190	70,63	79	29,37	
	ruka i rame	86	82,69	18	17,31	
	noga i kuk	103	67,32	50	32,68	
	uška, subungv. i prsti	3	33,33	6	66,67	
	oko	2	100,00	0	0,00	
	nepoznato primarno sijelo	0	0,00	10	100,00	
Tip (N = 508)	MIS	10	83,33	2	16,67	<0,0001
	SSM	273	82,23	59	17,77	
	NM	43	37,39	72	62,61	
	LMM	28	100,00	0	0,00	
	ALM	7	58,33	5	41,67	
	nevoidni melanom	4	50,00	4	50,00	
	dezmoplastični	1	100,00	0	0,00	
Klasifikacija po Clarku (N = 626)	1	21	91,30	2	8,70	<0,0001
	2	209	93,30	15	6,70	
	3	148	76,29	46	23,71	
	4	79	47,59	87	52,41	
	5	3	15,79	16	84,21	
Klasifikacija po Breslowu (N = 639)	I	204	95,33	10	4,67	<0,0001
	II	158	88,76	20	11,24	
	III	83	54,25	70	45,75	
	IV	29	30,85	65	69,15	
T stupanj prema TNM klasifi- kaciji (N = 350)	T1a	62	93,94	4	6,06	<0,0001
	T1b	126	95,45	6	4,55	
	T2a	56	73,68	20	26,32	
	T2b	11	57,89	8	42,11	
	T3a	3	50,00	3	50,00	
	T3b	1	12,50	7	87,50	
	T4a	4	30,77	9	69,23	
	T4b	8	26,67	22	73,33	
Ulceracija	ne	246	84,25	46	15,75	<0,0001

		neg	%	poz	%	p- vrijednost
(N = 355)	da	24	38,10	39	61,90	
Limfokapilarna infiltracija (N = 347)	ne	263	76,90	79	23,10	0,5923
	da	5	100,00	0	0,00	
Regresija (N = 347)	ne	264	76,97	79	23,03	0,5779
	da	4	100,00	0	0,00	
Broj mitoz (N = 361)	bez mitoz	67	89,33	8	10,67	<0,0001
	1	118	95,16	6	4,84	
	2–5	74	64,35	41	35,65	
	više od 5	15	31,91	32	68,09	
Limfocitna infiltracija (N = 356)	nema	9	69,23	4	30,77	<0,0001
	oskudna	32	57,14	24	42,86	
	srednje gusta	108	78,26	30	21,74	
	gusta	124	83,22	25	16,78	
Mikrosatelitoza (N = 354)	ne	262	78,92	70	21,08	<0,0001
	da	7	31,82	15	68,18	

Tablica 11.b.

		Sentinel		Ukupno
		negativan	pozitivan	
Metastaze	negativne	245	0	245
	pozitivne	39	122	161
Ukupno		284	122	406

Kao i kod testiranja sentinel nalaza, za testiranje hipoteza korišten je Pearsonov egzaktni χ^2 test kad god su svi podaci, odnosno očekivane vrijednosti svih podataka (na ovo upozori softver) u odgovarajućoj tablici veći ili jednaki 5, a u ostalim slučajevima korišten je Fisherov egzaktni test. Kod velikih tablica (tip, lokalizacija, klasifikacija po Clarku i T-stupanj), kad je broj mogućnosti vrlo velik, s Monte Carlo aproksimacijom za p -vrijednost.

5.4 Analiza dobivenih rezultata

U kategoriju metastatske bolesti uvršteni su svi bolesnici s identificiranim metastatski promijenjenim limfnim čvorom, te bolesnici s kožnim i (udaljenim) visceralnim metastazama.

Utvdili smo značajnu povezanost s muškim spolom ($p < 0,0001$).

NM pokazao je najizraženiju agresivnost, sa metastatskim razvojem bolesti kod čak 62,61% bolesnika oboljelih od ovog tipa PCM-a. Slijedio je nevoidni melanom s progresijom bolesti kod 50% bolesnika i ALM s 41,67% razvijenih metastaza u bolesnika s dijagnosticiranim ovim tipom melanoma ($p < 0,0001$).

Utvdili smo i statistički značajnu povezanost metastaziranja s obzirom na lokalizaciju primarnog tumora ($p < 0,0001$). Najčešće su metastazirali primarni melanomi akralnih lokalizacija (uška i prsti) – čak 66,67% ih je metastaziralo od ukupnog broja melanoma ove lokalizacije (odnosno 2,93% od ukupnog broja bolesnika s metastazama). Slijedila je lokalizacija trup sprijeda (36,56% unutar lokalizacije, odnosno 16,59% od ukupnog broja metastaza), noga i kuk (32,68% unutar lokalizacije, odnosno 24,37% od ukupnog broja metastaza), te trup straga i glutealno (sa 29,37% unutar lokalizacije i s čak 38,54% od ukupnog broja pronađenih metastaza).

Razina prodora po Clarku pokazala je povezanost s razvojem metastatske bolesti ($p < 0,0001$), tako što viši stupanj predstavlja i veću vjerojatnost pojave metastaza. Čak u 84,21% bolesnika sa Clark V razinom prodora tumora u primarnom ekscizatu, razvilo je metastatsku bolest.

Debljina primarnog tumora stupnjevana po Breslowu, izražena u mm kao i klasificirana po TNM-u pokazala je da s porastom debljine proporcionalno raste i agresivnost tumora ($p < 0,0001$).

Utvdili smo statistički značajnu povezanost razvoja metastatske bolesti s ulceracijom ($p < 0,0001$).

Od ukupnog broja sentinel negativnih bolesnika, koji je iznosio 284, kod 39 bolesnika je pronađena udaljena visceralna metastaza (tablica 11.b.).

Nije pronađena statistički značajna korelacija pojave metastaza s limfokapilarnom invazijom ($p = 0,5923$) i regresijom ($p = 0,5779$), s obzirom na neadekvatno mali uzorak i primjenu samo rutinskih bojenja (HE) u patohistološkoj analizi limfokapilarne invazije, slično kao i kod sentinela.

5.5 Logistička regresija

Logistička regresija modelira odnos jedne ili više nezavisnih varijabli i jedne zavisne varijable. Logistička regresija daje vjerojatnost događaja s obzirom na skup varijabli o kojima taj događaj ovisi. Na primjer, vjerojatnost metastatskog razvoja bolesti predviđa se mnogim

varijablama, na primjer, debljini tumora po Breslowu, mitotskom indeksu, ulceraciji... Ako vjerojatnost događaja ovisi samo o jednoj varijabli, onda se takva logistička regresija naziva univarijantna logistička regresija. Umjesto pravca kod obične regresije, kod univarijantne logističke regresije koristi se funkcija logističke regresije

$$P(x) = \frac{e^{\beta_1 x + \beta_0}}{1 + e^{\beta_1 x + \beta_0}},$$

pri čemu je x nezavisna varijabla, $P(x)$ vjerojatnost da se događaj dogodio, a β_1 i β_0 su parametri modela. Budući da su u brojniku i nazivniku nenegativni brojevi, i da je u nazivniku broj koji je veći od brojnika, nije teško pokazati da su vrijednosti $P(x)$ između 0 i 1.

Postoji veza između omjera šansi i logističkog modela. Ako je $P(x)$ vjerojatnost da se događaj dogodio, onda je $1 - P(x)$ vjerojatnost da se događaj nije dogodio, pa je

$$OR(x) = \frac{P(x)}{1 - P(x)} = e^{\beta_1 x + \beta_0}$$

omjer šansi da se događaj dogodio/događaj se nije dogodio. Logaritmiranjem obje strane dobivamo linearni model

$$\ln\left(\frac{P(x)}{1 - P(x)}\right) = \beta_1 x + \beta_0,$$

odakle i potječe ime **logistička regresija**.

Iz veze omjera šansi i logističkog modela nije teško izračunati da vrijedi

$$OR(x + 1) = OR(x) \cdot e^{\beta_1},$$

pa e^{β_1} predstavlja promjenu omjera šansi, ali ovaj puta multiplikativnu, ako se x poveća za 1. Ako je

- $\beta_1 = 0$, onda su svi omjeri šansi i sve vjerojatnosti jednake za sve x ,
jer je $e^{\beta_1} = e^0 = 1$,
- ako je $\beta_1 > 0$, onda omjeri šansi i vjerojatnosti rastu kad x raste,
jer je $e^{\beta_1} > e^0 = 1$,
- ako je $\beta_1 < 0$, onda omjeri šansi i vjerojatnosti padaju kad x raste,
jer je $e^{\beta_1} < e^0 = 1$.

Da bismo bili sigurni u ponašanje e^{β_1} , za njega treba izračunati interval pouzdanosti (u ovom radu 95% interval). Kad se interval pouzdanosti izračuna, onda je njegovo značenje sljedeće:

- ako je cijeli interval iznad 1, (recimo interval [1,12, 3,15]) to znači da postoji pozitivna veza,
- ako je cijeli interval ispod 1, (recimo interval [0,12, 0,15]) to znači da postoji negativna veza,
- ako interval obuhvaća 1, ne možemo tvrditi postoji li veza ili ne postoji.

Multivarijantna logistička regresija, za razliku od univarijantne logističke regresije može imati dvije ili više varijabli o kojima ovisi, samo funkcija logističke regresije

$$P(x_1, x_2, \dots, x_n) = \frac{e^{\beta_n x_n + \dots + \beta_2 x_2 + \beta_1 x_1 + \beta_0}}{1 + e^{\beta_n x_n + \dots + \beta_2 x_2 + \beta_1 x_1 + \beta_0}}$$

ovisi o varijablama (x_1, x_2, \dots, x_n) . Nije teško pokazati da i u ovom slučaju postoji povezanost omjera šansi i logističkog modela

$$OR(x_1, x_2, \dots, x_n) = \frac{P(x_1, x_2, \dots, x_n)}{1 - P(x_1, x_2, \dots, x_n)} = e^{\beta_n x_n + \dots + \beta_2 x_2 + \beta_1 x_1 + \beta_0},$$

pa logaritmiranjem kao transformacijom ponovno dobivamo standardnu linearnu regresiju

$$\ln\left(\frac{P(x_1, x_2, \dots, x_n)}{1 - P(x_1, x_2, \dots, x_n)}\right) = \beta_n x_n + \dots + \beta_2 x_2 + \beta_1 x_1 + \beta_0.$$

Slično kao kod univarijantnog modela, vrijedi

$$OR(x_1, x_2, \dots, x_k + 1, \dots, x_n) = OR(x_1, x_2, \dots, x_k, \dots, x_n) \cdot e^{\beta_k},$$

pa e^{β_k} predstavlja promjenu omjera šansi, ali ovaj puta multiplikativnu, ako se x_k poveća za 1, a sve druge varijable ostanu nepromijenjene.

U ovom radu, logističkom regresijom testirana je povezanost zavisnih varijabli (sentinel nalaz i prisutnost metastaza) s nezavisnim varijablama. Nadalje, napravljeni su i testovi nakon što se uklonio učinak zbunjujućih (engl. confounding) varijabli, recimo učinak dobi i spola. Učinak dobi i spola pokazao se kao malo značajan, jer su omjeri šansi i standardizirani omjeri šansi gotovo jednaki.

Tablica 12.a. Pozitivan ishod sentinela

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	0,622*	0,411–0,941		
Starost (god)	1,011	0,996–1,026		
Lokalizacija – glava i vrat vs. trup sprijeda	0,193*	0,053–0,704	0,178*	0,049–0,655
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,777	0,427–1,412	0,791	0,432–1,449
Lokalizacija – ruka i rame vs. trup sprijeda	0,412*	0,188–0,904	0,434*	0,195–0,969
Lokalizacija – noga i kuk vs. trup sprijeda	0,528	0,271–1,030	0,564	0,277–1,147
Lokalizacija – uška, subungv. vs. trup sprijeda	0,467	0,092–2,386	0,422	0,081–2,188
Lokalizacija – oko vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Lokalizacija – nepoznato primarno sijelo vs. trup sprijeda	>1000	<0,001–>1000	>1000	<0,001–>1000
Tip – SSM vs. MIS	0,473	0,042–5,351	0,491	0,043–5,573
Tip – NM vs. MIS	1,405	0,124–15,908	1,418	0,125–16,113
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip – ALM vs. MIS	0,444	0,026–7,666	0,464	0,027–8,039
Tip – nevoidni melanom vs. MIS	2,000	0,090–44,350	2,058	0,092–45,797
Tip – dezplastični vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,091	0,008–1,100	0,077*	0,006–0,941
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	0,090	0,008–1,028	0,074*	0,006–0,858
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	0,230	0,020–2,585	0,185	0,016–2,112
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	0,750	0,058–9,721	0,527	0,040–7,002
Debljina po Breslowu (mm)	1,240*	1,136–1,355	1,219*	1,115–1,333
Klasifikacija po Breslowu II vs. I	0,319*	0,121–0,840	0,329*	0,124–0,873
Klasifikacija po Breslowu III vs. I	1,181	0,498–2,798	1,160	0,486–2,768
Klasifikacija po Breslowu IV vs. I	2,400	0,986–5,842	2,241	0,910–5,518
TNM – T1b vs. T1a	0,405	0,096–1,720	0,426	0,100–1,824
TNM – T2a vs. T1a	0,455	0,122–1,689	0,449	0,120–1,675
TNM – T2b vs. T1a	0,625	0,137–2,852	0,613	0,134–2,809
TNM – T3a vs. T1a	0,833	0,115–6,013	0,865	0,117–6,402
TNM – T3b vs. T1a	1,786	0,349–9,127	1,861	0,362–9,577
TNM – T4a vs. T1a	1,875	0,390–9,013	1,922	0,396–9,343

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
TNM – T4b vs. T1a	3,214	0,830–12,444	3,170	0,800–12,568
Broj mitozna – 1 vs. 0	0,326	0,083–1,283	0,328	0,083–1,293
Broj mitozna – 2–5 vs. 0	1,084	0,363–3,241	1,058	0,353–3,175
Broj mitozna – >5 vs. 0	1,548	0,477–5,030	1,424	0,433–4,682
Ulceracija (da vs. ne)	3,265*	1,753–6,081	3,097*	1,651–5,807
Limfocitna infiltracija – bez vs. gusta	0,619	0,072–5,352	0,642	0,074–5,572
Limfocitna infiltracija – oskudna vs. gusta	2,889*	1,316–6,342	2,659*	1,195–5,917
Limfocitna infiltracija – srednje gusta vs. gusta	1,376	0,671–2,821	1,403	0,680–2,895
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	2,838*	1,110–7,255	2,859*	1,102–7,416

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za dob i spol.

Rezultati logističke regresijske analize za pozitivan ishod SLNB sumarno su prikazani u Tablici 12. Primjenom logističke regresije dokazali smo statistički značajnu prediktivnu vrijednost spola, debljine primarnog tumora, prisutnosti ulceracija i mikrosatelitoza. Nadalje, neke lokalizacije tumora (glava i vrat OR = 0.193; 95% CI = 0,053 – 0,704 i ruka i rame OR = 0,41295% CI = 0,188 – 0,904) imaju statistički značajno manje pozitivnih sentinel nalaza obzirom na lokalizaciju trup sprijeda. Nismo uočili očekivanu povezanost ishoda sentinel biopsije s dobi bolesnika. Za ostale promatrane kliničke i patohistološke pokazatelje, iako smo za neke utvrdili značajnu povezanost usporedbom nominalnih i ordinalnih varijabli, logističkom regresijom nismo ustanovili važnost.

Lokalizacija tumora pokazala je značajnu razliku skupina u smislu vjerojatnosti pozitivnog ishoda sentinela, pri čemu je trup sprijeda bio najčešće sjelo tumora s pozitivnim ishodom, što se vidi iz OR-a za sve ostale lokalizacije (osim za nepoznato primarno sjelo), koji je manji od 1. Ipak treba naglasiti da je s obzirom na interval pouzdanosti (CI), ta značajnost potvrđena samo za lokalizacije: glava i vrat; ruka i rame.

Razina tumorske invazije po Clarku za razinu II s obzirom na I i razinu III s obzirom na I pokazala je da kao korektivni faktor (s obzirom na spol i starost) ima statistički bitnu razliku (AOR = 0,077; 95% CI (AOR) = 0,006 – 0,941 za razinu II obzirom na I, AOR = 0,074; 95% CI (AOR) = 0,006 – 0,858 za razinu III prema I).

Veća debljina tumora po Breslowu (AOR = 1,240; 95% CI = 1,136 – 1,355) potvrdila je veći rizik od pozitivnosti sentinel limfnog čvora.

Ulceracija je bila prognostički signifikantan indikator pozitivnog ishoda sentinel biopsije (OR = 3,265; 95% CI = 1,753 – 6,081), kao i prisutnost mikrosatelitoza (OR = 2,838; 95% CI = 1,110 – 7,255). Vjerojatnost pozitivnog ishoda sentinela čak za oko tri puta je veća ukoliko postoji prisutna ulceracija ili mikrosatelitoze.

Limfocitna infiltracija – oskudna vs. gusta također je pokazala da rjeđa infiltracija ima veći rizik od pozitivnog limfnog čvora (OR = 2,889; 95% CI = 1,316 – 6,342). Iznenađujuće je da se nije pokazao isti rezultat za „bez infiltracije vs. gusta”, međutim vjerojatno je riječ o problemu malog uzorka.

Tablica 12.b. Pozitivan ishod sentinela

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR** *	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	0,732	0,470–1,139	0,965	0,500–1,860
Starost (god.)	1,009	0,993–1,025	1,007	0,984–1,031
Lokalizacija – glava i vrat vs. trup sprijeda	0,109*	0,023–0,519	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,757	0,397–1,443	1,160	0,419–3,209
Lokalizacija – ruka i rame vs. trup sprijeda	0,392*	0,167–0,921	0,622	0,167–2,314
Lokalizacija – noga i kuk vs. trup sprijeda	0,558	0,276–1,130	0,517	0,163–1,642
Lokalizacija – uška, subungv. vs. trup sprijeda	0,242	0,036–1,652	0,181	0,012–2,651
Lokalizacija – oko vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Lokalizacija – nepoznato primarno sijelo vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Tip – SSM vs. MIS	0,171	0,010–2,810	0,142	0,008–2,415
Tip – NM vs. MIS	0,386	0,023–6,505	0,297	0,016–5,409
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip – ALM vs. MIS	0,105	0,004–2,838	0,245	0,008–7,928
Tip – nevoidni melanom vs. MIS	0,374	0,009–14,769	0,388	0,010–15,759
Tip – dezplastični vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,080*	0,007–0,968	0,081	0,006–1,047
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	0,072*	0,006–0,828	0,033*	0,002–0,442
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	0,145	0,013–1,686	0,140	0,011–1,859
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	0,267	0,018–4,010	0,262	0,013–5,275

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR** *	95% CI (AOR)
Broj mitoza – 1 vs. 0	0,349	0,087–1,397		
Broj mitoza – 2–5 vs. 0	0,860	0,276–2,676		
Broj mitoza – >5 vs. 0	0,906	0,249–3,300		
Ulceracija (da vs. ne)	2,135*	1,036–4,399		
Limfocitna infiltracija – bez vs. gusta	0,603	0,066–5,518	0,543	0,058–5,097
Limfocitna infiltracija – oskudna vs. gusta	2,259	0,990–5,156	2,109	0,881–5,051
Limfocitna infiltracija – srednje gusta vs. gusta	1,270	0,605–2,665	1,437	0,667–3,096
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	1,852	0,647–5,304		

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za debljinu po Breslowu; ***AOR standardiziran za debljinu po Breslowu, broj mitoza i ulceraciju.

5.6 Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za pozitivan ishod sentinela – svi tumori

Stupnjevita logistička regresija (engl. stepwise logistic regression) u modelu koji opisuje neku pojavu dodaje jednu po jednu nezavisnu varijablu, procjenjujući njezin efekt i tako otkrivajući varijable koje su najznačajnije (najbolje opisuju) zavisnu varijablu (ovdje uzeto da u model mogu ući varijable s barem 5% važnosti). Iz modela je uklonjena varijabla T stupnja prema TNM klasifikaciji jer je ona neposredno dobivena iz debljine tumora, broja mitoza i prisustva ulceracija.

Testiranje je pokazalo da je jedina varijabla sa značajnošću od 5% u takvom modelu debljina po Breslowu, ali takav model sa samo jednom nezavisnom varijablom vrlo loše opisuje varijablu sentinel (Hosmer i Lemeshow test dobrote aproksimacije (engl. goodness of fit) jer daje vrlo veliku χ^2 vrijednost 21,3430 i malu p -vrijednost 0,0063). Nakon toga, u model je stavljena samo varijabla debljina po Breslowu, a za koeficijente modela dobiveno je

$$P(x_1) = \frac{e^{0,2153 x_1 - 1,7525}}{1 + e^{0,2153 x_1 - 1,7525}}$$

gdje je x_1 debljina tumora po Breslowu.

Za varijable koje imaju samo dvije vrijednosti (binarne varijable), kao što je ovdje sentinel, iz aproksimativnog modela može se izračunati slaganje modela sa stvarnim podacima. Naizgled razumno je reći ako je $P(x_1) > 0,5$, da je događaj je bio pozitivan, dok u suprotnom za $P(x_1) \leq 0,5$ događaj je bio negativan. Međutim, usporedbom sa stvarnim podacima, pokazuje

se da odabir vrijednosti 0,5 nije dobar. Bolji odabir dobiva se usporedbom modela i stvarnih podataka i na temelju usporedbe traži se granična vrijednost cp (engl. cutoff point) za koju se može proglasiti da su događaji za koje vrijedi $P(x_1) > cp$ pozitivni, dok oni za koje je $P(x_1) \leq cp$ su negativni.

Točnost klasifikacije mjeri se:

- osjetljivošću pozitivnih događaja (engl. sensitivity), odnosno postotku događaja koji su pozitivni i modelom su proglašeni za pozitivne, (oznaka osj_poz u tablici);
- osjetljivošću negativnih događaja (engl. specificity), odnosno postotku događaja koji su negativni i modelom su proglašeni za negativne, (oznaka osj_neg u tablici).

Nadalje, mogu se izračunati još i tri uvjetne vjerojatnosti:

- postotak događaja koji su modelom proglašeni pozitivnima, a stvarno su negativni (engl. false positive rate), (oznaka $lažno_poz$ u tablici);
- postotak događaja koji su modelom proglašeni negativnima, a stvarno su pozitivni (engl. false negative rate), (oznaka $lažno_neg$ u tablici);
- postotak modelom korektno utvrđenih klasifikacija, (oznaka $korektni$ u tablici).

Tablica 12.c. Granične vrijednosti za cp

Granični cp	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,150	113	0	345	0	24,7	100,0	0,0	75,3	–
0,175	98	41	304	15	30,3	86,7	11,9	75,6	26,8
0,200	86	171	174	27	56,1	76,1	49,6	66,9	13,6
0,225	72	223	122	41	64,4	63,7	64,6	62,9	15,5
0,250	55	265	80	58	69,9	48,7	76,8	59,3	18,0
0,275	46	282	63	67	71,6	40,7	81,7	57,8	19,2
0,300	41	304	41	72	75,3	36,3	88,1	50,0	19,1

Prethodna tablica jasno pokazuje da je najbolji cp negdje između 0,200 i 0,225, jer je tada točno klasificirano između 63,7% i 76,6% pozitivnih podataka (što je bitnije od negativnih) i između 49,6% i 64,6% negativnih podataka.

Tablica 13.a. Razvoj metastatske bolesti

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	0,509*	0,366–0,708		
Starost (god.)	1,010	0,999–1,022		
Lokalizacija – glava i vrat vs. trup sprijeda	0,316*	0,133–0,748	0,304*	0,126–0,733
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,722	0,439–1,186	0,749	0,450–1,248
Lokalizacija – ruka i rame vs. trup sprijeda	0,363*	0,188–0,703	0,415*	0,211–0,816
Lokalizacija – noga i kuk vs. trup sprijeda	0,842	0,491–1,446	1,083	0,607–1,933
Lokalizacija – uška, subungv. vs. trup sprijeda	3,471	0,815–14,777	3,258	0,751–14,142
Lokalizacija – oko vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija – nepoznato primarno sijelo vs. trup sprijeda	>1000	<0,001– >1000	>1000	<0,001– >1000
Tip – SSM vs. MIS	1,081	0,231–5,061	1,109	0,235–5,236
Tip – NM vs. MIS	8,372*	1,751–40,020	8,206*	1,704–39,527
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip – ALM vs. MIS	3,571	0,532–23,953	3,769	0,557–25,505
Tip – nevoidni melanom vs. MIS	5,000	0,640–39,059	4,996	0,632–39,497
Tip – dezoplastični vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,754	0,161–3,523	0,762	0,162–3,589
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	3,264	0,737–14,447	3,316	0,742–14,818
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	11,563*	2,627–50,900	11,369*	2,563–50,428
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	56,000*	8,345–375,813	52,496*	7,727–356,640
Debljina po Breslowu (mm)	1,709*	1,530–1,910	1,687*	1,510–1,885
Klasifikacija po Breslowu II vs. I	2,582*	1,175–5,671	2,588*	1,175–5,701
Klasifikacija po Breslowu III vs. I	17,200*	8,457–34,983	16,804*	8,249–34,233
Klasifikacija po Breslowu IV vs. I	45,712*	21,144–98,825	43,529*	20,079–94,367
TNM – T1b vs. T1a	0,738	0,201–2,712	0,778	0,208–2,904
TNM – T2a vs. T1a	5,536*	1,783–17,183	5,550*	1,784–17,268
TNM – T2b vs. T1a	11,273*	2,891–43,954	11,600*	2,960–45,458
TNM – T3a vs. T1a	15,500	2,335–102,903	14,154	2,080–96,330

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
	*		*	
TNM – T3b vs. T1a	108,49 7*	10,594->1000	115,16 4*	11,067->1000
TNM – T4a vs. T1a	34,875 *	7,385–164,682	34,448 *	7,254–163,578
TNM – T4b vs. T1a	42,624 *	11,674– 155,626	40,187 *	10,823– 149,221
Broj mitozna – 1 vs. 0	0,426	0,142–1,280	0,455	0,150–1,378
Broj mitozna – 2–5 vs. 0	4,640*	2,030–10,604	4,863*	2,114–11,188
Broj mitozna – >5 vs. 0	17,867 *	6,869–46,469	16,936 *	6,434–44,579
Ulceracija (da vs. ne)	8,689*	4,778–15,801	8,535*	4,639–15,704
Limfocitna infiltracija – bez vs. gusta	2,204	0,629–7,723	2,428	0,680–8,677
Limfocitna infiltracija – oskudna vs. gusta	3,720*	1,881–7,355	3,560*	1,777–7,134
Limfocitna infiltracija – srednje gusta vs. gusta	1,378	0,764–2,486	1,334	0,735–2,421
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	8,020*	3,148–20,432	8,598*	3,337–22,151

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za dob i spol.

Tablica 13.a. prikazuje rezultate logističke regresijske analize za razvoj metastatske bolesti.

Primjenom logističke regresijske analize kao značajne prediktore agresije tumora u smislu metastatskog širenja bolesti dokazali smo: spol, lokalizaciju tumora, histološki tip melanoma, razinu prodora po Clarku, debljinu tumora, povišen mitotski indeks, prisutnost ulceracije i mikrosatelitoza.

Tako muškarci imaju gotovo dva puta veću vjerojatnost razvoja metastatske bolesti u odnosu na žene (OR = 0,509; 95% CI = 0,366 – 0,708). Kod lokalizacije primarnog tumora na glavi i vratu (OR = 0,316; 95% CI = 0,133 – 0,748), te rukama i ramenima (OR = 0,363; 95% CI = 0,188 – 0,703), vjerojatnost razvoja metastatske bolesti je oko tri puta manja od lokalizacije trup sprijeda.

Tablica 13.b. Razvoj metastatske bolesti

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
Lokalizacija – trup sprijeda vs. glava i vrat	3,169*	1,337–7,516	3,286*	1,365–7,911
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. glava i vrat	2,287*	1,030–5,078	2,462*	1,097–5,527
Lokalizacija – ruka i rame vs. glava i vrat	1,151*	0,464–2,856	1,363	0,542–3,425
Lokalizacija – noga i kuk vs. glava i vrat	2,670*	1,169–6,096	3,560*	1,518–8,346
Lokalizacija – uška, subungv. vs. glava i vrat	11,000*	2,272–53,266	10,705*	2,175–52,683
Lokalizacija – oko vs. glava i vrat	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Lokalizacija – nepoznato primarno sjelo vs. glava i vrat	>1000	<0,001–>1000	>1000	<0,001–>1000

*Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za dob i spol.

Kod akralne lokalizacije tumora (uška, subungvalno, prsti), ta šansa je skoro jedanaest puta veća od vjerojatnosti razvoja metastatske bolesti kod lokalizacije primarnog tumora na glavi i vratu (OR = 11,000; 95% CI = 2,272 – 53,266).

Prema tipu tumora, najagresivniji je bio nodularni melanom (OR = 8,372; 95% CI = 1,751 – 40,020).

Sukladno očekivanjima više razine prodora po Clarku (razina IV prema I i razina V prema I) kao i veća debljina tumora stupnjevana po Breslowu višestruko su povećali rizik razvoja metastaza: Clark razina IV prema razini I (OR = 11,563; 95% CI = 2,627 – 50,900), Clark razina V prema razini I (OR = 56,000; 95% CI = 8,345 – 375,813), debljina tumora po Breslowu (OR = 1,709; 95% CI = 1,530 – 1,910).

Mitotski indeks (broj mitoza po mm²) pokazao se kao snažan indikator visokog rizika metastatskog širenja bolesti i to: u skupini 2–5 mitoza/mm² (OR = 4,640; 95% CI = 2,030 – 10,60419), a u skupini preko 5 mitoza/mm² (OR = 17,867; 95% CI = 6,869 – 46,469), u

usporedbi s rizikom razvoja metastaza u bolesnika čiji primarni tumor nije pokazivao mitotsku aktivnost.

Prisutnost ulceracije (OR = 8,689; 95% CI = 4,778 – 15,801) kao i mikrosatelitoza (OR = 8,020; 95% CI = 3,148 – 20,432), pokazali su se kao pouzdani prediktori metastatske bolesti.

Kod prisutne ulceracije i mikrosatelitoze taj rizik je više od 8x veći u odnosu na one bolesnike kod kojih nisu detektirani ovi parametri.

Tablica 13.c. Razvoj metastatske bolesti

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR***	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	0,652*	0,434–0,979	0,772	0,415–1,437
Starost (god.)	1,003	0,989–1,017	1,010	0,989–1,031
Lokalizacija – glava i vrat vs. trup sprijeda	0,191*	0,056–0,650	0,807	0,156–4,173
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,778	0,419–1,445	2,467	0,812–7,496
Lokalizacija – ruka i rame vs. trup sprijeda	0,392*	0,173–0,887	1,132	0,307–4,177
Lokalizacija – noga i kuk vs. trup sprijeda	0,985	0,510–1,899	1,955	0,615–6,209
Lokalizacija – uška, subungv. vs. trup sprijeda	1,209	0,162–9,038	0,890	0,047–16,939
Lokalizacija – oko vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Lokalizacija – nepoznato primarno sijelo vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Tip – SSM vs. MIS	1,057	0,130–8,604	0,480	0,055–4,204
Tip – NM vs. MIS	3,477	0,405–29,877	1,449	0,150–14,020
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip – ALM vs. MIS	1,943	0,152–24,781	3,450	0,228–52,210
Tip – nevoidni melanom vs. MIS	1,549	0,070–34,258	0,958	0,040–22,870
Tip – dezmozoplastični vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR***	95% CI (AOR)
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,564	0,119–2,673	0,281	0,051–1,544
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	1,843	0,408–8,314	0,716	0,130–3,953
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	3,961	0,847–18,518	2,139	0,365–12,553
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	6,087	0,734–50,507	3,438	0,279–42,415
Broj mitozu 1 vs. 0	0,342	0,098–1,197		
Broj mitozu 2 – 5 vs. 0	3,175*	1,265–7,972		
Broj mitozu >5 vs. 0	6,327*	2,028–19,741		
Ulceracija (da vs. ne)	3,443*	1,628–7,279		
Limfocitna infiltracija – bez vs. gusta	1,386	0,259–7,412	1,382	0,199–9,569
Limfocitna infiltracija – oskudna vs. gusta	3,273*	1,487–7,208	2,938*	1,271–6,790
Limfocitna infiltracija – srednje gusta vs. gusta	1,386	0,694–2,770	1,829	0,882–3,795
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	6,106*	2,048–18,205	3,766	0,968–14,657

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za debljinu po Breslowu; ***AOR standardiziran za debljinu po Breslowu, broj mitozu i ulceraciju.

5.7 Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za metastatski razvoj bolesti – svi tumori

Testiranje je pokazalo da su varijable sa značajnošću od 5% u takvom modelu (Tablica 14.):

Tablica 14.

	χ^2 vrijednost	p-vrijednost
Klasifikacija po Clarku	68,2715	<0,0001
Broj mitozu	10,9491	0,0009
Mikrosatelitoza	6,5516	0,0105
Debljina po Breslowu (mm)	5,8834	0,0153

Takav model relativno dobro opisuje varijablu metastaze (Hosmer i Lemeshow test dobrote aproksimacije (engl. goodness of fit) jer daje razumnu χ^2 vrijednost 12,7566 i p -vrijednost 0,1205). Jednako tako maksimalni reskalirani R^2 test je 0,4062.

Odgovarajući model, kad su u njega stavljene samo izabrane varijable je

$$P(x_1, x_2, x_3, x_4) = \frac{e^{0,8798 x_1 + 0,5666 x_2 + 1,6328 x_3 + 0,1750 x_4 - 5,4373}}{1 + e^{0,8798 x_1 + 0,5666 x_2 + 1,6328 x_3 + 0,1750 x_4 - 5,4373}}$$

gdje je x_1 razina prodora po Clarku (moguće vrijednosti: 1, 2, 3, 4, 5), x_2 broj mitozu (vrijednosti: 0 = nema mitozu, 1 = 1 mitozu, 2 = 2–5 mitozu, 3 = preko 5 mitozu), x_3 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_4 debljina tumora po Breslowu.

Tablica 14.a. Granične vrijednosti za cp

Granični cp	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,200	58	207	54	12	80,1	82,9	79,3	48,2	5,5
0,225	53	214	47	17	80,7	75,7	82,0	47,0	7,4
0,250	51	219	42	19	81,6	72,9	83,9	45,2	8,0
0,275	50	222	39	20	82,2	71,4	85,1	43,8	8,3
0,300	49	225	36	21	82,8	70,0	86,2	42,4	8,5
0,325	49	226	35	21	83,1	70,0	86,6	41,7	8,5
0,350	47	226	35	23	82,5	67,1	86,6	42,7	9,2

U prethodnoj tablici vidljivo je sljedeće: ako želimo barem 70% korektno predviđenih bolesnika s metastatskom bolešću, cp mora biti manji ili jednak 0,325.

PRIMJER 1.

$P(x_1, x_2, x_3, x_4)$ je vjerojatnost da određeni ispitanik ima metastaze, ako se u model uvrste njegovi parametri. Recimo da je razina po Clarku III (to znači da je $x_1 = 3$), broj mitozu 2 – 5 (to znači da je $x_2 = 2$), nema mikrosatelitoza (to znači da je $x_3 = 0$) i da je njegova debljina tumora 2,43 mm (to znači da je $x_4 = 2,43$), onda je njegova vjerojatnost da ima metastaze

$$P(3,2,0,2,43) = \frac{e^{0,7221 \cdot 3 + 0,6730 \cdot 2 + 1,9317 \cdot 0 + 0,1838 \cdot 2,43 - 5,1751}}{1 + e^{0,7221 \cdot 3 + 0,6730 \cdot 2 + 1,9317 \cdot 0 + 0,1838 \cdot 2,43 - 5,1751}} = 0,2286,$$

ili oko 22,86%, što znači šansu od preko 80% da je korektno klasificiran, tj. da nema metastaze – vidjeti gornju tablicu, granični cp se uzme, recimo, 0,250.

PRIMJER 2. (Melanoma malignum nodulare T3bNxMx, Cl IV, Br III)

iz PHD nalaza: Cl = 4 ($x_1 = 4$), broj mitozu 11 ($x_2 = 3$), mikrosatelitoza nema ($x_3 = 0$), debljina 2,70 ($x_4 = 2,70$), vjerojatnost ovog bolesnika da ima metastaze

$$P(3,2,0,2,43) = \frac{e^{0,7221 \cdot 4 + 0,6730 \cdot 3 + 1,9317 \cdot 0 + 0,1838 \cdot 2,70 - 5,1751}}{1 + e^{0,7221 \cdot 4 + 0,6730 \cdot 3 + 1,9317 \cdot 0 + 0,1838 \cdot 2,70 - 5,1751}} = 0,5632,$$

ili oko 56,32%, što znači šansu od preko 80% da je korektno klasificiran, tj. da ima metastaze.

Ako klasifikaciju po Clarku proglasimo nepouzdanom jer je temeljena na subjektivnoj procjeni pojedinca i izbacimo je iz mogućih varijabli, onda su rezultati testiranja nešto drugačiji (Tablica 15.).

Tablica 15.

	χ^2 vrijednost	p-vrijednost
Debljina po Breslowu (mm)	69,0394	<0,0001
Broj mitozu	17,1091	<0,0001
Mikrosatelitoza	6,4017	0,0114
Limfocitna infiltracija na bazi	4,3342	0,0374

Po Hosmer i Lemeshow testu takav model ne opisuje dobro varijablu metastaze χ^2 vrijednost 21,9590 i p-vrijednost 0,0050 dok je maksimalni reskalirani R^2 test = 0,3828.

Ponovno, nakon uvrštavanja u model samo izabраниh varijabli, model glasi:

$$P(x_1, x_2, x_3, x_4) = \frac{e^{0,3049 x_1 + 0,8230 x_2 + 1,2808 x_3 - 0,3473 x_4 - 2,6075}}{1 + e^{0,3049 x_1 + 0,8230 x_2 + 1,2808 x_3 - 0,3473 x_4 - 2,6075}}$$

gdje je x_1 debljina tumora po Breslowu, x_2 broj mitozu (vrijednosti: 0 = nema mitozu, 1 = 1 mitozu, 2 = 2 – 5 mitozu, 3 = preko 5 mitozu), x_3 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_4 limfocitna infiltracija na bazi (vrijednosti: 0 = bez, 1 = oskudna, 2 = srednje gusta, 3 = gusta).

Tablica 15.a. Granične vrijednosti za cp

Granični cp	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,150	64	179	85	8	72,3	88,9	67,8	57,0	4,3
0,175	62	197	67	10	77,1	86,1	74,6	51,9	4,8
0,200	58	208	56	14	79,2	80,6	78,8	49,1	6,3
0,225	55	219	45	17	81,5	76,4	83,0	45,0	7,2

Granični <i>cp</i>	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,250	54	226	38	18	83,3	75,0	85,6	41,3	7,4
0,275	49	235	29	23	84,5	68,1	89,0	37,2	8,9
0,300	42	237	27	30	83,0	58,3	89,8	39,1	11,2

U prethodnoj tablici vidljivo je sljedeće: ako želimo barem 80% korektno predviđenih bolesnika s metastatskom bolešću, *cp* mora biti približno jednak 0,250.

Zanimljivo je da se nigdje ne javlja ulceracija. Ona ulazi u prethodni model tek ako se iz modela osim razina po Clarku izbaci i broj mitozu (kao najmanje značajna varijabla), što pokazuje da su te dvije varijable vrlo blisko vezane (Tablica 16.).

Tablica 16.

	χ^2 vrijednost	p-vrijednost
Debljina po Breslowu (mm)	69,8906	<0,0001
Mikrosatelitoza	8,0062	0,0047
Limfocitna infiltracija na bazi	5,3751	0,0204
Ulceracija	4,4915	0,0341

Nažalost, takav model (u kojem smo uvrstili samo izabrane varijable)

$$P(x_1, x_2, x_3, x_4) = \frac{e^{0,4102 x_1 + 1,3031 x_2 - 0,3579 x_3 + 1,0353 x_4 - 1,6872}}{1 + e^{0,4102 x_1 + 1,3031 x_2 - 0,3579 x_3 + 1,0353 x_4 - 1,6872}}$$

gdje je x_1 debljina tumora po Breslowu, x_2 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_3 limfocitna infiltracija na bazi (vrijednosti: 0 = bez, 1 = oskudna, 2 = srednje gusta, 3 = gusta), x_4 ulceracija (0 = ne, 1 = da), je lošiji nego prethodna dva.

Tablica 16.a. Granične vrijednosti za *cp*

Granični <i>cp</i>	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,150	61	204	61	12	78,4	83,6	77,0	50,0	5,6
0,175	58	217	48	15	81,4	79,5	81,9	45,3	6,5
0,200	53	220	45	20	80,8	72,6	83,0	45,9	8,3
0,225	47	225	40	26	80,5	64,4	84,9	46,0	10,4
0,250	47	231	34	26	82,2	64,4	87,2	42,0	10,1

Granični <i>cp</i>	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,275	44	236	29	29	82,8	60,3	89,1	39,7	10,9
0,300	43	238	27	30	83,1	58,9	89,8	38,6	11,2

U prethodnoj tablici vidljivo je sljedeće: ako želimo barem 70% korektno predviđenih bolesnika s metastatskom bolešću, *cp* mora biti 0,200.

5.8 Tanki tumori – deskripcija

Svi ispitanici:

Tablica 17. Dob bolesnika i debljina tumora

	N	\bar{X}	SD	Med	Min	Max	25%	75%
Dob (god.)	425	52,74	14,93	53	10	89	41	64
Debljina po Breslowu (mm)	426	0,76	0,36	0,74	0,11	1,5	0,45	1

Tablica 18.a. Karakteristične vrijednosti testirane populacije

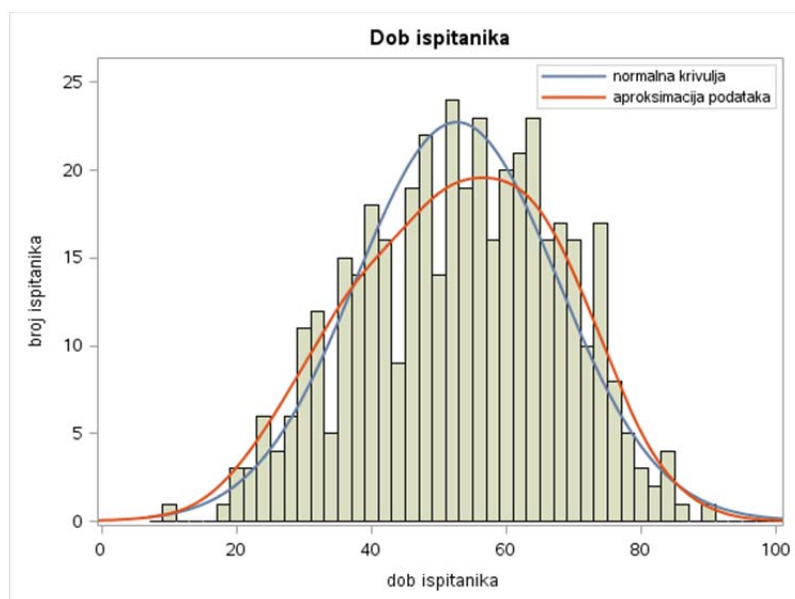
		n	% ukupni	% validni	% kumul.
Spol (N = 426)	muškarci	166	38,97	38,97	38,97
	žene	260	61,03	61,03	100,00
Lokalizacija (N = 423)	glava i vrat	33	7,75	7,80	7,80
	trup sprijeda	58	13,62	13,71	21,51
	trup straga i glutealno	172	40,38	40,66	62,17
	ruka i rame	70	16,43	16,55	78,72
	noga i kuk	88	20,66	20,80	99,53
	uška, subungv. i prsti	2	0,47	0,47	100,00
	oko	0	0,00	0,00	100,00
	nepoznato primarno sijelo	0	0,00	0,00	100,00
Tip (N = 327)	MIS	12	2,82	3,67	3,67
	SSM	266	62,44	81,35	85,02
	NM	13	3,05	3,98	88,99
	LMM	29	6,81	8,87	97,86
	ALM	5	1,17	1,53	99,39

		n	% ukupni	% validni	% kumul.
	nevoidni melanom	2	0,47	0,61	100,00
	dezmoplastični	0	0,00	0,00	100,00
Klasifikacija po Clarku (N = 409)	1	25	5,87	6,11	6,11
	2	222	52,11	54,28	60,39
	3	131	30,75	32,03	92,42
	4	30	7,04	7,33	99,76
	5	1	0,23	0,24	100,00
Klasifikacija po Breslowu (N = 426)	I	220	51,64	51,64	51,64
	II	206	48,36	48,36	100,00
	III	0	0,00	0,00	100,00
	IV	0	0,00	0,00	100,00
T stupanj prema TNM-u (N = 251)	T1a	70	16,43	27,89	27,89
	T1b	134	31,46	53,39	81,27
	T2a	40	9,39	15,94	97,21
	T2b	7	1,64	2,79	100,00
	T3a	0	0,00	0,00	100,00
	T3b	0	0,00	0,00	100,00
	T4a	0	0,00	0,00	100,00
	T4b	0	0,00	0,00	100,00
Tanki tumori (mm) (N = 426)	<0,5	116	13,74	27,23	27,23
	0,5–0,75	104	12,32	24,41	51,64
	0,76–1	111	13,15	26,06	77,70
	1,01–1,25	58	6,87	13,62	91,31
	1,26–1,5	37	4,38	8,69	100,00
Ulceracija (N = 247)	ne	234	54,93	94,74	94,74
	da	13	3,05	5,26	100,00
Limfokapilarna infiltracija (N = 243)	ne	240	56,34	98,77	98,77
	da	3	0,70	1,23	100,00
Regresija (N = 243)	ne	239	56,10	98,35	98,35
	da	4	0,94	1,65	100,00
Broj mitoza (N = 252)	bez mitoza	74	17,37	29,37	29,37
	1	113	26,53	44,84	74,21
	2–5	59	13,85	23,41	97,62

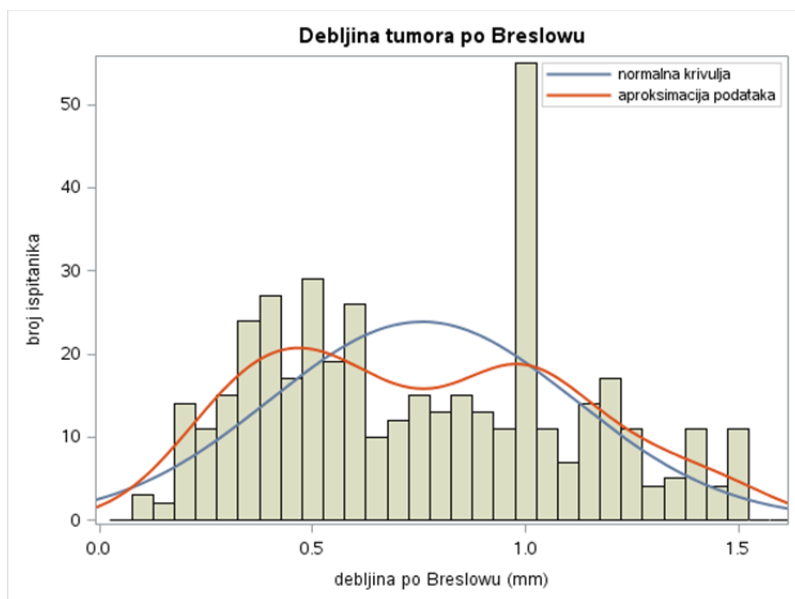
		n	% ukupni	% validni	% kumul.
	više od 5	6	1,41	2,38	100,00
Limfocitna infiltracija (N = 249)	nema	5	1,17	2,01	2,01
	oskudna	30	7,04	12,05	14,06
	srednje gusta	102	23,94	40,96	55,02
	gusta	112	26,29	44,98	100,00
Mikrosatelitoza (N = 246)	ne	236	55,40	95,93	95,93
	da	10	2,35	4,07	100,00

Tablica 18.b.

		Sentinel		Ukupno
		negativan	pozitivan	
Metastaze	negativne	134	0	134
	pozitivne	6	22	28
Ukupno		140	22	162



Slika 25.a. Distribucija bolesnika po dobi.



Slika 25.b. Distribucija debljine tumora.

Testiranje na normalnost izvršeno je Lillieforsovom verzijom Kolmogorov-Smirnovljevog testa, pri čemu je p -vrijednost i za starost i za debljinu tankih tumora po Breslowu bila manja od 0,01, što pokazuje da se ni starost ni debljina tankih tumora ne ponašaju kao normalne slučajne varijable.

5.9 Usporedba skupina ispitanika prema ishodu sentinel biopsije – tanki tumori

Tablica 19. a. i b. Karakteristične vrijednosti testirane grupe bolesnika

	Negativni (162)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	10	40	51	62	81	50,44	14,00
Debljina po Breslowu (mm)	0,32	0,91	1	1,23	1,5	1,03	0,29

	Pozitivni (22)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	26	46	50	62	70	51,73	12,39
Debljina po Breslowu (mm)	0,27	0,5	1	1,15	1,5	0,87	0,38

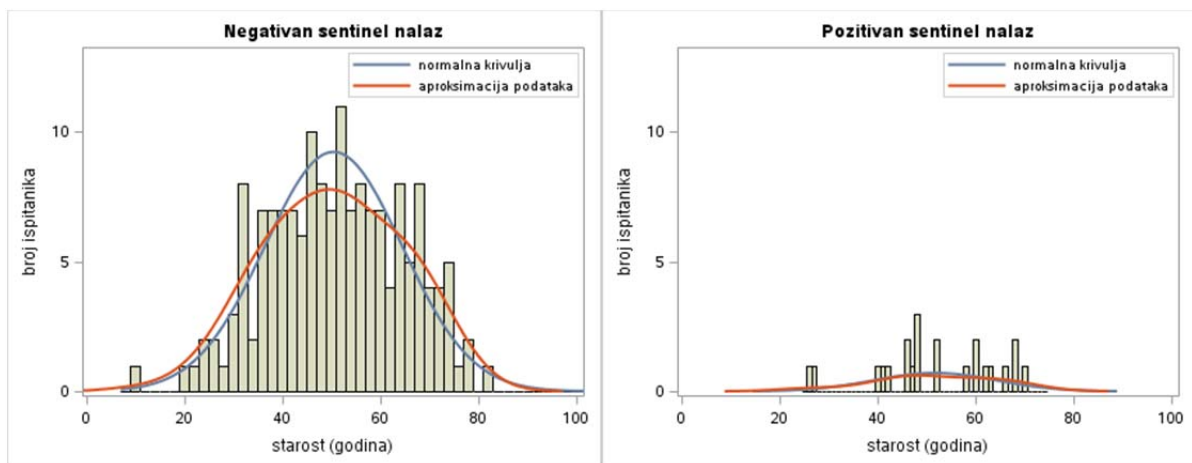
Tablica 20. Usporedba nominalnih i ordinalnih varijabli

		neg	%	poz	%	p-vrijednost
Spol (N = 184)	muškarci	67	89,33	8	10,67	0,8179
	žene	95	87,16	14	12,84	
Lokalizacija (N = 184)	glava i vrat	7	100,00	0	0,00	0,0293
	trup sprijeda	21	80,77	5	19,23	
	trup straga i glutealno	61	83,56	12	16,44	
	ruka i rame	32	100,00	0	0,00	
	noga i kuk	40	90,91	4	9,09	
	uška, subungv. i prsti	1	50,00	1	50,00	
	oko	0	NA	0	NA	
	nepoznato primarno sijelo	0	NA	0	NA	
Tip (N = 141)	MIS	1	50,00	1	50,00	0,5049
	SSM	107	87,70	15	12,30	
	NM	8	80,00	2	20,00	
	LMM	4	100,00	0	0,00	
	ALM	2	100,00	0	0,00	
	nevoidni melanom	1	100,00	0	0,00	
	dezmoplastični	0	NA	0	NA	
Klasifikacija po Clarku (N = 176)	1	1	33,33	2	66,67	0,0168
	2	49	89,09	6	10,91	
	3	82	91,11	8	8,89	
	4	24	88,89	3	11,11	
	5	0	0,00	1	100,00	
Klasifikacija po Breslowu (N = 184)	I	25	75,76	8	24,24	0,0231
	II	137	90,73	14	9,27	
	III	0	NA	0	NA	
	IV	0	NA	0	NA	
T stupanj prema TNM klasifikaciji (N = 101)	T1a	10	71,43	4	28,57	0,0240
	T1b	37	86,05	6	13,95	
	T2a	36	97,30	1	2,70	
	T2b	5	71,43	2	28,57	
	T3a	0	NA	0	NA	
	T3b	0	NA	0	NA	
	T4a	0	NA	0	NA	
	T4b	0	NA	0	NA	
Tanki tumori (mm)	<0,5	10	66,67	5	33,33	0,0002
	0,5–0,75	15	83,33	3	16,67	

		neg	%	poz	%	p-vrijednost
(N = 184)	0,76–1	60	89,55	7	10,45	
	1,01–1,25	44	91,67	4	8,33	
	1,26–1,5	33	91,67	3	8,33	
Ulceracija (N = 101)	ne	82	90,11	9	9,89	0,0230
	da	6	60,00	4	40,00	
Limfokapilarna infiltracija (N = 99)	ne	85	87,63	12	12,37	1
	da	2	100,00	0	0,00	
Regresija (N = 99)	ne	87	87,88	12	12,12	NA
	da	0	NA	0	NA	
Broj mitoz (N = 102)	bez mitoz	12	70,59	5	29,41	0,0357
	1	38	92,68	3	7,32	
	2–5	35	89,74	4	10,26	
	više od 5	3	60,00	2	40,00	
Limfocitna infiltracija (N = 103)	nema	2	100,00	0	0,00	0,0133
	oskudna	6	54,55	5	45,45	
	srednje gusta	37	88,10	5	11,90	
	gusta	45	93,75	3	6,25	
Mikrosatelitoza (N = 102)	ne	85	90,43	9	9,57	0,0503
	da	5	62,50	3	37,50	

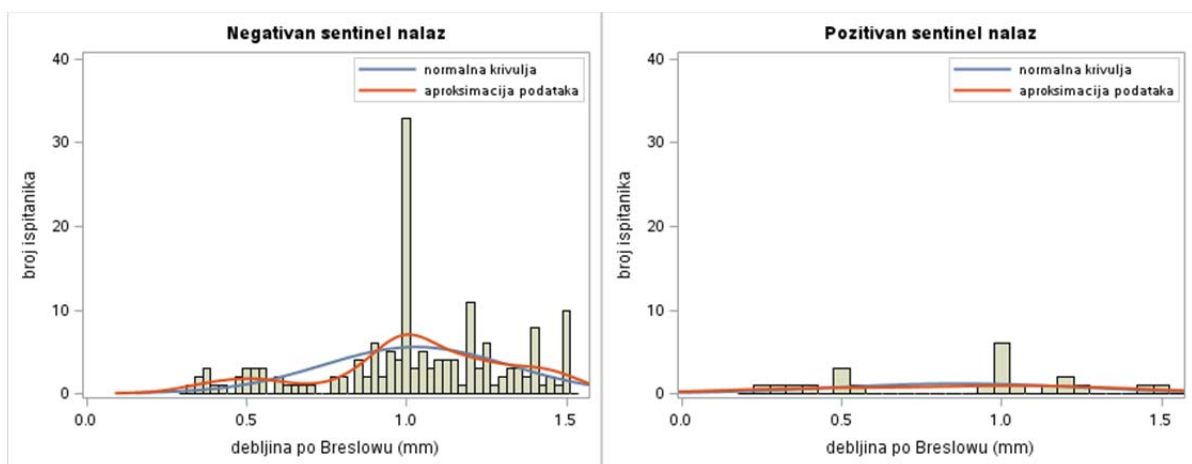
Za testiranje hipoteza korišten je Pearsonov egzaktni χ^2 test kad god su svi podaci, odnosno očekivane vrijednosti svih podataka (na ovo upozori softver) u odgovarajućoj tablici veći ili jednaki 5, a u ostalim slučajevima korišten je Fisherov egzaktni test (ovaj put nije bila potrebna Monte-Carlo aproksimacija za p -vrijednost).

Statistički nema značajnih razlika u očekivanju pozitivnog i negativnog sentinela za spol, tip tumora, limfokapilarnu invaziju i mikrosatelitozu jer su p -vrijednosti veće ili jednake 0,05. Za mikrosatelitozu ($p=0,0503$), treba naglasiti da je riječ o graničnoj p vrijednosti. Za sve ostale parametre, unutar pojedinog parametra postoji značajna razlika u očekivanju pozitivnog i negativnog sentinela između pojedinih podgrupa i to za: tanke tumore ($p=0,0002$), limfocitnu infiltraciju ($p=0,0133$), Clark ($p=0,0168$), ulceraciju ($p=0,0230$), Breslow ($p=0,0231$), T stupanj ($p=0,0240$), lokalizaciju ($p=0,0293$) i broj mitoz ($p=0,0357$).



Slika 26. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarne dobi bolesnika kod negativnog (a.) i pozitivnog (b.) ishoda sentinel biopsije.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza je li očekivanje dobi pacijenata s negativnim sentinelom jednako očekivanju dobi pacijenata s pozitivnim sentinelom. Dobivena je p -vrijednost 0,6836, što znači da na razini značajnosti od 5% ne možemo odbaciti tu hipotezu, tj. statistički nema značajne razlike u očekivanjima dobi pacijenata s negativnim i pozitivnim sentinelom.



Slika 27. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnih vrijednosti debljina tumora kod negativnog (a.) i pozitivnog (b.) ishoda sentinel biopsije.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza jesu li očekivanja debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim sentinelom i pacijenata s pozitivnim sentinelom jednaka. Dobivena je p -vrijednost 0,0209, što znači da na razini važnosti od 5% tu hipotezu odbacujemo, tj. statistički je bitna razlika u očekivanju debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim i pozitivnim sentinelom.

Tablica 21.a. Logistička regresija za pozitivan ishod sentinela

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	1,234	0,490–3,107		
Starost (god.)	1,007	0,975–1,040		
Lokalizacija – glava i vrat vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,826	0,260–2,623	0,621	0,182–2,113
Lokalizacija – ruka i rame vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija – noga i kuk vs. trup sprijeda	0,420	0,102–1,732	0,253	0,053–1,199
Lokalizacija – uška, subungv. vs. trup sprijeda	4,200	0,222–79,319	4,869	0,242–98,059
Tip – SSM vs. MIS	0,140	0,008–2,361	0,148	0,008–2,578
Tip – NM vs. MIS	0,250	0,010–5,985	0,258	0,010–6,469
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip – ALM vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip – dezoplastični vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,061*	0,005–0,781	0,060*	0,005–0,784
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	0,049*	0,004–0,599	0,046*	0,004–0,579
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	0,062*	0,004–0,915	0,059*	0,004–0,906
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	>1000	<0,001– >1000	>1000	<0,001– >1000
Debljina po Breslowu (mm)	0,200*	0,050–0,808	0,180*	0,043–0,749
Klasifikacija po Breslowu II vs. I	0,319*	0,121–0,840	0,282*	0,104–0,769
Tanki tumori 0,5–0,75 mm vs. <0,5 mm	0,400	0,078–2,061	0,460	0,086–2,449
Tanki tumori 0,76–1 mm vs. <0,5 mm	0,233*	0,062–0,881	0,229*	0,060–0,880
Tanki tumori 1,01–1,25 mm vs. <0,5 mm	0,182*	0,041–0,801	0,167*	0,037–0,749
Tanki tumori 1,26–1,5 mm vs. <0,5 mm	0,182*	0,037–0,897	0,184*	0,037–0,914
TNM – T1b vs. T1a	0,405	0,096–1,720	0,414	0,094–1,811
TNM – T2a vs. T1a	0,069*	0,007–0,693	0,069*	0,007–0,689
TNM – T2b vs. T1a	1,000	0,134–7,451	0,978	0,128–7,501
Broj mitozu 1 vs. 0	0,189*	0,039–0,912	0,181*	0,037–0,890
Broj mitozu	0,274	0,063–1,192	0,277	0,064–1,208

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
2–5 vs. 0				
Broj mitozā >5 vs. 0	1,600	0,202–12,694	1,733	0,213–14,121
Ulceracija (da vs. ne)	6,075*	1,439–25,647	6,372*	1,432–28,365
Limfocitna infiltracija bez vs. gusta	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Limfocitna infiltracija oskudna vs. gusta	12,500*	2,363–66,114	12,942*	2,416–69,336
Limfocitna infiltracija srednje gusta vs. gusta	2,027	0,454–9,048	2,073	0,459–9,358
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	5,667*	1,158–27,728	5,811*	1,157–29,184

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za dob i spol.

Postoje statistički značajne razlike prema najtanjim tumorima do 0,5 mm za sve ostale skupine tankih tumora veće od 0,75 mm, tako što je kod tumora tanjih od 0,5 mm bila značajnije veća vjerojatnost pozitivnog sentinela, po skupinama: 0,76 – 1 mm (OR = 0,233; 95% CI = 0,062 – 0,881); 1,01 – 1,25 mm (OR = 0,182; 95% CI = 0,041 – 0,801); 1,26 – 1,5 mm (OR = 0,182; 95% CI = 0,037 – 0,897). Prisutnost ulceracija pokazala je čak 6 puta veću vjerojatnost pozitiviteta sentinel čvora (OR = 6,075; 95% CI = 1,439 – 25,647), a mikrosatelitoze 5,6 puta veću vjerojatnost (OR = 5,667; 95% CI = 1,158 – 27,728).

Razine prodora po Clarku II, III i IV u odnosu na razinu I pokazale su značajnu razliku vezano za ishod sentinela: Clark II (OR = 0,061; 95% CI = 0,005 – 0,781); Clark III (OR = 0,049; 95% CI = 0,004 – 0,599) i Clark IV (OR = 0,062; 95% CI = 0,004 – 0,915). Kod prisutne oskudne limfocitne infiltracije, vjerojatnost pozitivnog ishoda je bila čak 12,5 puta veća u odnosu na one tumore kod kojih je pronađena gusta infiltracija (OR = 0,500; 95% CI = 2,363 – 66,114).

Tablica 21.b. Logistička regresija za pozitivan ishod sentinela

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR***	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	1,376	0,534–3,544	1,044	0,272–4,011
Starost (god.)	1,010	0,977–1,045	1,006	0,954–1,062
Lokalizacija glava i vrat vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,857	0,266–2,761	1,049	0,167–6,598
Lokalizacija ruka i rame vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR***	95% CI (AOR)
Lokalizacijanoga i kuk vs. trup sprijeda	0,431	0,103–1,802	0,356	0,034–3,735
Lokalizacija uška, subungv. vs. trup sprijeda	4,038	0,183–89,087	>1000	<0,001–>1000
Lokalizacija oko vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Lokalizacija nepoznato primarno sijelo vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Tip – SSM vs. MIS	0,339	0,018–6,451	0,529	0,025–11,275
Tip – NM vs. MIS	0,935	0,030–29,601	0,659	0,010–42,053
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip – ALM vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip nevoidni melanoma vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip dezplastični vs. MIS	NA	NA	NA	NA
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,097	0,007–1,401	0,117	0,007–1,877
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	0,106	0,006–1,919	0,063	0,002–2,012
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	0,152	0,006–3,643	0,308	0,005–17,572
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	>1000	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Broj mitozu 1 vs. 0	0,250	0,047–1,347		
Broj mitozu 2–5 vs. 0	0,938	0,151–5,822		
Broj mitozu >5 vs. 0	8,877	0,681–115,784		
Ulceracija (da vs. ne)	15,888*	2,390–105,608		
Limfocitna infiltracija bez vs. gusta	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Limfocitna infiltracija oskudna vs. gusta	18,530*	2,815–121,957	14,044*	1,810–108,986
Limfocitna infiltracija srednje gusta vs. gusta	1,333	0,270–6,587	1,392	0,254–7,613
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	5,378	0,905–31,964	6,807	0,880–52,640

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za debljinu po Breslowu; ***AOR standardiziran za debljinu po Breslowu, broj mitozu i ulceraciju.

Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za pozitivan sentinel nalaz

U trećem koraku testiranja dodane su ove varijable sa značajnošću od 5% (Tablica 22.):

Tablica 22.

	χ^2 vrijednost	p-vrijednost
Mikrosatelitoza	2,9977	0,0834
Debljina po Breslowu (mm)	8,2471	0,0041
Ulceracija	7,5805	0,0059

što je dalo maksimalni reskalirani R^2 test 0,4470.

Model (samo s uvrštenim značajnim varijablama) u tom slučaju glasi:

$$P(x_1, x_2, x_3) = \frac{e^{1,4184 x_1 - 3,4543 x_2 + 2,7953 x_3 + 0,2275}}{1 + e^{1,4184 x_1 - 3,4543 x_2 + 2,7953 x_3 + 0,2275}}$$

gdje je x_1 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_2 debljina tumora po Breslowu, x_3 ulceracija (0 = ne, 1 = da).

Tablica 22.a. Granične vrijednosti za cp

Granični cp	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,100	10	64	24	2	74,0	83,3	72,7	70,6	3,0
0,125	9	67	21	3	76,0	75,0	76,1	70,0	4,3
0,150	8	69	19	4	77,0	66,7	78,4	70,4	5,5
0,175	6	71	17	6	77,0	50,0	80,7	73,9	7,8
0,200	6	76	12	6	82,0	50,0	86,4	66,7	7,3
0,225	6	78	10	6	84,0	50,0	88,6	62,5	7,1
0,250	5	79	9	7	84,0	41,7	89,8	64,3	8,1

U prethodnoj tablici vidljivo je da cp mora biti nizak, oko 0,125 ako želimo razumnu prognozu ishoda.

U sljedećem koraku izbačena je kao varijabla sa značajnošću manjom od 5% mikrosatelitoza, tako da finalni model ima samo dvije varijable (Tablica 23.).

Tablica 23.

	χ^2 vrijednost	p-vrijednost
Debljina po Breslowu (mm)	7,3744	0,0066
Ulceracija	13,7515	0,0039

Takav model jako dobro opisuje varijablu sentinel (Hosmer i Lemeshow test dobrote aproksimacije (engl. goodness of fit) jer daje razumnu χ^2 vrijednost 4,6612 i p -vrijednost 0,7931. Jednako tako maksimalni reskalirani R^2 test je 0,3928.

Model (samo s uvrštenom debljinom po Breslowu i ulceracijom) glasi:

$$P(x_1, x_2) = \frac{e^{-3,2797 x_1 + 2,7655 x_2 + 0,4320}}{1 + e^{-3,2797 x_1 + 2,7655 x_2 + 0,4320}}$$

x_1 debljina tumora po Breslowu, x_2 ulceracija (0 = ne, 1 = da).

Tablica 23.a. Granične vrijednosti za cp

Granični cp	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,100	10	63	25	3	72,3	76,9	71,6	71,4	4,5
0,125	10	65	23	3	74,3	76,9	73,9	69,7	4,4
0,150	10	67	21	3	76,2	76,9	76,1	67,7	4,3
0,175	10	68	20	3	77,2	76,9	77,3	66,7	4,2
0,200	8	70	18	5	77,2	61,5	79,5	69,2	6,7
0,225	6	71	17	7	76,2	46,2	80,7	73,9	9,0
0,250	5	76	12	8	80,2	38,5	86,4	70,6	9,5

U prethodnoj tablici vidljivo je da cp mora biti približno 0,175 ako želimo razumnu prognozu.

5.10 Usporedba skupina ispitanika prema metastatskom razvoju bolesti – tanki tumori

Tablica 24. Karakteristične vrijednosti testirane grupe bolesnika

	Negativni (362)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	10	41	53	64	89	52,87	15,14
Debljina po Breslowu (mm)	0,11	0,43	0,67	1	1,5	0,71	0,33

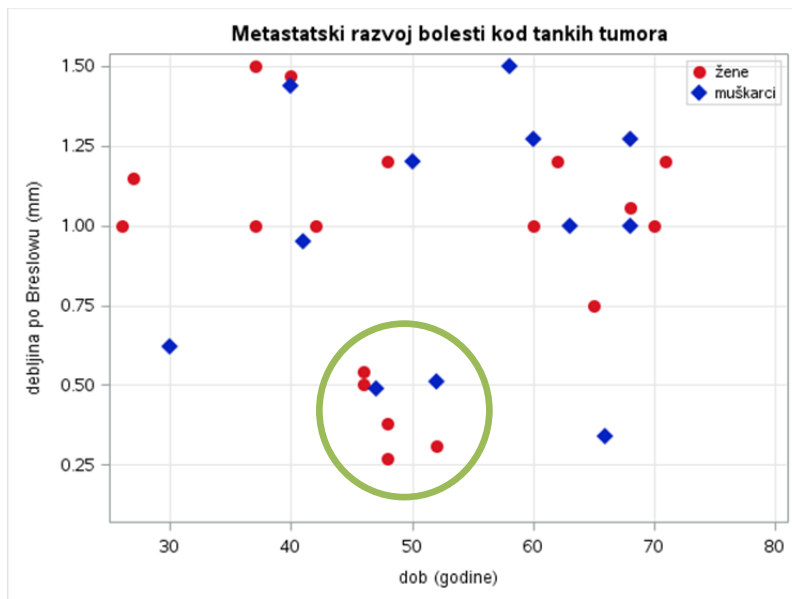
	Pozitivni (30)						
	Min	25%	Med	75%	Max	\bar{X}	SD
Dob (god.)	26	41	49	63	71	51,20	13,23
Debljina po Breslowu (mm)	0,27	0,54	1	1,2	1,5	0,94	0,380

Tablica 25. Usporedba nominalnih i ordinalnih varijabli

		neg	%	poz	%	p-vrijednost
Spol (N = 392)	muškarci	145	92,36	12	7,64	1
	žene	217	92,34	18	7,66	
Lokalizacija (N = 390)	glava i vrat	32	100,00	0	0,00	0,0002
	trup sprijeda	48	88,89	6	11,11	
	trup straga i glutealno	143	90,51	15	9,49	
	ruka i rame	64	100,00	0	0,00	
	noga i kuk	73	91,25	7	8,75	
	uška, subungv. i prsti	0	0,00	2	100,00	
	oko	0	NA	0	NA	
	nepoznato primarno sijelo	0	NA	0	NA	
Tip (N = 307)	MIS	9	90,00	1	10,00	0,4015
	SSM	231	92,03	20	7,97	
	NM	11	84,62	2	15,38	
	LMM	27	100,00	0	0,00	
	ALM	4	100,00	0	0,00	
	nevoidni melanom	2	100,00	0	0,00	
	dezmoplastični	0	NA	0	NA	
Klasifikacija po Clarku (N = 376)	1	20	90,91	2	9,09	0,0044
	2	204	95,77	9	4,23	
	3	105	89,74	12	10,26	
	4	19	82,61	4	17,39	
	5	0	0,00	1	100,00	
Klasifikacija po Breslowu (N = 392)	I	204	95,33	10	4,67	0,0209
	II	158	88,76	20	11,24	
	III	0	NA	0	NA	
	IV	0	NA	0	NA	
T stupanj prema TNM klasifikaciji (N = 239)	T1a	62	93,94	4	6,06	0,0447
	T1b	126	95,45	6	4,55	
	T2a	31	88,57	4	11,43	

		neg	%	poz	%	p-vrijednost
	T2b	4	66,67	2	33,33	
	T3a	0	NA	0	NA	
	T3b	0	NA	0	NA	
	T4a	0	NA	0	NA	
	T4b	0	NA	0	NA	
Tanki tumori (mm) (N = 392)	<0,5	105	95,45	5	4,55	0,0107
	0,5–0,75	99	95,19	5	4,81	
	0,76–1	97	92,38	8	7,62	
	1,01–1,25	41	87,23	6	12,77	
	1,26–1,5	20	76,92	6	23,08	
Ulceracija (N = 235)	ne	211	94,62	12	5,38	0,0052
	da	8	66,67	4	33,33	
Limfokapilarna infiltracija (N = 232)	ne	214	93,45	15	6,55	1
	da	3	100,00	0	0,00	
Regresija (N = 232)	ne	213	93,42	15	6,58	1
	da	4	100,00	0	0,00	
Broj mitoz (N = 240)	bez mitoz	65	92,86	5	7,14	0,0013
	1	109	97,32	3	2,68	
	2–5	46	88,46	6	11,54	
	više od 5	3	50,00	3	50,00	
Limfocitna infiltracija (N = 236)	nema	5	100,00	0	0,00	0,0249
	oskudna	22	78,57	6	21,43	
	srednje gusta	91	93,81	6	6,19	
	gusta	102	96,23	4	3,77	
Mikrosatelitoza (N = 233)	ne	212	94,64	12	5,36	0,0144
	da	6	66,67	3	33,33	

Statistički nema znatnih razlika u očekivanju pozitivnog i negativnog razvoja metastatske bolesti za spol, tip melanoma, limfokapilarnu infiltraciju i regresiju, jer su *p*-vrijednosti veće ili jednake 0,05. Kod različite lokalizacije tumora ($p=0,0002$), broja mitoz ($p=0,0013$), razina prodora po Clarku ($p=0,0044$), prisutnosti ulceracije ($p=0,0052$), mikrosatelitoza ($p=0,0144$), limfocitne infiltracije ($p=0,0249$), te debljine po Breslowu ($p=0,0209$) kao i skupina tankih tumora stratificiranih prema debljini ($p=0,0107$) postoji značajna razlika među podgrupama u očekivanju metastatskog ishoda.



Slika 28. Pozitivan metastatski ishod prema dobi kod tumora tanjih od 1,5 mm.

Zeleni krug – za objašnjenje je provedeno statističko testiranje testom ANOVA (statistički test kojim se mjere razlike u očekivanjima skupina ispitanika, testira se zapravo na to jesu li očekivanja grupa jednaka). Ispitanici su grupirani u skupine:

do 15 godina (skupina 1, nema ih s metastaziranim tumorima debljine do 1,5 mm)

od 15 – 25 godina (skupina 2, nema ih s metastaziranim tumorima debljine do 1,5 mm)

od 25 – 35 godina (skupina 3)

od 35 – 45 godina (skupina 4)

od 45 – 55 godina (skupina 5)

od 55 – 65 godina (skupina 6)

od 65 – 75 godina (skupina 7)

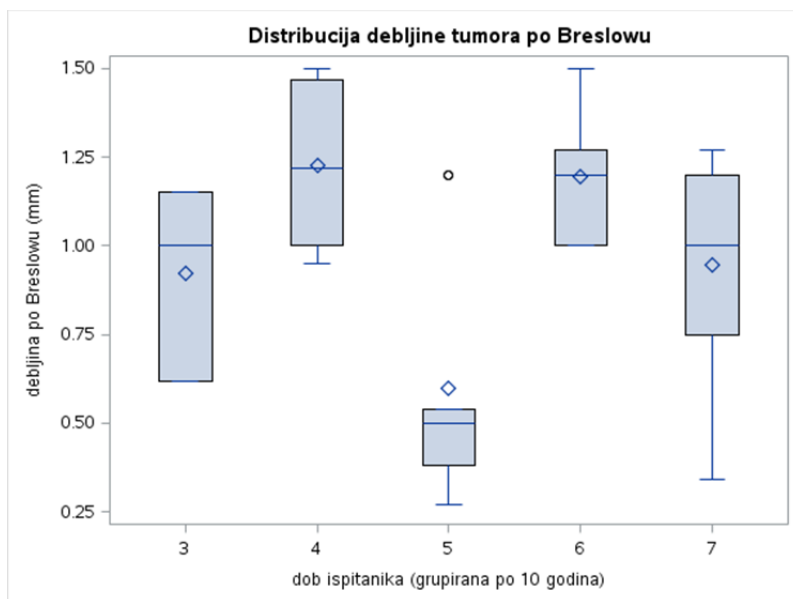
preko 75 godina (skupina 8, nema ih s metastaziranim tumorima debljine do 1,5 mm).

ANOVA test je pokazao da barem jedna grupa ima različito očekivanje debljine od ostalih (p -vrijednost 0,0038). Tukeyevim testom izvršeno je uspoređivanje grupa (test uspoređuje sve moguće parove grupa, značajan rezultat samo ako je -1 ili 1 unutar intervala).

Tablica 26. Razlike u očekivanjima metastatske bolesti prema dobnim skupinama

Usporedbe različite na razini značajnosti 0,05 označene s ***				
Usporedba grupa	Razlika u očekivanju	Istovremene 95% granice pouzdanosti		
4 – 6	0,0327	-0,5032	0,5686	
4 – 7	0,2818	-0,2106	0,7742	
4 – 3	0,3033	-0,3225	0,9291	
4 – 5	0,6267	0,1602	1,0931	***
6 – 4	-0,0327	-0,5686	0,5032	
6 – 7	0,2491	-0,2691	0,7673	
6 – 3	0,2707	-0,3756	0,9170	
6 – 5	0,5940	0,1004	1,0876	***
7 – 4	-0,2818	-0,7742	0,2106	
7 – 6	-0,2491	-0,7673	0,2691	
7 – 3	0,0215	-0,5892	0,6322	
7 – 5	0,3449	-0,1011	0,7909	
3 – 4	-0,3033	-0,9291	0,3225	
3 – 6	-0,2707	-0,9170	0,3756	
3 – 7	-0,0215	-0,6322	0,5892	
3 – 5	0,3233	-0,2667	0,9133	
5 – 4	-0,6267	-1,0931	-0,1602	***
5 – 6	-0,5940	-1,0876	-0,1004	***
5 – 7	-0,3449	-0,7909	0,1011	
5 – 3	-0,3233	-0,9133	0,2667	

što je vidljivo i iz dijagrama pravokutnika (Slika 29.).

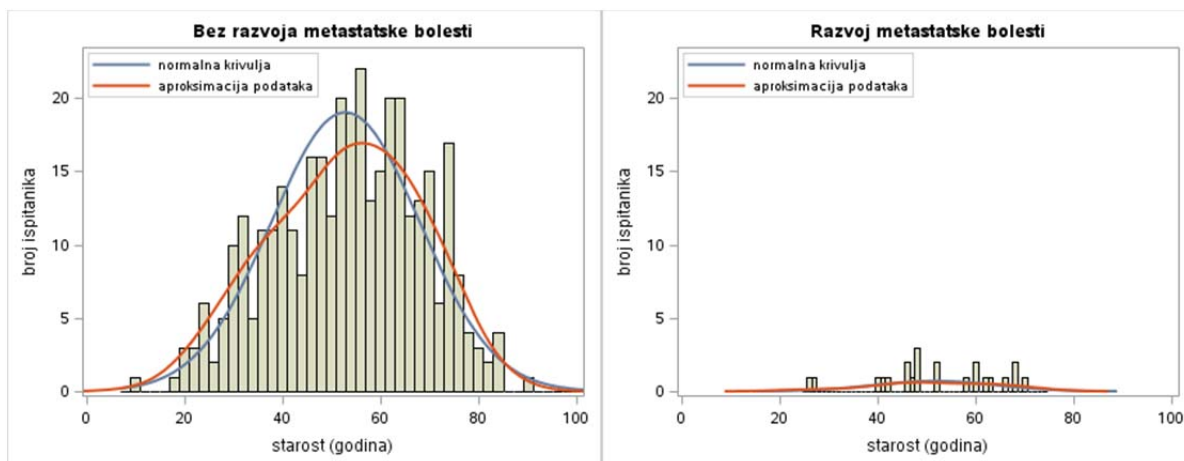


Slika 29. Grafički prikaz očekivanja razvoja metastaza po definiranim dobnim skupinama.

Na prethodnoj slici rombovima su označene očekivane (aritmetička sredina) debljine tumora u grupi, dok je vodoravna crta unutar pravokutnika medijan grupe.

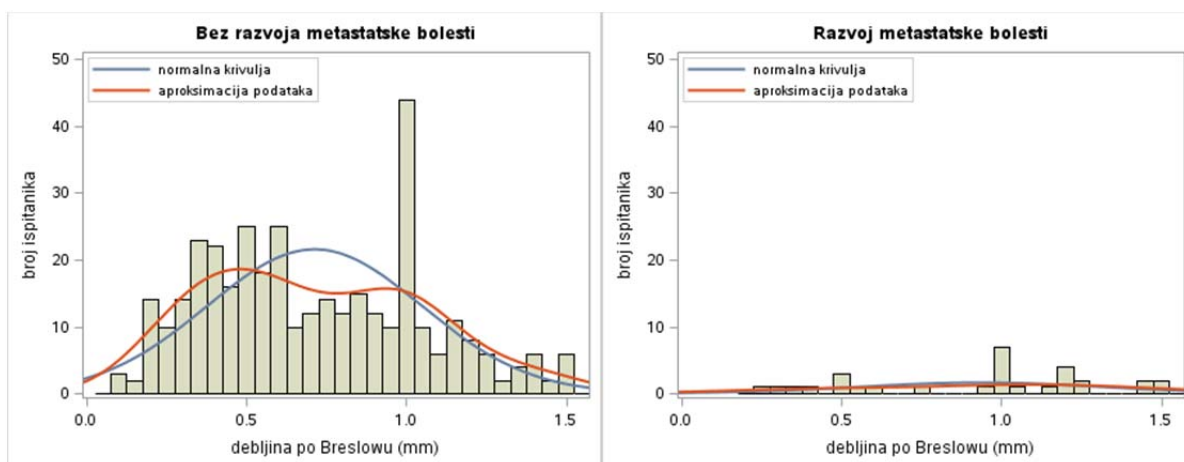
Tablica 27.

Grupa	Broj ispitanika	\bar{X}	MED
3	3	0,9233333	1,00
4	6	1,2266667	1,22
5	9	0,6000000	0,50
6	5	1,1940000	1,20
7	7	0,9448571	1,00



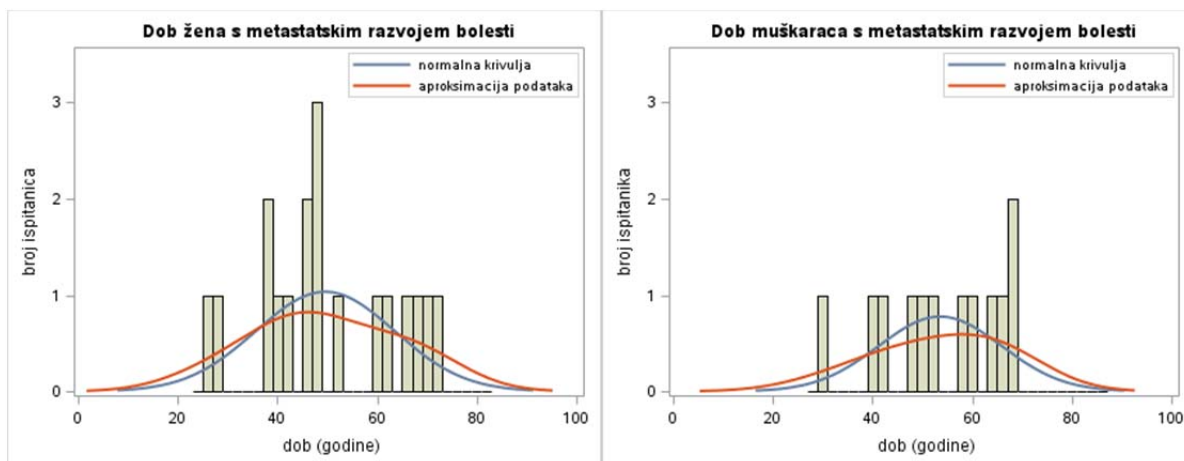
Slika 30. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarne dobi bolesnika kod negativnog (a.) i pozitivnog (b.) ishoda metastatske bolesti.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza je li očekivanje dobi pacijenata s negativnim metastazama jednako očekivanju dobi pacijenata s pozitivnim metastazama. Dobivena je p -vrijednost 0,5592, što znači da na razini važnosti od 5% ne možemo odbaciti tu hipotezu, tj. statistički nema značajne razlike u očekivanjima dobi pacijenata s negativnim i pozitivnim metastazama.



Slika 31. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnih vrijednosti debljina tumora kod negativnog (a.) i pozitivnog (b.) ishoda metastatske bolesti.

Korištenjem Studentovog t-testa testirana je hipoteza jesu li očekivanja debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim metastazama i pacijenata s pozitivnim metastazama jednaka. Dobivena je p -vrijednost $< 0,0006$, što znači da na razini značajnosti od 5% tu hipotezu odbacujemo, tj. statistički je značajna razlika u očekivanju debljine tumora po Breslowu pacijenata s negativnim i pozitivnim metastazama.



Slika 32. a. i b. Usporedba normalne slučajne varijacije i stvarnog metastatskog ishoda prema dobi kod žena (a.) i muškaraca (b.).

Na Slici 32. vidi se da je došlo do bitnog pada razvoja bolesti kod žena u dobi 52 – 60 godina, a kod muškaraca u dobi 52 – 58 godina.

Tablica 28.a. Logistička regresija za razvoj metastatske bolesti

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	1,002	0,469–2,143		
Starost (god.)	0,993	0,968–1,017		
Lokalizacija – glava i vrat vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Lokalizacija – trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,839	0,308–2,285	0,822	0,294–2,300
Lokalizacija – ruka i rame vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Lokalizacija – noga i kuk vs. trup sprijeda	0,767	0,243–2,422	0,686	0,201–2,339
Lokalizacija – uška, subungv. vs. trup sprijeda	>1000	<0,001–>1000	>1000	<0,001–>1000
Tip – SSM vs. MIS	0,779	0,094–6,465	0,778	0,093–6,497
Tip – NM vs. MIS	1,636	0,127–21,104	1,550	0,119–20,207
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip – ALM vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Tip nevoidni melanom vs. MIS	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,441	0,089–2,184	0,413	0,082–2,072
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	1,143	0,237–5,501	1,053	0,215–5,153
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	2,105	0,345–12,861	1,930	0,310–12,025
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	>1000	<0,001–>1000	>1000	<0,001–>1000

Karakteristika	OR	95% CI (OR)	AOR**	95% CI (AOR)
Debljina po Breslowu (mm)	6,521*	2,145–19,821	6,429	2,098–19,697
Klasifikacija po Breslowu II vs. I	2,582*	1,175–5,673	2,535*	1,150–5,589
Tanki tumori 0,5–0,75 mm vs. <0,5 mm	1,061	0,298–3,775	1,000	0,276–3,622
Tanki tumori 0,76–1 mm vs. <0,5 mm	1,732	0,548–5,475	1,630	0,505–5,267
Tanki tumori 1,01–1,25 mm vs. <0,5 mm	3,073	0,889–10,625	2,991	0,863–10,363
Tanki tumori 1,26–1,5 mm vs. <0,5 mm	6,300*	1,752–22,648	6,051*	1,641–22,316
TNM – T1b vs. T1a	0,738	0,201–2,711	0,677	0,175–2,620
TNM – T2a vs. T1a	2,000	0,468–8,538	1,894	0,439–8,171
TNM – T2b vs. T1a	7,750*	1,075–55,891	7,718*	1,066–55,857
Broj mitozu 1 vs. 0	0,358	0,083–1,547	0,316	0,070–1,425
Broj mitozu 2–5 vs. 0	1,696	0,488–5,892	1,567	0,434–5,661
Broj mitozu >5 vs. 0	13,00*	2,063–81,916	13,82*	2,157–88,554
Ulceracija (da vs. ne)	8,791*	2,316–33,365	8,940*	2,314–34,541
Limfocitna infiltracija bez vs. gusta	<0,001	<0,001–>1000	<0,001	<0,001–>1000
Limfocitna infiltracija oskudna vs. gusta	6,955*	1,809–26,731	7,383*	1,892–28,813
Limfocitna infiltracija srednje gusta vs. gusta	1,681	0,460–6,147	1,678	0,458–6,157
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	8,834*	1,965–39,710	8,670*	1,919–39,163

*Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za dob i spol.

Postoje statistički znatne razlike prema najtanjim tumorima do 0,5 mm, i to samo za podgrupu najdebljih tankih tumora od 1,26 – 1,5 mm (OR = 6,300; 95% CI = 1,752 – 22,648) i debljinu po Breslowu (OR = 6,521; 95% CI = 2,145 – 19,821) kod kojih je više od 6 puta bila veća vjerojatnost metastaziranja. Znatne razlike su dokazane i za prisutnost ulceracije (OR = 8,791; 95% CI = 2,316 – 33,365), mikrosatelitoza (OR = 8,834; 95% CI = 1,965 – 39,710), kod kojih je prisutnost ovih čimbenika značila skoro 9 puta veću vjerojatnost metastatskog ishoda. Oskudna u odnosu na gustu limfocitnu infiltraciju imala je skoro 7 puta veću vjerojatnost (OR = 6,955; 95% CI = 1,809 – 26,731), dok su tumori mitotskog indeksa od 5 i više mitozu/mm² u odnosu na one bez mitozu imali čak 13 puta veću šansu (OR = 13,000; 95% CI = 2,063 – 81,916).

Tablica 28.a. Logistička regresija za razvoj metastatske bolesti

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR***	95% CI (AOR)
Spol (ž vs. m)	1,050	0,484–2,276	0,589	0,205– 1,696
Starost (god.)	0,997	0,971– 1,023	1,001	0,966– 1,038
Lokalizacija glava i vrat vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija trup straga i glutealno vs. trup sprijeda	0,784	0,281–2,192	1,317	0,261–6,650
Lokalizacija ruka i rame vs. trup sprijeda	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Lokalizacija noga i kuk vs. trup sprijeda	0,773	0,238–2,506	1,245	0,208–7,459
Lokalizacija uška, subungv. vs. trup sprijeda	>1000	<0,001– >1000	>1000	<0,001– >1000
Lokalizacija oko vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Lokalizacija nepoznato primarno sijelo vs. trup sprijeda	NA	NA	NA	NA
Tip – SSM vs. MIS	0,386	0,040–3,689	0,506	0,050–5,145
Tip – NM vs. MIS	0,495	0,029–8,476	0,261	0,008–8,690
Tip – LMM vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip – ALM vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip nevoidni melanom vs. MIS	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000
Tip dezmostoplastični vs. MIS	NA	NA	NA	NA
Klasifikacija po Clarku 2 vs. 1	0,171	0,029–1,009	0,186	0,026–1,341
Klasifikacija po Clarku 3 vs. 1	0,190	0,026–1,415	0,136	0,008–2,186
Klasifikacija po Clarku 4 vs. 1	0,243	0,024–2,504	0,457	0,019–10,951
Klasifikacija po Clarku 5 vs. 1	>1000	<0,001– >1000	>1000	<0,001– >1000
Broj mitozu 1 vs. 0	0,333	0,075–1,473		
Broj mitozu 2 – 5 vs. 0	1,371	0,317–5,923		
Broj mitozu >5 vs. 0	10,118*	1,309–78,219		
Ulceracija (da vs. ne)	7,298*	1,732– 30,760		
Limfocitna infiltracija bez vs. gusta	<0,001	<0,001– >1000	<0,001	<0,001– >1000

Karakteristika	AOR**	95% CI (AOR)	AOR***	95% CI (AOR)
Limfocitna infiltracija oskudna vs. gusta	7,360*	1,884–28,757	5,564*	1,318–23,489
Limfocitna infiltracija srednje gusta vs. gusta	1,842	0,498–6,814	2,256	0,581–8,758
Mikrosatelitoza (da vs. ne)	8,315*	1,819– 38,008	7,005*	1,260– 38,946

* Statistički značajan rezultat na razini $\alpha = 0,05$; **AOR standardiziran za debljinu po Breslowu; ***AOR standardiziran za debljinu po Breslowu, broj mitoza i ulceraciju.

5.11 Logistička regresija za određivanje varijabli značajnih za metastatski razvoj bolesti – tanki tumori

Finalni model ima samo dvije varijable (sa značajnošću od 5%) (Tablica 29.):

Tablica 29.

	χ^2 vrijednost	p-vrijednost
Mikrosatelitoza	19,3989	<0,0001
Ulceracija	4,4093	0,0357

Takav model dobro ne opisuje varijablu metastaze [Hosmer i Lemeshow test dobrote aproksimacije (engl. goodness of fit)] jer daje razumnu χ^2 vrijednost 0,0832 dok p -vrijednost nije u stanju izračunati zbog nedostatka podataka. Jednako tako maksimalni reskalirani R^2 test je 0,1582.

Model (samo sa značajnim varijablama) glasi:

$$P(x_1, x_2) = \frac{e^{2,0254 x_1 + 2,0061 x_2 - 3,0754}}{1 + e^{2,0254 x_1 + 2,0061 x_2 - 3,0754}}$$

x_1 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_2 ulceracija (0 = ne, 1 = da).

Tablica 29.a. Granične vrijednosti za cp

Granični cp	Korektno klasificirani		Nekorektno klasificirani		Postoci				
	poz.	neg.	poz.	neg.	korektni	osj_poz	osj_neg	l_poz	l_neg
0,150	6	205	12	9	90,9	40,0	94,5	66,7	4,2
0,175	4	205	12	11	90,1	26,7	94,5	75,0	5,1
0,200	1	205	12	14	88,8	6,7	94,5	92,3	6,4
0,300	1	216	1	14	93,5	6,7	99,5	50,0	6,1

Ova se tablica bitno razlikuje s obzirom na sve prethodne, jer uključuje dvije varijable koje imaju svaka po samo dva moguća ishoda, pa su u tablici naznačene samo granice promjena. Budući da je vrijednost korektno i nekorektno klasificiranih ishoda jednaka za sve vrijednosti $cp \leq 0,150$, a svi veći cp -ovi nemaju nikakvog smisla jer vrlo loše predviđaju metastatski razvoj bolesti, vjerojatno je izbor 0,150 najbolji izbor za cp .

Tablica 30. Usporedba omjera šansi za sve i usporedno tanke tumore za ishod sentinela i metastatskog ishoda

Tanki tm.	OR SLNB	AOR dob/spol	AOR deb.	AOR debljina mitoza /ulcerac.	OR SLNB	AOR dob/spol	AOR deb.	AOR debljina mitoza /ulcerac.
spol					+			
dob								
lokalizacija					+	+	+	
tip								
Clark	+	+				+	+	+
Breslow	+	+			+	+		
tanki	+	+						
TNM	+	+						
mitoze	+	+						
ulceracija	+	+	+		+	+	+	
limf. infiltr.	+	+	+	+	+	+		
mikrosat.	+	+			+	+		

Tanki tm.	OR meta	AOR dob/spol	AOR debljina	AOR debljina mitoza /ulcerac.	OR meta	AOR dob/spol	AOR debljina	AOR debljina mitoza /ulcerac.
spol					+		+	
dob								
lokalizacija					+	+	+	
tip					+	+		
Clark	+	+			+	+		
Breslow	+	+			+	+		
tanki	+	+			+	+		
TNM	+	+			+			
mitoze	+	+			+	+	+	
ulceracija	+	+	+		+	+	+	
limf. infiltr.	+	+	+	+	+	+	+	+
mikrosat.	+	+			+	+	+	

6 RASPRAVA

Kriteriji za postavljanje indikacije za SLNB i dalje se prilično razlikuju u pojedinim zdravstvenim ustanovama i postoji jasna potreba za konsenzusom.

S obzirom da je do 2010. debljina primarnog tumora iznad 1 mm bila jedini opće prihvaćeni kriterij, osim odgovora na hipotezu ova disertacija imala je za cilj ispitati prediktivnu vrijednost ostalih rutinski određivanih kliničkih i patohistoloških parametara pri određivanju indikacije za sentinel biopsiju.

Trenutne preporuke AJCC Melanoma Staging Committee su izvođenje SLNB kod svih T2, T3 i T4 melanoma, bez klinički suspektnih limfnih čvorova, te selektivan pristup kod T1b melanoma. SLNB za sve melanome stupnja Ib i II, danas je obavezan inkluzivni kriterij svih kliničkih studija koje ispituju nove lijekove. Postoje kritičari takvog pristupa, a neki autori ne vide korist od primjene sentinel biopsije kod debelih, pa čak i melanoma srednje debljine, o čemu se vode žestoke rasprave.

U novoj AJCC klasifikaciji najznačajnije promjene su uvedene upravo u “stagingu” i klasifikaciji tankih melanoma (<1mm). Kao najvažniji prognostički čimbenici, istaknuti su debljina, mitotski indeks i prisustvo ulceracija. Mitotski indeks je prihvaćen kao primarni faktor u “stagingu” T1b melanoma, umjesto razina invazije po Clarku, koja je s obzirom na nedostatnu prediktivnu vrijednost izbačena u novoj klasifikaciji. Ipak, u slučajevima kada mitotski indeks ne može biti precizno određen, potrebno je uzeti u obzir razine prodora po Clarku ⁸¹.

Prema preporukama NCCN-a (National Comprehensive Cancer Network), SLNB se mora učiniti kod svih bolesnika s klinički negativnim čvorovima kod kojih je primarni melanom kože veći od 1 mm debljine, a postupak je nepotreban kod onih PCM-a tanjih od 1 mm. SLNB se može razmotriti u PCM-a debljine 0,76 – 1,0 mm uz uvjet prisutnosti i nekih drugih nepovoljnih čimbenika kao što su pozitivne duboke margine primarnog ekscizata, limfokapilarna invazija, vertikalna faza rasta, povišen mitotski indeks, Clark razine \geq IV, te dob onih mlađih od 40 godina. Regresija i dalje ostaje predmetom kontradikcije, dok SLNB treba učiniti i kod onih čija debljina prelazi 4 mm i imaju klinički negativne limfne čvorove.

Dakle, postoje neusaglašenosti oko indikacije za primjenu metode. I dok se debljina najčešće navodi kao jedini siguran kriterij, postoje kontradikcije oko ostalih kliničkih i patohistoloških parametara koje potiču daljnja istraživanja. Cilj ove disertacije je pridonijeti rasvjetljavanju

svih pojedinačnih prediktora i identificirati one bolesnike kojima SLNB predstavlja oblikovnu proceduru u „stagingu“ bolesti. Za razliku od brojnih studija koje naglašavaju debljinu tumora, naši rezultati nedvojbeno upućuju na potrebu uključivanja drugih kriterija, minimizirajući prediktivnu vrijednost debljine.

Coit D. G. i suradnici smatraju da posebnu pozornost treba usmjeriti na pozitivitet margina primarnog ekscizata, limfovaskularnu invaziju, (vertikalnu) fazu rasta tumora, mitotski indeks, razinu prodora po Clarku, kao i dob bolesnika, što se posebice odnosi na tzv. tanke tumore, debljine ispod 1mm⁸¹⁻⁸².

Studija MSLT I (Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial I) osim što je pokazala jasan benefit SLNB-a u „stagingu“ i prognozi kao i u terapijskom smislu kod različitih debljina primarnog tumora i stupnjeva bolesti, ističe i važnost mitotskog indeksa kod vrlo tankih primarnih tumora¹⁹⁰.

Iako naši rezultati ne negiraju povezanost debljine s pozitivnim ishodom SLNB-a i pojavnosti metastaza, kao čimbenik prognoze, debljina ima vrlo limitirano značenje, posebice kod tankih tumora. Kada smo standardizacijom parametra debljine logističkom regresijom analizirali ishod sentinela, naši rezultati su pokazali tek utjecaj ulceracije i limfocitne infiltracije, a standardizacijom za prisutnost mitozu i ulceracije (odnosno eliminacijom utjecaja ovih parametara), dobili smo značajan utjecaj samo limfocitne infiltracije. Što se tiče metastatskog ishoda, za tanke tumore dobili smo iste rezultate.

Mitotski indeks u smislu ishoda sentinela je bio značajan samo kod tankih tumora, a što se tiče metastatskog ishoda već je i jedna mitozu bila značajan prediktor kod tankih tumora, a za ostale tumore je utjecaj bio vidljiv kod prisutnosti dvije i više mitozu/mm².

Charles R. Scoggins i sur. analizirali su podatke 240 pacijenata s MM-om debljine preko 4 mm. Bolesnici s negativnim sentinelom pokazali su znatno duže razdoblje bez znakova bolesti (engl. disease-free interval) kao i sveukupno preživljenje u odnosu na bolesnike s pozitivnim sentinel nodusima. Autori također smatraju da su lokalizacija tumora na ekstremitetima, dublji prodor po Clarku kao i limfovaskularna invazija povezani s većim rizikom pozitivnog sentinel limfnog čvora. Muški spol, debljina po Breslowu, ulceracija i pozitivni sentinel nodusi pokazali su povezanost sa sveukupnim preživljenjem¹⁹¹.

S obzirom da kod tzv. debelih tumora, debljine preko 4 mm, postoji visoka incidencija pozitivnih limfnih čvorova (30 – 40%), kao i većina autora smatramo da i kod klinički negativnih limfnih čvorova treba učiniti SLNB¹⁹²⁻¹⁹³. U našoj skupini tumora debljine preko 4

mm, od svih učinjenih SLNB-a čak 44% je imalo pozitivan ishod, dok su se metastaze razvile kod 65 bolesnika ili 70%.

Međutim, ipak većina primarnih kutanih melanoma su tanki tumori (0,51 – 1,0 mm debljine). Iako se tanki tumori smatraju nisko rizičnim za progresiju bolesti i mortalitet povezan s MM-om, u oko 10% bolesnika s tankim MM-om dolazi do recidiva i smrti uzročno povezane s melanomom¹⁹⁴⁻¹⁹⁵. Čak polovica naših pacijenata (426 ili 50,47%) imala je tanke tumore, debljine manje od 1,5 mm. Kod 184 bolesnika (43%) te grupe učinjena je sentinel biopsija. U grupi tankih tumora sentinel je bio pozitivan kod 22 bolesnika (12% od ukupnog broja svih sentinel biopsija na tankim tumorima), dok je 30 bolesnika (7,65% od ukupnog broja svih tankih tumora) razvilo metastatsku bolest. Intrigantno je da je 50% od svih pozitivnih čvorova nađeno u grupi tumora tanjih od 1 mm. Ovim je naša studija potvrdila agresivnost nekih tankih lezija.

Uporabna vrijednost SLNB biopsije u tankih melanoma loše je determinirana. Primjena SLNB u svih bolesnika bila bi preskupa i suočila bi ove bolesnike s mogućim komplikacijama ove metode (iako su one rijetke).

Naši rezultati upućuju da samo debljina kod tankih tumora – ispod 1,5 mm, ne predstavlja pouzdan prognostički čimbenik agresivnosti tumora, posebice ne na ishod sentinel biopsije, te da treba uvažavati i ostale parametre. U našoj promatranoj skupini tankih tumora nije bio značajan utjecaj lokalizacije, dobi, spola i tipa tumora, dok su debljina tumora, razina prodora po Clarku, mitotski indeks, prisustvo ulceracija, limfocitni infiltrat i prisutne mikrosatelitoze značajno utjecale na ishod. Multivarijantnom analizom kod standardizacije za dob i spol, dobili smo iste rezultate. Kada smo standardizirali debljinu, izgubio se utjecaj svih čimbenika, osim ulceracije i limfocitne infiltracije, a standardizacijom za mitoze i ulceracije značajan preostaje samo utjecaj limfocitnog infiltrata kako za sentinel, tako i za metastatski ishod.

Potrebno je naglasiti da je naša analiza tzv. tankih tumora opterećena i činjenicom da je riječ o retrospektivnoj studiji, te da se u rutinskom radu u našoj ustanovi nije primjenjivao SLNB tumora tanjih od 1 mm. Bolesnici s tumorom tanjim od 1 mm – kojima je ipak rađena biopsija – imali su moguće i neke druge faktore rizika, što možda može biti jedno od objašnjenja čak veće agresivnosti tanjih tumora unutar ove skupine u smislu pozitivnog ishoda sentinel biopsije. Ipak u smislu metastatskog ishoda između stratificiranih tankih tumora značajno najveću sklonost metastaziranju pokazali su oni „najdeblji“, tj. debljine 1,26 – 1,5 mm.

Ova činjenica svakako ukazuje na potrebu daljnjih analiza i novih prospektivnih studija na tankim tumorima.

Rajmohan Murali i suradnici ¹⁹⁶ istraživali su ulogu SLNB-a u pacijenata s tankim melanomom, analizirajući velike serije pacijenata s namjerom da determiniraju kliničko-patološke parametre, koji bi bili prediktivni za ishod SLNB-a, recidive u regionalne limfne čvorove i preživljenje. U njihovoj studiji pokazan je nizak, ali signifikantan broj SLN pozitiviteta u bolesnika s primarnim MM-om 0,51 – 1,0 mm debljine. Studija je pokazala značajnu povezanost limfokapilarne invazije s pozitivitetom SLN-a i prediktivnu vrijednost mitotskog indeksa na preživljenje, te u zaključku studije autori smatraju da je u ovih bolesnika potrebno razmotriti SLNB, posebno ako postoji i limfovaskularna invazija na primarnoj lokaciji tumora. Također, kod lokalizacije glava/vrat primarnog tumora u njihovoj skupini bolesnika bili su češći recidivi u regionalne limfne čvorove.

Michael P. Mays i sur. ⁷⁷ istraživali su utjecaj kliničko-patoloških parametara na sveukupno preživljenje (engl. OS) i razdoblje bez znakova bolesti (engl. DFS), te pokušali determinirati podgrupu bolesnika s primarnim kutanim MM-om debljine 1 – 2 mm s minimalnim rizikom metastaza. (Njihovi rezultati upućuju da debljina po Breslowu, dob, ulceracija, histološki podtip, regresija i razina prodora po Clarku predstavljaju signifikantno prediktivne faktore za DFS, dok debljina po Breslowu, dob, lokalizacija primarnog tumora, spol, prisustvo ulceracija i SLN status predstavljaju signifikantno prediktivne čimbenike za OS). Također, pokazali su da bolesnici s primarnim tumorom debljine manje od 1,6 mm po Breslowu, bez limfokapilarne invazije i u dobi ispod 59 godina, imaju nizak rizik (ispod 5%) pozitivnog ishoda sentinel biopsije.

Nažalost, iako oba autora naglašavaju značaj limfokapilarne invazije, zbog premalog uzorka detektiranih limfokapilarnih invazija u našoj skupini tankih tumora, nismo mogli analizirati utjecaj ovog parametra.

S obzirom na činjenicu da su u našem patohistološkom laboratoriju na promatranom uzorku vršena samo rutinska bojenja – HE stain (engl. hematoxylin and eosin stain), a što ne predstavlja idealnu metodu za probir bolesnika s prisutnom limfokapilarnom invazijom, detektiran je premali broj (N = 7) za relevantnu statističku analizu. Kako neki radovi upućuju da je limfokapilarna invazija važan prognostički čimbenik za ishod sentinela, mišljenja smo da bi bilo uputno uvesti u rutinskom radu i dodatne, imunohistokemijske metode, za bolji probir bolesnika s limfokapilarnom invazijom.

Neka istraživanja dovode u vezu povezanost regresije s nodalnim metastazama, no njezina uloga još uvijek predstavlja predmet rasprava¹⁹⁷.

S obzirom na mali broj zabilježenih regresija (N = 4), te s obzirom da nikome od pacijenata s utvrđenom prisutnom regresijom nije rađena sentinel biopsija, nismo bili u mogućnosti utvrditi povezanost regresije i ishoda SLNB-a.

Iako naša studija naglašava prediktivnu vrijednost određenih patohistoloških i kliničkih parametara, odnosno njihovu prediktivnu vrijednost Melanie A. Warycha i autori¹⁹⁸ u njihovoj metaanalizi SLN pozitiviteta u tankih melanoma smatraju da trenutno ne postoji pouzdani kriterij kod tankih melanoma koji bi identificirao posebno rizičnu skupinu s jasnim benefitom od SLNB-a.

U našem istraživanju uočili smo znatan utjecaj muškog spola, lokalizacije tumora, debljine po Breslowu, ulceracije, limfocitne infiltracije i mikrosatelitoze kao značajnih prediktora pozitivnog sentinela, dok se kod tankih tumora utjecaj ovih čimbenika mijenja, tako što se gubi utjecaj spola i lokalizacije, dok se kao novi važni parametri javljaju razina prodora po Clarku i mitotski indeks. Kod provedene standardizacije za tanke tumore po dobi i spolu, ništa se ne mijenja, dok standardizacijom za debljinu preostaje značajna samo ulceracija i limfocitna infiltracija, a standardizacijom na debljinu po Breslowu, mitoze i ulceraciju kao jedini značajan faktor preostaje limfocitna infiltracija.

Kod standardizacije za dob i spol u skupini svih tumora (ne samo tankih) pokazao se značajnim – osim ovih – i utjecaj prodora po Clarku, dok se osim razina po Clarku kod standardizacije na debljinu po Breslowu, mitoze i ulceraciju izgubio utjecaj svih ostalih parametara.

Sličnu usporedbu proveli smo i za metastatski ishod. Naši rezultati upućuju na važnost spola, lokalizacije (trup sprijeda, glava/vrat i ruka/rame), tipa (NM), prodora po Clarku (razina samo IV i V), debljine, mitozu (više od 2/mm²), ulceracije, limfocitne infiltracije i mikrosatelitoze. Slika se bitno mijenja kod tankih tumora gdje se potpuno gubi utjecaj spola, lokalizacije i tipa tumora. Razine po Clarku dobivaju na značaju tako, što se uvode i niži stupnjevi.

Standardizacijom za spol i dob kod svih tumora nismo dobili nikakvu promjenu u rezultatima, dok je standardizacijom za debljinu ostao utjecaj lokalizacije (trup sprijeda, glava/vrat i ruka/rame), mitotskog indeksa, prisutnosti ulceracije, limfocitne infiltracije i mikrosatelitoza (a izgubio se utjecaj tipa tumora, razina po Clarku i debljine). Kod tankih tumora ostao je značajan samo utjecaj ulceracije i limfocitne infiltracije, dok se izgubio utjecaj svih ostalih

čimbenika. Standardizacijom na debljinu, mitoze i ulceraciju kod svih tumora (uključujući skupinu tankih tumora) preostao je značajan samo čimbenik limfocitne infiltracije.

Ovim naša studija upućuje na značajno različiti biološki potencijal tankih tumora.

Tijekom ispitivanja tankih tumora uočene su i neke druge zanimljive činjenice. Naime, metastazirali su samo tumori nekih lokalizacija (trup, noga i akralna lokalizacija), što se bitno razlikuje od ostalih tumora (glava/vrat, ruka/rame, trup sprijeda). Očekivano, prema tipu prevladavali su SSM, a svi NM koji su metastazirali bili su debljine preko 1mm.

Kombinacijom trenutno rutinski prikupljenih kliničko-patohistoloških parametara može se postići bolja predikcija ishoda sentinel biopsije od one dobivene pomoću debljine primarnog ekscizata tumora. Dobiveni rezultati omogućili su izradu matematičkih modela procjene ishoda za sentinel i metastaze:

1. Za procjenu ishoda sentinela za sve tumore, model uključuje samo varijablu debljina sa značajnošću od 5%. Statistički taj model loše opisuje varijablu sentinel, no čini se da rezultati na testiranoj populaciji nisu jako loši. Primjenom *cpa* pouzdanost rezultata iznosi 60%.

$$P(x_1) = \frac{e^{0,2153 x_1 - 1,7525}}{1 + e^{0,2153 x_1 - 1,7525}}$$

2. Za procjenu ishoda metastaza za sve tumore dobili smo 2 dobra modela, koji daju točnost predviđanja 75 – 80%.

I model koji uključuje nezavisne varijable: Clark razine, mitotski indeks, mikrosatelitoze, debljina po Breslowu. Ovaj model dobro opisuje varijablu metastaze

$$P(x_1, x_2, x_3, x_4) = \frac{e^{0,8798 x_1 + 0,5666 x_2 + 1,6328 x_3 + 0,1750 x_4 - 5,4373}}{1 + e^{0,8798 x_1 + 0,5666 x_2 + 1,6328 x_3 + 0,1750 x_4 - 5,4373}}$$

gdje je x_1 razina tumora po Clarku (moguće vrijednosti: 1, 2, 3, 4, 5), x_2 broj mitozna (vrijednosti: 0 = nema mitozna, 1 = 1 mitozna, 2 = 2 – 5 mitozna, 3 = preko 5 mitozna), x_3 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_4 debljina tumora po Breslowu.

II model uključuje nezavisne varijable: debljina po Breslowu, mitotski indeks, mikrosatelitoze, limfocitnu infiltraciju. Ovim modelom može biti objašnjeno 38% podataka.

$$P(x_1, x_2, x_3, x_4) = \frac{e^{0,3049 x_1 + 0,8230 x_2 + 1,2808 x_3 - 0,3473 x_4 - 2,6075}}{1 + e^{0,3049 x_1 + 0,8230 x_2 + 1,2808 x_3 - 0,3473 x_4 - 2,6075}}$$

gdje je x_1 debljina tumora po Breslowu, x_2 broj mitozu (vrijednosti: 0 = nema mitozu, 1 = 1 mitozu, 2 = 2 – 5 mitozu, 3 = preko 5 mitozu), x_3 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_4 limfocitna infiltracija na bazi (vrijednosti: 0 = bez, 1 = oskudna, 2 = srednje gusta, 3 = gusta).

III model dobili smo uključivanjem ulceracije u prethodni model. Model uključuje: debljinu po Breslowu, mikrosatelitoze, limfocitnu infiltraciju i ulceracije. Ovaj model je loš.

Međutim, pri postavljanju ovog modela naučili smo da ulceracija ulazi u prethodni model tek ako se iz modela – osim razina po Clarku – izbac i broj mitozu (kao najmanje važna varijabla), što ukazuje da su ove dvije varijable vrlo blisko vezane (Tablica 16.).

Za procjenu ishoda sentinela kod tankih tumora, dobili smo dva dobra modela.

I model uključuje: mikrosatelitozu, debljinu po Breslowu i ulceracije. Ovo je dobar model koji objašnjava 75% podataka:

$$P(x_1, x_2, x_3) = \frac{e^{1,4184 x_1 - 3,4543 x_2 + 2,7953 x_3 + 0,2275}}{1 + e^{1,4184 x_1 - 3,4543 x_2 + 2,7953 x_3 + 0,2275}}$$

gdje je x_1 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_2 debljina tumora po Breslowu, x_3 ulceracija (0 = ne, 1 = da).

II model uključuje samo dvije nezavisne varijable: debljinu po Breslowu i ulceracije. Model jako dobro – sa samo dvije neovisne varijable – opisuje zavisnu varijablu sentinel, dajući objašnjenje za 76 – 77% podataka:

$$P(x_1, x_2) = \frac{e^{-3,2797 x_1 + 2,7655 x_2 + 0,4320}}{1 + e^{-3,2797 x_1 + 2,7655 x_2 + 0,4320}}$$

x_1 debljina tumora po Breslowu, x_2 ulceracija (0 = ne, 1 = da).

1. Za procjenu metastatskog ishoda za tanke tumore kao neovisne varijable koristili smo mikrosatelitoze i ulceraciju. Nažalost, ovo je statistički najlošiji od svih modela koji, u slučaju pozitivnog ishoda predviđanja, ne predviđa dobro postojanje metastaza (u najviše 40% slučajeva se poklopilo s opaženim podacima). Nasuprot tome, u slučaju negativnog predviđanja, test dosta dobro opisuje negativno predviđanje metastatske bolesti s čak 95% sigurnosti:

$$P(x_1, x_2) = \frac{e^{2,0254 x_1 + 2,0061 x_2 - 3,0754}}{1 + e^{2,0254 x_1 + 2,0061 x_2 - 3,0754}}$$

gdje je x_1 mikrosatelitoza (0 = ne, 1 = da), x_2 ulceracija (0 = ne, 1 = da).

Iako se ne govori o idealnim modelima, s točnostima predviđanja od oko 80%, oni definitivno imaju svoje mjesto u svakodnevnom radu. Ne manje važno je naglasiti da je značajno manja vjerojatnost lažno negativnih od lažno pozitivnih rezultata, što u ovom slučaju bez sumnje predstavlja prednost. Uzevši u obzir i to da je sada točnost kliničke prosudbe tek oko 20%, te da nisu uključeni nikakvi dopunski parametri u model, primjena modela kao dodatnog alata u dvojbenim kliničkim situacijama apsolutno znači prednost, a u bolničkim centrima gdje ne postoji dermatoonkologija sigurno bitan doprinos u boljem probiru bolesnika za SLNB.

U proučavanju ishoda metastatske bolesti prema dobi kod tankih tumora, primijetili smo grupiranje dijela bolesnika u dobi oko 50 godina sa značajnije manjim pozitivnim metastatskim ishodom. Za objašnjenje, provedeno je statističko testiranje testom ANOVA. Ispitanici su grupirani u skupine, a Tukeyevim testom izvršeno je uspoređivanje grupa. Analiza je potvrdila znatno različiti očekivani ishod u grupi od 45 do 55 godina starosti.

Slične rezultate uočili smo i kod ispitivanja metastatske bolesti u odnosu na dob i spol kod svih tumora, gdje smo primijetili bitni pad razvoja metastatske bolesti u dobi bolesnika od 52 do 56 godina starosti, a pri čemu je bio bitan utjecaj spola na razvoj bolesti. Naime, kod žena je izraženiji pad razvoja metastatske bolesti u toj dobi. Štoviše, prema krivulji usporedbe normalne slučajne varijacije sa stvarnim metastatskim ishodom, kod mlađih žena (do oko 38 godina starosti), bolest je imala agresivniji tok u smislu veće pojavnosti metastaza.

U našoj promatranoj skupini tankih tumora prevladavale su žene. Od 51 bolesnika do 30 god. starosti 34 su bile žene. Može se zaključiti da je agresivniji tok tankih tumora češći kod mlađih žena. Čini se da ovaj trend korelira sa hormonalnim statusom žena, te bi valjalo istražiti u budućim studijama i utjecaj estrogena na razvoj bolesti. U prilog tome govore i pretpostavke nekih autora o značaju hormonalnih čimbenika u etiologiji melanoma.

Nismo potvrdili statistički značajnu korelaciju pojave metastaza s limfokapilarnom invazijom i regresijom, slično kao i kod ishoda sentinel biopsije s obzirom na neadekvatno mali uzorak i primjenu samo rutinskih bojenja (HE) u patohistološkoj analizi. Potrebno je uvođenje dodatnih imunohistokemijskih metoda u svakodnevom rutinskom radu patohistološkog laboratorija u smislu utvrđivanja prisutnosti limfokapilarne invazije i regresije te provođenje novih prospektivnih studija kako bi zauzeli kritičan stav vezano uz prediktivnu vrijednost ovih parametara, posebice u utvrđivanju rizika kod tzv. tankih tumora.

7 ZAKLJUČAK

- Istraživanje je potvrdilo hipotezu da debljina nije dostatan čimbenik prilikom postavljanja indikacije za SLNB, pa je čak i nebitan parametar u predikciji metastatskog ishoda kod tankih tumora.
- Kombinacijom trenutno dostupnih kliničko-patohistoloških parametara postiže se bolja predikcija ishoda sentinela i metastaza.
- Stupnjevitom logističkom regresijom postavljeni su matematički modeli za izračun vjerojatnosti:

Pozitivnog ishoda sentinel nalaza kod svih tumora, i to:

1. Model koji uključuje samo debljinu po Breslowu sa sigurnošću od približno 60% na testiranoj skupini bolesnika predviđa pozitivan ili negativan ishod sentinel biopsije.

Za tanke tumore:

1. Prvi model uključuje: mikrosatelitozu, debljinu po Breslowu i ulceraciju. Na testiranoj skupini bolesnika ishod sentinel nalaza predviđa se sa sigurnošću od 75%.
 2. Drugi model koji uključuje samo debljinu po Breslowu i ulceraciju, čak je i bolji iako ima manje parametara i na testiranoj skupini bolesnika ishod predviđa u 76% do 77% slučajeva.
- Stupnjevitom logističkom regresijom postavljeni su matematički modeli za izračun vjerojatnosti:

Razvoja metastaza kod svih tumora, i to:

1. Prvi model uključuje: Clark razine, mitoze, mikrosatelitozu i debljinu po Breslowu. Ovaj model je statistički najbolji i na testiranoj skupini bolesnika predviđa postojanje ili nepostojanje metastatske bolesti u 75% do 80% bolesnika.
2. Drugi model koji uključuje debljinu po Breslowu, mitoze, mikrosatelitoze i limfocitnu infiltraciju i tek je nešto statistički lošiji od prethodnoga, na testiranom skupu bolesnika daje slične rezultate (predviđa postojanje ili nepostojanje metastatske bolesti u 75% do 80% bolesnika), s tim da parametri nisu podložni subjektivnoj procjeni.

Za tanke tumore:

1. Model uključuje samo mikrosatelitozu i ulceraciju i daje relativno loše predviđanje postojanja metastatske bolesti (približno 40% na ovoj skupini bolesnika) i precizno predviđanje nepostojanja metastatske bolesti od približno 95%.

Ponuđeni modeli daju puno bolje predviđanje pri odluci o postavljanju indikacije za sentinel od dosad uobičajenog načina odlučivanja kod kojeg je točnost predviđanja tek oko 20%.

Ovi originalni matematički modeli–proizašli iz istraživanja–predstavljaju značajan znanstveni doprinos ovog rada.

Tijekom istraživanja primjećeno je i sljedeće.

1. Pojavnost agresivnijih formi tankih tumora kod mlađih žena – moguća je povezanost s hormonalnim statusom (estrogen).
2. Uočen je značajni pad razvoja metastatske bolesti u pedesetim godinama života, bitno izraženije kod žena – moguća je povezanost s hormonalnim statusom.
3. Bitno različit biološki potencijal tankih tumora.
4. Uočena je povezanost ulceracije i mitozu, koju bi trebalo dodatno istražiti.

8 KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

U nastojanju da smanjimo broj nepotrebnih SLNB i usmjerimo primjenu ove procedure prema rizičnijim skupinama bolesnika, testirali smo hipotezu da debljina tumora nije dostatan čimbenik pri postavljanju indikacije. Analizirali smo uporabnu vrijednost svih dostupnih kliničkih i patohistoloških parametara u bolesnika sa primarnim kutanim melanomom.

U istraživanju je korištena arhiva RC za melanom MiZRH u Klinici za kožne i spolne bolesti i Zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“. Studijom su obuhvaćena 844 bolesnika, u promatranom razdoblju od 6 godina. Sentinel biopsija učinjena je kod 484 bolesnika (57%), od kojih je pozitivan čvor zabilježen u 122 slučaja (14,45%). Kod 205 (24,28%) bolesnika došlo je do progresije bolesti. Polovica naših bolesnika imala je tanke tumore (<1,5 mm). Posebno smo analizirali ovu skupinu bolesnika, stratificirajući tumore u rastući niz za po 0,25 mm. Kod 184 bolesnika (43%), učinjena je sentinel biopsija, sa pozitivnim ishodom kod 22 bolesnika (12%). U 30 bolesnika (7,65%) došlo je do razvoja metastatske bolesti. Unutar ove skupine čak 50% pozitivnih čvorova nađeno u grupi tumora tanjih od 1 mm, što ukazuje na agresivnost nekih tankih lezija.

Logističkom regresijom testirali smo povezanost zavisnih varijabli (sentinel nalaz i prisutnost metastaza) s nezavisnim varijablama (klinički i patohistološki parametri). Standardiziranim omjerima šansi koji su učinjeni za dob i spol, debljinu, te prisustvo mitozu i ulceracija, dobiveni su rezultati koji upućuju na bitno različit biološki potencijal tankih tumora.

Stupnjevitom logističkom regresijom postavljeni su matematički modeli za predviđanje ishoda sentinel biopsije i razvoja metastatske bolesti s točnostima predviđanja od 80%. Uzevši u obzir sadašnju točnost kliničke prosudbe (oko 20%) te da nisu uključeni nikakvi novi parametri u model, primjena ovih modela kao dodatnog alata u dvojbenim kliničkim situacijama apsolutno znači prednost, a u bolničkim centrima gdje ne postoji dermatoonkologija važan doprinos u boljem probiru bolesnika za SLNB.

U proučavanju ishoda metastatske bolesti uočili smo i određena grupiranja bolesnika vezana za dob i spol, a moguće i hormonalni status bolesnica.

Istraživanje je potvrdilo hipotezu da debljina nije dostatan čimbenik prilikom postavljanja indikacije za SLNB, pa je čak nebitan parametar u predikciji metastatskog ishoda kod tankih tumora. Kombinacijom trenutno dostupnih kliničko-patohistoloških parametara postiže se bolja predikcija ishoda sentinela i metastaza.

«Values of the Current Criteria in Determining the Indications for the Sentinel Lymph Node Biopsy among the Patients with Primary Skin Melanoma »

The aim of the study was to determine which clinico-pathohistological parameters represent high risk factors for metastatic progression which would enable better selection of SLNB candidates.

Study group included 844 patients with PCM diagnosed between January 1, 2005 and December 31, 2010. SLNB was conducted in 484 (57.3%) patients. Positive node has been found in 122 (14.5%) and metastatic development in 205 (24,28%) patients.

Half of our patients had thin tumors (≤ 1.5 mm). This group was stratified by 0.25 mm and tested separately. 184 (43%) patients underwent SLNB, with positive results in 22 patients (12%). Metastatic development was found in 30 patients (7.65%).

Multivariate analysis was done on both group, testing SLNB and metastatic outcome.

When deciding to conduct SLNB, except tumor thickness, other parameters must be taken into consideration, among which: ulceration, lymphocyte infiltration, microsatellitosis, Clark level, trunk and acral localization and male gender predict a positive SLNB outcome. It seems that additional presence of mitoses and nodular melanoma increase the probability of metastatic spread. In the group of thin lesions: gender, localization and type of melanoma does not play an important role.

Further analysis with different cofounding variables: age, gender, thickness, mitotic rate and ulceration gave us quite different results, showing significantly different biological behavior of thin tumors.

By applying stepwise logistic regression we set up mathematical models for prognosis of sentinel and metastatic outcome. With accuracy approximately 80%, this could be good additional tool in risk estimation.

Particularly in case of very thin lesions, tumor thickness is not sufficient and should be evaluated with other clinico-pathohistological indicators.

Damir Homolak, Zagreb, 2014.

10 LITERATURA

1. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. *Am Fam Physician* 2000;62(2):357-68.
2. Croatian National Cancer Registry. Cancer incidence in Croatia. Zagreb: Croatian National Institute of Public Health; 2010.
3. Barbarić J, Znaor A. Incidence and mortality trends of melanoma in Croatia. *Croat Med J* 2012;53:135-40.
4. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7-33.
5. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U. Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res* 2007;17:393-9.
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010;5:277-300.
7. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002;5(2):74-108.
8. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gigson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer* 2005;116(1):144-9.
9. Evans RD, Kopf AW, Lew RA i sur. Risk factors for the development of malignant melanoma - I: Review of case control studies. *J Dermatol Surg Oncol* 1988;14(4):393-408.
10. Marrett LD, King WD, Walter SD, From L. Use of host factors to identify people at high risk for cutaneous malignant melanoma. *CMAJ* 1992;147(4):445-53.
11. Cancer Research UK statistics team. Cancer Research UK. Dostupno na: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/skin/incidence/uk-skin-cancer-incidence-statistics>. Pristupljeno: Srpanj 26, 2014.
12. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
13. Rogan SA, Kovačić K, Kusić Z. Sentinel Lymph node concept and its role in the management of melanoma patients. *Acta Clin Croat* 2007;46:175-85.
14. Runger TM, Farahvash B, Hatvani Z, Rees A. Comparison of DNA damage responses

- following equimutagenic doses of UVA and UVB: a less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidin dimers more mutagenic than UV-induced one. *Photochem. Photobiol. Sci* 2012;1(11):207-15.
15. Budden T, Bowdoin NA. The role of Altered Nucleotide Excision Repair and UVB-Induced DNA Damage in Melanomagenesis. *Int j Mol Sci* 2013;1(14):1132-51.
 16. Roehrig A VM. Melanoma. Braun-Falco's Dermatology. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009, str. 1416-18.
 17. Nouri K. U: Lee S, Fakharzadeh SS, ur. The Genetic Basis of Common Forms of Skin Cancer. *Skin Cancer. China: The McGraw-Hill Companies, Inc*; 2008, str. 46-51.
 18. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A. Melanocytic tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC Press; 2006, str. 66-92.
 19. Clark Jr WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* 1986;17:443-50.
 20. Clark Jr WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27.
 21. Haneke E, Bastian BC. Superficial spreading melanoma. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. Pathology and genetics of skin tumours. Lyon: IARC Press; 2006, str. 66-7.
 22. Barnhill RL, Mihm Jr MC. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol* 1993;10:47-75.
 23. Chamberlain AJ, Fritschi L, Kelly JW. Nodular melanoma: patient's perceptions of presenting features and implications for earlier detection. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:694-701.
 24. Fernando SS, Johnson S, Bate J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody. *Pathology* 1994;26:16-9.
 25. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *Am J Dermatopathol* 2002;24:270-81.
 26. Sellheyer K, Krahl D, Ratch H. Distribution of Bcl-2 and Bax in embryonic and fetal human skin: antiapoptotic and proapoptotic proteins are differentially expressed in

- developing skin. *Am J Dermatopathol* 2001;23:1-7.
27. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1845-53.
 28. Van Belle PA, Elenitsas R, Satyamoorthy K i sur. Progression related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. *Hum Pathol* 1999;30:562-7.
 29. Pollock PM, Trent JM. The genetics of cutaneous melanoma. *Clin Lab Med* 2000;20:667-90.
 30. Bergman R, Bruckner-Tuderman S, Hercegova J, Bastian BC. Nodular melanoma. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. *Pathology and genetics of skin tumours*. Lyon: IARC Press; 2006, str. 68-9.
 31. Cox NH, Aitchinson TC, MacKie RM. Extrafacial lentigo maligna melanoma: analysis of 71 cases and comparison with lentigo maligna melanoma of the head and neck. *Br J Dermatol* 1998;139:439-43.
 32. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer INST* 2003;95:806-12.
 33. Cohen LM. The starburst giant cell is useful for distinguishing lentigo maligna from photodamaged skin. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:962-8.
 34. Allan SJ, Dicker AJ, Tidman MJ, McLaren KM, Hunter JA. Amelanotic lentigo maligna and amelanotic lentigo maligna melanoma: a report of free cases mimicking intraepidermal squamous carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;11:78-81.
 35. Spatz A, Giglia-Mari G, Benhamou S, Sarasin A. Association between DNA repair-deficiency and high level of p53 mutations in melanoma of Xeroderma pigmentosum. *Cancer Res* 2001;61:2480-6.
 36. Maldonado JL, Fridyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer INST* 2003;95:1878-90.
 37. Bastian BC, Olshen A, LeBoit P, Pinke D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003;163:1765-70.
 38. Ackerman AB. Mitology and numerology in the sphere of melanoma. *Cancer* 2000;88:491-6.

39. Heenan P, Spatz A, Cerio R, Bastian BC. Lentigo maligna. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. Pathology and genetics of skin tumours. Lyon: IARC Press; 2006, str. 70-2.
40. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol* 2000;143:275-80.
41. Scrivner D, Oxenhandler RW, Lopez M, Perez-Mesa C. Plantar lentiginous melanoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 1987;60:2502-9.
42. Kato T, Suetake T, Sugiyama Y, Tabata N, Tagami H. Epidemiology and prognosis of subungual melanoma in 34 Japanese patients. *Br J Dermatol* 1996;134:383-7.
43. Seiji M, Takematsu H, Hosokawa M i sur. Acral melanoma in Japan. *J Invest Dermatol* 1983;80:56S-60S.
44. Soon SL, Solomon AR, Papadopoulos D, Murray DR, McAlpine B, Washington CV. Acral lentiginous melanoma mimicking benign disease: the Emory experience. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:183-8.
45. Kim TH, Choi EH, Ahn SK, Lee SH. Vascular tumors arising in portwine stains: two cases of piogenic granuloma and a case of acquired tufted angioma. *J Dermatol* 1999;26:813-6.
46. Saida T. Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci* 2001;26:1-13.
47. Tokura Y BBDL. Acral-lentiginous melanoma. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. Pathology and genetics of skin tumours. Lyon: IARC Press; 2006, str. 73-5.
48. Mulvany NJ, Sykes P. Desmoplastic melanoma of the vulva. *Pathology* 1997;29:241-5.
49. Jain S, Allen PW. Desmoplastic malignant melanoma and it's variants. A study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 1989;13:358-73.
50. Quinn MJ, Crotty KA, Thompson JF, Coates AS, O'Brien CJ, McCarthy WH. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma: experience with 280 patients. *Cancer* 1998;83:1128-35.
51. Prieto VG, Woodruff JM. Expression of basement membrane antigens in spindle cell melanoma. *J Cutan Pathol* 1998;25:297-300.
52. Weedon D. *Skin Pathology*. London: Churchill Livingstone; 2002.

53. McCarthy SW, Scolyer RA, Palmer AA. Desmoplastic melanoma: a diagnostic trap for the unwary. *Pathology* 2004;36:445-51.
54. Gutzmer R, Herbst RA, Mommert S i sur. Allelelic loss at the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene locus is frequent in desmoplastic neurotropic melanoma. *Hum Genet* 2000;107:357-61.
55. Mc Carthy SW, Crotty KA, Scolyer RA. Desmoplastic melanoma and desmoplastic neurotropic melanoma. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. *Pathology and genetics of skin tumours*. Lyon: IARC Press; 2006, str. 76-8.
56. Carlson JA, Slominski A, Linette GP, Mihm Jr MC. Biomarkers in melanoma: staging, prognosis and detection of early metastases. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:303-30.
57. Gayraud A, Lorenzato M, Sartelet H i sur. Malignant blue nevus clinicopathologic study with agNOR measurement. Seven cases. *Ann Dermatol Venereol* 2002;129:1359-64.
58. Granter SR, McKee PH, Calonje E, Mihm Jr MC, Busam K. Melanoma associated with blue nevus and melanoma mimicking cellular blue nevus: a clinicopathologic study of 10 cases on the spectrum of so-called "malignant blue nevus". *Am J Surg Pathol* 2001;25:316-23.
59. Kerl H, Clemente C, North PE, Sanchez-Carpintero I, Mihm MC, Bastian BC. Melanoma arising in giant congenital naevi. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. *Pathology and genetics of skin tumours*. Lyon: IARC Press; 2006, str. 83-4.
60. Barnhill RL. Childhood melanoma. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, ur. *Pathology and genetics of skin tumours*. Lyon: IARC Press; 2006, str. 84-5.
61. Blessing K, Evans AT, al Nafussi A. Verrucous naevoid and keratotic malignant melanoma: a clinico-pathological study of 20 cases. *Histopathology* 1993;23:453-8.
62. McNutt NS, Urmacher C, Hakimian J, Hoss DM, Lugo J. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *J Cutan Pathol* 1995;22:502-17.
63. Yu LL, Heenan PJ. The morphological features of locally recurrent melanoma and cutaneous metastases of melanoma. *Hum Pathol* 1999;30:551-5.
64. Heenan PJ, Maize JC, Cook MG, LeBoit PE. Persistent melanoma and local metastasis of melanoma. U: LeBoit PE, Burg G, Weedon G, Sarasin A, ur. *Pathology and genetics of skin tumours*. Lyon: IARC Press; 2006, str. 90-2.

65. Morton DL, Wen DR, Wong JH i sur. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg 1992;127:392-9.
66. Alex JC, Weaver DL, Fairbank JT, Rankin BS, Krag DN. Gamma probe guided lymph node localisation in malignant melanoma. Surg Onkol 1993;2:303-8.
67. Keidan RD. Medscape. Travanj 28, 2014. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/854424-overview>. Pristupljeno: Srpanj 26, 2014.
68. Forsea AM. Melanoma Staging and Sentinel Lymph Node Biopsy. Acta Dermatovenerol Croat 2010;18(4):279-88.
69. Rughani MG, Swan MC, Adams TS i sur. Sentinel lymph node biopsy in melanoma: The Oxford ten year clinical experience. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2011;64:1284-90.
70. Aviles-Izquierdo JA, Lazaro-Ochaita P. Sentinel node biopsy as a prognostic factor in cutaneous melanoma. Actas Dermosifiliogr 2009;100:486-92.
71. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ i sur. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. N Engl J Med 2006;355(28):1307-17.
72. Karim RZ, Scolyer RA, Li W i sur. False negative sentinel lymph node biopsies in melanoma may result from deficiencies in nuclear medicine, surgery or pathology. Ann Surg 2008;247:1003-10.
73. Agnese DM, Abdessalam SF, Burag WE i sur. Cost-effectiveness of sentinel lymph node biopsy in thin melanomas. Surgery 2003;134:542-7.
74. Chao C, Martin RC, Ross MI i sur. Correlation between prognostic factors and increasing age in melanoma. Ann Surg Oncol 2004;11:259-64.
75. Rayatt SS, Hettiaratchy s, Key A, Powell BW. Sentinel node biopsy for malignant melanoma. Having this biopsy gives psychological benefits. BMJ 2000;321:1285.
76. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol 2009;27:6199-6206.
77. Mays MP, Martin RC, Burton A, Ginter B, Edwards MJ, Reintgen DS. Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy ? Cancer 2010;116:1535-44.
78. Ranieri JM, Wagner JD, Wenck S, Johnson CS, Coleman 3rd JJ. The prognostic importance of sentinel lymph node biopsy in thin melanoma. Ann Surg Oncol

- 2006;13:927-32.
79. Puleo CA, Messina JL, Riker AI, Glass LF, Nelson C, Cruse CW. Sentinel node biopsy for thin melanomas: which patients should be considered ? *Cancer Control* 2005;12:230-35.
 80. Gutzmer R, Satzger I, Thomas KM, Volke B, Mitteldorf C, Kapp A. Sentinel lymph node status is the most important prognostic factor for thick (≥ 4 mm) melanomas. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008;6:198-203.
 81. Coit DG, Andtbacka R, Bickakjian CK i sur. Melanoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2009;7:250-75.
 82. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ i sur. Melanoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2012;10:366-400.
 83. Payette MJ, Katz III M, Grant-Kels JM. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. *Clinics in Dermatology* 2009;27:53-74.
 84. Ferrari A, Bono A, Baldi M i sur. Does melanoma behave differently in younger children than in adults? A retrospective study of 33 cases of childhood melanoma from a single institution. *Pediatrics* 2005;115:649-54.
 85. Jen M, Murphy M, Grant-Kels JM. Paediatric melanoma. *Clinics in Dermatol* 2009;27:529-36.
 86. Garbe C, Buttner P, Bertz J i sur. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups estimation of individual prognosias for 5093 patients. *Cancer* 1995;75:2484-91.
 87. Lindholm C, Andersson R, Dufmats M i sur. Invasive cutaneous malignant melanoma in Swedwn, 1990-1999. A prospective, population based study of survival and prognostic factors. *Cancer* 2004;101:2067-78.
 88. Masback A, Olsson H, Westerdahl J i sur. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population -based study and review. *Melanoma Res* 2001;11:435-45.
 89. Barnes BC, Segler HF, Saxby TS i sur. Melanoma of the foot. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:892-98.
 90. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL i sur. Survival differences between patients with scalp or neck melanoma and those with melanoma of othersites in the Surveillance,

- Epidemiology and End Results (SEER) program. Arch Dermatol 2008;144:515-21.
91. Gillgren P, Brattstrom G, Frisell J. 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.
 92. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970;172:902-8.
 93. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE i sur. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Comitee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol 2001;19:3622-34.
 94. Karakousis CP, Emrich LJ, Rao U. Tumor thickness and prognosis in clinical stage I malignant melanoma. Cancer 1989;64:1432-6.
 95. Slingluff Jr CL, Vollmer RT, Reintgen DS i sur. Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. Ann Surg 1988;208:150-61.
 96. Buttner P, Garbe C, Bertz J i sur. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. Cancer 1995;75:2499-506.
 97. Smolle J, Okcu A, Hofman-Wellenhof R i sur. Automated measurement of melanoma cross sectional area. Am J Dermatopathol 1998;20:155-9.
 98. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW i sur. Volume of malignant melanoma is superior to thickness as a prognostic indicator. Preliminary observation. Dermatol Clin 1991;9:643-8.
 99. Corona R, Scio M, Mele A i sur. Survival and prognostic factors in patients with localised cutaneous melanoma observed between 1980 and 1991 at the Istituto Dermopatico dell'Immacolata in Rome, Italy. Eur J Cancer 1994;30A:333-8.
 100. Rongioletti F, Smoller BR. Unusual histological variants of cutaneous malignant melanoma with some clinical and possible prognostic correlations. J Cutan Pathol 2005;32:589-603.
 101. Larsen TE, Grude TH. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I.4. The relation of cross sectional profile, level of invasion, ulceration and vascular invasion to tumor type and prognosis. Acta Pathol Microbiol Scand [A] 1979;87A:131-8.
 102. Gordon LG, Lowry WS, Pedlow PJ i sur. Poor prognosis for malignant melanoma in

- Nothern Ireland: a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1991;63:283-6.
103. Lassau N, Koscielny S, Avril MF i sur. Prognostic value of angiogenesis evaluated with high frequency and color Doppler sonography for preoperative assesment of melanomas. *AJR Am J Roentgenol* 2002;178:1547-51.
 104. Kim SH, Garcia C, Rodriguez J i sur. Prognosis of thick cutaneous melanoma. *J Am Coll Surg* 1999;188:241-7.
 105. Gimotty PA, Guerry D, Ming ME i sur. Thin primary cutaneous malignant melanoma: a prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American Joint Commitee on Cancer staging. *J Clin Oncol* 2004;22:3668-76.
 106. Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK i sur. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Clin Oncol* 2004;22:3660-7.
 107. Chang CK, Jacobs IA, Vizgirda VM i sur. Melanoma in the elderly patient. *Arch Surg* 2003;138:1135-8.
 108. Grande Sarpa H, Reinke K, Shaikh L i sur. Prognostic significance of extent of ulceration in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1396-400.
 109. Crowson AN, Magro CM, Mihm Jr MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol* 2006;19(2):S71-S87.
 110. Francken AB, Shaw HM, Thompson JF i sur. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow up. *Ann Surg Oncol* 2004;11:426-33.
 111. 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 single center. *Cancer* 2003;97:1488-98.
 112. Attis MG, Vollmer RT. Mitotic rate in melanoma: reexamination. *Am J Clin Pathol* 2007;127:380-4.
 113. Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R i sur. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am* 2003;83:61-75.
 114. Schmoeckel C, Braun-Falco O. Prognostic index in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1978;114:871-3.
 115. Kopf AW, Gross DF, Rogers GS i sur. Prognostic index for malignant melanoma.

- Cancer 1987;59:1236-41.
116. Sondergaard K, Hou-Jense K. Partial regression in thin primary cutaneous malignant melanomas clinical stage I. A study of 486 cases. *Virshows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985;408:241-7.
 117. Guitart J, Lowe L, Piepkorn M i sur. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case control study of 43 cases. *Arch Dermatol* 2002;138:603-8.
 118. Cecchi R, Buralli L, Innocenti S i sur. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanomas. *J Dermatol* 2007;34:512-5.
 119. Kaur C, Thomas RJ, Desai N i sur. The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status. *J Clin Pathol* 2008;61:297-300.
 120. Massi D, Franchi A, Borgognoni L i sur. Thin cutaneous malignant melanoma (>
 121. Shaw HM, McCarthy SW, McCarthy WH i sur. Thin regressing malignant melanoma: significance of concurrent regional lymph node metastases. *Histopathology* 1989;15:257-65.
 122. Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanomas are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 1993;143:99-104.
 123. Taylor RC, Patel A, Panageas KS i sur. Tumor infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2007;25:869-75.
 124. Hakansson A, Gustafsson B, Krysaner L i sur. Biochemotherapy of metastatic malignant melanoma. Predictive value of tumour-infiltrating lymphocytes. *Br J Cancer* 2001;85:1871-7.
 125. Ladanyii A, Kiss J, Somlai B i sur. Density of DC-LAMP (+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1459-69.
 126. Barnhill RL, Fine JA, Roush GC i sur. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population -based study. *Cancer* 1996;78:427-32.
 127. Vlaykova T, Laurila P, Muhonen T i sur. Prognostic value of tumor vascularity in metastatic melanoma and association of blood vessel density with vascular endothelial growth factor expression. *Melanoma Res* 1999;9:59-68.
 128. Carlson JA, Ross JS, Slominski A i sur. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad*

Dermatol 2005;52:775-8.

129. Srivastava A, Laider P, Davies RP i sur. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988;133:419-23.
130. Neitzel LT, Neitzel CD, Magee KL i sur. Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Ann Surg Oncol* 1999;6:70-4.
131. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM i sur. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin oncol* 2002;20:1826-31.
132. Carnochan P, Briggs JC, Westbury G i sur. The vascularity of cutaneous melanoma: a quantitative histological study of lesions 0.85-1.25 mm in thickness. *Br J cancer* 1991;64:102-7.
133. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS i sur. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (>
134. Barnhill RL, Lugassy C. Angiotropic malignant melanoma and extravascular migratory metastasis: description of 36 cases with emphasis on a new mechanism of tumour spread. *Pathology* 2004;36:485-90.
135. Gerami P, Shea C, Stone MS. Angiotropism in epidermotropic metastatic melanoma: another clue to the diagnosis. *Am J Dermatopathol* 2006;28:429-33.
136. Lugassy C, Barnhill RL. Angiotropic melanoma and extravascular migratory metastasis: a review. *Adv Anat Pathol* 2007;14:195-201.
137. Lugassy C, Vernon SE, Busam K i sur. Angiotropism of human melanoma: studies involving in transit and other cutaneous metastases and the chicken chorioallantoic membrane: implications for extravascular melanoma invasion and metastasis. *Am J Dermatopathol* 2006;28:187-93.
138. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM i sur. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2001;137:1169-73.
139. Zettersten E, Sagebiel RW, Miller 3rd JR i sur. Prognostic factors in patients with thick cutaneous melanoma (>4 mm). *Cancer* 2002;94:1049-56.
140. Swetter SM. Dermatological perspectives of malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 2003;83:77-95.
141. Hacene K, Le Doussal V, Brunet M i sur. Prognostic index for clinical Stage I cutaneous

- malignant melanoma. *Cancer Res* 1983;43:2991-6.
142. Ringborg U, Afzelius LE, Lagerlof B i sur. Cutaneous malignant melanoma of the head and neck. Analysis of treatment results and prognostic factors in 581 patients: a report from the Swedish Melanoma Study Group. *Cancer* 1993;71:751-8.
 143. Weyers W, Euler M, Diaz-Cascajo C i sur. Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathological criteria for the distinction of different types. *Cancer* 1999;86:288-99.
 144. Giuliano AE, Cochran AJ, Moerton DL. Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. *Semin Oncol* 1982;9:442-7.
 145. Koch SE, Lange JR. Amelanotic melanoma: the great masquerader. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:731-4.
 146. Rangioletti F, Smoller BR. Unusual histological variants of cutaneous malignant melanoma with some clinical and possible prognostic correlations. *J Cutan Pathol* 2005;32:589-603.
 147. Leon P, Daly JM, Synnestvedt M i sur. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. *Arch Surg* 1991;126:1461-8.
 148. Fabrizi G, Massi G. Spitzoid malignant melanoma in teenagers: an entity with no better prognosis than that of other forms of melanomas. *Cancer* 2001;38:448-53.
 149. Rutten A, Huschka U, Requena C i sur. Primary cutaneous singet-ring cell melanoma: a clinico-pathologic and immunohistochemical study of two cases. *Am J Dermatopathol* 2003;25:418-22.
 150. Podnos YD, Jimenez JC, Zainabadi K i sur. Minimal deviation melanoma. *Cancer Treat Rev* 2002;28:219-21.
 151. Zembowicz A, McCusker M, Chiarelli C i sur. Morphological analysis of nevoid melanoma: a study of 20 cases with a review of the literature. *Am J Dermatopathol* 2001;23:167-75.
 152. Cuellar FA, Vilalta A, Rull R i sur. Small cell melanoma and ulceration as predictors of positive sentinel lymph node in malignant melanoma patients. *Melanoma Res* 2004;14:277-82.
 153. Skelton HG, Smith KJ, Laskin WB. Desmoplastic malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:717-25.

154. Busam KJ, Mujumdar U, Hummer AJ i sur. Cutaneous desmoplastic melanoma: reappraisal of morphologic heterogeneity and prognostic factors. *Am J Surg pathol* 2004;28:1518-25.
155. Hawkins WG, Busam KJ, Ben-Port L i sur. Desmoplastic melanoma: a pathologically and clinically distinct form of cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2005;12:207-13.
156. Carlson JA, Dickersin GR, Sober AJ i sur. Desmoplastic neurotropic melanoma. A clinicopathologic analysis of 28 cases. *Cancer* 1995;75:478-94.
157. Baer SC, Schultz D, Synnestvedt M i sur. Desmoplasia and neurotropism. prognostic variables in patients with stage I melanoma. *Cancer* 1995;76:2242-7.
158. Reed RJ, Leonard DD. Neurotropic melanoma. A variant of desmoplastic melanoma. *Am J Surg Pathol* 1979;3:301-11.
159. Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas - does origin matter ? *Br J Dermatol* 2007;156:72-6.
160. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW i sur. Favorable prognosis for malignant melanomas associated with acquired melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 1983;119:455-62.
161. Heenan PJ, English DR, Holman CD i sur. Survival among patients with clinical stage I cutaneous malignant melanoma diagnosed in Western Australia in 1975/1976 and 1980/1981. *Cancer* 1991;68:2079-87.
162. Drunkenmolle E, Marsch W, Lubbe D i sur. Paratumoral epidermal hyperplasia: a novel prognostic factor in thick primary melanoma of the skin ? *Am J Dermatopathol* 2005;27:582-8.
163. Mott RT, Rosenberg A, Livingston S i sur. Melanoma associated with pseudoepitheliomatous hyperplasia: a case series and investigation into the role of epidermal growth factor receptor. *J Cutan Pathol* 2002;29:490-7.
164. Nakayama T, Taback B, Turner R i sur. Molecular clonality of in-transit melanoma metastasis. *Am J Pathol* 2001;158:1371-8.
165. Shaikh L, Sagebiel RW, Ferreira CM. The role of microsatellites as a prognostic factor in primary malignant melanoma. *Arch Dermatol* 2005;141:739-42.
166. Wong JH, Cagle LA, Kopald KH i sur. Natural history and selective management of in transit melanoma. *J Surg Oncol* 1990;44:146-50.
167. Day Jr CL, Harrist TJ, Gorstein F i sur. Malignant melanoma. Prognostic significance of

- "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg* 1981;194:108-12.
168. Harrist TJ, Rigel DS, Day Jr C i sur. "Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer* 1984;53:2183-7.
169. Singletary SE, Tucker SL, Boddie Jr AW. Multivariate analysis of prognostic factors in regional cutaneous metastases of extremity melanoma. *Cancer* 1988;61:1437-40.
170. Cascinelli N, Bufalino R, Marolda R i sur. Regional non-nodal metastases of cutaneous melanoma. *Eur J Surg Oncol* 1986;12:175-80.
171. Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, Boucher K, Leachman SA. Clinical germline genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol* 2004;5(5):314-9.
172. Ruitter DJ, Brocker EB. Immunohistochemistry in the evaluation of melanocytic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1993;10(1):76-91.
173. Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors. *Int J Surg Pathol* 2003;11(1):11-5.
174. Mengini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *Am J Dermatopathol* 2002;24(3):270-81.
175. Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC i sur. Comparison of five antibodies as markers in a diagnosis of melanoma in cytologic preparations. *Am J Clin Pathol* 2002;118(6):930-6.
176. Li KC, Goodall J, Gooding CR i sur. The melanocyte inducing factor MITF is stably expressed in cell lines from human clear cell sarcoma. *Br J Cancer* 2003;89:1072-8.
177. Harpio R, Einarsson R. S-100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 2004;37(7):512-8.
178. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha 2b. *Clin Cancer Res* 2007;13:2422-8.
179. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227-9.
180. Marić Brozić J. Utjecaj imunskog sustava na prisutnost cirkulirajućih melanomskih stanica (disertacija) Zagreb. Hrvatska: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet, 2013, 22-8.

181. Battyani Z, Xerri L, Hassoun J, Bonerandi JJ, Grob JJ. Tyrosinase gene expression in human tissues. *Pigment Cell Res* 1993;6(6):400-5.
182. Koyanagi K, O'Day SJ, Gonzalez R i sur. Serial monitoring of circulating melanoma cells during neoadjuvant biochemotherapy for stage III melanoma: outcome prediction in a multicenter trial. *J Clin Oncol* 2005;23:8057-64.
183. Rutkowski P, Nowecki ZI, Kulik J, Ruka W, Siedlecki JA. Molecular staging by multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of lymphatic drainage and blood from melanoma patients after lymph node dissection. *Melanoma Res* 2008;18:246-52.
184. Reinhold U, Ludtke-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW, Abken H. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J Invest Dermatol* 1997;108:166-9.
185. Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8125-9.
186. Parmiani G, Castelli C, Santinami M, Rivoltini L. Melanoma immunology: past, present and future. *Curr Opin Oncol* 2007;19:121-7.
187. Kashani-Sabet M. Molecular markers in melanoma. *Br J Dermatol* 2014;170:31-5.
188. Mocellin S, Ambrosi A, Montesco MC, Foletto M, Zavagno G, Nitti D. Support vector machine learning model for the prediction of sentinel node status in patients with cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1113-22.
189. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-3648.
190. Giau QP, Jane LM, Vernon KS, Johnathan SZ. Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma: Indications and rationale. *FACS: Cancer Control* 2009;16:234-9.
191. Scoggis CR, Bowen AL, Martin 2nd RC. Prognostic information from sentinel lymph node biopsy in patients with thick melanoma. *Arch Surg* 2010;145:622-7.
192. Gershenwald JE, Mansfield PF, Lee JE, Ross MI. Role for lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with thick (≥ 4 mm) primary melanoma. *Ann Surg Oncol* 2000;7:160-5.

193. Ferrone CR, Panageas KS, Busam K, Brady MS, Coit DG. Multivariate prognostic model for patients with thick cutaneous melanoma: importance of sentinel lymph node status. *Ann Surg Oncol* 2002;9:637-645.
194. Kalady MF, White RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas: predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. *Ann Surg* 2003;238:528-35.
195. Salman SM, Rogers GS. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1990;16:413-8.
196. Murali R, Haydu LE, Quinn MJ i sur. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin primary cutaneous melanoma. *Ann Surg* 2012;255:128-33.
197. Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel Lymph node metastasis ? *Am J Dermatopathol* 2003;25:371-6.
198. Warycha MA, Zakrzewski J, Ni Q i sur. Meta-analysis of sentinel lymph node positivity in thin melanoma (less or equ 1mm). *Cancer* 2009;115:869-79.

11 BIOGRAFIJA

Rođen sam 1962., oženjen, otac dvoje djece. Diplomirao sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1988. godine. Od 1989. – 1991. godine boravio sam u SAD-u kao doktorand, gdje sam sudjelovao i samostalno vodio nekoliko znanstvenih projekata na Odjelu biofizike i Odjelu hematologije Medicinskog fakulteta u Miamiju. (University of Miami – Jackson Memorial Hospital).

Po povratku u Hrvatsku krajem 1991., radio sam na Odjelu ginekologije i porodiljstva, te surađivao s prof. Goldenbergom u Klinici Tel Hashomer u Israelu. Sredinom devedesetih započeo sam i u narednih deset godina ostvario uspješnu karijeru u farmaceutskoj industriji (generalni manager: Hoechst; RPR; Aventis; sanofi-aventis). Završio sam poslijediplomski studij Management u zdravstvu. Vođen željom za radom s bolesnicima, vratio sam se u struku, te završio specijalizaciju iz dermatovenerologije i doktorski znanstveni studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U svibnju 2009. Obranio sam temu doktorske disertacije: "Uporabna vrijednost sadašnjih kriterija u određivanju indikacije za biopsiju limfnog čvora čuvara u bolesnika s primarnim melanomom kože", pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Šitum.

Član sam ISDS-a (International Society for Dermatologic Surgery) i EADV-a (European academy of dermatology and venerology).

Hobi mi je glazba. Aktivan sam član *big-banda* HGZ-a (Hrvatski glazbeni zavod).

Radovi

„Clinico-pathological features of melanoma patients with positive sentinel lymph node biopsy: a single institution experience“.

"Our experience of Melanoma Thickness as a Predictor of Outcome of Sentinel Node Biopsy".

„Abnormal electrophoretic mobilities of platelets in immune thrombocytopenias and thromboses and their correction by taurine“.

„Electrophoretic properties of platelets from normal, thrombocitic and ITP patients by doppler electrophoretic light scattering analysis“.