

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Damir Vučinić
REGULACIJA MOLEKULA PD-1 / PD-L1 SIGNALNOG PUTA U
MALIGNOM MELANOMU

Doktorski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Damir Vučinić
REGULACIJA MOLEKULA PD-1 / PD-L1 SIGNALNOG PUTA U
MALIGNOM MELANOMU

Doktorski rad

Mentorica rada:
prof.dr.sc. Gordana Zamolo, prim.dr.med.

Rijeka, 2023.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Damir Vučinić

REGULATION OF PD-1/PD-L1 PATHWAY IN MALIGNANT
MELANOMA

Doctoral thesis

Mentor:

Prof. Gordana Zamolo, MD PhD

Rijeka, 2023.

Mentorica rada: prof.dr.sc. Gordana Zamolo, prim.dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____
_____,'

pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima 102 lista.

UDK: _____

PREDGOVOR

Istraživanje na kojem se temelji ova doktorska disertacija izrađeno je na Zavodu za opću patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a u suradnji s Klinikom za kirurgiju i Klinikom za tumore, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Dio materijala prikupljen je uz pomoć suradnika Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Istraživanja su dio znanstvenog projekta „Regulacija molekula PD-1 / PD-L1 signalnog puta“. Projekt je financiran od Sveučilišta u Rijeci (uniri-biomed-18-18 31337).

ZAHVALE

Zahvaljujem prof.dr.sc. Gordani Zamolo, koja me kao mentorica vodila u svim fazama ovog istraživanja. Hvala Vam što ste mi otvorili vrata svijeta znanosti. Hvala na uputama, znanju i beskrajnoj podršci. Bili ste i ostatak moje inspiracije i uzor u znanstvenoj karijeri.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za patologiju i patološku anatomiju na pomoći i suradnji. Veliko hvala kolegama Klinike za tumore na nesebičnoj pomoći i podršci.

Svim ljudima koji su sudjelovali u istraživanjima na kojima se temelji ova disertacija želim zahvaliti na trudu kojeg su mi posvetili.

Veliko hvala svim mojim prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Naposljetku, najveću zahvalu upućujem mojim roditeljima. Vaša podrška i ljubav dali su mi snagu da budem najbolja verzija sebe. Hvala vam, mama i tata. Ovaj rad posvećujem vama.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Da bi se predvidjela učinkovitost i optimiziranje anti-PD-1 i anti-PD-L1 terapije važno je razjasniti regulaciju tih molekula. Imunohistokemijskim metodama i metodama molekularne dijagnostike ispitivali smo ulogu tri skupine regulacije: promjene u genetskom materijalu i signalnim putevima melanomske stanice, regulacija od strane imunološkog sustava i regulacija od strane enzima tumorskog mikrookoliša.

Ispitanici i metode: Iz reprezentativnog dijela tkiva melanoma koristilo se 3 cilindra promjera 1 mm za izradu tkivnih mikroareja (TMA). U istraživanje smo uključili 39 bioptata primarnih melanoma (Breslow <1,5 mm), 42 uzorka primarnih melanoma (Breslow >1,5 mm) te 31 uzorak metastaza melanoma. Uz određivanje ekspresije PD-1 i PD-L1 molekula identificirali smo limfocite koji infiltriraju tumor (TIL) imunohistokemijskim bojanjem na CD3 molekulu. Nadalje, ispitivali smo prisutnost CD8⁺, CD4⁺ i Foxp3⁺ limfocita kao i CD20⁺ B limfocita. TIL je kategoriziran u BRISK kategorije. Određen je odnos ekspresije MITF, ciklina D1 i Bcl-2 proteina kao i enzima metaloproteinaza s istraživanim molekulama. Genetska preuredba MITF gena analizirana je metodom qReal-time PCR.

Rezultati: Molekule PD-1 i PD-L1 jače su izražene u melanomima svrstanim u kategoriju Breslow > 1.5 mm. Ekspresija PD-L1 proteina na tumorskim stanicama gotovo uvijek iznosi > 50% kada je TIL u kategoriji BRISK B. U kategoriji BRISK B statistički je značajna razlika u ekspresiji PD-1 molekule ($p=0.003$). Nismo dokazali dominantno prisustvo određenih limfocita (CD8⁺, CD4⁺ ili Treg) u nekom od kategorija TIL-a. Dokazana je statistički značajna korelacija ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina s ekspresijom ciklina D1 u jezgri stanice i MITF te Bcl-2 proteina u citoplazmi tumorskih stanica ($p<0.001$). Razlika u ekspresiji PD-L1 je bila statistički značajna ovisno o tome postoji li MITF amplifikacija, u grupi metastaza ($p=0.008$). Nije pronađena povezanost između ekspresije metaloproteinaza s ekspresijom PD-1 i PD-L1 ($p=0.723$).

Zaključak: Ekspresija proteina uključenih u PD-1/PD-L1 signalni put regulirana je međusobnim djelovanjem stanice melanoma i stanica imunološkog sustava. Ovisi o smještaju limfocita i gustoći TIL-a, a ne o njihovoj vrsti. Ekspresija PD-L1 ovisna je o aktivnosti MITF čimbenika i njegovih ciljnih proteina, regulatora staničnog ciklusa.

Ključne riječi: PD-1 protein; PD-L1 protein; transkripcijski faktor povezan s mikroftalmijom; tumor-infiltrirajući limfociti

SUMMARY

Objectives: Immunohistochemical methods and molecular diagnostic methods have been used to examine the role of three groups of regulation: changes in the genetic material and signalling pathways of the melanoma cell, regulation by the immune system, and regulation by the enzyme of the tumour microenvironment. **Patients and methods:** From a representative part of the melanoma tissue, 3 cylinders with a diameter of 1 mm were used for the preparation of tissue microarrays (TMAs). The study included 39 biopsies of primary melanoma (Breslow < 1.5 mm), 42 samples of primary melanoma (Breslow > 1.5 mm) and 31 samples of metastatic melanoma. In addition to determining the expression of the PD-1 and PD-L1 molecules, by immunohistochemical staining of the CD3 molecule we identified tumour infiltrating lymphocytes (TILs). Furthermore, we examined the presence of CD8+, CD4+ Foxp3+ and CD20+ B lymphocytes. TIL is classified into BRISK categories. The relationship between the expression of MITF, cyclin D1 and Bcl-2 proteins, as well as the metalloproteinase (MMPs) enzymes, and the investigated molecules has been determined. The genetic rearrangement of the MITF gene was analysed using the qReal-time PCR method. **Results:** PD-1 and PD-L1 are more strongly expressed in melanomas categorized as Breslow > 1.5 mm. The expression of PD-1 and PD-L1 almost always > 50% when TIL is in BRISK B category. We did not prove the dominant presence of certain lymphocytes (CD8+, CD4+ or Treg) in any of the TIL categories. We proved a statistically significant correlation of expression of PD-1 and PD-L1 proteins with expression of cyclin D1 in the cell nucleus and MITF, as well as Bcl-2 proteins in the cytoplasm of tumour cells ($p < 0.001$). The difference in PD-L1 expression was statistically significant, depending on whether MITF amplification was present, in the metastasis group ($p = 0.008$). No correlation was found between the expression of MMPs and the expression of PD-1 and PD-L1 ($p = 0.723$). **Conclusion:** The expression of proteins involved in the PD-1/PD-L1 signalling pathway is regulated by the interaction of the melanoma cell and the immune system cells. It depends on the location of the lymphocytes and the density of the TIL, not on their type. The expression of PD-L1 is dependent on the activity of the MITF factor and its target proteins, the cell cycle regulators.

Key words: PD-1 protein; PD-L1 protein; microphthalmia-associated transcription factor; tumour-infiltrating lymphocytes

SADRŽAJ

1.	Uvod i pregled područja istraživanja	1
1.1	Incidencija i epidemiologija	1
1.2	Bazična etiologija melanoma i nasljedni oblici	2
1.3	Patohistološka dijagnoza melanoma	3
1.4	Ključni signalni putevi u patogenezi melanoma	6
1.5	Molekularna osnova metastaziranja melanoma	8
1.6	Signalni putevi koji reguliraju upalu i angiogenezu u melanomu	9
1.7	Matriks metaloproteinaze u mikrokolištu melanoma	12
1.8	Apotoza stanica melanoma	13
1.9	Uloga ciklina u staničnom ciklusu melanoma	14
1.10	Uloga MITF-a u odgovoru melanoma na imunoterapiju	15
1.11	Limfociti koji infiltriraju tumor - prognostički i prediktivni čimbenik melanoma	16
1.12	Mikrokolišt tumora i limfociti koji infiltriraju tumor	16
1.13	Inhibitori kontrolnih točaka u liječenju melanoma	20
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	23
3.	ISPITANICI I METODE	24
3.1	Ispitanici u istraživanju	24
3.1.1	Izjava o poštivanju etičkih principa u istraživanju	27
3.2	Metode istraživanja	28
3.2.1	Metoda tkivnih mikroareja (TMA, tissue microarray)	28
3.2.2	Imunohistokemijske analize - opći protokol Zavoda za patologiju i patološku anatomiju ..	29
3.2.3	Evaluacija imunohistokemijskih preparata i istraživanje proteina tumorskih stanica	31
3.2.4	Evaluacija imunohistokemijskih preparata u svrhu određivanja limfocita koji infiltriraju tumor	31
3.2.5	Izolacija DNA iz tumorskog materijala	33
3.2.6	Analiza amplifikacije MITF gena metodom SyberGreen Real- time PCR-a	33
3.3	Statistička obrada podataka	35
4.	REZULTATI	36
4.1	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na kliničke i patološke značajke primarnih melanoma	36
4.2	Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule od strane infiltrata limfocita oko tumora	39
4.2.1	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na BRISK kategorije tumorskog upalnog infiltrata	41

4.2.2	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na prisustvo CD20 ⁺ B limfocita u TIL-u	43
4.2.3	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na prisustvo CD8 ⁺ , CD4 ⁺ i foxp3 ⁺ T limfocita u TIL-u i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma	44
4.3	Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule od strane proteina važnih u staničnom ciklusu stanice melanoma	46
4.3.1	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na ekspresiju ciklin D1 proteina i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma	47
4.3.2	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na ekspresiju Bcl-2 proteina i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma	51
4.3.3	Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na ekspresiju MITF proteina i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma	55
4.4	Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule od strane enzima matriks metaloproteinaza	59
4.5	Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom	60
4.5.1	Molekularna analiza amplifikacije MITF gena u uzorcima primarnog melanoma pacijenata liječenih imunoterapijom	64
4.5.2	Analiza preživljenja bez progresije bolesti u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom – ovisno o kliničkim obilježjima i analiziranim parametrima regulacije PD-1 / PD-L1 signalnog puta	65
4.6	Analiza ekspresije PD-L1 proteina u grupi metastaza melanoma i njezin odnos s drugim analiziranim proteinima tumorske stanice	68
5.	RASPRAVA	69
6.	ZAKLJUČCI	79
7.	LITERATURA	82
	POPIS TABLICA	93
	POPIS POKRATA	97
	ŽIVOTOPIS	99

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 Incidencija i epidemiologija

Melanom je tumor s velikim utjecajem na epidemiologiju malignih bolesti zbog svoje brzo rastuće učestalosti, visoke smrtnosti te stalnog povećanja troškova skrbi u uznapredovanim stadijima. Diljem svijeta svakim danom ulažu se istraživački naponi kako bi se dijagnoza pomaknula prema ranijim fazama, spriječila ukupna incidencija melanoma i razvili revolucionarni tretmani [1]. Pomno promatranje epidemioloških podataka i trendova je u tijeku, a sve kako bi se pronašli prvi znakovi uspjeha ovih inicijativa kroz promjene u incidenciji ili smrtnosti. Također, isto je od interesa kako bi se verificirali tragovi novih čimbenika rizika ili prognostičkih markera. Digitalno doba nudi mogućnost prikupljanja, dijeljenja i usporedbe podataka. Incidencija melanoma u Europi tako postaje sve veća, a do izražaja dolazi i njena heterogenost. Epidemiološke analize, koliko god bile složene, dobre su onoliko koliko su dobri njihovi izvori podataka. Temelj epidemiološkog nadzora raka čine populacijski registri raka (eng. population-based cancer registries PCR) [2,3]. PCR su složene organizacije namijenjene sustavnom prikupljanju, pohrani i analizi podataka o svim slučajevima raka koji se javljaju u određenoj populaciji, obično na određenom zemljopisnom području [1]. Diljem svijeta, melanom je 20. najčešći tumor, procjenjuje se da je 2018. godine bilo 287 723 novih slučajeva (1,6% svih tumora) i 60 712 smrtnih slučajeva (0,6% svih smrti od raka), a utvrđena je rastuća petogodišnja prevalencija od 965 623 slučaja. U Europi je melanom šesti najčešći tumor, procijenjeno je 144 209 novih slučajeva (3,4% svih tumora) i 27 147 smrtnih slučajeva (1,4% svih smrti od raka), a petogodišnja prevalencija od 494 111 slučajeva [4-6]. Najveće dobno standardizirane stope incidencije (standardizirane na svjetsku populaciju) zabilježene su u Oceaniji (28,3 na 100 000 stanovnika), a najniže u Aziji i Africi (0,48 odnosno 0,51 na 100 000 stanovnika). U Ujedinjenom Kraljevstvu melanom je 5. najčešći tumor s oko 16 200 novih slučajeva (4% svih karcinoma) i 2300 smrtnih slučajeva (1,0% svih smrti od raka) u 2017. godini. Otprilike polovica slučajeva dijagnosticira se u dobi od 65 i više godina, a velika većina slučajeva javlja se na trupu kod muškaraca i na donjim udovima kod žena [2]. Kumulativni rizik od razvoja melanoma do 74 godine života je 1,34% kod muškaraca i 1,35% kod žena. Melanom se javlja između 20. i 60. godine života, s vrhom incidencije u 5. desetljeću [7,8]. Na sreću, vrlo rijetko se javlja u dječjoj dobi.

Displastični nevusi osobito u obitelji s obiteljskim melanomom povećavaju rizik melanoma u djece. Osobe s jednim ili više rođaka u 1. koljenu koji u anamnezi imaju melanom su u većoj opasnosti (do 6 – 10 puta) od onih bez opterećene obiteljske anamneze. Procijenjene stope mortaliteta od melanoma kože za Hrvatsku u 2020. nalaze se među najvišim stopama u zemljama Europske unije (EU): 7,7 za muški spol i 3,8 za ženski. Nažalost, Hrvatska se nalazi među članicama EU koje imaju najniže stope preživljanja, i to 64,96% za muškarce i 76,02% za žene (za dob 15 godina i više) [2,8].

1.2 Bazična etiologija melanoma i nasljedni oblici

Melanociti su stanice neuralnog grebena koje se mogu naći uglavnom u bazalnom epidermisu i u folikulima dlake, duž površina sluznice, moždanih ovojnica i u koroidalnom sloju oka. Kao odgovor na oštećenje DNA izazvano sunčevim zračenjem, keratinociti kože proizvode hormon koji stimulira melanocite (MSH) [9]. Taj hormon veže receptor melanokortina 1 (MC1R) na melanocitima, koji zatim proizvode i otpuštaju melanin. Pigment melanin u konačnici djeluje kao štit za ultraljubičasto (UV) zračenje, čime se sprječava daljnje oštećenje DNA. Primarni okolišni čimbenik rizika za razvoj melanoma kože je UV zračenje sunca, kao i umjetno stvorene UV zrake [9,10]. Osim svijetle puti, broj opekлина nakupljenih tijekom života, posebno tijekom djetinjstva, povezan je s većim rizikom od nastanka melanoma. Nadalje, broj madeža na tijelu osobe također povećava rizik za razvoj melanoma kože [11]. Tijekom proteklih godina postignuto je bolje razumijevanje razvoja i biologije melanoma. Postalo je jasno da razvoj melanoma iz preneoplastičnih lezija nije određen jednim evolucijskim obrascem. Svaki podtip melanoma može se razviti iz različitih prekursorskih lezija i može uključivati različite genske mutacije i stupanj transformacije [2,12]. Zanimljivo, BRAF mutacija je pronađena u do 80% benignih nevusa, što rezultira ograničenom proliferacijom melanocita putem onkogenom posredovane aktivacije starenja stanica. Ovi nevusi ostaju indolentni desetljećima upravo zbog imunološkog nadzora. Stoga, sam mutirani onkogen BRAF nije dovoljan za razvoj melanoma. Rijetko benigni nevusi napreduju do melanoma [13]. Kada se to dogodi, ključne su naknadne mutacije u različitim genima, kao što su TERT ili CDKN2A. S druge strane, melanomi povezani s kožom koja je kronično izložena suncu obično ne nastaju iz već postojećih nevusa, već iz melanoma *in situ* ili displastičnih lezija.

Između 7 i 15% bolesnika s melanomom ima obiteljsku anamnezu bolesti, a rizik od melanoma se udvostručuje ako je melanom prethodno dijagnosticiran u prvom koljenu srodnika. Većina rizika je povezana sa zajedničkim izlaganjem suncu među članovima obitelji, a manji broj slučajeva su nasljedne prirode [10,12,14]. Najčešće nasljedno stanje je obiteljski sindrom atipičnih madeža-melanoma (eng. familial atypical multiple mole melanoma - FAMMM) [15]. Ovi pacijenti su u opasnosti od kožnog melanoma, karcinoma gušterače i tumora neuralnog sustava. Kriteriji za dijagnozu FAMMM sindroma uključuju obiteljsku povijest kožnog melanoma kod rođaka prvog ili drugog koljena; više od 50 nevusa s više atipičnih nevusa; specifične histološke značajke u nevusima, kao što su asimetrija, subepidermalna fibroplazija i lentiginozna melanocitna hiperplazija s vretenastim ili epiteloidnim melanocitima. Ovaj sindrom je najčešće povezan s mutacijom u genu CDKN2A, a također je opisan s mutacijama CDK4. Ukupno je 45% melanoma povezanih s genetskom etiologijom povezano s mutacijom germinativne linije u CDKN2A ili CDK4 [16,17]. CDKN2A je gen smješten na kromosomu 9p21.3 koji kodira p16 i/ili p14ARF, dva inhibitorna proteina. Protein p16 je kinaza ovisna o ciklinu uključena u put Rb (retinoblastoma), a mutacija rezultira nereguliranom staničnom diobom zbog ne inhibiranog G1-S faznog prijelaza. Nadalje, p14ARF regulira ubikvitinaciju tumorskog supresora p53, označavajući ga za razgradnju u proteosomu. Disfunkcija P14ARF smanjuje odgovor stanice na oštećenje DNA. Istovremeni gubitak p14 i p16 dovodi do melanom-astrocitom sindroma [18]. Taj rijetki sindrom karakteriziran je prisutnošću melanoma i astrocitoma kao i drugih neoplazmi živčanog sustava, poput tumora ovojnice perifernih živaca i meningeoma. Uloga genetskog testiranja nasljednog melanoma je kontroverzna budući da dermatološko liječenje pojedinaca s obiteljskim melanomom (tj. nadzor, edukacija o zaštiti od sunca, itd.) rijetko zahtijeva informaciju o CDKN2A statusu pacijenta. Međutim, fenotip melanoma može biti prozor za procjenu latentnog rizika za razvoj melanoma kože [2,6,19]. Zaključno, budućnost u personaliziranoj onkologiji svakako uključuje procjenu genetskog rizika i savjetovanje.

1.3 Patohistološka dijagnoza melanoma

Patološko izvješće o melanomu treba uključivati opis značajki na kojima se temelji dijagnoza melanoma kao i značajke koje su važne za prognozu i liječenje bolesnika. Korištenje strukturiranog formata nalaza olakšava komunikaciju patologa i kliničara. Prognoza za bolesnike s klinički lokaliziranim primarnim melanomom uglavnom ovisi

o debljini tumora. Isto je opisao Breslow, čija je klasifikacija i danas neizostavan dio patološkog nalaza. Klasifikacija koju je predložio Clark, temelji se na histološkim parametrima i u stupnjevima od 1-5 opisuje do kojeg je sloja kože proširen melanom. [20] (Tablica 1)

Tablica 1: Clark klasifikacija melanoma – opis invazije slojeva kože

STUPANJ	OPIS
I	melanom <i>in situ</i>
II	infiltracija melanoma u papilarni dermis
III	melanom ispunjava i proširuje papilarni dermis
IV	infiltracija melanoma u retikularni dermis
V	melanom proširen na subkutis

Druge važne prognostičke značajke primarnog melanoma uključuju ulceraciju, stopu mitoze, limfovaskularnu invaziju, limfocite koji infiltriraju tumor (eng. tumor-infiltrating lymphocytes - TIL), podtip melanoma (npr. dezmodoplastični melanom koji je povezan s boljom prognozom), kao i karakteristike bolesnika kao što su dob, spol i anatomsko mjesto tumora (mlada dob bolesnika, ženski spol i melanom koji nastaje na ekstremitetima povezani su s povoljnijom prognozom) [21,22]. Ackerman i sur. predložili su koncept histološke klasifikacije melanoma na temelju morfoloških i citoloških značajki. Arhitektonska obilježja melanoma uključuju asimetriju, prisutnost nepravilno raspoređenih melanocita, pojedinačno ili u gnijezdima, a koji zauzimaju epidermis, adneksa i dermis. Melanociti iznad spoja epidermisa i dermisa ponekad tvore nepravilna gnijezda. Gnijezda i pojedinačni melanociti nemaju sazrijevanje s progresivnim spuštanjem u dermis [23]. Nadalje, melanin je nepravilno raspoređen u leziji unutar epidermisa, dermisa i adneksa. Citološke karakteristike uključuju prisutnost atipičnih melanocita, nekrotičnih melanocita i melanocita koji prolaze kroz proces mitoze. Standardizirani i suvremeni sustav određivanja stadija tumora olakšava točnu stratifikaciju rizika i ključan je za usmjeravanje liječenja bolesnika [24]. (Slika 1) Osmo izdanje sustava određivanja stadija Američkog odbora za rak (American Joint

Committee on Cancer - AJCC) trenutno je najšire prihvaćen pristup određivanja stadija i klasifikacije melanoma pri početnoj dijagnozi [25]. (Tablica 2)

Tablica 2: Osmo izdanje sustava određivanja stadija Američkog odbora za rak (American Joint Committee on Cancer - AJCC)

T Category	8 th Edition (implemented 2018)	
	Thickness	Ulceration status
TX	N/A	N/A
T0	N/A	N/A
Tis	N/A	N/A
T1	≤1.0 mm	Unknown or unspecified
T1a	<0.8 mm	Without ulceration
T1b	<0.8 mm 0.8-1.0 mm	With ulceration With or without ulceration
T2	>1.0-2.0 mm	Unknown or unspecified
T2a	>1.0-2.0 mm	Without ulceration
T2b	>1.0-2.0 mm	With ulceration
T3	>2.0-4.0 mm	Unknown or unspecified
T3a	>2.0-4.0 mm	Without ulceration
T3b	>2.0-4.0 mm	With ulceration
T4	>4.0 mm	Unknown or unspecified
T4a	>4.0 mm	Without ulceration
T4b	>4.0 mm	With ulceration

TABLE 1
STAGES OF MELANOMA

Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b T2a	N0 N0	M0 M0
IIA	T2b T3a	N0 N0	M0 M0
IIB	T3b T4a	N0 N0	M0 M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T4a T1-T4a	N1a N2a	M0 M0
IIIB	T1-T4b T1-T4b T1-T4a T1-T4a T1-T4a	N1a N2a N1b N2b N2c	M0 M0 M0 M0 M0
IIIC	T1-T4b T1-T4b T1-T4b Any T	N1b N2b N2c N3	M0 M0 M0 M0
IV	Any T	Any N	M1

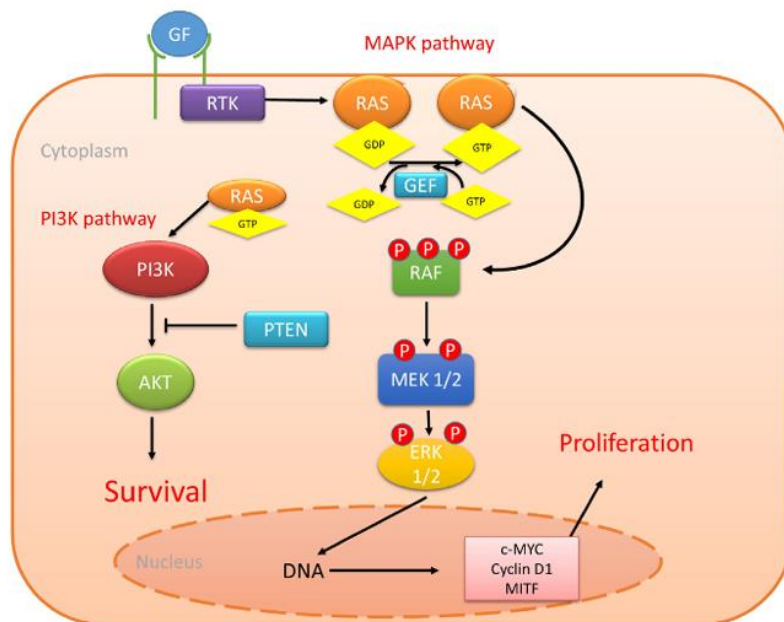
Slika 1. Shematski prikaz određivanja stadija melanoma

Još je 1967. godine eminentni američki patolog, Wallace Clark, predložio klasifikaciju melanoma u kojoj je ova maligna bolest podijeljena uglavnom na temelju histopatoloških značajki intraepidermalne komponente tumora [26]. Podtipovi su bili površinski šireći melanom, lentigo maligna melanom i nodularni melanom. Dok su od tada opisani dodatni entiteti, uključujući akralni lentiginozni melanom, melanom sluznice, dezmodoplastični melanom i nevoidni melanom, prije spomenuti „osnovni“ tipovi melanoma ostaju ključni i u posljednjoj verziji klasifikacije melanoma Svjetske zdravstvene organizacije [9,21,24]. Površinsko šireći melanomi obično se javljaju kod mlađih bolesnika (srednja dob je 5. desetljeće života). Obično zahvaćaju kožu izloženu suncu kao što su trup, leđa i ekstremiteti. Tipično je to ravna polagano rastuća nepravilna lezija s raznolikom pigmentacijom koja se radijalno povećava. Histološki, intraepidermalni sloj površinsko širećeg melanoma karakterizira prisutnost velikih pleomorfnih epiteloidnih melanocita. Ostala obilježja ovog tipa melanoma uključuju promjenjivo zadebljanje epidermisa i izraženu intracitoplazmatsku melanizaciju [27]. Nodularni melanomi (NM) obično se javljaju kod nešto starijih pacijenata (srednja dob je 7. desetljeće). Mogu se pojaviti na bilo kojem mjestu i obično se pojavljuju kao čvorići koji se brzo šire uz ulceraciju i krvarenje. Klinički se mogu zamijeniti s drugim kožnim tumorima kao što su karcinomi bazalnih stanica, osobito ako su amelanotični. Histološki, postoji dermalna masa displastičnih tumorskih stanica s epidermalnom invazijom prema gore, ali minimalnim susjednim epidermalnim širenjem ili horizontalnim rastom. Tumorske stanice su često okrugle i epiteloidne morfologije s hiperkromatskim jezgrama. Lentigo maligna melanom histološki je karakteriziran lentiginoznom proliferacijom atipičnih melanocita u UV zračenjem oštećenoj koži koja pokazuje epidermalnu atrofiju, tešku dermalnu solarnu elastozu i dermalno stanjivanje. Često su takvi melanomi uz adneksalne strukture i uz prisutne tipične multinuklearne ili divovske melanocite [20,21,28].

1.4 Ključni signalni putevi u patogenezi melanoma

Metode molekularne biologije, osobito sekvencioniranja cijelog genoma identificirale su izuzetnu genetsku složenost melanoma. Ona se sastoji od tisuća mutacija, delecija, amplifikacija, translokacija kao i promjena u metilaciji DNA. Unatoč ovom obilju i složenosti genetskih promjena, od kojih su mnoge takozvane "driver" mutacije, identificirano je nekoliko ključnih za patogenezu melanoma [29]. Možda je najbolje proučena onkogeno mutacija u melanomu ona proto-onkogeno mišjeg sarkoma

(BRAF) koji kodira serin/treonin protein kinazu. Taj enzim djeluje u putu RAS–RAF–MEK–ERK protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) [22,29]. (Slika 2.) Aktivirajuće mutacije u BRAF genu javljaju se u više od 50% melanoma, a najčešća mutacija dovodi do valin – glutaminska kiselina supstitucije na poziciji 600 (V600E). Dok divlji tip BRAF kinaze tipično aktivira KRAS, mutacija pV600E uzrokuje nereguliranu aktivnost iste kinaze. Takva promjena dovodi do konstitutivne aktivacije MEK gena koja pokreće put ERK kinaze. Zanimljivo je da melanomi koji posjeduju divlji tip BRAF obično imaju mutacije u ključnim genima koji kodiraju uzvodne proteine MAPK puta, uključujući NRAS, KIT, GNAQ i GNA11 [22]. Ovo opažanje snažno ukazuje na središnju ulogu prekomjerne aktivacije puta RAS–RAF–MEK–ERK u patogenezi melanoma. Štoviše, aktivirajuće mutacije BRAF često se nalaze u benignim i displastičnim nevusima, a aktivacija BRAF dovodi do razvoja nevusa kroz proces poznat kao starenje izazvano onkogenom. Unatoč prekomjernoj aktivaciji BRAF-a u nevusima, postoji mehanizam zaustavljanja staničnog ciklusa koja je rezultat ekspresije ključnog inhibitora kinaze ovisne o ciklinu, p16INK4A [12,29,30]. Ipak, mutacije BRAF-a smatraju se uobičajenim genetskim mutacijama ranog stadija u progresiji melanoma. Međutim, same aktivirajuće mutacije u BRAF-u nisu dovoljne da izazovu melanom.



Slika 2. Prikaz prekomjerne aktivacije puta RAS–RAF–MEK–ERK u patogenezi melanoma. Preuzeto iz rada Scolyer i sur. [20]

Kao i u razvoju svakog tumorskog kлона, potrebne su dodatne genetske promjene u BRAF mutiranim stanicama kako bi se izazvao potpuno kancerogeni fenotip. Jedna takva genetska promjena, visoke penetracije u melanomu, je gubitak ili mutacija lokusa inhibitora kinaze ovisne o ciklinu 2A (CDKN2A) [31]. Značajno je da se ovaj lokus nalazi na kromosomu 9p21 i kodira dva tumor supresorska proteina, p16INK4A i p14ARF (razlikuju se u posttranslacijskim modifikacijama), a oba djeluju na zaustavljanje staničnog ciklusa. Kao što je gore navedeno, p16INK4A je ključni negativni regulator staničnog ciklusa koji se veže na i inhibira kinazu ovisnu o ciklinu (CDK4), čime aktivira Rb [27,30]. Na taj način sprječava napredovanje staničnog ciklusa, odnosno „prolazak“ stanice kroz kontrolne točke G1-S faze staničnog ciklusa. S druge strane, p14ARF djeluje kao pozitivni regulator p53 inhibicijom njegovog glavnog negativnog regulatora, jezgreno lokalizirane E3 ubikvitin ligaze. Iz tog razloga, inaktivacija CDKN2A delecijom, utišavanjem promotora ili mutacijom dovodi do nekontrolirane stanične proliferacije. Zanimljivo je da kontinuirana ekspresija onkogene BRAFV600E u melanocitima inducira ekspresiju p16INK4A, za koju se čini da ne uključuje trošenje telomera i gubitak replikativnog potencijala. Ova barijera "onkogenom izazvanog starenja" u melanocitima potiče razvoj nevusa i kontrolirana je p16INK4A-ciklin D/CDK4-RB interakcijom [12,31-33]. U normalnim melanocitima, indukcija p16INK4A MAPK puta tipično uključuje aktivaciju transkripcijskog faktora povezanog s mikroftalmijom (MITF). Ključno je da se amplifikacija MITF lokusa nalazi u 20-30% melanoma i često je praćena aktiviranjem BRAF mutacija i gubitkom p16INK4 [34].

1.5 Molekularna osnova metastaziranja melanoma

Metastaze tumora najvažniji su uzrok loše prognoze bolesnika s melanomom. Općenito, pojava metastaza uglavnom uključuje sljedeće ključne korake: invaziju, intravazaciju, cirkulaciju, ekstravazaciju i kolonizaciju udaljenog tkiva. Važno je naglasiti i neke važne biološke procese uključene u metastaziranje: epitelno-mezenhimalni prijelaz (EMT), adheziju stanica melanoma i produkciju egzosoma. EMT se odnosi na stanični proces karakteriziran sniženom ekspresijom višestrukih epitelnih markera poput E-kadherina, laminina, citokeratina i pojačanom regulacijom i ekspresijom mezenhimalnih markera poput N-kadherina, vimentina i α -SMA [35,36]. EMT je fiziološki ključan u embriogenezi, fibrozi i cijeljenju rana. Kod tumora, pojava EMT-a je popraćena morfološkim prelaskom iz epiteloidnog u mezenhimalni/vretenasti stanični oblik, dajući tumorskim stanicama poboljšanu invazivnu i migracijsku

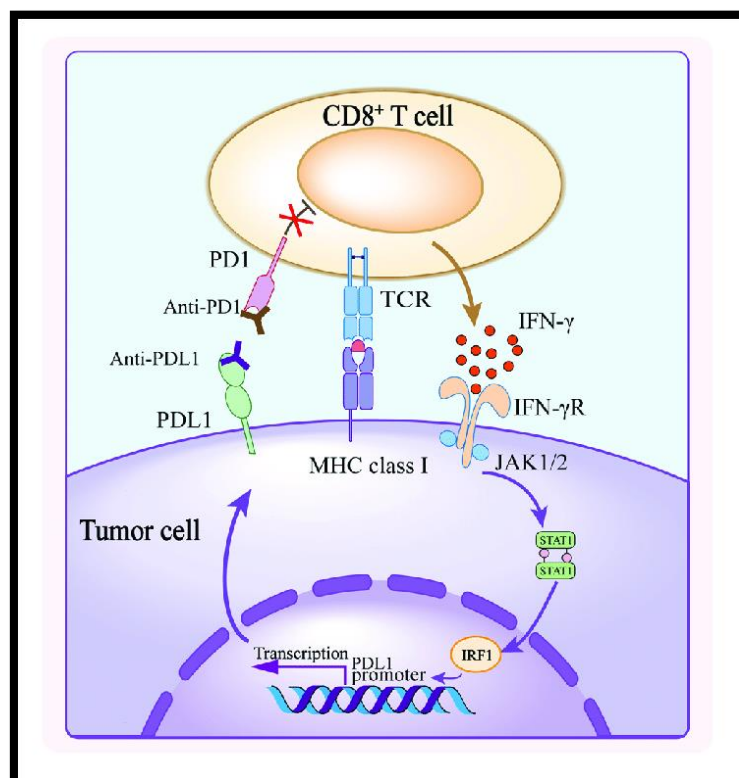
sposobnost. Čini se da je EMT upravo pod kontrolom kanonskih onkogenih putova kao što su BRAF/MEK, AKT/mTOR, Wnt/ β -katenin i TGF- β . Najčešće su istraživane ekspresije transkripcijskih čimbenika koji induciraju EMT (EMT-TF) uključujući MITF, SOX2 i NF- κ B [37]. Kao odgovor na aktivaciju MEK/ERK u melanomima koji sadrže BRAF ili NRAS mutaciju, dolazi do promjene molekularne mreže, a time raste i invazivna sposobnost tumora. Autori opisuju aktivaciju AKT i mTOR signalnog puta koji je u snažnoj pozitivnoj korelaciji s agresivnošću melanoma i lošom prognozom pacijenata. Gubitak PTEN-a glavni je razlog hiperaktivacije AKT puta. Neke kliničke analize ukazuju na blisku vezu između aktivacije AKT-a i pojave metastaza u određenim regijama kao što su mozak, limfni čvorovi i pluća. Štoviše, prekomjerna ekspresija AKT-a dramatično inducira invazivni fenotip melanoma, promičući pretvorbu iz radialnog u vertikalni rast [12,30]. Osim MAPK i AKT puta, Wnt/ β -katenin je također usko povezan s EMT-om i metastazama melanoma. Sinnberg i sur. je dokazali su da je β -katenin često eksprimiran na invazivnom prednjem dijelu melanoma, što ukazuje na međusobnu interakciju stanica tumora i tumorskog mikrookoliša [38,39].

1.6 Signalni putevi koji reguliraju upalu i angiogenezu u melanomu

Signalni putevi upalne reakcije uvelike su povezani s karcinogenezom i napredovanjem melanoma. Upalni čimbenici uključujući čimbenik nekroze tumora (TNF α), interferon gama (IFN- γ), interleukine i molekule vezane za NF- κ B regulatorni put privlače sve više pozornosti u istraživanju biologije melanoma i njegovog mikrookoliša [40]. (Slika 3.)

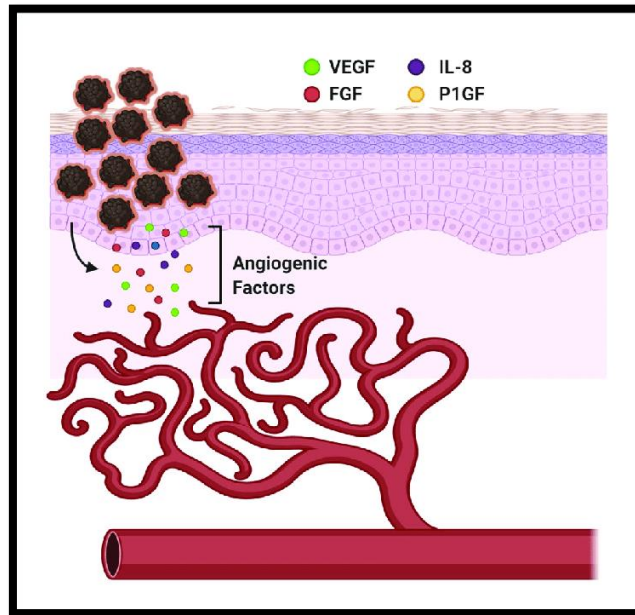
Prethodna istraživanja potvrdila su povećanu ekspresiju TNF α u stanicama melanoma. Za razliku od činjenice da visoke doze egzogenog TNF α mogu inducirati apoptozu melanoma, što je korišteno u raznim kliničkim ispitivanjima i terapiji drugih tumora, TNF α izveden iz tumorske stanice ili mikrookoliša melanoma ima istaknutu regulatornu ulogu u preživljavanju, proliferaciji, invaziji i metastaziranju melanoma. TNF α koji izlučuju tumorske stanice potiče nizvodnu aktivaciju kaskade RIPK1-NF- κ B te omogućuje preživljavanje tumorskih stanica [29,41]. Stoga bi blokada TNF α mogla biti obećavajući terapijski pristup uz ciljanu terapiju. Osim toga, Zhu i sur. dokazali su da TNF α stimulira migracijski potencijal stanica melanoma preko pojačane ekspresije fibronektina i integrina [42]. Sukladno tome, TNF α potiče ekspresiju MMP2 i MMP9 kako bi se olakšala migracija tumorskih stanica. Što je još važnije, otkriveno je da TNF α

određuje fenotipsku plastičnost stanica melanoma povećavajući MITF ekspresiju. Slabije diferencirano stanje stanica melanoma karakterizirano je niskom razinom MITF te sukladno tome potiče jaku upalnu reakciju oko tumora [40,43]. Nedavne studije koncentriraju se na ulogu interferon gama (IFN- γ) signalizacije u regulaciji imunološkog odgovora oko tumora. Konkretno, IFN- γ bi mogao inducirati ekspresiju molekula važnih u putevima imunoloških kontrolnih točaka, uključujući citotoksični T limfocitni antigen-4 (CTLA-4), a djelujući putem transkripcijske kaskade ovisne o JAK-STAT signalnom putu [44]. Čini se da IFN- γ može modulirati imunološke kontrolne točke kako bi se prekinulo i „nadziranje“ tumorskih stanica od strane limfocita. Intrigantno je da IFN- γ izlučen od strane limfocita koji infiltriraju tumor, a nakon imunoterapije ili radioterapije može izvršiti svoj izravan učinak na tumorske stanice putem smanjene regulacije sustava ferroptoze, novog modaliteta stanične smrti koja je karakterizirana prekomjernom oksidacijom lipida [45].



Slika 3. Prikaz interakcije citotoksičnog limfocita i tumorske stanice kao i kaskada signalnih puteva reguliranih IFN- γ . Preuzeto iz rada Nardone i sur. [40]

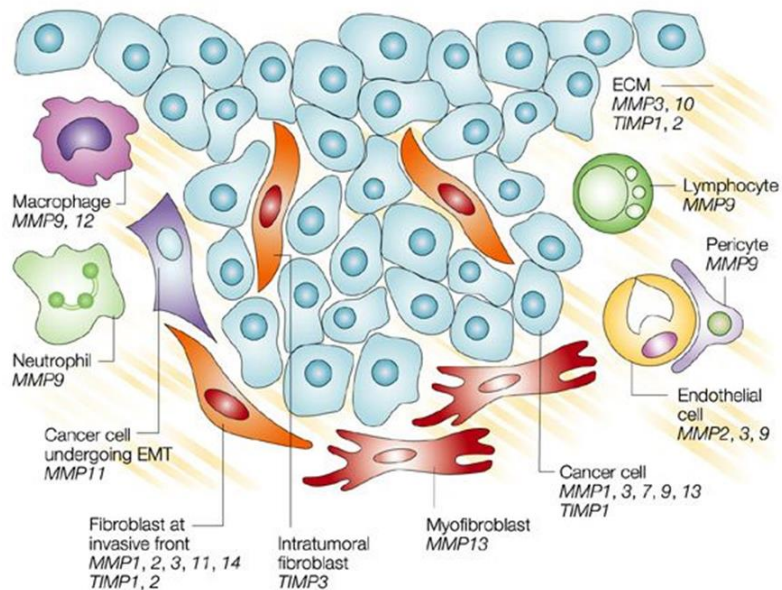
Interleukini i kemokini dva su ključna tipa čimbenika povezanih s upalom u patogenezi melanoma, a posebno u regulaciji imunoloških stanica u tumorskom mikrookruženju. Razni interleukini imaju različite, čak suprotne učinke na antitumorsku imunost. IL-2 je snažan aktivator CD8⁺ T stanica i NK stanica. U pokušajima liječenja, 1998. godine, visoke doze IL-2 odobrene su za liječenje melanoma te su postigle značajan odgovor, čak u 15-20% pacijenata s uznapredovalim melanomom. Međutim, povećani rizik od ozbiljnih nuspojava uključujući gastrointestinalne nuspojave, vrućicu i zimicu ograničio je kontinuiranu upotrebu IL-2 [46]. Angiogeneza se definira kao stvaranje novih krvnih žila proizašlih iz već postojeće neoplastične vaskulature, koja je uglavnom odgovorna za opskrbu dovoljnom količinom hranjivih tvari i kisika kako bi se osigurala brza proliferacija tumorskih stanica. Utvrđeno je da je status angiogeneze u visokoj korelaciji s progresijom melanoma, osobito s prijelazom iz radijalne faze rasta u vertikalnu fazu rasta [21,29,47]. Razvoj bogate vaskularne arhitekture unutar tumorskog mikrookruženja reguliran je angiogenim prekidačem, što znači pojačanje ekspresije proangiogenih čimbenika i supresija antiangiogenih čimbenika. Nekoliko je glavnih čimbenika koji pridonose neovaskularizaciji melanoma, uključujući VEGF-A, bazični faktor rasta fibroblasta (bFGF), faktor rasta placente (PIGF), angiopoetin (Ang), IL-8 i PDGF [48,49]. (Slika 4.) Ove čimbenike uglavnom proizvode tumorske stanice, uz sudjelovanje alternativnih tipova stanica poput endotelnih stanica i imunoloških stanica. Preciznije, VEGF-A izlučen iz stanica melanoma ostvaruje svoj učinak na angiogenezu kroz vezanje na receptor VEGFR na stanicama endotela. Posljedično, sinteza dušikovog oksida i PI3K/AKT signalizacija se aktiviraju kako bi se povećala propusnost krvnih žila i pospješila proliferacija endotelnih stanica. Osim toga, aktivacija fokalne adhezijske kinaze (FAK) pridonosi ekstravazaciji stanica melanoma. Slično drugim vrstama raka, razina ekspresije VEGF-A u melanomu također je pod transkripcijskom regulacijom HIF1 α , što je inducirano lokalnom tkivnom hipoksijom [31,50]. Osim VEGF-A, bFGF je još jedan čimbenik pro-angiogeneze koji je fiziološki uključen u modulaciju zacjeljivanja rana stimuliranjem proliferacije endotelnih stanica i migracije makrofaga i fibroblasta. Mehanički, bFGF izlučene iz stanica melanoma ne samo da mogu komunicirati s receptorom na površini endotelnih stanica kako bi se olakšala neovaskularizacija, već i aktivirati tumorske stanice na autokrini način kako bi se pospješila njihova proliferacija. Supresija aktivnosti bFGF korištenjem ciljanih protutijela dovodi do izražene regresije angiogeneze i smanjenja rasta tumora. Stoga je bFGF terapijska meta s višestrukim učinkom za liječenje melanoma [51,52].



Slika 4. Faktori angiogeneze u melanomu, ključni za sprječavanje hipoksije tumorskog tkiva kao i metastaziranje. Preuzeto iz rada Raiabi i sur. [48]

1.7 Matriks metaloproteinaze u mikrookolišu melanoma

Razgradnja bazalnih membrana i remodeliranje izvanstaničnog matriksa od strane matriks metaloproteinazama (MMP) važni su koraci u lokalnoj invaziji i metastaziranju melanoma. MMP su skupina od 26 ljudskih endopeptidaza koje vežu cink i reguliraju proteolizu elemenata mikrookoliša kao i staničnu migraciju u nizu karcinoma [53]. Klasificiraju se kao kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), gelatinaze (MMP-2, MMP-9), stromelizini (MMP-3, MMP -10), i matrilizini (MMP-7, MMP-26). Ekspresija MMP-a inducira se kada je potrebno remodeliranje tkiva u fiziološkim i patološkim uvjetima. MMP stupaju u interakciju sa širokim rasponom ne-matričnih proteina koje djeluju kao adhezijske molekule, čimbenici rasta i posrednici angiogeneze [54]. (Slika 5.) Iako su brojne studije ispitivale MMP i njihovu ekspresiju i/ili aktivaciju u staničnoj liniji melanoma *in vitro* i *in vivo*, još uvijek postoji potreba za istraživanjem ekspresije MMP-a u kliničkim uzorcima. Kao regulator proteinske ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule spominju se i određeni enzimi prisutni u tumorskom mikrookolišu. Do sada je ovaj proteolitički enzim bio označen kao jedan od glavnih mehanizama tumorske invazije [55,56].



Slika 5. Enzimi matriks metaloproteinaza u funkciji remodeliranja tumorskog mikrokoliša. Preuzeto iz rada Docampo i sur. [54]

1.8 Apoptoza stanica melanoma

Apoptoza, programirana stanična smrt, djeluje na održavanje ravnoteže različitih staničnih procesa, što znači da je izbjegavanje apoptotičkog puta ključno za stvaranje tumora i nekontroliranu proliferaciju stanica melanoma. Apoptoza je posredovana proenzimom inicijatorom i efektorom – kaspazama koje propagiraju proteolitičku kaskadu proteina koja naposljetku završava smrću stanice. Apoptozu pokreću tri puta, unutarnji, vanjski i put neovisan o kaspazi [57]. Unutarnji put, također poznat kao mitohondrijski put, iniciran je nepovoljnim uvjetima okoline kao što su UV zračenje, nedostatak hranjivih tvari i oksidativni stres. Ovaj proces reguliraju proapoptotičke i antiapoptotičke molekule u obitelji Bcl-2, koje djeluju na povećanje propusnosti mitohondrija i naknadno oslobađanje citokroma c. S druge strane, vanjski put je posredovan TNF α i vezanjem na njihove odgovarajuće receptore Fas i TNFR. Put neovisan kaspazama induciran je citotoksičnim T stanicama [58,59,60]. Stanice malignog melanoma mogu izbjeći apoptozu putem sljedećih procesa: poremećene ravnoteže pro-apoptotičkih i anti-apoptotičkih proteina, smanjene funkcije kaspaze i poremećajima u signalizaciji receptora smrti. Proliferacija melanoma povezana je s disregulacijom nekoliko modulatora apoptoze kao što su protein p53 i inhibitori proteina apoptoze (IAP). Avery-Kiejda i sur. dokazali su smanjenu ekspresiju p53 koja je u

korelaciji s proliferacijom stanica melanoma. IAP su endogeni inhibitori kaspaza i prekomjerna ekspresija ovih proteina povezana je s farmakološkom rezistencijom stanica karcinoma [61]. Vucic i sur. opisuju povećanu ekspresiju IAP kod stanica melanoma. Razvoj ciljanih terapija u svrhu djelovanja na članove obitelji Bcl-2, p53, IAP, kaspaza i drugih molekula uključenih u apoptozu, mogao bi se pokazati ključan za buduće liječenje melanoma [62].

1.9 Uloga ciklina u staničnom ciklusu melanoma

Ciklini su proteini koji reguliraju progresiju staničnog ciklusa, tj. niz događaja koji se javljaju u stanicama kako bi se podijelile i razmnožile. Oni su odgovorni za kontrolu pravilnog prolaska stanica kroz različite faze staničnog ciklusa, uključujući fazu G1, S, G2 i M. U melanomu, poremećena regulacija staničnog ciklusa igra važnu ulogu u razvoju i napredovanju bolesti. Genetske mutacije ili promjene u ekspresiji proteina koji kontroliraju stanični ciklus mogu dovesti do nekontrolirane podjele stanica, stvarajući tumor [20, 63,64].

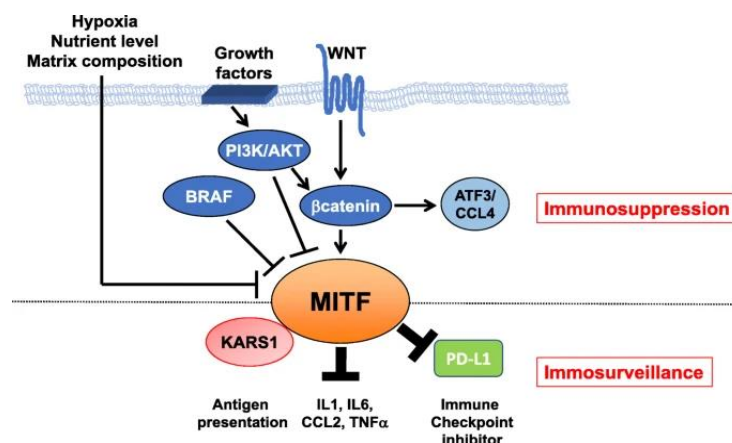
Postoji nekoliko ključnih čimbenika koji su povezani s ciklinima u malignom melanomu [65]:

- Povećana ekspresija ciklina - promjene u ekspresiji različitih ciklina mogu rezultirati ubrzanjem staničnog ciklusa i nekontroliranom podjelom stanica u melanomu pa je tako povećana ekspresija ciklina D1, D2 i E često je povezana s melanomom
- Inhibicija ciklinskih inhibitora - postoje i proteini nazvani ciklinski inhibitori kinaza (CDKi) koji obično inhibiraju aktivnost ciklinskih kompleksa; u malignom melanomu, može doći do smanjenja ekspresije ili funkcionalnosti ovih inhibitora, što rezultira nekontroliranom podjelom stanica
- Aktivacija onkogenih signalnih putova - signalni putovi koji su uključeni u razvoj melanoma, kao što je put RAS/BRAF/MEK/ERK, mogu utjecati na ekspresiju i aktivnost ciklina; aktivacija tih putova može potaknuti proliferaciju stanica melanoma
- Ciljanje ciklina u terapiji - Inhibitori ciklinskih kinaza (CDK inhibitori) su jedan od takvih pristupa koji mogu usporiti progresiju bolesti inhibirajući aktivnost ciklinskih kompleksa

Ukratko, poremećaj u regulaciji staničnog ciklusa i povezanost s ciklinima igra važnu ulogu u melanomu. Razumijevanje ovih mehanizama može pomoći u razvoju novih terapijskih pristupa.

1.10 Uloga MITF-a u odgovoru melanoma na imunoterapiju

MITF se sastoji od osam izoformi različito izraženih unutar različitih vrsta stanica i tkiva. Izoforma MITF-M (u daljnjem tekstu označena kao MITF) je glavni regulator melanocita i identificirana je kao onkogen u melanomu [66]. Vodeća hipoteza u novijim istraživanjima je da je visoka ekspresija MITF-a (MITF_{high}) povezana s diferenciranim i proliferativnim fenotipom, dok je niska ekspresija MITF-a (MITF_{low}) povezana s dediferenciranim, invazivnim staničnim fenotipom otpornim na apoptozu. Stanice MITF_{high} i MITF_{low} koegzistiraju u melanomu, a time povećavaju intratumorsku heterogenost. Signali u mikrookolišu tumora, kao što su hipoksija, dostupnost hranjivih tvari i citokini, prigušuju razine MITF-a [67,68]. (Slika 6.) Za istaknuti je da se MITF pokazao važnim u odgovoru na ciljane terapije, no njegova je uloga složena s obzirom da i povećana i smanjena ekspresija MITF-a može posredovati u otpornosti na BRAF/MEK inhibitore. Osim toga, prikupljeno je više dokaza koji sugeriraju ulogu MITF-a u otpornosti na imunoterapiju [69]. Uloga u rezistenciji na imunoterapiju predmet je istraživanja u recentnim znanstvenim radovima.



Slika 6. Prikaz utjecaja MITF proteina u imunomodulaciji stanice melanoma.

Preuzeto iz rada Dilshat i sur. [67]

1.11 Limfociti koji infiltriraju tumor - prognostički i prediktivni čimbenik melanoma

Tijekom vremena razvoja terapije i dijagnostike melanoma, histopatološki parametri u primarnom melanomu kože bili su predmet brojnih istraživanja. Stoga su multivarijatne analize pokazale da su debljina tumora i ulceracija najvažniji prognostički prediktori u lokaliziranoj bolesti. Sve više dokaza ukazuje na to da limfociti koji infiltriraju tumor (TIL) predstavljaju neovisni prognostički biljeg. Brojne studije opetovano su pokazale da gustoća i obrazac distribucije TIL-a u vertikalnoj fazi rasta primarnih melanoma ima prognostički značaj. Isto nije dokazano u radijalnoj fazi rasta [70]. Hussein i sur. pokazali su progresivno povećanje TIL-a tijekom tumorogeneze u melanocitnim lezijama, što se tumači kao učinak povećanja ekspresije antigena tumora [71]. Zanimljivo je da smanjenje TIL-a kod metastatskog melanoma odražava sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora. Štoviše, isto se može smatrati neovisnim prediktivnim čimbenikom za status limfnih čvorova čuvara [72]. Uočeno je da je prognoza bolesnika s jakim upalnim infiltratom bila značajno bolja od prognoze bolesnika s odsutnim TIL-om i korelirala s produljenim preživljenjem do progresije bolesti i ukupnim preživljenjem. Zbog njegovog prognostičkog značaja, neki autori smatraju da ovaj parametar treba uključiti i kvantificirati u histološkom nalazu [71,73].

1.12 Mikrookoliš tumora i limfociti koji infiltriraju tumor

Tumorsku masu čine tumorske stanice, ali i stromalne stanice, endotelne stanice, infiltrirajući leukociti, fibroblasti i složeni izvanstanični matriks koji čine tumorski mikrookoliš.

TIL su polimorfna skupina koja se sastoji od efektorni T limfocita, regulatornih T limfocita, stanica ubojica (NK), dendritičnih stanica i makrofaga. Distribucija, gustoća, profil i stanje aktivacije stanica koje čine TIL mogu biti promjenjivi i modulirati klinički ishod [74]. Prvi korak u pokretanju imunološkog odgovora domaćina u melanomu kože je prepoznavanje antigena koji će inducirati upalni intratumorski infiltrat. Postoje dvije vrste tumorskih antigena u melanomu: specifični antigeni koje ekspimiraju tumorske stanice (tumor-specifični antigeni, TSA) i tumorski povezani antigeni (TAA) koji se uglavnom proizvode raspadom tumorskih stanica [70,71,75]. TSA se nazivaju i neoantigeni jer su novoformirani antigeni i ne nalaze se u normalnom ljudskom genomu. TSA pokazuje visoku imunogenost i induciraju T-limfocite [76]. Iznimno je

velik broj mogućih mutacija, tako da je tumor svakog bolesnika jedinstven. S druge strane, TAA se također mogu eksprimirati u normalnim melanocitima, a većina njih je intracelularnog proteinskog podrijetla. Najčešće stanice melanoma izražavaju samo MHC klase I i ne eksprimiraju molekule MHC klase II. TAA ne inducira idealnu citotoksičnu T-staničnu reakciju i generira smanjeno stvaranje tumor-specifičnih CD4⁺. Stanice malignog tumora mogu upotrijebiti različite strategije kako bi izbjegle citotoksičnu ulogu T-stanica. U nekim slučajevima, stanice mogu smanjiti svoju ekspresiju TAA ili mogu proizvesti kemokine i citokine s imunosupresivnim učinkom. [72,77]

Dendritičke stanice (DC) prepoznaju tumorske antigene i igraju ključnu ulogu u pokretanju i regulaciji urođene i adaptivne imunosti. One su stanice koje predstavljaju antigene. Nakon toga, induciraju specifičan antitumorski odgovor unakrsnom prezentacijom antigena CD8⁺ T limfocitima pomoću MHC molekula klase I. DC može dodatno pridonijeti citotoksičnoj imunološkoj reakciji izravno i aktivacijom NK stanica. DC iz kože, Langerhansove stanice, dermalni DC i plazmacitoidni DC mogu pokazivati različite fenotipove, s različitim funkcijama [78]. U mikrookruženju tumora, medijatori koje oslobađaju tumorske stanice ili makrofagi povezani s tumorom (TAMs) kao što su IL-8, IL-10, TGF-β1 i VEGF ograničavaju normalno sazrijevanje DC-a i na taj način inhibiraju imunološki odgovor domaćina. DC u nezrelom stanju ne uspijevaju pravilno stimulirati T-stanice [77]. S druge strane, pogodujući proliferaciji regulatornih T-stanica, one blokiraju učinak citotoksičnih T-stanica. Na taj su način nezreli DC posrednici imunološke tolerancije unatoč imunološkoj aktivaciji, fenomenu koji su 1997. godine opisali Enk i sur. u bolesnika s melanomom [79]. Nezreli DC reguliraju angiogenezu tumora i pogoduju aktivnom rastu tumora. Zreli DC raspoređeni su uglavnom na periferiji tumora, a njihova gustoća zajedno sa statusom aktivacije limfocita T, korelirala s debljinom melanoma i preživljenjem bolesnika. Radi navedenog, autori preporučuju korištenje ovih parametara kao prediktora odgovora na liječenje u bolesnika liječenih imunoterapijom. Lotze je pokazao da je infiltracija zrelih DC u primarnim tumorima povezana s manjim brojem metastaza i boljom prognozom [80].

U idealnoj situaciji, stanice koje prezentiraju antigen dovode do aktivacije efektornih memorijskih T-stanica u limfnim čvorovima koje posreduju antitumorske učinke na mjestu tumora, proizvodeći nove antigene iz uništenih tumorskih stanica i stvarajući tumorski „imunitet“. Nakon prepoznavanja antigena predstavljenog APC-om, T-stanice

zahtijevaju nekoliko signala za punu aktivaciju. Prvi signal ovisi o antigenu i predstavlja li ga MHC I ili MHC II molekula. Kompleks s prezentiranim peptidom veže se na T-stanični receptor (TCR). Molekule stanične adhezije odgovorne su za održavanje veze između dviju stanica i omogućuju aktivaciju što je moguće više TCR-a na T-stanici. Drugi signal aktivacije zahtijeva specifičnu interakciju između T-staničnih receptora i njihovih liganada na APC (iz obitelji CD28/B7). Ovi receptori mogu djelovati kao kostimulatori ili koinhibitori [81,82]. Međudjelovanje između kostimulacijskih receptora i njihovog liganda potpuno aktivira T-stanice i inducira aktivaciju tumor-specifičnih T-stanica. U normalnim uvjetima, koinhibitorni receptori [programirana stanična smrt-1 (PD-1), citotoksični T-limfocitni antigen-4 (CTLA-4), B i T-limfocitni atenuator (BTLA) i T-stanični imunoglobulin i mucinska domena-3 (TIM-3), poznate kao 'molekule imunološke kontrolne točke'] i njihovi ligandi [ligand programirane smrti 1 (PD-L1) ili (PD-L2), CD80 ili CD86, posrednik ulaska herpesvirusa (HVEM) i galektin 9] inhibiraju aktivnost T-stanica i uključeni su u održavanje autoimunosti te moduliranje intenziteta i trajanja imunološkog odgovora [78,83]. Aktivacijom inhibicijskih imunoloških kontrolnih točaka, stanica raka štiti sebe od imunološkog napada. Uočeno je da imunološki sustav ima dvostruku ulogu, modificirajući interakcije između kostimulacijskih i koinhibicijskih signala. S jedne strane može kontrolirati maligne stanice, ali s druge strane može pogodovati progresiji tumora. TIL limfocita uključuje različite podskupine limfocita, u različitim omjerima, prilagođene citokinima koje luče tumorske stanice i stanice mikrokoliša. Limfociti T imaju glavnu ulogu u antitumorskim imunološkom odgovoru i dominantni su u mikrokruženju tumora. TSA generiraju vrlo osjetljivo i specifično CD8⁺ T prepoznavanje. CD8 efektorske T-stanice inhibiraju proliferaciju tumora, bilo izravnim citolitičkim djelovanjem na tumorske stanice ili otpuštanjem IFN- γ i TNF- α . Stoga je velika infiltracija CD8⁺ T-stanica u tumor povezana s dobrom prognozom u bolesnika s melanomom. Produljena izloženost antigenu može uzrokovati 'iscrpljenost' T-stanica specifičnih za tumorski antigen. PD-1 i TIM-3 smatraju se imunohistokemijskim markerima koji verificiraju "iscrpljenost" citotoksičnih limfocita [84]. Dio regulacije aktivnosti odvija se i posredovanjem T pomoćnih stanica. Postoje četiri glavne vrste CD4⁺ T-stanica, s različitim svojstvima i u promjenjivom postotku: Th1, Th2 Th17 i Treg. Th1, Th2 pomažu u borbi protiv tumora stimulirajući aktivnost CD8⁺ T-stanica preko medijatora kao što su IFN- γ , TGF- β ili IL-2. Th1 također može pogodovati aktivaciji makrofaga i sazrijevanju dendritičnih stanica, dok Th2 može stimulirati aktivnost eozinofila. Konzistentna intratumorska infiltracija CD8⁺ T-stanica i

Th1 stanica povezana je s povoljnom prognozom i boljim preživljenjem u većini vrsta karcinoma [81,85,86]. Th17 stanice imaju dva antagonistička oblika: u određenim citokinskim miljeima mogu se pretvoriti u Th1 i ispoljavati antitumorske učinke, dok se u drugim stanjima mogu prebaciti na karakteristike regulatornih T-stanica i potaknuti progresiju tumora. Regulacijske T-stanice (CD25/Foxp3+; supresivne T-stanice, Treg) su podvrsta T-stanica s ključnom ulogom u prevenciji autoimunih bolesti. Njihova prisutnost u mikrookolišu tumora inhibira antitumorske imunološke odgovore. Njih u tumorski mikrookoliš privlače kemokini koje izlučuju tumorske stanice i makrofagi. Treg se aktiviraju nakon prepoznavanja TAA oslobođenog iz uništenih tumorskih stanica, a zatim specifično potiskuju aktivaciju TAA-specifičnih efektorskih T-stanica i učinkovito uništavanje tumorskih stanica različitim mehanizmima (IL-10, TGF- β). Štoviše, Treg može suzbiti djelovanje nekoliko vrsta stanica imunološkog sustava kao što su CD8⁺ T-stanice, NK stanice, B stanice i APC. Nekoliko je studija provedeno o prognostičkoj ulozi Treg u melanomu. Neki su primijetili povezanost između prisutnosti visokog Treg infiltrata s lokalnim recidivom bolesti, brzom progresijom tumora, višom stopom metastaza u limfnom čvoru čuvaru, ali bez ikakve povezanosti s debljinom tumora i preživljenjem bolesnika [72,75,82].

Smatra se da omjeri između različitih podskupova T-stanica mogu dati točnije informacije o lokalnoj imunološkoj ravnoteži, a najčešće se koriste omjeri CD8/Foxp3+ (efektor/regulator) i CD8/CD4 (efektor/pomoćnik). Kako bi izbjegle imunološki napad, tumorske stanice potiskuju tumor-specifični T efektor i induciraju imunosupresivne Treg stanice, čime se smanjuju omjer CD8/Treg. U bolesnika liječenih kombiniranom terapijom kontrolnim točkama, omjeri CD8/Treg porasli su i bili su povezani s boljim preživljenja kod melanoma [77, 81].

NK su efektorske stanice urođenog imunološkog sustava i igraju ključnu ulogu u imunološkom nadzoru tumora zbog svoje sposobnosti uništavanja tumorskih stanica neovisno o MHC ili prethodnoj aktivaciji. NK stanice također sudjeluju u regulaciji adaptivnih imunoloških reakcija kroz interakcije s predočnim stanicama koje aktiviraju NK stanice i određuju njihov snažan citotoksični imunološki odgovor. Tumorske stanice mogu suprimirati NK stanični odgovor otpuštanjem TGF- β , niskom ekspresijom antigenosti ili povećanom ekspresijom MHC I [78]. Treg limfociti također mogu pridonijeti supresji regulacijom IL-2. Prognostička uloga infiltracije NK stanica u

melanomu nije jasno definirana, ali čini se da one ograničavaju razvoj hematogenih metastaza [87].

B stanice B stanice predstavljaju 15-20% svih infiltriranih limfocita . Točne uloge B stanica koje infiltriraju tumor u antitumorskom imunološkom odgovoru nisu definirane. Trend njihove veće prevalencije uočen je u debljim tumorima, a povećana gustoća B limfocita koji infiltriraju primarne kožne melanome povezana je sa smanjenim rizikom od udaljenih metastaza i dužim preživljavanjem. Bosisio i sur. nedavno su izvijestili o statistički značajno lošijem preživljenju u primarnim melanomima s nakupinama plazma stanica u usporedbi s boljim ishodom u slučajevima s oskudnim infiltratom plazma stanica [88]. Većina plazma stanica bile su poliklonalne, izražavajući pretežno IgG i IgA [81,89].

Makrofagi su heterogena skupina stanica sa sposobnošću prezentiranja antigena i predstavljaju dominantne upalne stanice koji infiltriraju tumor. Nalaze se u svim stadijima tumorske progresije. M1 makrofagi, klasični tip, imaju visoko antigen-prezentirajuće djelovanje, a također mogu proizvoditi Th1 citokine i ispoljavati antitumorski učinak. M2 makrofagi imaju nisku aktivnost prezentiranja antigena, inhibiraju aktivnost CD8⁺ T-stanica i NK stanica, stimuliraju dominaciju Th2 i Treg, stimuliraju proizvodnju antitijela i pogoduju migraciji tumorskih stanica. Upravo je zato jasna činjenica kako se tijekom rasta i progresije tumora, makrofagi pretvaraju iz M1 u M2 fenotip [90].

1.13 Inhibitori kontrolnih točaka u liječenju melanoma

Prije uvođenja imunoterapije u liječenju uznapredovalog melanoma, rezultati su uglavnom bili loši unatoč primjeni mnogih citotoksičnih sredstava i njihovih kombinacija. Medijan preživljenja ne operabilne metastatske bolesti bio je 6-9 mjeseci [12]. Nakon odobrenja imunoterapije, odnosno prve i druge generacije inhibitora kontrolnih točaka, preživljenje se značajno poboljšalo. U dugotrajnim analizama praćenja, studije pokazuju medijan preživljenja od gotovo 6 godina za kombinaciju CTLA4 i PD1 blokade. Protein 4 povezan s citotoksičnim T limfocitima (CTLA-4) igra ključnu ulogu u imunološkoj toleranciji i uključen je u regulaciju antitumorskog imunološkog odgovora. CTLA-4 je stanični receptor i homolog CD28, eksprimiran na regulatornim T stanicama. Vežanje B7 na CTLA-4 inicira se inhibicijska signalna kaskada koja rezultira supresijom funkcije T stanica. Anti-CTLA-4 monoklonska

protutijela sprječavaju vezanje CD28 na B7, što rezultira povećanom aktivacijom T stanica. Upravo je u tu svrhu odobreno liječenje ipilimumabom [91].

PD-1 eksprimira se na površini limfocita, dok je njegov ligand (PD-L1) široko eksprimiran i na imunološkim i na drugim stanicama različitih tkiva. Vezanje PD-1 na PD-L1 rezultira smanjenom aktivnošću T stanica. PD-L1 je prekomjerno izražen na velikom broju tumora, uključujući melanom, što rezultira izbjegavanjem imunološkog odgovora. Inhibicija PD-1 vraća standardno imunološko prepoznavanje malignih stanica i naknadno imunološki posredovano uništenje. Antitumorski učinak inhibicije PD-1 dokazan je pomoću dvaju monoklonskih protutijela specifičnih za PD-1, pembrolizumaba i nivolumaba. KEYNOTE-001, faza 1 ispitivanja koja je istraživala upotrebu pembrolizumaba u multiplim uznapredovalim solidnim tumorima, prva je signalizirala potencijalnu kliničku učinkovitost za liječenje uznapredovalog melanoma. Ti su rezultati dodatno ispitani u KEYNOTE-002, koja je pokazala učinkovitost pembrolizumaba nakon progresije na ipilimumab u usporedbi sa standardnom kemoterapijom. Pembrolizumab je rezultirao poboljšanim preživljenjem bez progresije bolesti i pri dozama od 2 mg/kg i 10 mg/kg (omjer rizika 0,57 odnosno 0,50), sa 6-mjesečnim preživljenjem bez progresije bolesti od 34% u skupini koja je primala pembrolizumab 2 mg/kg, 38 % u skupini koja je primala 10 mg/kg i 16% u skupini koja je primala kemoterapiju. Dodatno, manje nuspojave stupnja gradusa ≥ 3 prijavljeno je za bolesnike liječene pembrolizumabom u usporedbi s kemoterapijom. Rezultati ovog ispitivanja utvrdili su pembrolizumab kao novi standard liječenja. Nakon rezultata koji pokazuju njegovu kliničku korist kao adjuvantne terapije za bolesnike sa stadijem III melanoma, pembrolizumab je ispitan za upotrebu kod bolesnika s visokorizičnim stadijem II bolesti u usporedbi s placeboom u KEYNOTE-716, studije faze 3. Visokorizični stadij II melanoma definiran je kao melanom stadija IIB ili IIC. Rezultati su pokazali značajno smanjenje recidiva bolesti ili smrti (omjer rizika 0,61, interval pouzdanosti 0,45-0,82) s toksičnošću sličnom onoj uočenoj u prethodnim ispitivanjima. Nakon ovih rezultata, pembrolizumab je 2021. dobio odobrenje FDA za adjuvantno liječenje melanoma stadija IIB ili IIC nakon potpune resekcije [92-94].

Nivolumab je potpuno ljudsko IgG4 monoklonsko protutijelo usmjereno protiv PD-1. Godine 2012. objavljeni su rezultati ispitivanja prve faze, koji pokazuju aktivnost BMS-936558, kasnije nazvanog nivolumab, kod pacijenata s uznapredovalim solidnim tumorima, uključujući melanom. Nakon ovih rezultata, nivolumab je 2014. dobio

ubrzano odobrenje FDA za liječenje uznapredovalog melanoma. Ipilimumab i nivolumab, u kombinaciji, pokazali su sinergističke učinke na imunološki odgovor. Ispitivanje faze III, CheckMate-067 istraživalo je kliničku učinkovitost kombinacije ipilimumaba i nivolumaba u usporedbi sa svakim lijekom pojedinačno. Bolesnici s neoperabilnim stadijem III ili IV randomizirani su 1:1:1 na nivolumab + ipilimumab, samo nivolumab ili samo ipilimumab. Rezultati su pokazali da je kombinirana terapija poboljšala preživljenje bez progresije bolesti i ukupno preživljenje u odnosu na ipilimumab kao i u usporedbi s monoterapijom nivolumabom. Dugoročni ishodi nakon 6,5 godina pokazali su medijan ukupnog preživljenja od 72,1 mjesec za skupinu koja je primala ipilimumab i nivolumab, 36,9 mjeseci za monoterapiju nivolumabom i 19,9 mjeseci za monoterapiju ipilimumabom. Nuspojave povezane s liječenjem, koje su dovele do prekida uzimanja ispitivanog lijeka, javile su se u 7,7% pacijenata u skupini na nivolumabu u usporedbi s 36,4% onih u skupini na kombiniranoj terapiji. Nuspojave stupnja ≥ 3 pojavile su se u 59% skupine s kombinacijom ipilimumaba i nivolumaba, 24% s monoterapijom nivolumabom i 28% s monoterapijom ipilimumabom [95,96].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Iako je imunoterapija melanoma postigla izvrstan i revolucionaran učinak, nešto više od polovice pacijenata nema klinički odgovor na datu terapiju. Upravo iz tog razloga važna je definicija regulacije molekula PD-1 / PD-L1 signalnog puta. U ovoj studiji koja obuhvaća istraživanje regulacije na tri razine, imunološkoj, genetskoj i epigenetskoj, cilj je doći do vrijednih biomarkera i obilježja koje će biti moguće koristiti pri samoj patohistološkoj dijagnozi melanoma. Definiranjem dinamične promjene ekspresije PD-L1 molekule, uslijed promjena genoma i tumorskog mikrookoliša, učvrstit će i bolje razjasniti njezinu ulogu kao do sada jedinog vrijednog biomarkera kod terapije inhibitorima kontrolnih točaka.

HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA: Ekspresija proteina uključenih u PD-1 / PD-L1 signalni put inhibicije limfocita, regulirana je međusobnim djelovanjem tumorske stanice malignog melanoma i stanica imunološkog sustava. Hipoteza naših istraživanja jest da se promjene važne za regulaciju PD-1/PD-L1 signalnog puta nalaze se na razini genoma melanomske stanice, enzima strome i tumorskog upalnog infiltrata.

GLAVNI CILJ ISTRAŽIVANJA: Imunohistokemijskim metodama odrediti profil, odnosno tip limfocita uključenih u tumorski upalni infiltrat melanoma te statistički odrediti vezu profila imunoloških stanica s dinamikom ekspresije molekule PD-1 na T-limfocitima i PD-L1 na membrani tumorske stanice.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- vrstu limfocita u TIL-u povezati s promjenom imunološke reakcije u histološkim stadijima i tipovima melanoma
- metodama molekularne genetike odrediti MITF amplifikaciju i ispitati vezu s tipom TIL-a i ekspresijom PD-1/PD-L1 proteina
- odrediti povezanost ekspresije proteina ciklin D1 i Bcl-2, kao poznatih proteina reguliranih MITF-om, s ekspresijom proteina PD-1 i PD-L1 signalnog puta
- odrediti povezanost ekspresije metaloproteinaza, podvrste kolagenaza (MMP-1 i MMP-13) s ekspresijom proteina PD-1 i PD-L1 signalnog puta
- retrospektivni pregled pacijenata liječenih imunoterapijom kao i prospektivno praćenje pacijenata (određivanje vremena do progresije bolesti)

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitanici u istraživanju

Istraživanje je provedeno na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U istraživanju se, retrospektivno, koristio dijelom arhivski materijal (parafinske kocke s tkivom melanoma iz arhive Zavoda za patologiju) kao i prospektivno prikupljeni uzorci novo dijagnosticiranih melanoma odnosno primarnih melanoma pacijenata u tijeku imunoterapije. Retrospektivni materijal obuhvaćao je biopsije tkiva melanoma nakon ekscizije u razdoblju od 2017. do 2021. godine. Nadalje, biopsije pacijenata u tijeku liječenja imunoterapijom prikupljene su u vrijeme provođenja projekta, počevši u prosincu 2018. godine do kraja 2021. godine. U istraživanje je, nakon pažljive selekcije parafinskih kocki sa zadovoljavajućom količinom tumorskog tkiva, koje je proveo specijalist dermatopatolog i doktorand, uključen 81 uzorak tkiva primarnih melanoma i 31 uzorak metastaze melanoma. Biopsijski uzorci su preko noći fiksirani u 10% puferiranom formaldehidu (Kemika, Zagreb, Hrvatska), fiksirani materijal je višestruko narezan radi procjene najveće dubine invazije tumora i uzorci su uklopljeni u parafin. Parafinski blokovi su mikrotomom narezani na rezove debljine 3-4 μm , postavljeni na mikroskopsko stakalce i obojani hemalaun-eozinom (HE) radi provođenja patohistološke analize. Protokol je obuhvaćao ponovni pregled kliničkih podataka i patohistološkog reza od strane mentora i doktoranda u cilju formiranja skupina: Clark i Breslow klasifikacija; AJCC TNM kategorija; histološkog tipa melanoma po dominantnom načinu rasta i invazije; određivanje količine i mjesta tumorskog upalnog infiltrata – BRISK kategorija. Kod analize histološkog tipa melanoma isti su podijeljeni u tri najčešća tipa: površinsko šireći melanom, nodularni melanom i lentigo maligna melanom. Iz analize su isključeni rijetki oblici MM: amelanotični, MM svijetlih stanica, dezmoplastični i mikroidni MM. Navedeni nisu istraživani radi njihove dokazane različitosti u genetskoj osnovi maligne proliferacije, što uzrokuje izostanak poznatih biljega melanoma. Pri formiranju grupa na osnovu kliničkog stadija uključeno je 39 primarnih melanoma (Breslow $<1,5$ mm), 42 uzoraka primarnih melanoma (Breslow $>1,5$ mm) te 31 uzorak metastaza malignog melanoma. Grupu metastaza melanoma činili su uzorci pacijenata koji do trenutka uzimanja biopsije metastaze nisu primali sistemsku terapiju liječenja MM. Broj uzoraka metastaza melanoma čine i uzorci suradničke Ustanove KBC Sestre Milosrdnice,

Zagreb. Na osnovu kliničkog stadija prema AJCC klasifikaciji uzorke smo grupirali u sljedeće kategorije: kategorija 1 – klinički stadiji 0, I, IIa; kategorija 2 – klinički stadiji IIb, IIC; kategoriju 3 je činio klinički stadij III dok su u kategoriju 4 uvršteni inicijalno metastatski melanomi kliničke kategorije IV. Unutar skupine primarnih melanoma izdvojili smo one pacijente koji su primali liječenje ili bili u tijeku liječenja imunoterapijom. Analizirao se klinički odgovor i provedeno je praćenje 31 pacijenta koji su imunoterapiju započeli u vremenskom periodu 2017. do 2021. godine. Također, na ovim uzorcima provedena je imunohistokemijska i molekularna analiza te je praćen njihov odgovor na terapiju do dovršetka ovog projekta (siječanj 2023 godine), a najmanje dvije godine od početka aplikacije imunoterapije. Kliničkopatološki podatci primarnih melanoma prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Kliničke i patološke karakteristike ispitivane skupine pacijenata primarnih melanoma.

	Skupina primarnih melanoma	Postotak
	n=81	
Spol		
Žene	23	28%
Muškarci	58	72%
Godine kod postavljanja dijagnoze		
Median (raspon)	67,0 (21-90)	
Anatomska lokalizacija melanoma		
trup	42	52%
ekstremiteti	23	28%
glava i vrat	16	20%
Stupnjevanje melanoma prema Breslow-u (debljina)		
(0, 1-1.5 mm)	39	48%
(>1,5 mm)	42	52%
Histološki tip melanoma		
Lentigo maligna	9	11%
Površinsko šireći	29	35%
Nodularni	43	54%
Sentinel limfni čvor		
Pozitivan	29	36%
Negativan	52	64%
Kategorije na osnovu kliničkog stadija		
KATEGORIJA 1 - 0, I, IIa	38	47%
KATEGORIJA 2 - IIb, IIc	14	17%
KATEGORIJA 3 - III	26	32%
KATEGORIJA 4 - IV	3	4%

3.1.1 Izjava o poštivanju etičkih principa u istraživanju

Ovim istraživanjem osigurano je poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost za ispitanika. U prikupljanju i prikazivanju podataka očuvala se privatnost ispitanika i zaštito njihov identitet. Uzorci su označeni šifrom te će se kao takvi korišteni tijekom cijelog istraživanja. Pri znanstvenom istraživanju pridržavali smo se preporuka Helsinške deklaracije i njezinih revizija, Kodeksa medicinske etike i deontologije (NN 55/08), Pravilnika o kliničkim ispitivanjima i dobroj kliničkoj praksi (NN 121/2007, NN 175/2003) koji je uskladu sa Smjernicama Europske medicinske agencije i njenog tijela Committee for Proprietary Medicinal Products («Note for Guidance on Good Clinical Practice» - CPMP/ICH/135/95). Tijekom ispitivanja poštivani su i drugi pravni akti RH (Zakon o lijekovima, NN 71/07; Zakon o lijekovima i medicinskim proizvodima NN 121/03; Zakon o liječništvu NN 121/03; Statut Hrvatske liječničke komore) i druge preporuke. Svi pacijenti u tijeku liječenja imunoterapijom potpisali su informirani pristanak. Obrazac informiranog pristanka sastavljen je u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 158/08, 71/10, 139/10, 22/11, 84/11, 12/12, 35/12, 70/12 i 82/13) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04, 37/08)). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

3.2 Metode istraživanja

3.2.1 Metoda tkivnih mikroareja (TMA, tissue microarray)

Imunohistokemijske analize učinjene su na uzorcima tkiva MM metodom tkivnih mikroarea (TMA). To je tehnički postupak prijenosa uzoraka ispitivanog tkiva s više parafinskih blokova u jedan zajednički parafinski blok. Takva metoda omogućava istovremenu analizu pregled velikog broja uzoraka na jednom preparatu i pod istim eksperimentalnim uvjetima. TMA metoda pridonosi uštedi protutijela i/ili proba za imunofluorescentne tehnike. Ipak, najvažnija je činjenica da se ovom metodom štedi biološki materijal potreban za druga istraživanja i/ili potencijalu reviziju patohistološke dijagnoze. Iako se ne može tvrditi da neće biti određenih odstupanja zbog nemogućnosti analize čitavog tumora, provedene studije su pokazale visoku podudarnost između rezultata dobivenih metodom TMA i metoda koje su koristile pune rezove tumora. Na standardnom tkivnom rezu obojenom HE patolog označi tumorsko tkivo bez nekroze. Sa odgovarajućeg parafinskog bloka punktiraju se šupljom iglom po tri cilindra tumorskog ili kontrolnog tkiva promjera 1mm iz parafinskog bloka donora, pomoću uređaja MTA Booster OI i prenose se u parafinski blok primatelj. Razmak između dva uzorka 0.5 mm. Kao orijentacija koristilo se zdravo tkivo jetre. Nakon izrade TMA bloka, isti se ostavlja se preko noći u termostatu na 45°C da bi se parafin i uneseno tkivo homogenizirali.

3.2.2 Imunohistokemijske analize - opći protokol Zavoda za patologiju i patološku anatomiju

Rezovi TMA parafinskih blokova debljine 4 µm stavljaju se na predmetno stakalce obloženo silanom te se suše tijekom noći i to 12 sati, na 37 °C. Slijedi deparafinizacija supstitucijom ksilena (Tissue Clear firme Sakura,UK) tri puta tijekom 10 minuta. Daljnja priprema vrši se rehidracijom, tri puta po 5 minuta, redom apsolutnim etilnim alkoholom 100%-im, 96%-im i 70%-im. Nakon opisanog postupka vrši se ispiranje u destiliranoj vodi kroz 10 minuta. Predmetna stakla s tkivnim rezovima za dokazivanje cyclin D1 i Bcl-2 antigena uranjaju se u Target Retrieval otopinu (DakoCytomation Glostrup, Denmark) u aparat PT link na 20 minuta na temperaturi od 97 °C. Predmetna stakla sa tkivnim rezovima za dokazivanje antigena specifičnih za limfocite (PD-1, CD8, CD4, CD3, CD20 i Foxp3+) kao i MITF te PD-L1 antigena te enzima metaloproteinaza, uranjaju se u Tris/EDTA pufer pH 9, a zatim stavljaju u laboratorijski pretis lonac Pascal firme DakoCytomation i u njemu se pufer sa stakalcima zagrijava do 125 °C i po postignutoj temperaturi mjeri se efektivno vrijeme inkubacije 30 sekundi.

Nakon 20 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi i ispiranja u destiliranoj vodi predmetna stakla su spremna za imunohistokemijsko bojenje. Imunohistokemijsko bojanja vrši se u automatskom imunobojaču (Dako Autostainer Plus, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Korištena odgovarajuća protutijela navedena su u Tablici 4. Za određivanje izražaja proteina koristi se „EnVision“-imunohistokemijska metoda s REAL ENVISION DETECTION sustavom (Glostrup, Denmark) prema uputama proizvođača.

Tablica 4: Karakteristike protutijela korištenih za imunohistokemijske analize

Protutijelo, kat.broj	Proizvođač	Razrijeđenje protutijela	Demaskiranje	Obojenje/ očitavanje
Anti-PD-1 - antibody [EPR4877(2)] 100ul kat broj. ab137132	AbCam, UK	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-PD-L1 - antibody [28-8] 50 µl; kat. broj ab205921	AbCam, UK	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-CD3 – antibody RB A-HU T-CELL, kat. broj A045201	Dako, CytomationDanska	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-CD8 – antibody MO A-HU T CELL,CD8, C8/114B, kat. broj M710301	Dako, CytomationDanska	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-CD4 – antibody kat. broj 104R-16	Cell Marque, Njemačka	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-Foxp3+ - antibody [236A/E7] 250ug kat broj. ab20034	AbCam, UK	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-CD20 - antibody MONOCLONAL DAKO-B CELL, L26 kat. broj M075501	Dako, CytomationDanska	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Stanična membrana, %
Anti-MMP-1 – antibody 3B6 kat. broj sc-21731	Santa Cruz Biotech, USA	1:200	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Citoplazma; %
Anti-MMP-13 – antibody kat broj. sc-101564	Santa Cruz Biotech, USA	1:200	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Citoplazma; %
Anti-cyclinD1- antibody; Target Retrieval otopina, clon EP12	Dako, CytomationDanska	1:50	Target Retrieval otopina, Dako, Cytomation 97°C, 20 min	Jezgra; %
Anti-MITF – antibody MO A-HU kat. broj M362129	Dako, CytomationDanska	1:100	Tris/EDTA, pH 9 Zagrijavanje 125°C- 35 s, hlađenje 20 min	Jezgra; %
Anti-cyclinD1- antibody; Target Retrieval otopina, clon 134	Dako, CytomationDanska	1:200	Target Retrieval otopina Dako, Cytomation 97°C, 20 min	Citoplazma; %

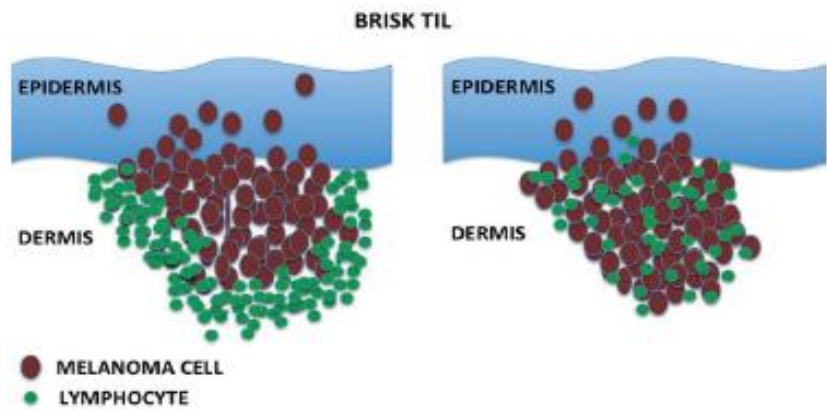
3.2.3 Evaluacija imunohistokemijskih preparata i istraživanje proteina tumorskih stanica

Dva patologa i istraživač su nezavisno očitavali imunohistokemijske (IHC) preparate melanoma na način da smo u svakom od tri kopije TMA mikroskopskih rezova izbrojali pozitivno obojane stanice na 100 tumorskih stanica. Broj obojenih stanica izrazili smo u postotcima. IHC obojenje na Bcl-2 protein i metaloproteinaze očitavali smo u citoplazmi, PD-L1 ekspresiju određivali smo na membranama stanica, a IHC obojenje na ciklin D1 i MITF proteine u jezgrama tumorskih stanica.

3.2.4 Evaluacija imunohistokemijskih preparata u svrhu određivanja limfocita koji infiltriraju tumor

Područja izolirana za IHC analizu morala su uz tumorsko tkivo sadržavati i područja upalnog infiltrata oko tumora. Nakon pripreme TMA blokova slijedilo je IHC bojenje na CD3. Isti marker određuje prisustvo T limfocita u upalnom infiltratu. Bojenje nam je omogućilo kategorizaciju prema BRISK klasifikaciji, a istu smo za potrebe ove studije modificirali. Detaljan opis prikazuje Slika 7.

Drugi rezovi služili su za ispitivanje podvrsta T limfocita kao i određivanje moguće infiltracije B limfocitima. Broj obojanih stanica izrazio se u postotcima u usporedbi s ukupnim brojem T limfocita utvrđenih IHC bojenjem na CD3. Na osnovu prisustva CD20⁺ limfocita melanome smo svrstali u dvije kategorije obzirom na prisustvo B limfocita u infiltratu oko ili u tumorskom tkivu.

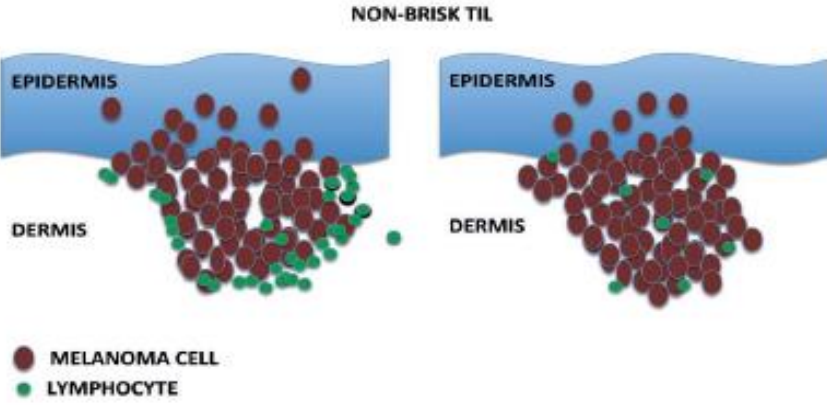


BRISK KLASIFIKACIJA:

BRISK A – infiltracija na bazi i oko tkiva melanoma, kontinuirana s najmanje 4 reda limfocita

BRISK B – limfociti između stanica melanoma

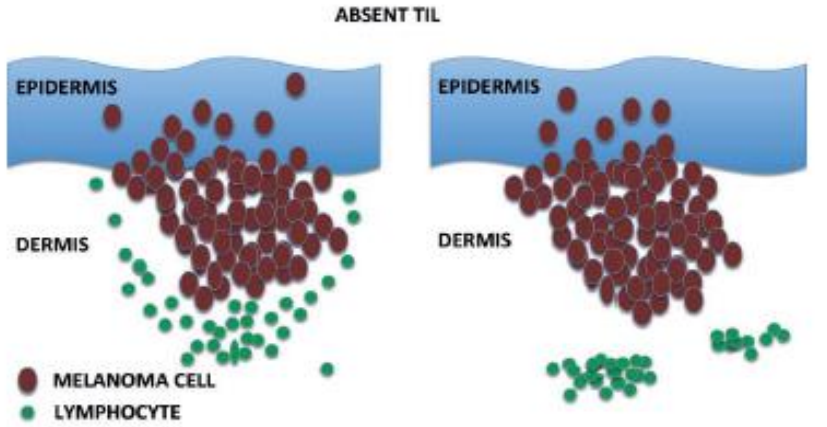
1. epidermis
2. dermis
3. epidermis + dermis



NON BRISK KLASIFIKACIJA:

NON BRISK A – infiltracija na bazi i oko tkiva melanoma, diskontinuirana ili s najmanje od 4 reda limfocita

NON BRISK B – limfociti između stanica melanoma, ali fokalno raspoređeni



ABSENT TIL KLASIFIKACIJA:

ABSENT TIL A – infiltracija na bazi udaljena od samog tkiva melanoma, odnosno bez kontakta sa stanicama melanoma

ABSENT TIL B – lokaliziran TIL oko krvnih žila ili na mjestima fibroze

Slika 7. Modificirana BRISK klasifikacija shematski prikazuje distribuciju limfocita u TIL-u. . Modificirano prema Betof i sur. [74]

3.2.5 Izolacija DNA iz tumorskog materijala

Za potrebe analize amplifikacije MITF gena, DNA je izolirana iz arhivskog materijala primarnih melanoma u liječenju imunoterapijom i biopsija metastaza melanoma, uklopljenih u parafinske kocke. Nekoliko mikrotomskih rezova debljine 5-10 μm nanešeni su na predmetna stakalca i po jedan rez je obojen hemalaun-eozinom. Patolog je pod mikroskopom označio područje gdje je broj tumorskih stanica i bio odgovarajuću. To područje tumorskog tkiva bilo je bez znakova nekroze i infiltracije s imunološkim stanicama. Mikrodisekcija označenih područja je načinjena pomoću sterilnog skalpela s neobojenih rezova. DNA je izolirana pomoću komercijalnog reagensa NucleoSpin Tissue (proizvođača Macherey-Nagel, Duren, Njemačka), posebno prilagođenog za taj tip materijala, a prema uputama proizvođača. Kvaliteta i koncentracija izolirane DNA provjerena je na fluorometru Qubit 3.0 s reagensom Qubit DNA HS (Invitrogen, Carlsbad, California, SAD). Koncentracija DNA bila je u rasponu od 0,5 do 12 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

3.2.6 Analiza amplifikacije MITF gena metodom SyberGreen Real- time PCR-a

Amplifikacija MITF gena provedena je metodom SybrGreen Real- time PCR (PCR u stvarnom vremenu), prema metodama opisanim u radovima Garraway i sur. (2005) i Ugurel i sur. (2007) [97,98]. PCR reakcija provedena je u duplikatu koristeći reagens SYBER Premix Ex Taq (Perfect Real Time) tvrtke Takara Bio. Inc. (Shiga, Japan). Svaka tumorska DNA umnožena je pomoću početnica za navedene gene, a referentni gen je bio GAPDH, repetitivna sekvenca čiji su brojevi kopija po haploidnom genomu slični među svim humanim normalnim i neoplastičnim stanicama. Relativni broj MITF i GAPDH kopija u uzorcima tumorske DNA normaliziran je u odnosu na genomsku DNA izoliranu iz stanica zdrave kože. DNA zdravih stanica kože je umnožena s istim početnicama, kao i tumorska DNA i predstavljala je kalibrator s diploidnim brojem kopija. (Tablica 5.)

Tablica 5. Popis korištenih primera i njihove karakteristike

NAZIV POČETNICA	POČETNICE (PRIMERI)	VELIČINA AMPLIKONA
MITF	5 - GACCCACCTCGAAAACCCACCAAGT 3 - GTGGGAATCATATTCAACAGACAAG	293 bp
GAPDH	5 - GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA 3 - GACGGTGCCATGGAATTTGC	183 bp

Stopa amplifikacije (SA) MITF i GAPDH gena u tumorskoj DNA (SATu-DNA) određena je uporabom formule:

$$SA \text{ Tu-DNA} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$\Delta\Delta CT$ (MITF) = [CT (MITF; tumor) - CT (LINE1; tumor)] / [CT (MITF; kalibrator) - CT (GAPDH; kalibrator)].

Postotak tumorskih stanica (PTS), obojenih protutijelima na MITF proteina korišten je za procjenu stope amplifikacije (SA) u uzorku tumorskog tkiva (melanoma). Stopa amplifikacije MITF gena u tumorskom tkivu (SA Tu-T) izračunata je pod pretpostavkom da kontaminirajuće ne-tumorske stanice imaju normalnu diploidnu konfiguraciju, koristeći formulu: (Ugurel i sur. 2007.)

$$SA \text{ Tu-T} = (SA \text{ Tu-DNA} - 1 + PTS) / PTS$$

Porast stope amplifikacije za 0,5 ukazuje na dobitak jedne kopije MITF gena. PCR su rađeni u duplikatu, na Real-time PCR uređaju ABI 7500 (Applied Biosystem). Granična vrijednost (Cut-off) za amplifikaciju postavljen je na 4 kopije - kada je stopa amplifikacije 2.

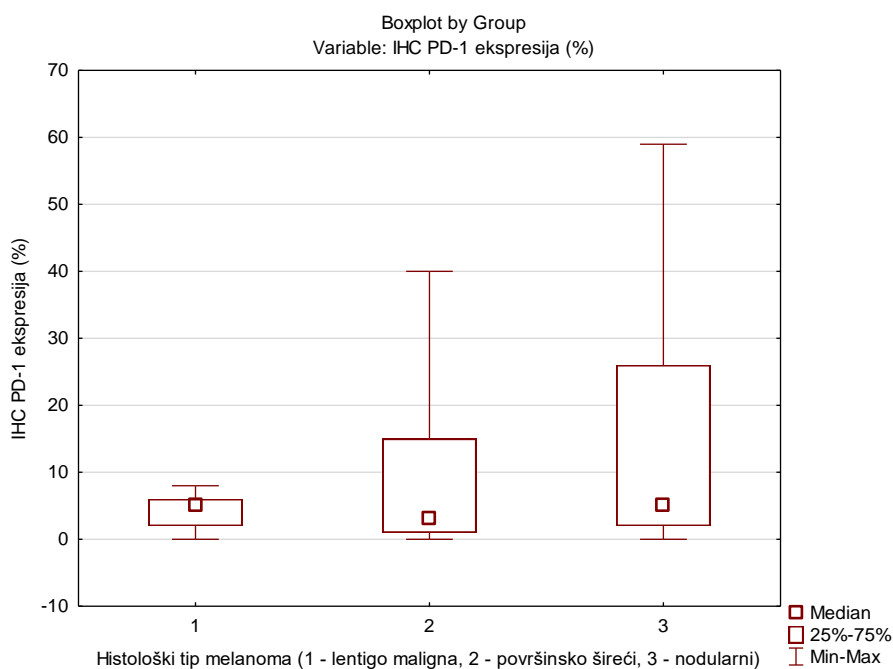
3.3 Statistička obrada podataka

Statistička obrada prikupljenih podataka odrađena je pomoću osobnog računala. Baza podataka oblikovala se u MS Excel programu, a obrada i analiza izvršila se korištenjem statističkih programskih paketa Dell Statistica v.12 (Dell Inc. 2015, software.dell.com) i MedCalc Statistical Software version 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018). Podatci su uneseni u proračunsku tablicu i ovisno o pripadanju određenoj mjernoj ljestvici, ovisnosti i broju skupina, raspodjeli podataka i veličini uzorka, koristili su se određeni parametrijski ili neparametrijski testovi. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Podatci su prikazani mjerom središnjice i raspršenja s obzirom na njihovu raspodjelu. Kod opisa podataka koristili smo se klasičnim metodama deskriptivne statistike. Za testiranje razlika pokazatelja mjera središnjice, nezavisnih uzoraka, ovisno o zadovoljavanju pretpostavke normalnosti, koristio se t-test za nezavisne uzorke i jednosmjerna ANOVA ili Mann-Whitneyev test i Kruskal-Wallisov test. Kod usporedbe proporcija koristio se Fisherov i χ^2 – test. Preživljavanje bez progresije (PFS, događaj: prva progresija bolesti ili smrt po bilo kojem uzroku) izračunata je s obzirom na početnu točku datuma početka liječenja imunoterapijom; parametri ishoda vremena do događaja procijenjeni su metodom Kaplan-Meier-ov proizvodni limit i Cox modelom proporcionalnih opasnosti uz procjenu omjera rizika (HR), kako bi analizirali prognostičke čimbenike koji su utjecali na vrijeme do događaja i ocijenili statističku snagu naše studije.

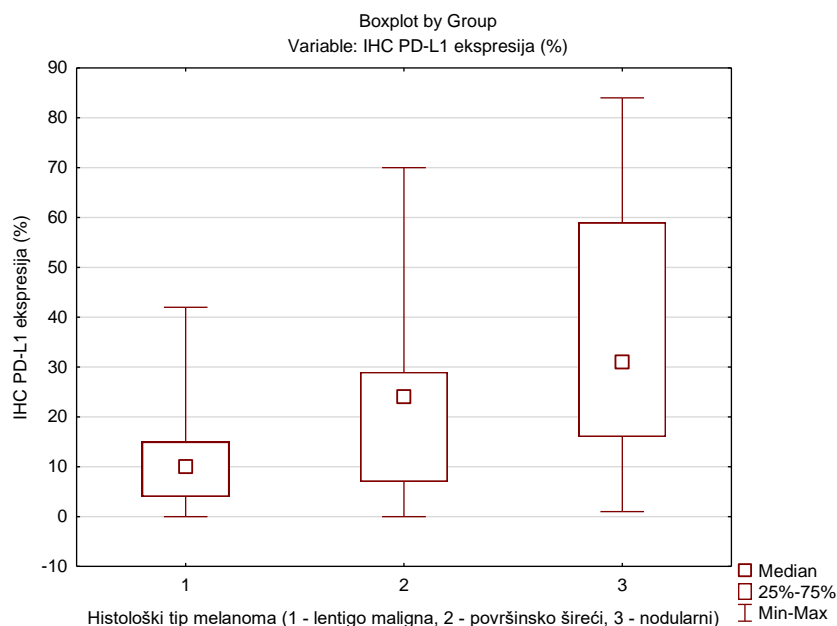
4. REZULTATI

4.1 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na kliničke i patološke značajke primarnih melanoma

U ovom istraživanju evaluirano je 81 biopsija primarnog melanoma te je utvrđen median ekspresije PD-L1 proteina 26% u rasponu od 0% do 84%. Median ekspresije PD-1 proteina na površini limfocita iznosio je 5%, također u rasponu od 0% do 59%. Nije potvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji PD-1 molekule na osnovu kategorija anatomske lokalizacije primarnog melanoma ($p=0.59$). Također, PD-L1 molekula bila je slično izražena na membrana tumorskih stanica u svih lokalizacija melanoma ($p=0.27$). U kategorijama histološkog tipa melanoma nije postignuta satistički značajna razlika u PD-1 ekspresiji, iako je trend povišenog izražaja tog proteina vidljiv u nodularnom melanomu ($p=0.06$). (Slika 8.) Statistički je bitna razlika u ekspresiji PD-L1 molekule ($p=0.01$). (Slika 9.)

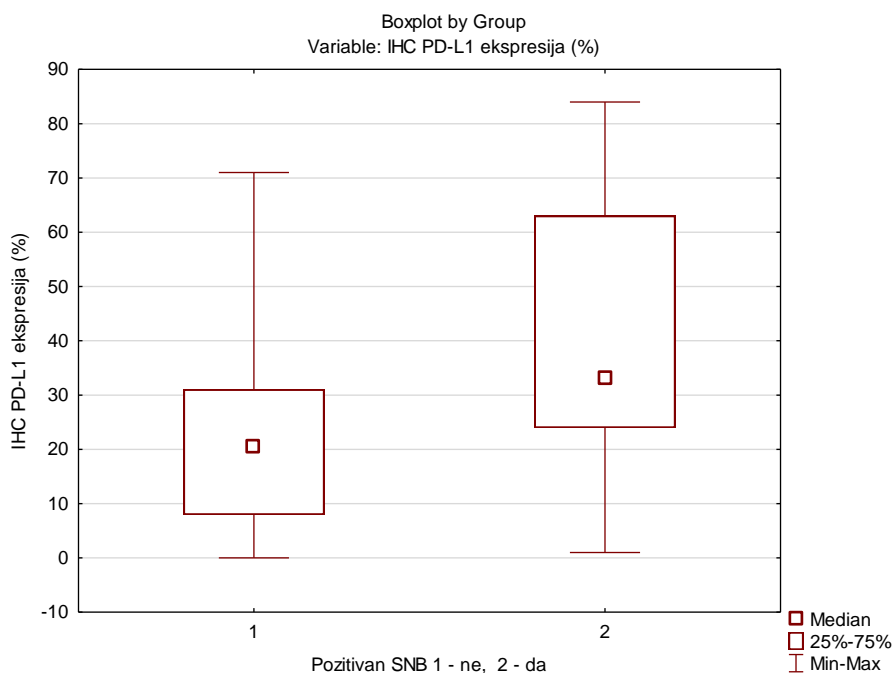


Slika 8. Box & whisker dijagram odnosa PD-1 ekspresije u grupama prema histološkom tipu ispitivanih primarnih melanoma; ($p=0.06$)



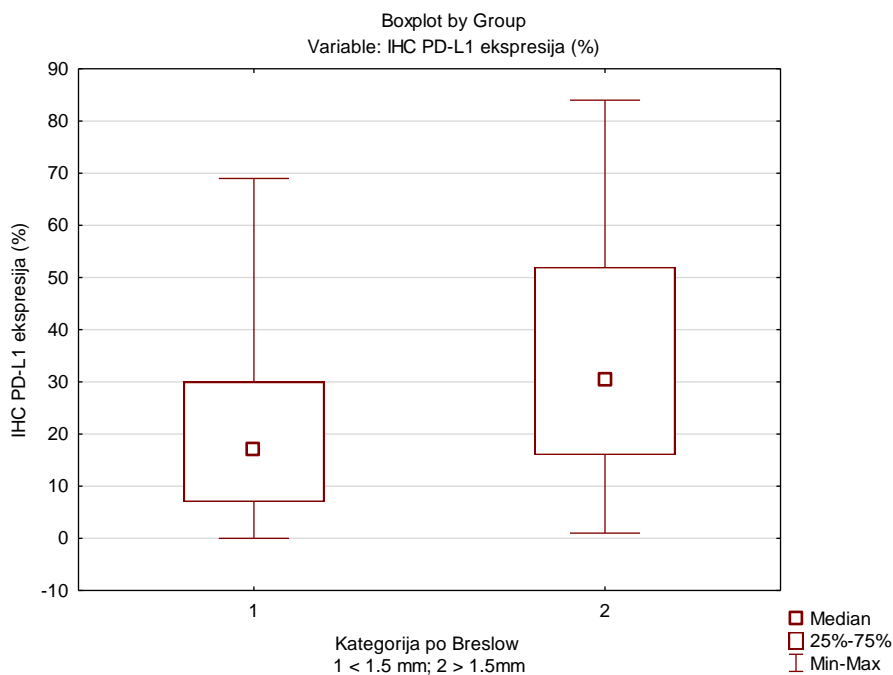
Slika 9. Box & whisker dijagram odnosa PD-L1 ekspresije u grupama prema histološkom tipu ispitivanih primarnih melanoma; ($p=0.01$)

Analizom molekula PD-1 i PD-L1 u melanoma koji su imali invaziju tumorskih stanica u limfnom čvoru čuvaru potvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji PD-L1 proteina ($p=0.002$) (Slika 10.), dok je razlika u PD-1 ekspresiji nije postigla statističku značajnost ($p=0.052$).

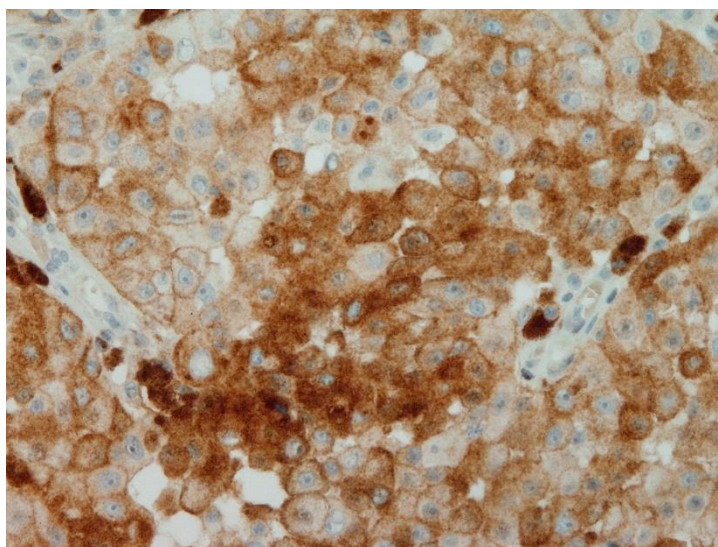


Slika 10. Box & whisker dijagram odnosa PD-L1 u grupama melanoma prema podatku prisutnosti invazije tumorskih stanica u limfnom čvoru čuvaru; ($p=0.002$)

Analiza IHC ekspresije učinjena je i u grupama na osnovu Breslow kategorije, odnosno dubine invazije stanica melanoma u slojeve kože. Utvrđena je statistički značajna razlika u PD-1 ekspresiji (Kruskal-Wallis ANOVA test; $H=6.08$; $p=0,013$). Razlika je i izraženija u PD-L1 molekuli (Kruskal-Wallis ANOVA test; $H=6.78$; $p=0,009$). (Slika 11. i Slika 12.)



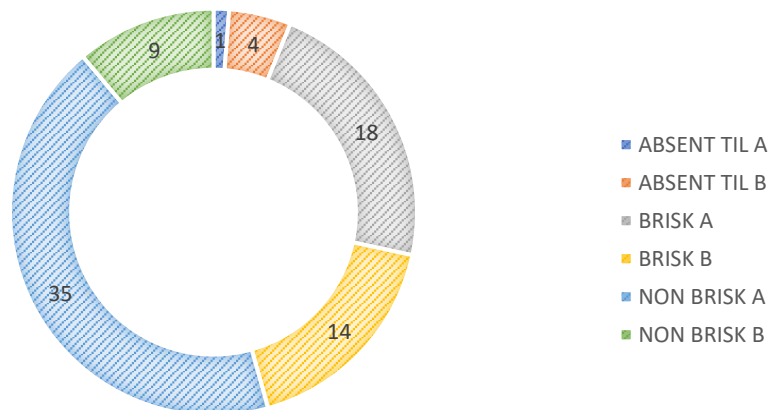
Slika 11. Box & whisker dijagram odnosa PD-L1 u grupama na osnovu Breslow kategorije 1 < 1.5mm te kategorija 2 – Breslow > 1.5mm; ($p=0.009$)



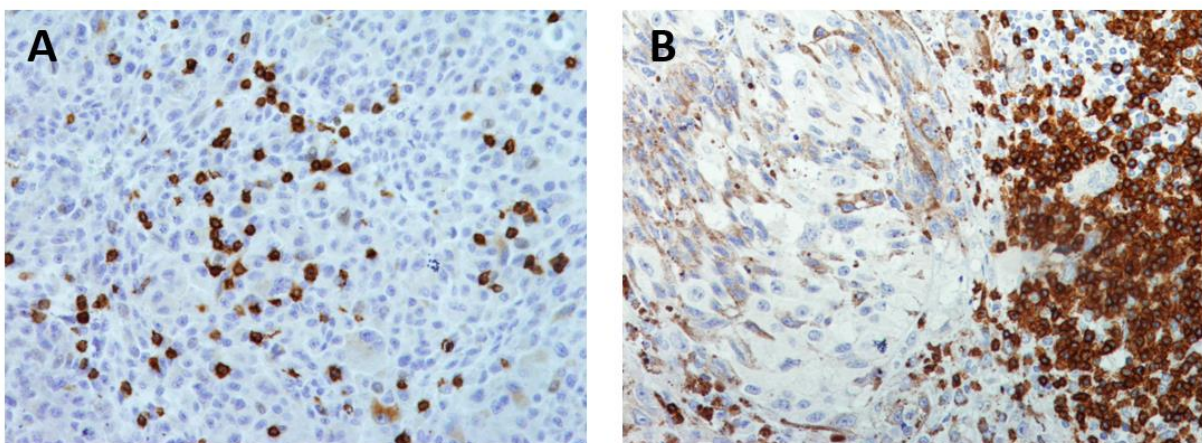
Slika 12. Imunohistokemijsko bojanje na PD-L1 stanica melanoma i difuzna ekspresija PD-L1 proteina na membrani melanomske stanice (povećanje x200)

4.2 Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule od strane infiltrata limfocita oko tumora

Na prikupljenim uzorcima, a nakon IHC bojanja CD3 molekule, kategoriziran je TIL. Grafički je prikaza raspodjela TIL-a u modificirane BRISK kategorije. (Slika 13. i Slika 14.) Potvrđeno je kako čak 43% svih upalnih infiltrata melanoma pripada kategoriji NON BRISK A za koju znamo da označava infiltraciju limfocitima na rubovima melanoma, ali diskontinuirano u ne više od četiri sloja. U našem istraživanju samo je jedan uzorak svrstan u kategoriju ABSENT TIL A i četiri biopsije imale su vidljiv ABSENT TIL B.

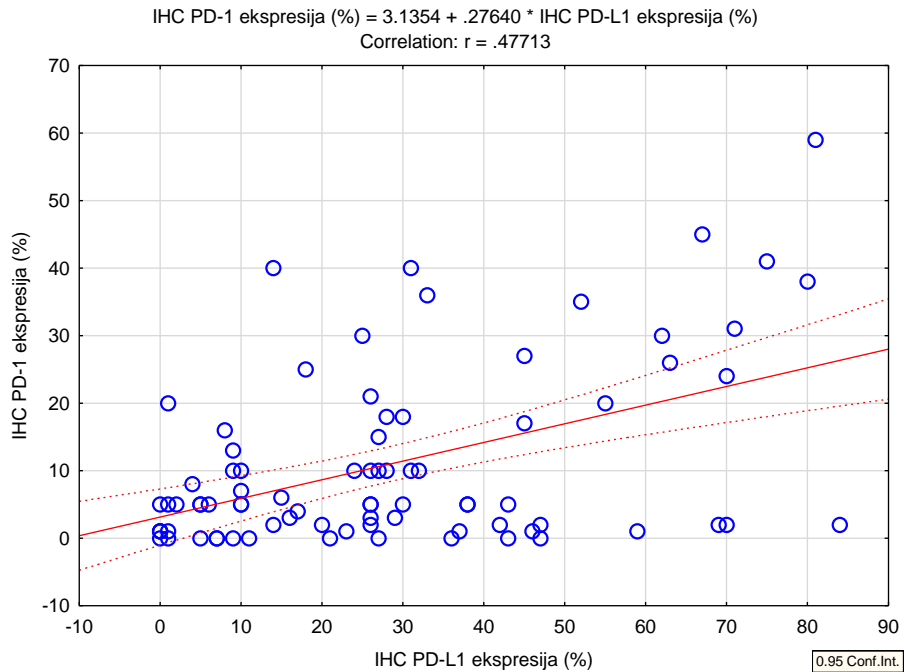


Slika 13. Raspodjela melanoma na osnovu određene BRISK kategorije.



Slika 14. Imunohistokemijsko bojanje na CD3 limfocita TIL-a: A- infiltracija limfocita među stanicama melanoma u BRISK B kategoriji; B – periferno smješteni limfociti u > 4 sloja u BRISK A kategoriji (povećanje x200)

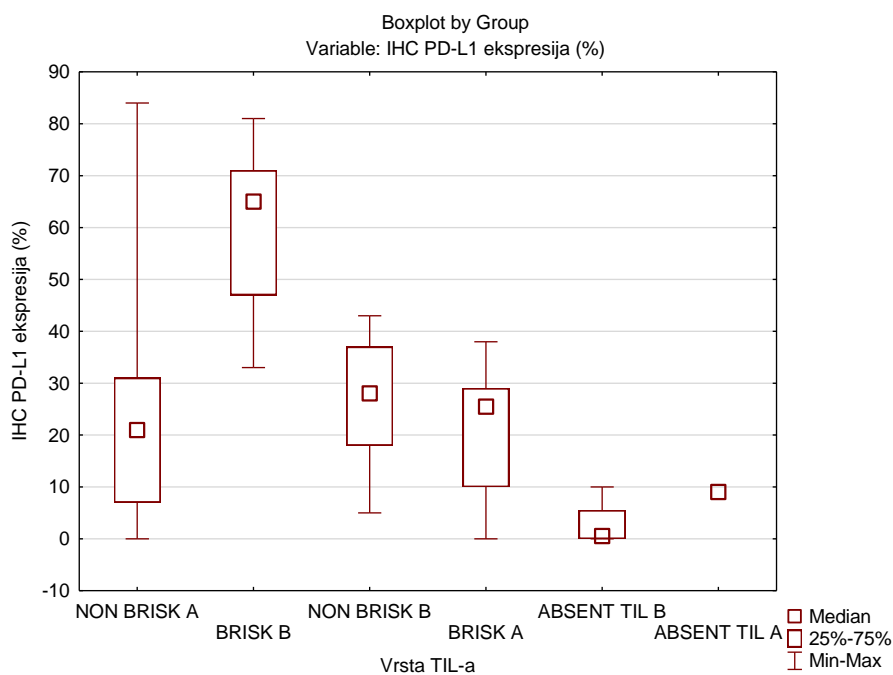
Na verificiranom infiltratu limfocita učinjeno je IHC bojenje na PD-1 molekulu. Analiza rezultata pokazala je da postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i PD-1 ekspresije na limfocitima (Pearsonov koeficijent korelacije $r = 0.48$; $p < 0.05$), (Slika 15)



Slika 15. Dijagram raspršenja - postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i PD-1 ekspresije na limfocitima primarnih melanoma; ($r = 0.48$; $p < 0.05$)

4.2.1 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na BRISK kategorije tumorskog upalnog infiltrata

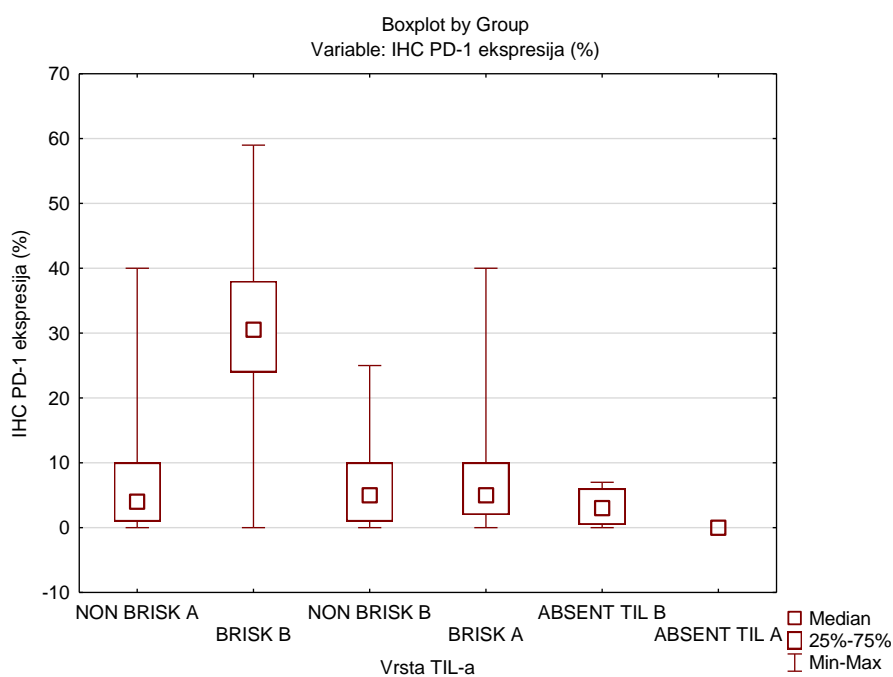
Usporedba IHC PD-L1 ekspresije prema BRISK kategorijama je statistički značajna (Kruskal-Wallis ANOVA test; $H=34,4$; $P < 0,001$). (Slika 16.) (Tablica 6.) Za istaknuti je da ekspresija PD-L1 molekule na tumorskim stanicama gotovo uvijek iznosi $> 50\%$ kada je TIL u kategoriji BRISK B. S druge strane, vidljivo je kako u slučaju smještaja limfocita na rubovima melanoma ekspresija PD-L1 molekule ima statistički značajno manje razine. U kategoriji BRISK B statistički je značajna razlika u ekspresiji PD-1 molekule limfocita u odnosu na kategoriju NON BRISK A. ($H=20,45$; $P = 0,001$). (Slika 17.)



Slika 16. Box & whisker dijagram usporedbe IHC PD-L1 ekspresije prema BRISK kategorijama; ($p < 0.001$)

Tablica 6. Izražene p vrijednosti međusobne usporedbe IHC PD-L1 ekspresije primarnih melanoma u grupama prema BRISK kategorijama

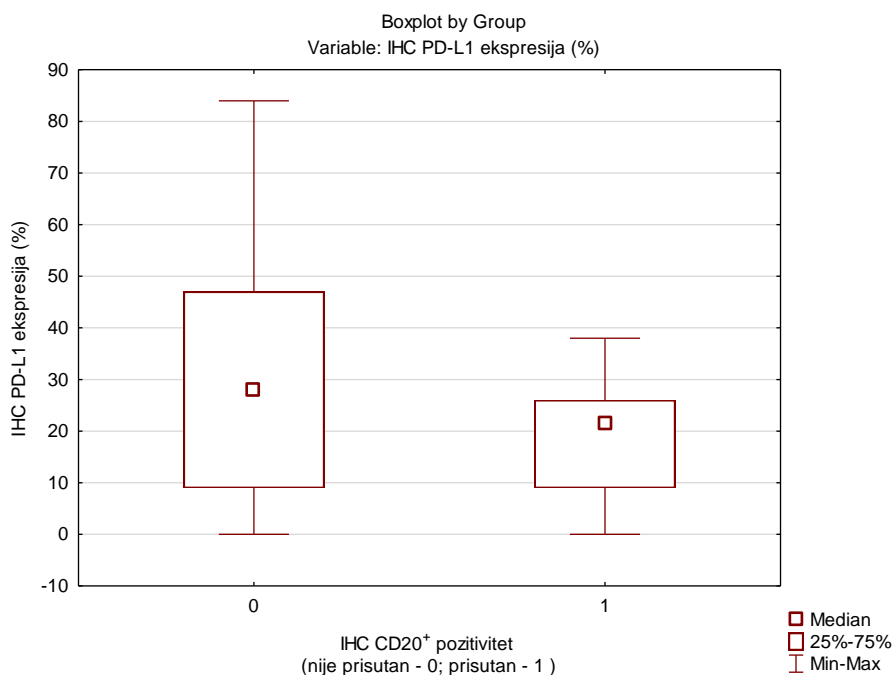
Ovisno o IHC PD-L1 ekspresiji (%)	p vrijednosti nakon analize Kruskal-Wallis testom: H (5, N= 81) =34,40639 p =,0000					
	NON BRISK A R:35,871	BRISK B R:71,250	NON BRISK B R:43,389	BRISK A R:34,472	ABSENT TIL B R:9,2500	ABSENT TIL A R:20,000
NON BRISK A		0,000030	1,000000	1,000000	0,480615	1,000000
BRISK B	0,000030		0,083622	0,000173	0,000050	0,529994
NON BRISK B	1,000000	0,083622		1,000000	0,236198	1,000000
BRISK A	1,000000	0,000173	1,000000		0,786692	1,000000
ABSENT TIL B	0,480615	0,000050	0,236198	0,786692		1,000000
ABSENT TIL A	1,000000	0,529994	1,000000	1,000000	1,000000	



Slika 17. Box & whisker dijagram usporedbe IHC PD-1 ekspresije prema BRISK kategorijama; ($p < 0.001$)

4.2.2 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na prisustvo CD20⁺ B limfocita u TIL-u

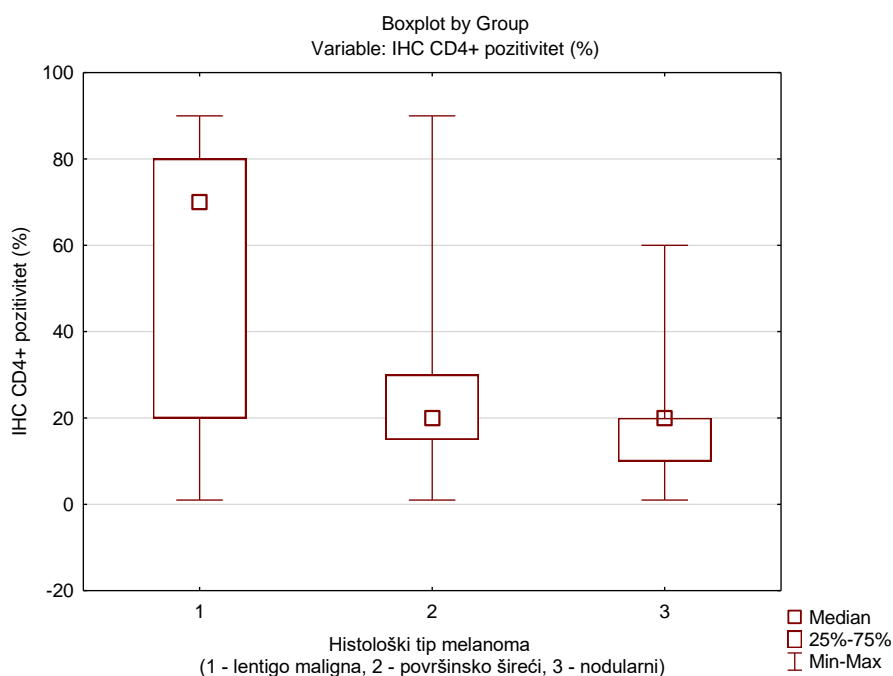
IHC bojenje na CD20 molekulu učinjeno je na svim uzorcima primarnog melanoma. Radi očekivanog malog udjela u ukupnom broju limfocita TIL-a, biopsije smo grupirali u dvije grupe obzirom na prisustvo B limfocita. Utvrđeno je njihovo prisustvo u TIL-u 18 (22%) istraživanih melanoma. Za istaknuti je činjenica kako je kategorija TIL-a u 8 pozitivnih uzoraka bila upravo BRISK A. Nije pronađena statistički bitna razlika u ekspresiji PD-1 molekule ovisno o prisustvu B limfocita. ($H=2.87$, $p=0.09$). Nasuprot toj činjenici, potvrdili smo statistički važnu razliku u ekspresiji PD-L1 molekule. Naime, verificirano je da je median ekspresije PD-L1 značajno manji u slučaju prisustva CD20⁺ limfocita. (Slika 18.)



Slika 18. Box & whisker dijagram usporedbe IHC PD-L1 ekspresije u slučaju prisustva CD20⁺ limfocita u TIL-u; $p = 0.002$

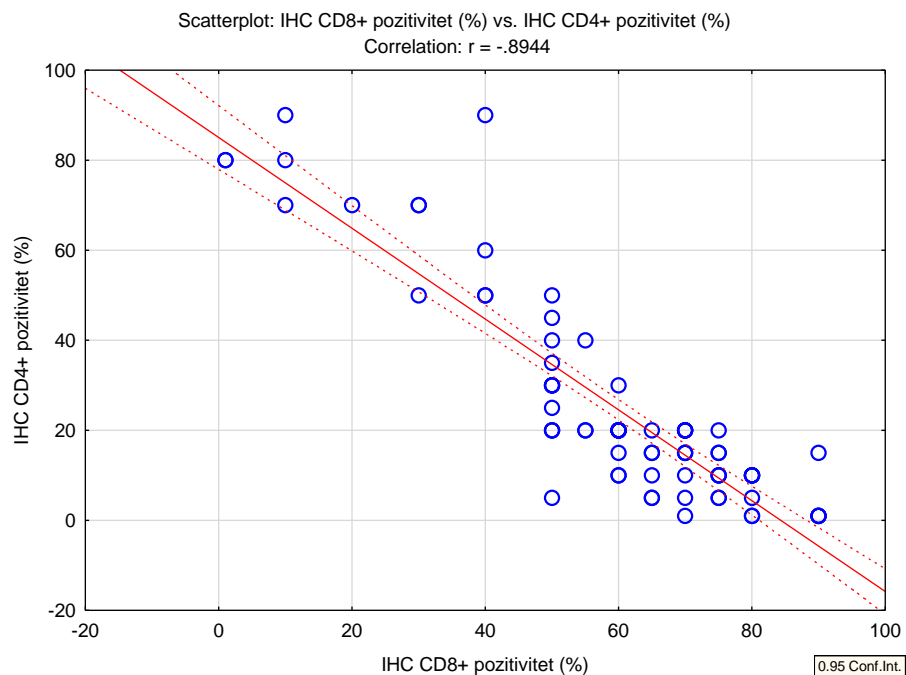
4.2.3 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na prisustvo CD8⁺, CD4⁺ i foxp3⁺ T limfocita u TIL-u i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma

Na osnovu identifikacije T limfocita IHC bojanjem CD3 molekule istražili smo udio CD8⁺ i CD4⁺ limfocita u TIL-u svih primarnih melanoma uključenih u ovu studiju. Median ekspresije CD8⁺ limfocira u TIL-u bio je 60% u rasponu od 1% do 90%, dok je median ekspresije CD4⁺ limfocira u TIL-u bio je 20% u rasponu od 1% do 90%. Proučavani su i Treg limfociti tako da je njihov marker Foxp3⁺ imao median pozitiviteta 1% u rasponu od 0% do 70%. Usporedba IHC CD8⁺ prema BRISK kategorijama nije bila statistički značajna (H=7,73; p=0,172). Također, usporedba IHC CD4⁺ prema BRISK kategorijama nije statistički značajna (H=6,94; p= 0,225). Nismo dokazali i dominantno prisustvo Treg limfocita u nekom od kategorija TiL-a (H=3.01, p=0.697). U usporedbi s kliničkim i patološkim značajkama melanoma utvrdili smo kako je ekspresija CD4⁺ statistički značajno veća kod melanoma tipa lentigo maligna (H=6.76, p=0.034). (Slika 19.) U usporedbi ekspresija ispitivanih limfocita u drugim grupama kliničkih značajki nije pronađena statistički važna razlika.



Slika 19. Box & whisker dijagram usporedbe IHC CD4⁺ pozitiviteta u različitim histološkim tipovima melanoma; $p = 0.034$

U međusobnoj usporedbi ispitivanih podvrsta T limfocita utvrđena je negativna korelacija između prisustva CD8⁺ i CD4⁺ limfocita ($r = -0.894$, $p < 0.01$). (Slika 20) Ekspresija foxp3⁺ pozitivnih limfocita nije korelirala s prisustvom drugih T limfocita.

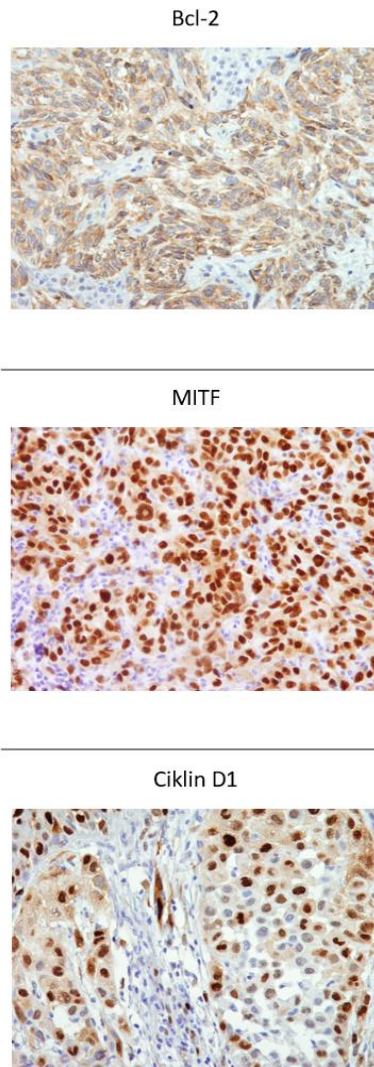


Slika 20. Dijagram raspršenja – u usporedbi ispitivanih podvrsta T limfocita utvrđena je negativna korelacija između prisustva CD8⁺ i CD4⁺ limfocita ($r = -0.894$, $p < 0.01$).

Analizirana povezanost između IHC ekspresije PD-L1 i CD8⁺ limfocita nije bila statistički značajna ($r=0.1647$, $p=0.142$). Također, nije pronađena povezanost prisustva citotoksičnih limfocita i povećane ekspresije PD-1 molekule ($r=0.1196$, $p=0.288$). Utvrđena je negativna korelacija u odnosu prisustva CD4⁺ limfocita i ekspresije molekula PD-1 i PD-L1, ali ona nije statistički značajna ($p=0.750$; $p=0.132$). Također, dokazali smo kako prisustvo foxp3⁺ limfocita ne utječe na ekspresiju molekula PD-1 i PD-L1 inhibitornog puta.

4.3 Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule od strane proteina važnih u staničnom ciklusu stanice melanoma

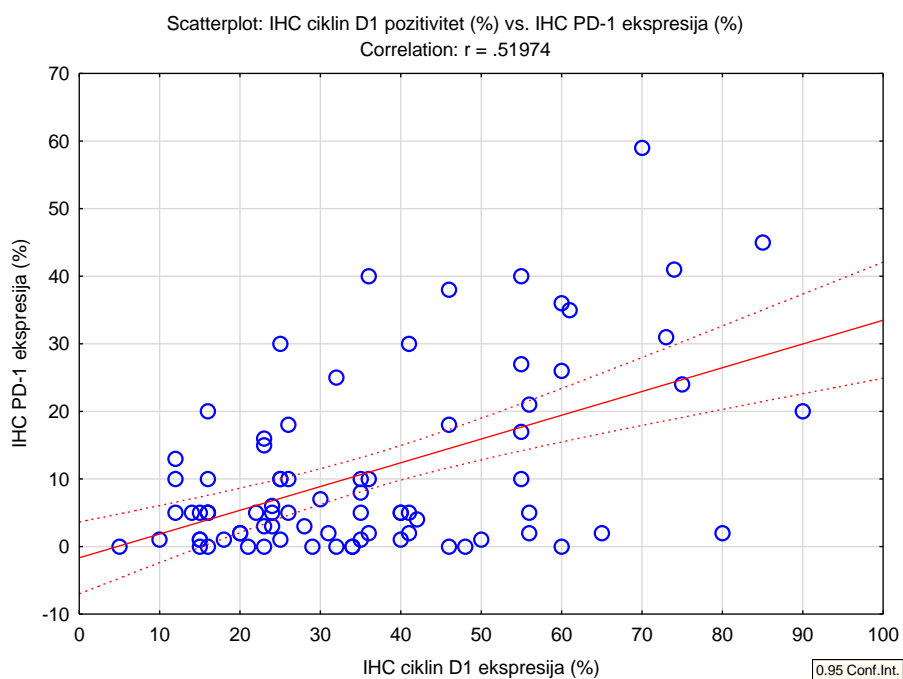
U istraživanju ove vrste regulacije ispitivanih molekula analizirali smo proteinsku ekspresiju ciklin D1, Bcl-2 kao i MITF proteina. Median ekspresije ciklin D1 proteina u citoplazmi tumorskih stanica iznosi 32% u rasponu od 5% do 90%. Median ekspresije Bcl-2 proteina, važnog u apoptozi tumorske stanice, iznosi 28% u rasponu od 1% do 81%. Konačno, MITF protein imao je median ekspresije 33% u rasponu od 2% do 95%. (Slika 21.)



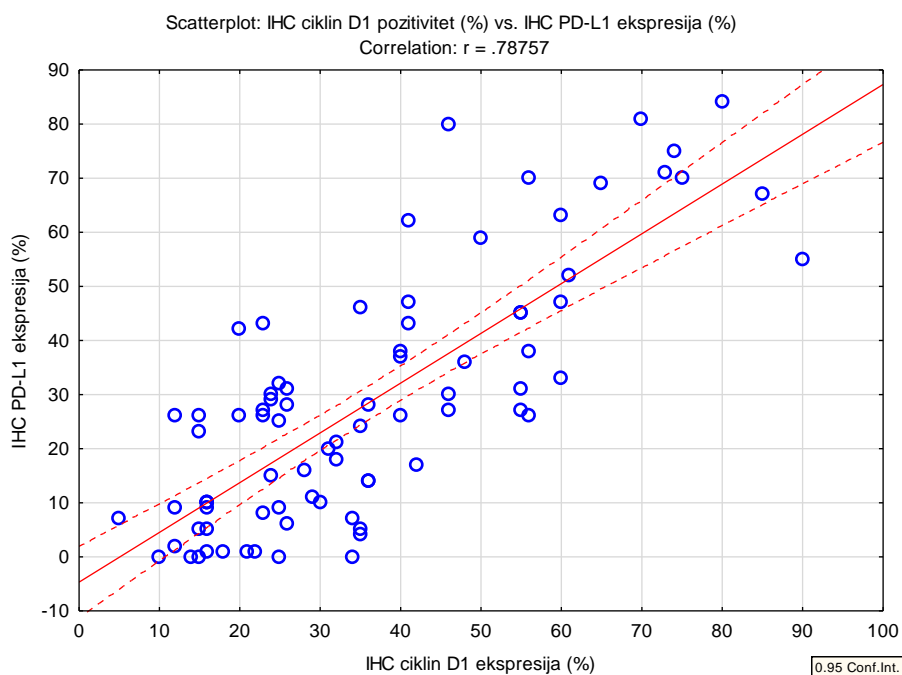
Slika 21. Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2, MITF i ciklin D1 stanica melanoma i difuzna ekspresija tih proteina u citoplazmi i jezgri (ciklin D1) i melanomske stanice

4.3.1 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na ekspresiju ciklin D1 proteina i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma

Povezanost između ekspresije PD-1 molekule limfocita i ekspresije ciklina D1 tumorske stanice je bila statistički značajna. ($r=0.519$, $p<0.001$). (Slika 22.) Također utvrđena je statistički značajna povezanost između ekspresije PD-L1 molekule i ciklina D1 ($r=0.787$, $p<0.001$). (Slika 23.) Povezanost s ekspresijom ostalih istraživanih proteina prikazana je u Tablici 7.



Slika 22. Dijagram raspršenja – povezanost između ekspresije PD-1 molekule limfocita i ekspresije ciklina D1 tumorske stanice ($r=0.519$, $p<0.001$).

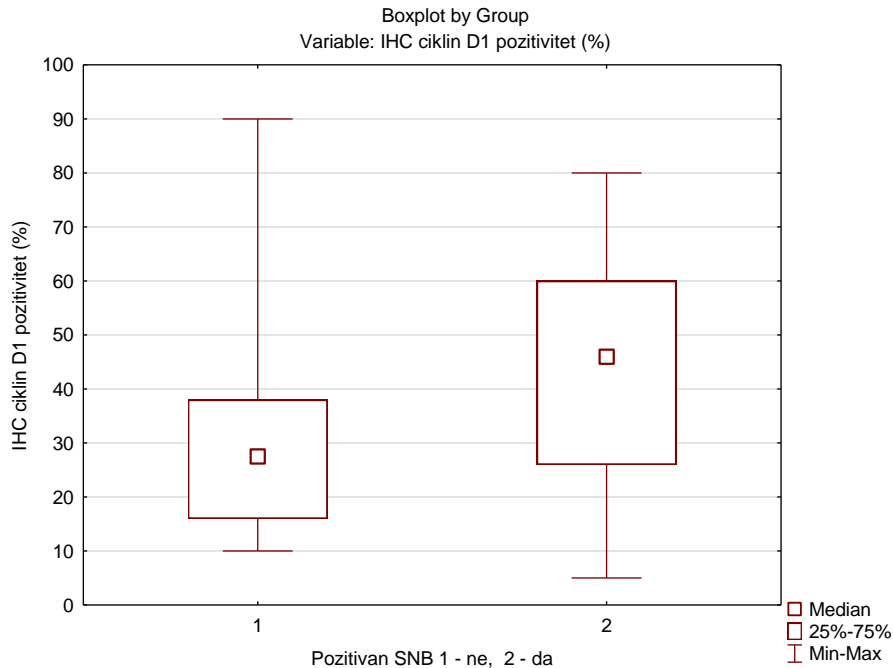


Slika 23. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije PD-L1 molekule i ciklina D1 ($r=0.787$, $p<0.001$)

Tablica 7. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije ciklina D1 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora

Varijabla: IHC CIKLIN D1 EKSPRESIJA (%)	Analizirane korelacije			
	IHC PD-1 ekspresija (%)	IHC PD-L1 ekspresija (%)	IHC Bcl-2 ekspresija (%)	IHC MITF ekspresija (%)
Koeficijent korelacije, r	0.519	0.7876	0.5601	0.4952
p vrijednost	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Analizom ekspresije ciklina D1 u različitim grupama na osnovu kliničkih i patoloških značajki ispitivanih melanoma utvrdili smo statistički značajnu razliku kod ekspresije u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar ($H=8.65$, $p=0.003$). (Slika 24.) U ostalim ispitivanim grupama nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina.

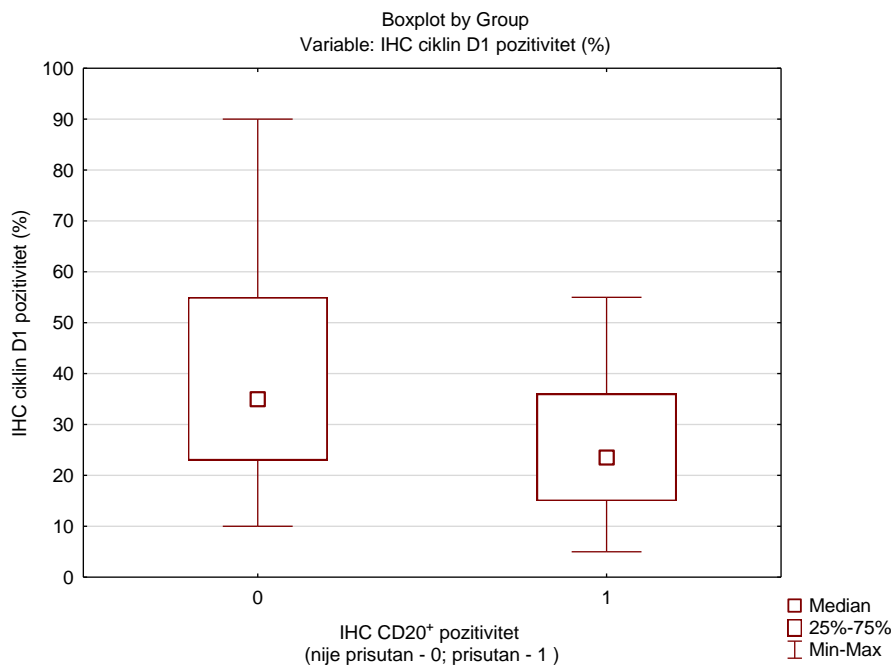


Slika 24. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije ciklina D1 u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar; $p=0.003$

Povezanost regulacije PD-L1 molekule i ekspresije ciklina D1 očituje se i u sličnim rezultatima njihovog izražaja kod melanoma s istom kategorijom TIL-a u BRISK klasifikaciji. Naime potvrdili smo kako je usporedba ciklina D1 ekspresije prema BRISK kategorijama statistički značajna ($H=28,73$; $p < 0,001$) (Tablica 8.). Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije ciklina D1 s prisutnosti neke od određenih podvrsta T limfocita. Zanimljivo je da kako je utvrđena statistički značajno manjaekspresija ciklina D1 kada su u TIL-u prisutni B limfociti. ($H=5.89$, $p=0.015$). (Slika 25.)

Tablica 8. Izražene p vrijednosti međusobne usporedbe IHC ciklin D1 ekspresije primarnih melanoma u grupama prema BRISK kategorijama

Ovisno o IHC ciklin D1 ekspresiji (%)	p vrijednosti nakon analize Kruskal-Wallis testom: H (5, N= 81)=28.73 p =,0000					
	NON BRISK A R:38,414	BRISK B R:70,214	NON BRISK B R:29,056	BRISK A R:33,806	ABSENT TIL B R:27,500	ABSENT TIL A R:13,500
NON BRISK A		0,000288	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BRISK B	0,000288		0,000634	0,000211	0,020445	0,297960
NON BRISK B	1,000000	0,000634		1,000000	1,000000	1,000000
BRISK A	1,000000	0,000211	1,000000		1,000000	1,000000
ABSENT TIL B	1,000000	0,020445	1,000000	1,000000		1,000000
ABSENT TIL A	1,000000	0,297960	1,000000	1,000000	1,000000	



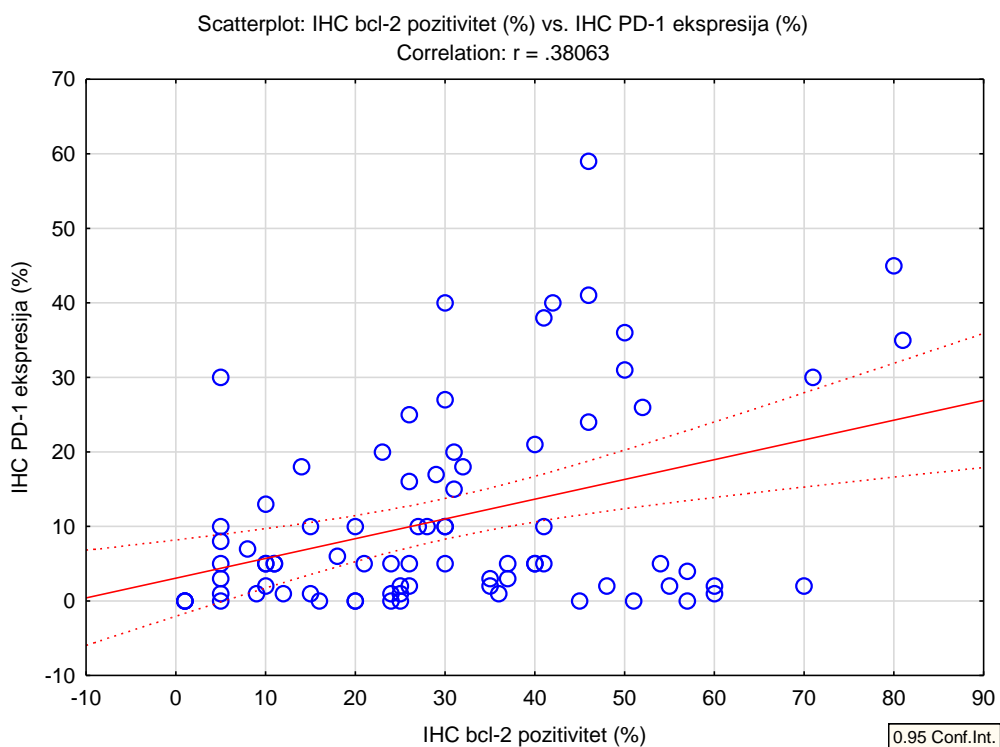
Slika 25. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije ciklin D1 proteina u slučaju prisutnosti B limfocita u TIL-u; $p=0.015$

4.3.2 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na ekspresiju Bcl-2 proteina i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma

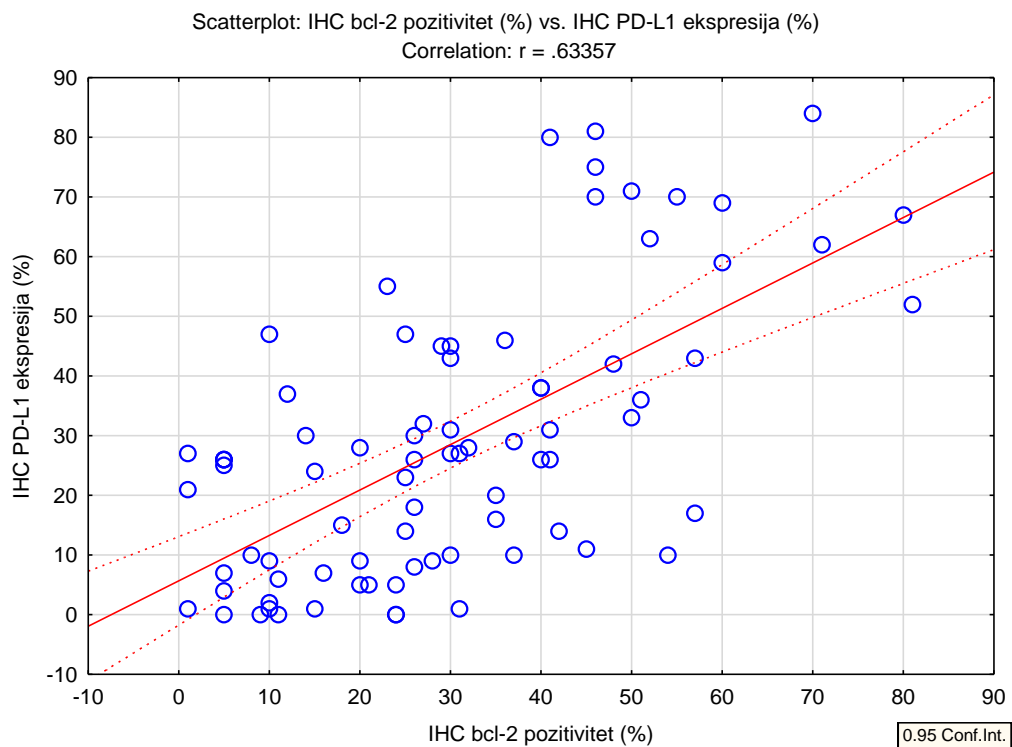
Analiza rezultata pokazala je da postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom proteina PD-1/PD-L1 signalnog puta (u oba slučaja $p < 0.001$). (Slika 26. i 27.) Povezanost s ekspresijom ostalih istraživanih proteina prikazana je u Tablici 9.

Tablica 9. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije Bcl-2 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora

Varijabla: IHC Bcl-2 EKSPRESIJA (%)	Analizirane korelacije			
	IHC PD-1 ekspresija (%)	IHC PD-L1 ekspresija (%)	IHC ciklin D1 ekspresija (%)	IHC MITF ekspresija (%)
Koeficijent korelacije, r	0.3806	0.6336	0.5601	0.4715
p vrijednost	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

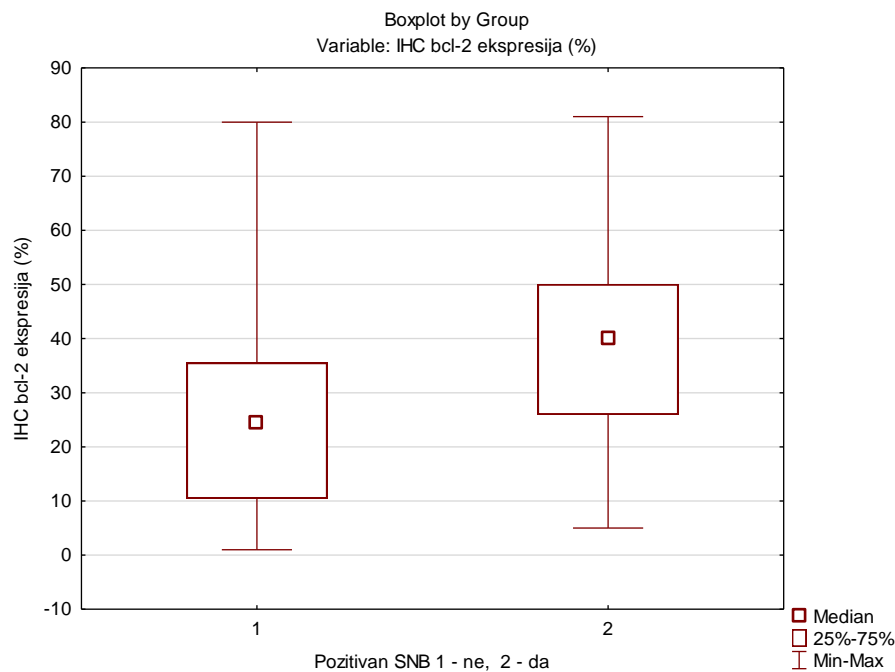


Slika 26. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom proteina PD-1

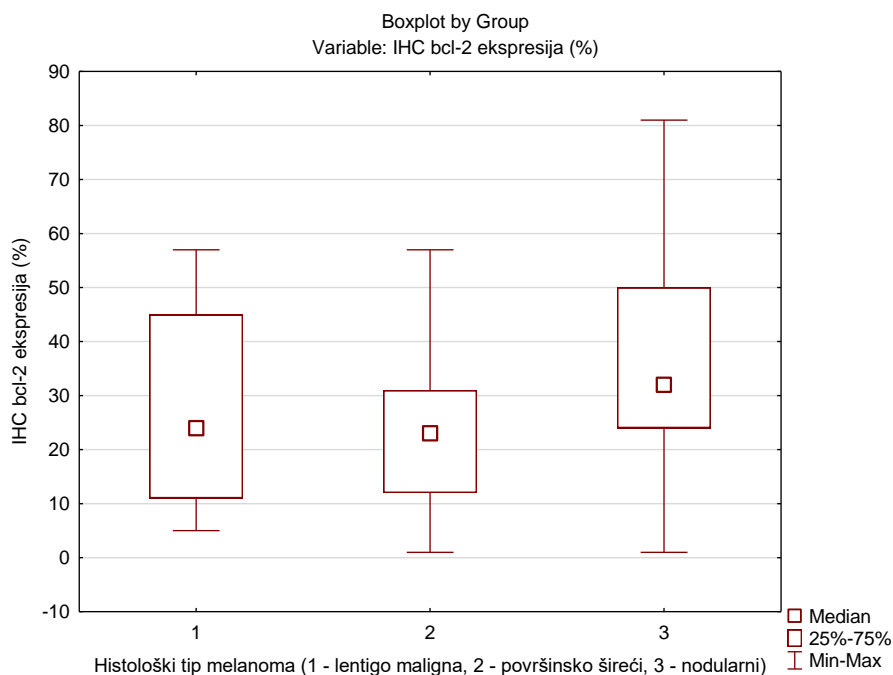


Slika 27. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom proteina PD-L1

Analizom ekspresije Bcl-2 proteina u različitim grupama na osnovu kliničkih i patoloških značajki ispitivanih melanoma utvrdili smo statistički značajnu razliku kod ekspresije u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar ($H=7.84$, $p=0.005$). (Slika 28.) Također, utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji ovog proteina kod nodularnog melanoma u odnosu na druge ispitivane histološke podtipove. ($H=6.74$, $p=0.034$). (Slika 29.) U ostalim ispitivanim grupama nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina.



Slika 28. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije Bcl-2 u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar; $p=0.005$



Slika 29. Box & whisker dijagram je statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina kod nodularnog melanoma u odnosu na druge ispitivane histološke podtipove; $p=0.034$

Usporedba IHC Bcl-2 ekspresije prema BRISK kategorijama je statistički značajna te odgovara podacima ekspresije ostalih analiziranih proteina tumorske stanice. ($H=19.41$; $p = 0,002$). (Tablica 10.) Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije Bcl-2 proteina s prisutnosti neke od određenih podvrsta T limfocita kao ni s prisutnosti B limfocita u TIL-u.

Tablica 10. Izražene p vrijednosti međusobne usporedbe IHC Bcl-2 ekspresije primarnih melanoma u grupama prema BRISK kategorijama

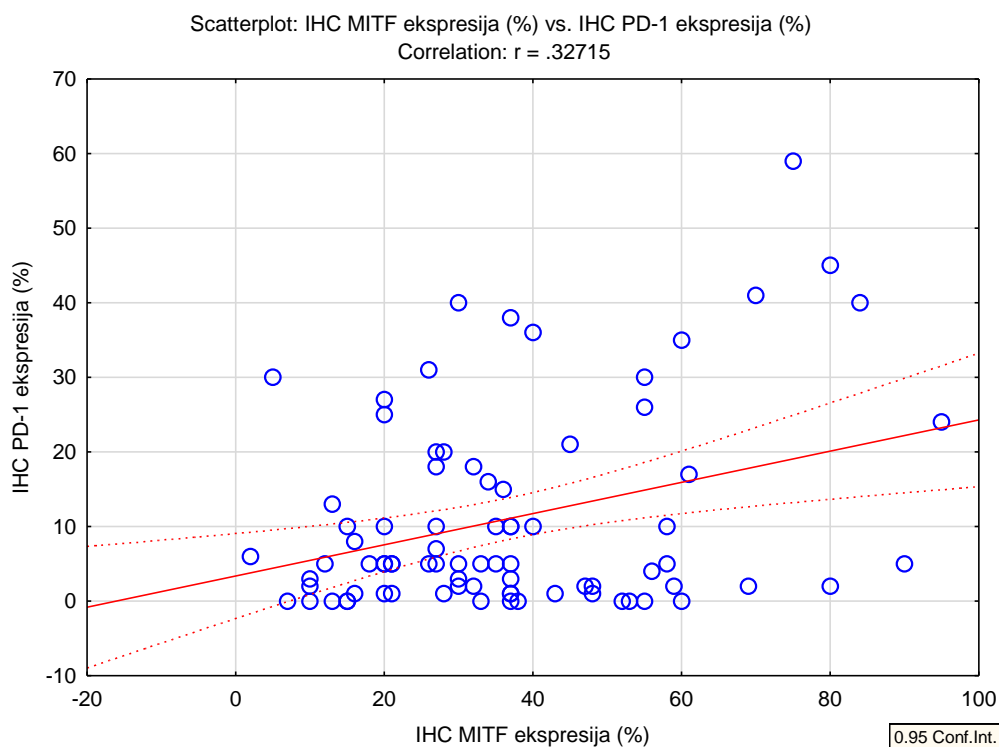
Ovisno o IHC Bcl-2 ekspresiji (%)	p vrijednosti nakon analize Kruskal-Wallis testom: $H (5, N= 81) =19.41$ $p =,002$					
	NON BRISK A R:37,614	BRISK B R:64,071	NON BRISK B R:39,278	BRISK A R:36,639	ABSENT TIL B R:17,125	NON BRISK A R:37,614
NON BRISK A		0,005644	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BRISK B	0,005644		0,204590	0,016010	0,006481	1,000000
NON BRISK B	1,000000	0,204590		1,000000	1,000000	1,000000
BRISK A	1,000000	0,016010	1,000000		1,000000	1,000000
ABSENT TIL B	1,000000	0,006481	1,000000	1,000000		1,000000
ABSENT TIL A	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

4.3.3 Analiza ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina u odnosu na ekspresiju MITF proteina i ispitivane kliničko-patološke značajke melanoma

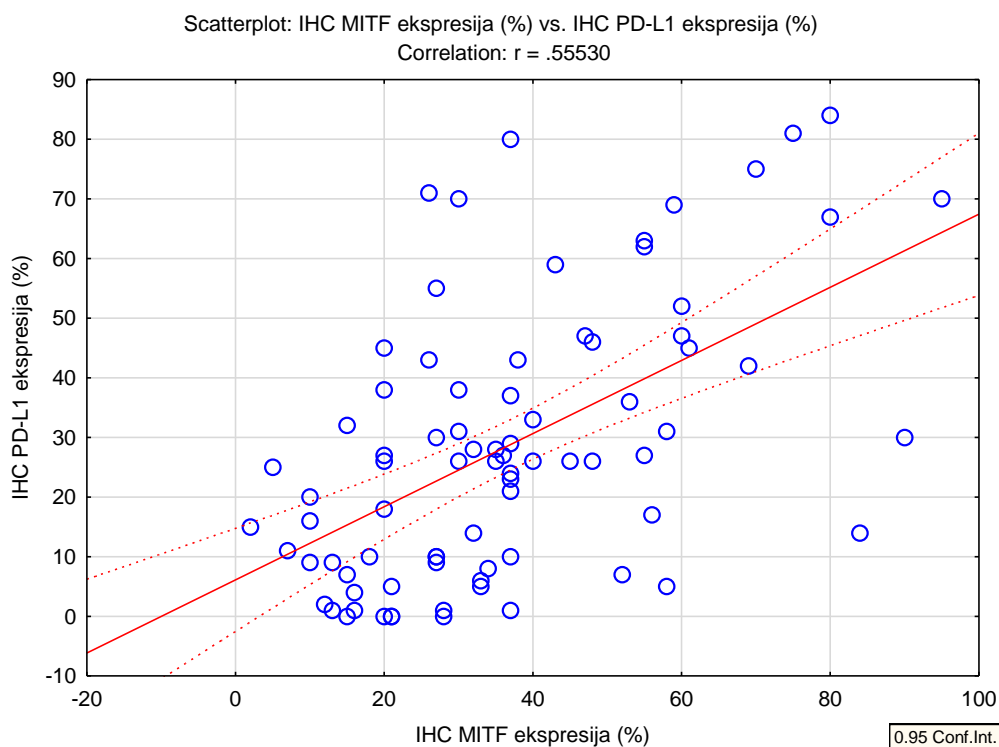
Analiza rezultata pokazala je da postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina MITF s ekspresijom proteina PD-1/PD-L1 signalnog puta inhibicije limfocita (u oba slučaja $p < 0.001$). (Slika 30 i 31) Povezanost s ekspresijom ostalih istraživanih proteina tumorske stanice prikazana je u Tablici 11.

Tablica 11. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije Bcl-2 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora

Varijabla: IHC MITF EKSPRESIJA (%)	Analizirane korelacije			
	IHC PD-1 ekspresija (%)	IHC PD-L1 ekspresija (%)	IHC Bcl-2 ekspresija (%)	IHC ciklin D1 ekspresija (%)
Koeficijent korelacije, r	0.3272	0.5553	0.4715	0.4952
p vrijednost	0.003	< 0.001	< 0.001	< 0.001



Slika 30. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina MITF s ekspresijom proteina PD-1; $p < 0.001$

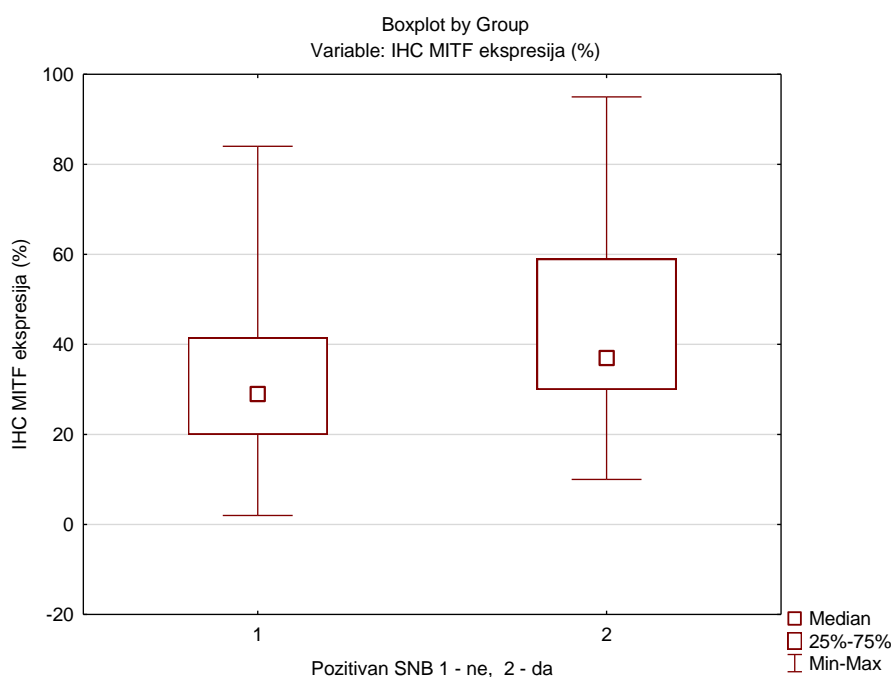


Slika 31. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina *Bcl-2* s ekspresijom *PD-L1*; $p < 0.001$

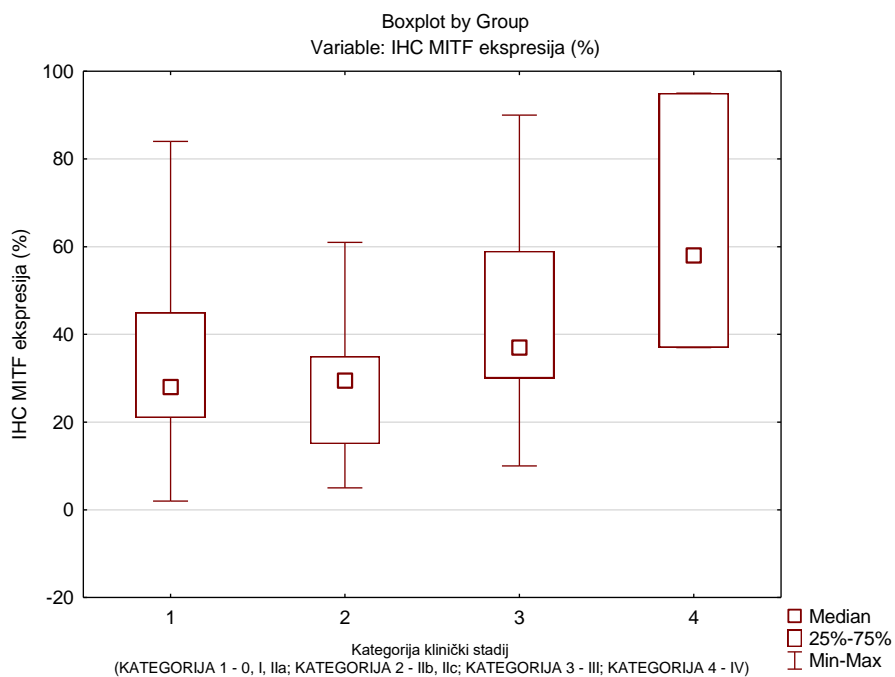
Analizom ekspresije MITF proteina u različitim grupama na osnovu kliničkih i patoloških značajki ispitivanih melanoma utvrdili smo statistički značajnu razliku kod ekspresije u tumorskim stanicama melanoma ovisno o lokalizaciji primarnog melanoma. Statistički se značajno razlikuje ekspresija u grupama primarnog melanoma trupa i ekstremiteta (Tablica 12.). Kao i kod drugih ispitivanih proteina, ekspresija MITF-a je povišena kod širenja melanoma u limfni čvor čuvar ($H=5.21$, $p=0.022$). (Slika 32.) Također, utvrdili smo statistički značajnu povišenu ekspresiju MITF proteina u uznapredovanim kliničkim stadijima melanoma ($H=8.41$, $p=0.03$). (Slika 33.) U ostalim ispitivanim grupama nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina.

Tablica 12. Prikazi p vrijednosti dobivenih Kruskal-Wallis testom analiziranih grupa po anatomskoj lokalizaciji primarnog melanoma, ovisno o ekspresiji MITF proteina

Ovisno o IHC MITF ekspresiji (%)	p vrijednosti nakon analize Kruskal-Wallis testom: H (5, N= 81) =8.09 p =,017		
	primarni melanom trupa R:47.012	primarni melanom ekstremiteta R:29.674	Primarni melanom glave i vrata R:41.500
primarni melanom trupa		0,013492	1,000000
primarni melanom ekstremiteta	0,013492		0,367696
primarni melanom glave i vrata	1,000000	0,367696	



Slika 32. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije MITF proteina u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar; p=0.022

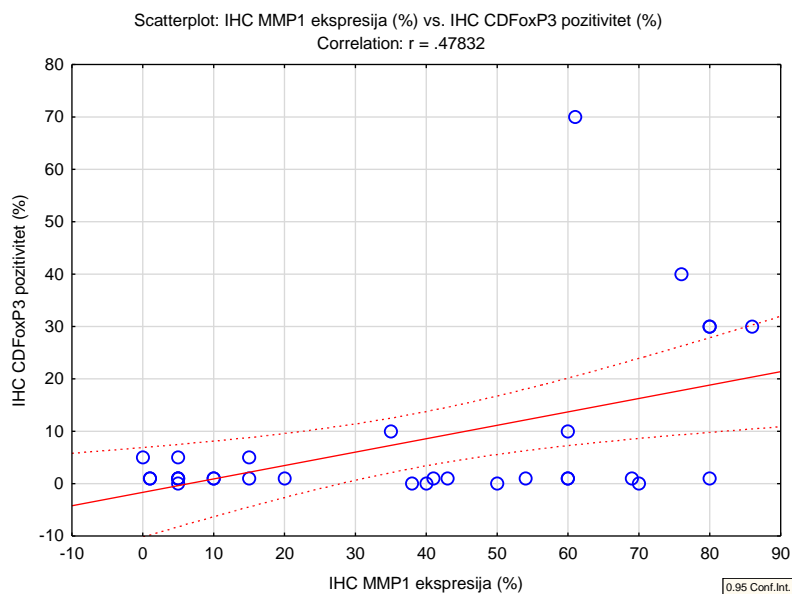


Slika 33. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike MITF proteina u uznapredovanim kliničkim stadijima melanoma

Usporedba MITF ekspresije prema BRISK kategorijama nije bila statistički značajna ($p=0.07$). Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije MITF proteina s prisutnosti neke od određenih podvrsta T limfocita. Ipak, utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MITF proteina u slučaju prisutnosti B limfocita u TIL-u. ($H=6.75$, $p=0.009$).

4.4 Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule od strane enzima matriks metaloproteinaza

Ovu vrstu potencijalne regulacije ekspresije molekula PD-1 / PD-L1 signalnog puta istraživali smo analizom ekspresije proteina MMP-1 i MMP-13. Pozitivno IHC bojanje citoplazme i membrane tumorske stanice i stanica tumorskog mikrookoliša označavalo je prisutnost produkcije ovih enzima. Mean ekspresije MMP-1 bio je $38\% \pm SD 29.45\%$. Mean ekspresije MMP-13 iznosio je $6.13\% \pm SD 10.67\%$. Utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije metaloproteinaza, podvrste kolagenaza (MMP-1) s ekspresijom proteina PD-1 i PD-L1 signalnog puta ($r=-0.21$, $P=0.059$) ($r=-0.04$, $p=0.723$). Također, ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije MMP-13 s ekspresijom proteina PD-1 i PD-L1 ($r=0.15$, $p=0.173$) ($r=-0.074$, $p=0.510$). Analizom ekspresije MMP-1 u različitim grupama na osnovu kliničkih i patoloških značajki ispitivanih melanoma nismo utvrdili statistički značajnu razliku. Također, u istim grupama nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji MMP-13. Usporedba ekspresije MMP-1 i MMP-13 po BRISK kategorijama nije pokazala statističku značajnost. Za istaknuti je činjenica kako postoji značajna povezanost u ekspresiji MMP-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita ($r=0.4783$, $p=0.006$). (Slika 34) Korelacije MMP-1 i MMP-13 s ostalim ispitivanim proteinima i limfocitima nisu bile statistički značajne.



Slika 34. Dijagram raspršenja – povezanost ekspresije MMP-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita; $p = 0.006$

4.5 Regulacija ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom

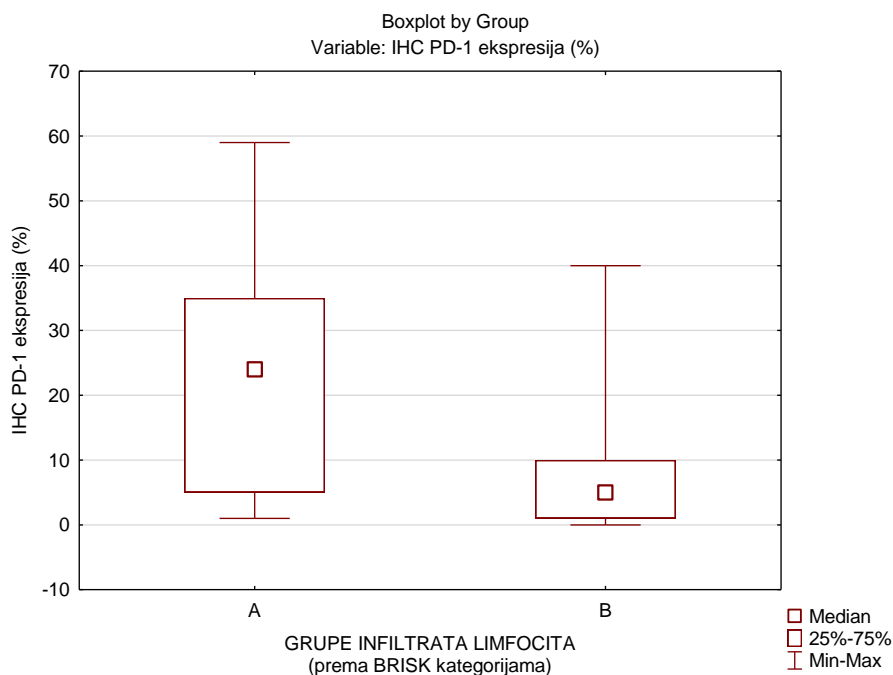
Iz skupine istraživanih primarnih melanoma izdvojeni su oni koji su tijekom trajanja ove studije započeli liječenje imunoterapijom. Nakon probira istih i isključenja onih koji su prethodno primali neku vrstu onkološkog liječenja, u grupu pacijenata liječenih imunoterapijom uključili smo 31 bolesnika s melanomom. Klinički i patološki podaci kao i raspodjela u definirane grupe prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Kliničke i patološke karakteristike ispitivane skupine pacijenata primarnih melanoma liječenih imunoterapijom

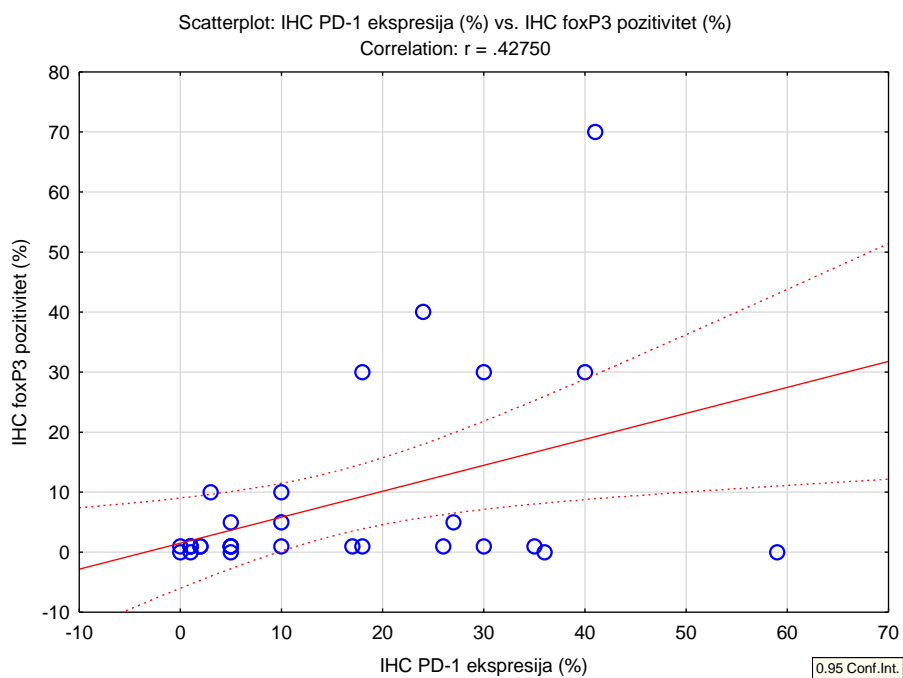
	Skupina pacijenata liječenih imunoterapijom	Postotak
	n=31	
Spol		
Žene	10	32%
Muškarci	21	68%
Godine kod postavljanja dijagnoze		
Median (raspon)	65,0 (28-80)	
Anatomska lokalizacija melanoma		
trup	17	54%
ekstremiteti	8	26%
glava i vrat	6	20%
Stupnjevanje melanoma prema Breslow-u (debljina)		
(0,1-1.5 mm)	8	26%
(>1,5 mm)	23	74%
Histološki tip melanoma		
Lentigo maligna	/	/
Površinsko šireći	8	26%
Nodularni	23	74%
Sentinel limfni čvor		
Pozitivan	18	58%
Negativan	13	42%
Kategorije na osnovu kliničkog stadija		
KATEGORIJA 1 - 0, I, IIa	6	20%
KATEGORIJA 2 - IIb, IIc	6	20%
KATEGORIJA 3 - III	16	51%
KATEGORIJA 4 - IV	3	9%
Vrsta imunoterapije		
Pembrolizumab	27	87%
Nivolumab	4	13%

Određena je i klasifikacija TIL-a po BRISK kategorijama koja je za potrebe analize u ovoj grupi, a na osnovu rezultata navedenih prethodno, uvrštena u dvije grupe. Naime, grupu A činile su skupine BRISK klasifikacije gdje se limfociti nalaze unutar tumorskog tkiva (BRISK B i NON BRISK B) dok su grupu B činile skupine s TIL-om na rubovima tumorskog tkiva (BRISK A, NON BRISK A te ABSENT TIL A i B). Grupnu A činilo je 15 uzoraka melanoma dok je u grupi B bilo njih 16.

Median ekspresije PD-1 proteina na površini limfocita iznosio je 10%, u rasponu od 0% do 59%. Nije pronađena statistički bitna razlika u ekspresiji PD-1 na membrani limfocita u grupama kategoriziranih na osnovu kliničkih i patoloških obilježja melanoma. Analizom je potvrđena statistički značajno veća ekspresija PD-1 u grupi A klasifikacije TIL-a ($H=5.591$, $p=0.018$). (Slika 35.) U analizi povezanosti PD-1 ekspresije s udjelom određenih vrsta limfocita u TIL-u pronašli smo statistički značajnu povezanost s ekspresijom foxp3+ na Treg limfocitima ($r=0.427$, $p=0.001$). (Slika 36.) Za istaknuti je kako nije bilo razlike u postotku određenih limfocita u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom u odnosu na ostale primarne melanome. Dodatno, nismo pronašli statistički značajnu dominaciju neke od podvrsta T limfocita u grupama A i B.



Slika 35. Box & whisker dijagram statistički značajno veće ekspresije PD-1 u grupi A klasifikacije TIL-a, $p=0.018$



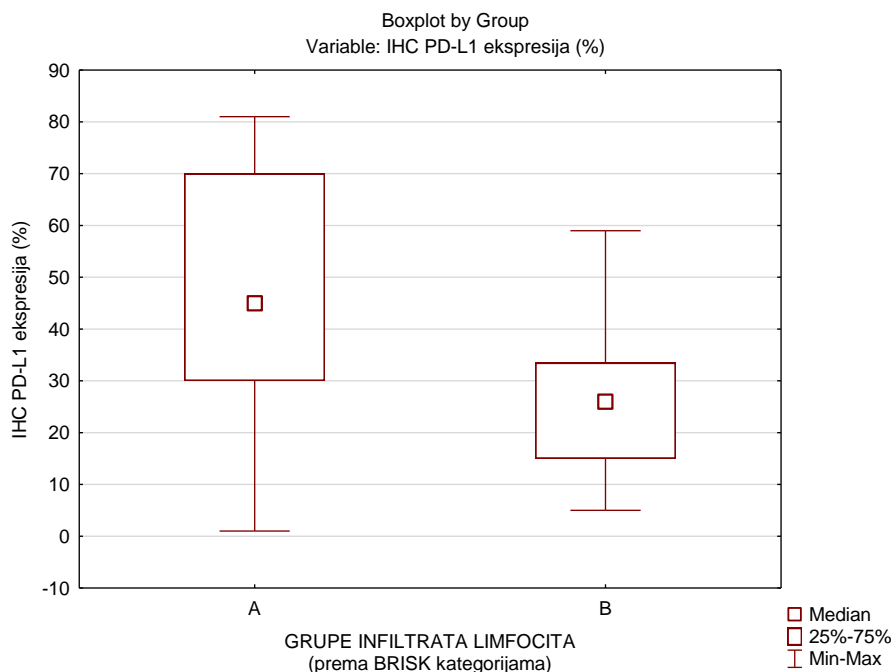
Slika 36. Dijagram raspršenja – povezanost ekspresije PD-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita; $p = 0.001$

Analizirana je povezanost ekspresije PD-1 s ispitivanim proteinima važnim u staničnom ciklusu stanice melanoma. U ovoj grupi pacijenata pronađena je statistički značajna povezanost ekspresije PD-1 i ciklina D1 ($r=0.4275$, $p=0.016$). Nije potvrđena statistički značajna povezanost s ekspresijom ostalih proteina.

Utvrđen je median ekspresije PD-L1 proteina 31% u rasponu od 1% do 81%. Nije pronađena statistički bitna razlika u ekspresiji PD-L1 na membrani tumorskih stanica u grupama kategoriziranih na osnovu kliničkih i patoloških obilježja melanoma. Analizom je potvrđena statistički značajno veća ekspresija PD-L1 u grupi A klasifikacije TIL-a ($H=6.201$, $p=0.012$). (Slika 37.) U analizi povezanosti PD-L1 ekspresije s udjelom određenih vrsta limfocita u TIL-u pronašli smo statistički značajnu povezanost s ekspresijom foxp3+ na Treg limfocitima ($r=0.3971$, $p=0.027$).

Analizom povezanosti ekspresije PD-L1 s ostalim ispitivanim proteinima, potvrđeni su rezultati dobiveni u cjelovitoj grupi primarnih melanoma. Naime, PD-L1 ekspresija

statistički značajno korelira s izražajem ciklin D1, Bcl-2 i MITF proteina u tumorskim stanicama. (Tablica 14.) Niti u ovoj grupi uzoraka nije pronađena povezanost u ekspresiji PD-1 / PD-L1 molekula s aktivnosti enzima MMP-1 i MMP-13.



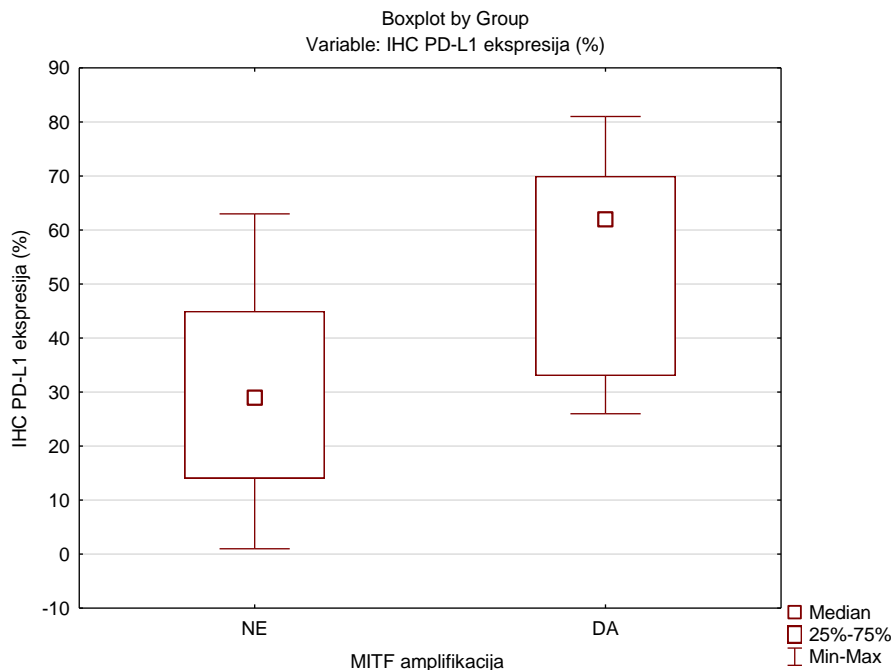
Slika 37. Box & whisker dijagram statistički značajno veće ekspresije PD-L1 u grupi A klasifikacije TIL-a, $p=0.012$

Tablica 14. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije PD-L1 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom

Varijabla: IHC PD-L1 EKSPRESIJA (%)	Analizirane korelacije			
	IHC PD-1 ekspresija (%)	IHC MITF ekspresija (%)	IHC Bcl-2 ekspresija (%)	IHC ciklin D1 ekspresija (%)
Koeficijent korelacije, r	0.3234	0.5256	0.6666	0.8068
p vrijednost	0.003	0.002	< 0.001	< 0.001

4.5.1 Molekularna analiza amplifikacije MITF gena u uzorcima primarnog melanoma pacijenata liječenih imunoterapijom

U grupi pacijenata liječenih imunoterapijom metodom SybrGreen Real- time PCR-a određena je prisutnost amplifikacije MITF gena. Iz svih uoraka izolirana je dovoljna količina DNA za analizu. Amplifikacija je potvrđena u 9 uzoraka, odnosno u njih 29%. Razlika u ekspresiji PD-L1 je statistički značajna ovisno o tomu postoji li MITF amplifikacija ili ne postoji (Mann-Whitney U test, $p=0,008$). (Slika 38.) Protein PD-1 nije bio statistički značajno ovisan o MITF amplifikaciji ($p=0.127$). Za istaknuti je da statistička značajnost nije postignuta ni za vrijednost IHC ekspresije MITF proteina, iako je trend vidljiv ($p=0.058$). Analizom ekspresije ostalih proteina vidljivo je da u grupi uzoraka s MITF amplifikacijom imamo višu ekspresiju ciklina D1 ($p=0.008$) i Bcl-2 proteina ($p=0.001$) u odnosu na uzorke kojima nije potvrđena amplifikacija MITF gena. Ostali analizirani parametri, kliničke i patološke značajke kao i kategorizacija TIL-a, nije se statistički značajno razlikovala ovisno o tome postoji li MITF amplifikacija ili ne.



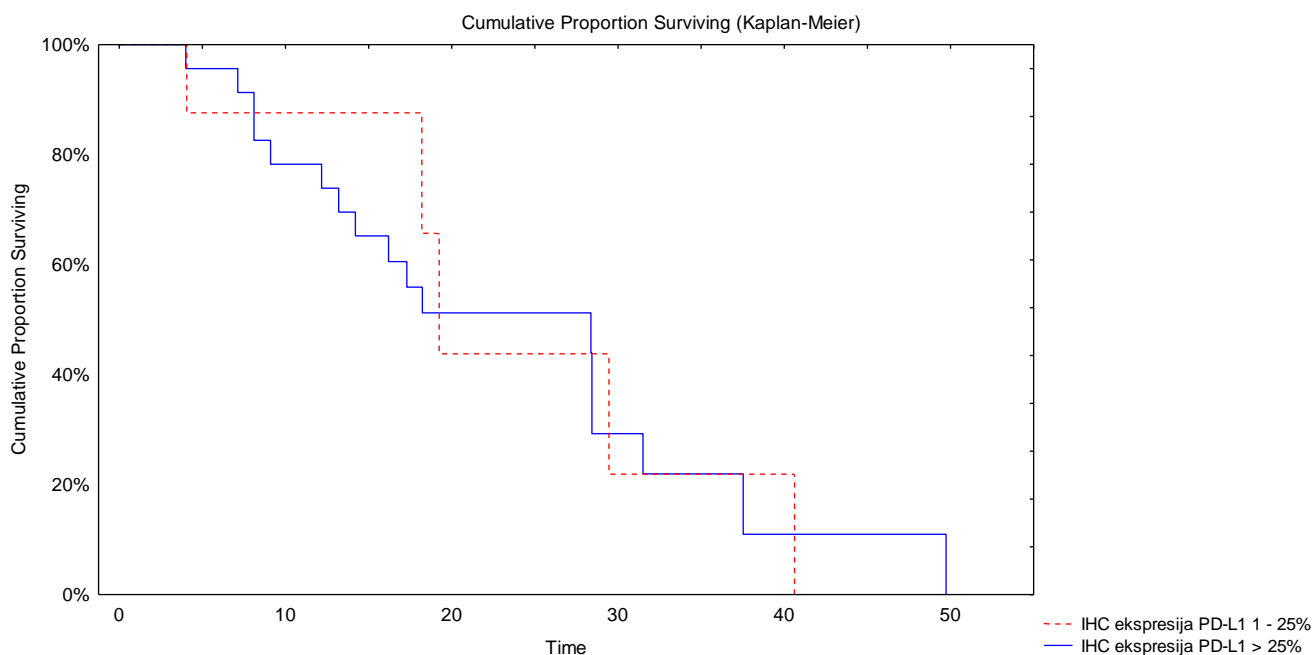
Slika 38. Box & whisker dijagram ekspresije PD-L1 ptoreina u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom ovisno o tomu postoji li MITF amplifikacija ili ne postoji (Mann-Whitney U test, $p=0,008$)

4.5.2 Analiza preživljenja bez progresije bolesti u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom – ovisno o kliničkim obilježjima i analiziranim parametrima regulacije PD-1 / PD-L1 signalnog puta

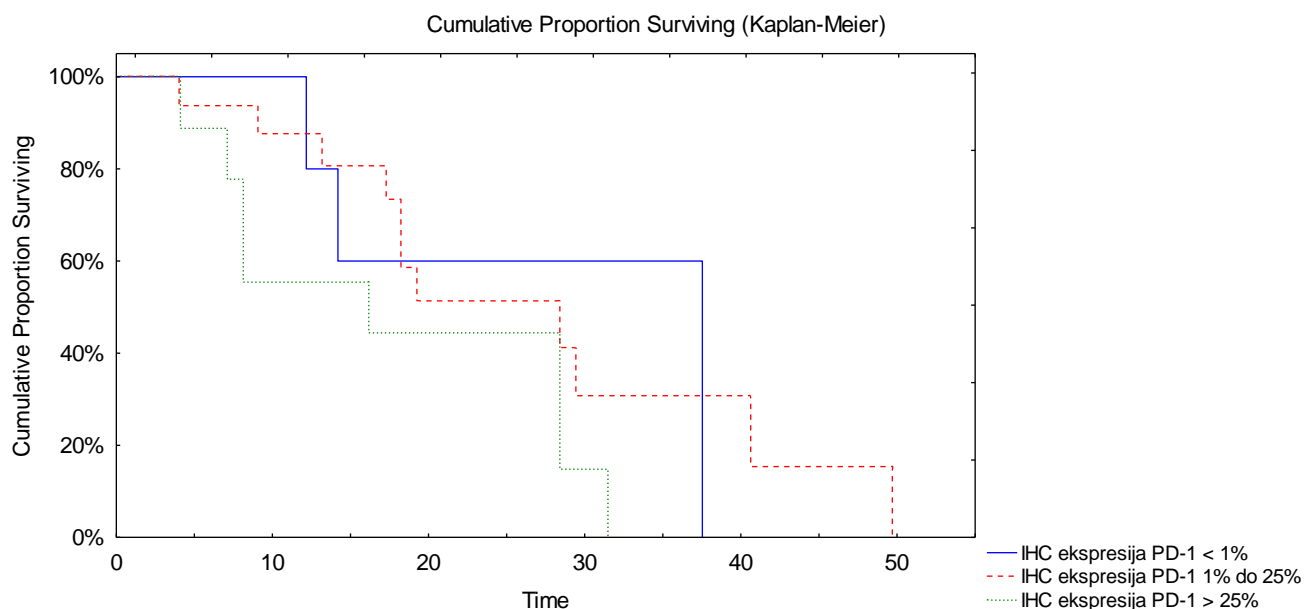
Svi pacijenti u ispitivanoj grupi primali su imunoterapiju u prvoj liniji liječenja metastatskog melanoma. Također, prije uključanja u studiju nisu primali drugo onkološko liječenje. Median vremena do progresije bolesti (eng. progression-free survival – PFS) u ispitivanoj grupi iznosio je 22 mjeseca (95%, CI 16.2 do 29.4). Prosječno vrijeme praćenja pacijenata ove grupe bilo je 47 mjeseci (u rasponu od 0.03 do 51 mjeseca). Srednje vrijeme do progresije bolesti za kategoriju melanoma s Breslow < 1.5mm iznosilo je 30,2 mjeseca, a za kategoriju melanoma s dubinom invazije > 1.5mm iznosilo je 22,2 mjeseca. Razlika između te dvije kategorije nije bila statistički značajna ($p=0.239$).

Za potrebu ove analize grupirana je ekspresija PD-L1 proteina i to kako slijedi: grupa 1 – ekspresija od 1 do 25% te grupa 2 melanoma s PD-L1 > 25%. Razlika u srednjem vremenu do progresije bolesti u ovih grupa nije bila statistički značajna ($p=0.778$) (Slika 39.) Nadalje, izvršeno je i grupiranje melanoma ovisno o ekspresiji PD-1 molekule limfocita TIL-a: grupa 1 uzorci s PD-1 < 1%, grupa 2 uzorci s PD-1 1% do 25% te grupa 3 s PD-1 > 25%. Konačno, nije postignuta statistički značajna razlika u PFS-u tih grupa. (Slika 40.)

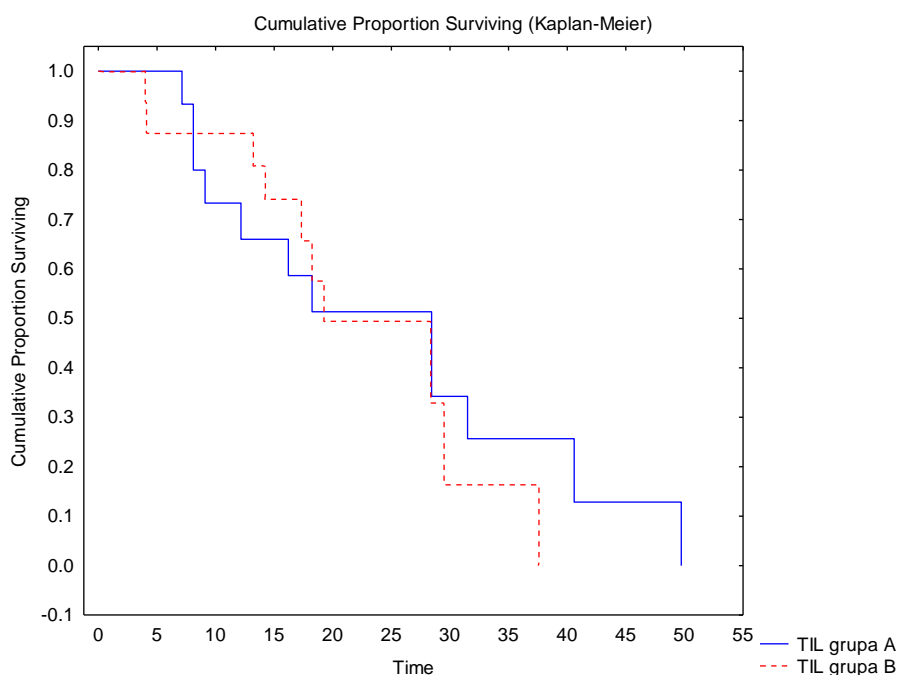
Analizom PFS-a u drugim ispitivanim grupama kliničkih i patoloških parametara nismo pronašli statističku značajnost. Također, analiziran je PFS pacijenata čiji melanomi pripadaju nekom od grupa klasificiranih po TIL-u, odnosno BRISK klasifikaciji. Razlike u PFS-u nisu bile statistički značajne u grupama formiranim obzirom na infiltraciju limfocita u tumor ($p=0.383$), kao niti kada se analiza učini po svakoj BRISK skupini pojedinačno ($p=0.543$). (Slika 41. i 42.)



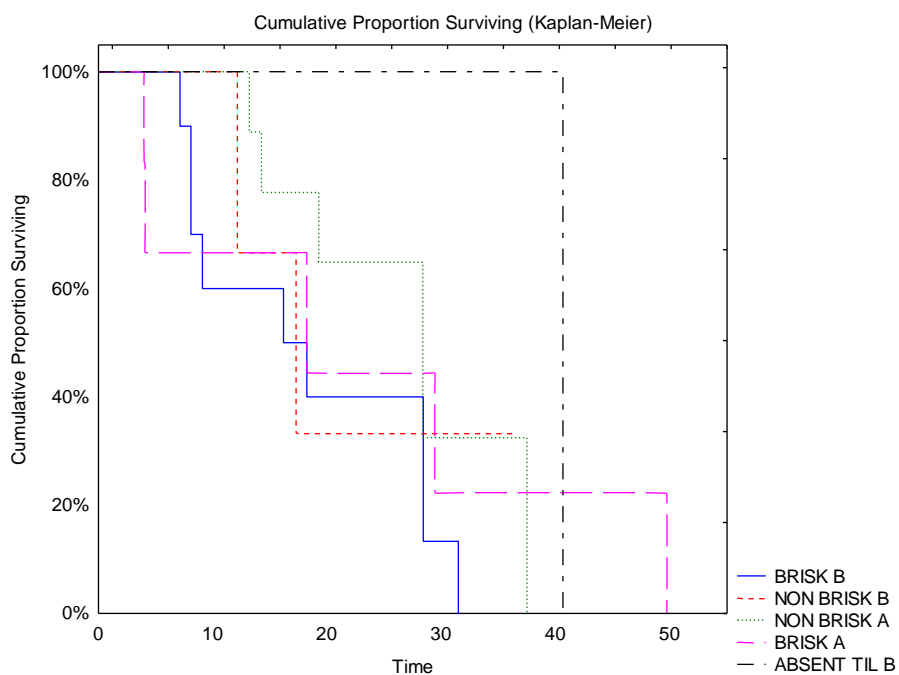
Slika 39. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama na osnovu PD-L1 ekspresije (grupa 1 – ekspresija od 1 do 25% te grupa 2 melanomi s PD-L1 > 25%)



Slika 40. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama na osnovu PD-1 ekspresije (grupa 1 – ekspresija < 1%, grupa 2 ekspresija od 1 do 25% te grupa 3 melanomi s PD-1 > 25%)



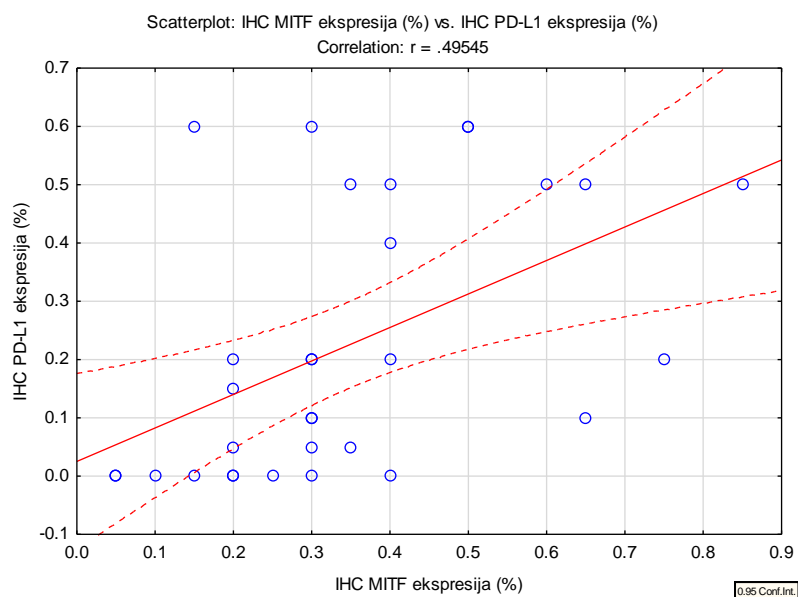
Slika 41. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama po mjestu infiltrata limfocita.



Slika 42. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama po BRISK klasifikaciji

4.6 Analiza ekspresije PD-L1 proteina u grupi metastaza melanoma i njezin odnos s drugim analiziranim proteinima tumorske stanice

U analiziranoj grupi uključene su biopsije metastaza prethodno ne liječenih pacijenata uznapredovanog kliničkog stadija melanoma. Grupa se sastojala od 19 (61%) muških pacijenata i 12 (39%) ženskih pacijentica. Median dobi iznosio je 51 godinu u rasponu od 35 do 82 godine. Median ekspresije PD-L1 proteina na stanicama metastaza bio je 15% u rasponu od 0% do 60%. Analiza rezultata pokazala je da postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i IHC MITF ekspresije ($r = 0.495$; $p = 0,0046$). (Slika 43.) Nadalje, analiza rezultata pokazala je da ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i IHC ciklina D1 ($r = -0,21$; $p=0,25$). Korelacija je negativna i nije statistički značajna. Utvrđena je statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i IHC Bcl-2 ($r = 0,496$; $p = 0,0045$). Povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i IHC MMP-1 i MMP-13 aktivnosti nije bila statistički značajna ($r = -0,22$; $p=0,231$); ($r = 0,33$; $p=0,067$). Uspoređeni su analizirani parametri ovisno o tome postoji li MITF amplifikacija ili ne. Utvrđena je amplifikacija u 10 analiziranih uzoraka tkiva metastaza. Razlika je bila statistički značajna za IHC PD-L1 ekspresiju ($p < 0,001$). Ostali parametri se nisu razlikovali statistički značajno ovisno o tome postoji li MITF amplifikacija ili ne.



Slika 43. Dijagram raspršenja – povezanost ekspresije PD-L1 i ekspresije MITF proteina u uzorcima metastaza melanoma; $p = 0.004$

5. RASPRAVA

Tumori mogu izražavati PD-L1 molekulu na površini stanica kako bi formirali takozvani „molekularni štiti“ protiv antitumorskih imunoloških efektorskih stanica, olakšavajući izbjegavanje imunološkog odgovora i invaziju u okolno tkivo i žilni sustav. Naši rezultati govore o jednakom izražaju PD-1 i PD-L1 molekule u osnovnim histološkim grupama melanoma kože. Hodis i sur. navode kako je upravo PD-L1 ekspresija najviša u melanomima kože uzorkovanim kroničnim i štetnim djelovanjem UV zračenja. U svojoj studiji iznose podatak kako je čak 66% takvih melanoma PD-L1 pozitivno, što znači ekspresiju proteina > 1% [10, 99]. Thierauf i sur. proučavali su sve vrste melanoma kože te njihov rezultat prosječne ekspresije PD-L1 molekule od 35% odgovara našim analizama ispitivane skupine primarnih melanoma [100]. Zanimljivo je da autori povezuju način tumorskog rasta s međusobnom interakcijom PD-1 i PD-L1 molekule. Naime, Lee i sur. ističu kako je ekspresija PD-L1 proteina vidljiva samo u područjima melanoma koji je u kontaktu sa stanicama TIL-a. Sukladno tome, u melanomima s radijalnim načinom rasta i prisutnim TIL-om, opisuju najgušću ekspresiju PD-L1 molekule [23,46,101]. Takav je rezultat na prvi pogled suprotan našoj analizi koja verificira značajno izraženiju ekspresiju PD-L1 molekule u nodularnim melanomima. Ipak, treba uzeti u obzir činjenicu da limfociti često infiltriraju unutar samih stanica ove vrste melanoma. Upravo je to jedan od mogućih razloga ekspresije PD-L1 i kod ove agresivne histološke slike melanoma.

U istraživanju skupine melanoma sa slabijim odgovorom na imunoterapiju, Massi i sur. u analizu uzimaju i primarno sjelo melanoma, odnosno anatomsku lokalizaciju. Nije dokazana povezanost tog kliničkog podatka s odgovorom na liječenje pembrolizumabom [102]. Naši rezultati govore u prilog toj analizi, ekspresija ispitivanih molekula bila je podjednaka u melanomima nastalim na koži trupa, ekstremiteta i koži glave i vrata. Potonja skupina znači lošiju prognozu pacijenata i predmet je istraživanja radi često inicijalno uznapredovanog stadija. Višnjić i sur. donose petogodišnji pregled liječenja 116 pacijenata te molekularni profil koji se ne razlikuje od drugih primarnih sjela. U studiji nije istražen TIL koji se u našem istraživanju ne razlikuje od onog u ostalih anatomskih lokalizacija [19,103].

Temeljito razumijevanje prognostičkih čimbenika i stadija melanoma kože presudno je za početnu procjenu bolesnika i planiranje liječenja. Osmo izdanje AJCC sustava

stadija melanoma je standardizirani i suvremeni sustav stratifikacije rizika pacijenta i usmjeravanja liječenja. Nedavno objavljena klinička ispitivanja adjuvantnih terapija u pacijenata sa stadijem III i IV melanoma, istražuju razliku u prognozi pacijenata kod kojih se nakon utvrđenog pozitivnog limfnog čvora stražara učini disekcija pripadajuće limfne regije s pacijentima kod kojih se uz terapiju redovito prati dinamika mogućeg porasta limfnih čvorova. Rezultati takvih istraživanja mijenjaju kliničku praksu [72,104]. Gledajući unaprijed, vjerojatno će se izvoditi manje disekcija pripadajućih limfnih čvorova, što će rezultirati manjkom prognostičkih informacija. Kliničke odluke u vezi s adjuvantnim terapijama morat će se donijeti na osnovu informacija o molekularnom profilu. Upravo iz tog razloga, važne su studije koje opisuju molekularne razlike u određenim kliničkim stadijima melanoma. Kakavand i sur. objavljuju rezultate koji potvrđuju značajno veću tumorsku ekspresiju PD-L1 u melanomima stadija III i IV [105]. S druge strane, Takeuchi i sur. na velikom uzorku ističu kako nema statistički bitne povezanosti ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina sa širenjem tumora u sentinel limfni čvor [106]. Tarhini i sur. bavili su se pitanjem potrebe adjuvantnog liječenja u slučaju mikrometastaze u sentinel limfnom čvoru. Oni su pokazali kako PD-L1 ekspresija snažno korelira s prisutnošću mikrometastaza [107]. Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost metastaza u limfne čvorove s PD-1 ekspresijom. Ipak, podatak o statistički značajno višoj ekspresiji PD-L1 kod melanoma sa širenjem malignih stanica u limfni čvor čuvar podržava ideju adjuvantnog liječenja ovog stadija melanoma bez nužne disekcije limfnih regija.

Prognoza melanoma je primarno povezana sa debljinom tumora. Alexander Breslow uveo je određivanje debljine melanoma kao osnovni prognostički pokazatelj lokaliziranog melanoma. Ekspresija molekule PD-L1 često je opažena upravo kod melanoma Breslow debljine 2-4 mm. Caraban i sur. opisuju pozitivnu korelaciju ekspresije PD-L1 i Breslow stadija. U toj studiji istaknuto je kako već melanomi debljine veće od 1 mm gotovo uvijek ekspimiraju PD-L1 [108]. Tome u prilog govore i rezultati ove studije u kojoj smo potvrdili izraženu ekspresiju PD-L1 u melanomima svrstanim u kategoriju Breslow > 1.5 mm. Zanimljivo je da Obeid i sur. ističu kako stanice TIL-a u tumorima Breslow > 4 mm rijetko ekspimiraju PD-1 molekulu [109]. Takav zaključak su opravdali činjenicom očitog uspješnog izbjegavanja imunološkog odgovora i „iscrpljivanjem“ T limfocita. Konačno, naši rezultati pokazuju povišenu ekspresiju PD-1 molekule kod grupe Breslow > 1.5mm.

Prema Clarku i sur., TIL se može klasificirati kao: BRISK, NON BRISK i ABSENT. TIL se smatra odsutnim (ABSENT TIL) kada nema infiltracije leukocita na bazama ili u samom tumoru. Ovoj kategoriji pripada i TIL lokaliziran oko krvnih žila na periferiji tumorskog mikrookoliša. NON BRISK TIL predstavlja infiltrat raspoređen samo fokalno, a ne duž cijele baze invazivne komponente. BRISK TIL definiran je limfocitima koji difuzno infiltriraju cijelu invazivnu komponentu ili infiltriraju preko cijele baze vertikalne faze rasta. Iako je ova klasifikacija prihvaćena od strane većine autora, modifikacije kao i u ovoj studiji otežavaju usporedbu rezultata. Na primjer, Balatoni i sur. proveli su istraživanje na kohorti od 30 pacijenata i predložili da je viši stupanj TIL-a, lokaliziran na rubovima tumora, povezan s boljim ukupnim preživljenjem pacijenata s melanomom [110]. Nadalje, de Moll i sur. proučavali su kohortu 94 pacijenta i pokazali da su TIL-ovi usko povezani s preživljenjem samo u ulceriranom melanomu [111]. Heterogenost među populacijama pacijenata i kriteriji odabira mogu povećati poteškoće u procjeni i usporedbi različitih zaključaka. Na primjer, Nicolau i sur. proučavali su pacijente s kožnim melanomom u svim stadijima, uz uključene pacijente iz različitih zemljama i zaključili da je TIL BRISK kategorija povezana s boljim ukupnim preživljenjem. S druge strane, Barnhill i sur. sugeriraju da ne postoji povezanost između grupa TIL po BRISK klasifikaciji i ukupnog preživljenja na temelju kohorte studije koja se sastoji od većine pacijenata s melanomima Breslow < 1,7 mm [112,113]. Kuempers i sur. istraživali su TIL kategoriziran po BRISK klasifikaciji u odnosu na odgovor na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka. U toj studiji nisu utvrdili vezu ekspresije PD-L1 molekule s određenom grupom TIL-a [114]. Po našim saznanjima, rezultati naše studije jedini dovode u vezu ekspresiju PD-L1 proteina sa određenom skupinom TIL-a. Naime, za istaknuti je kako gotovo svi melanomi čiji TIL ulazi u kategoriju BRISK B imaju ekspresiju PD-L1 > 50%. Jacquelot i sur. ističu kako je ekspresija PD-L1 snažno povezana s povećanom prisutnošću CD8⁺ T limfocita u TIL-u kao i u perifernoj krvi pacijenata. U ovoj studiji nismo potvrdili vezu CD8⁺ limfocita s PD-L1 proteinom, ali svakako je činjenica prisustva citotoksičnih limfocita između stanica melanoma bitan faktor u regulaciji ekspresije PD-L1 [115]. Aktivirane CD8⁺ T stanice inducirat će staničnu smrt putem Fas liganda. Glavna uloga CD8⁺ T stanica je u izlučivanju interferona gama odgovornog za pojačanu regulaciju MCH I i II molekula. Tako djelujući izravno utječu na diferencijaciju CD4⁺ Th stanica. Ferroptaza je oblik stanične smrti koji je posljedica nakupljanja lipidnih peroksida ovisnih o željezu. U studiji koju su proveli Wang i sur., primijećeno je da imunoterapijom aktivirane CD8⁺ T stanice poboljšavaju

peroksidaciju lipida u malignim stanicama. Upravo tim načinom djelovanja, induciranjem ferroptoze, doprinose učinkovitosti imunoterapije [116]. Aktivirane CD8⁺ stanice eksprimiraju na površini stanice CD152 (CTLA-4 molekulu), koja ima ulogu u inhibiciji imunološkog odgovora. Terapije temeljene na ipilimumabu (anti-CTLA-4 protutijelo) pokazuju rano povećanje apsolutnog broja limfocita koje se u pravilu dogodi unutar 2-8 tjedana nakon prvog ciklusa liječenja. Ovo povećanje je u korelaciji s poboljšanjem preživljenja. Povećanje apsolutnog broja limfocita postiže se na temelju povećanja gustoće i CD8⁺ i CD4⁺ stanica. S gledišta imunoterapije, ona obnavlja i poboljšava djelovanje CD8⁺ limfocita u melanomu. Dva gore navedena događaja ukazuju na promjenu u imunološkom sustavu, što može istaknuti prijelaz iz nespecifične imunosti u specifičan tip. Prema rezultatima koje su dobili Piras i sur., ovisno o gustoći stanica poredanih uz normalni dermis kod melanoma s vertikalnom fazom rasta, stopa mortaliteta varirala je od 81% u slučajevima niske gustoće do 20% u slučajevima visoke gustoće limfocita CD8⁺. Stopa 5-godišnjeg preživljenja u slučajevima niske gustoće bila je 25% i 78,8% u slučajevima limfocita visoke gustoće [117]. Ovakvi rezultati podupiru naš zaključak kako je lokacija tumorskog infiltrata i njegova gustoća važna i u regulaciji potencijalnih biomarkera u imunoterapiji kao što su PD-1 i PD-L1 molekula. Osim potpore koju daju CD8⁺ citotoksičnim limfocitima, CD4⁺ T stanice mogu imati izravan citotoksični učinak na maligne melanocyte. CD4⁺ T stanice zajedno sa svojim markerima aktivacije, kao što su CD25 ili CD134, imaju povoljnu prognostičku ulogu u melanomu. Takav učinak je utvrđen kada su CD4⁺ limfociti identificirani u povećanoj peritumoralnoj gustoći, ali ne kada su identificirani unutar tumora [59, 118].

Treg je visoko imunosupresivna subpopulacija CD4⁺ T stanica. Treg limfociti su prethodno identificirani kao CD4⁺CD25⁺ T-stanice i potvrđeno je da inhibiraju T stanice kako bi se izbjegla oštećenja uzrokovana njihovom ekstremnom aktivacijom. Stoga Treg limfociti igraju ključnu ulogu u održavanju imunološke homeostaze. Cioplea i sur. su procijenili korelacije prognostičkih čimbenika melanoma (Breslow stadij i mitotski indeks) s ekspresijom foxp3⁺ regulatornih T stanica i dendritičnih stanica u tumorskoj stromi.. Zaključili su kako je foxp3⁺ vjerojatno korisna terapijska meta u melanomu, budući da inhibicija regulatornih T stanica može eliminirati sposobnost tumorskih stanica da izbjegnu imunološku obranu domaćina [119]. Rezultati studije Li i sur. sugeriraju da bi PD-L1 i Treg limfociti mogli djelovati sinergistički te da njihova pojačana

ekspresija potiče inhibiciju imunološkog sustava kod raka dojke [120,121]. Naše istraživanje nije dokazalo značajnu korelaciju u navedenoj ekspresiji. Također, čini se kako PD-1 pozitivni limfociti TIL-a melanoma nisu u cijelosti pod regulacijom samo Treg limfocita.

CD20, B-stanični marker, je fosfoprotein ugrađen u membranu limfocita, kodiran genom MS4A1. Izražen je u B limfocitima i obično se gubi kada B stanice postanu plazma stanice. Kod autoimunosti i transplantacije organa, T-stanice i B-stanice surađuju kako bi generirale snažne imunološke reakcije koje mogu rezultirati velikim oštećenjem tkiva i odbacivanjem organa. U tim situacijama, B stanice pojačavaju odgovore T stanica proizvodnjom citokina i kemokina, služeći kao lokalne antigen prezentirajuće stanice i formiraju limfoidne strukture koje održavaju dugoročni imunitet. Uključivanje B limfocita reaktivnih na tumor može biti važan uvjet za stvaranje snažnih, dugoročnih odgovora T stanica protiv raka. Kod karcinoma grlića maternice, CD20⁺ TIL povezan je s nižom stopom recidiva. Willsmore i sur. navode kako B limfociti nisu samo „promatrači“ u imunoterapiji melanoma. Čini se da je njihova uloga indukcije T limfocita važan element u dobrom odgovoru na imunoterapiju [121]. Sukladno tome, značajan je rezultat ove studije u kojem ističemo činjenicu da je PD-L1 ekspresija značajno manja u tumorima čiji TIL sadrži i B limfocite.

Ciklin D1, kodiran genom CCND1 koji se nalazi na dijelu kromosoma 11q13, potiče napredovanje staničnog ciklusa tijekom G1 u S fazu. Već nekoliko godina poznato je da CCND1 može djelovati kao relevantan onkogen u nekim vrstama tumora, promovirajući povećanje kapaciteta migracije stanica, inhibiciju diferencijacije, inhibiciju popravka DNA i poremećajima u metabolizmu mitohondrija. Meta-analiza González-Ruiz i sur. pokazuje povezanost između regulacije CCND1/ciklina D1 i nekih kliničko-patoloških značajki melanoma. Među njima se ističe značajna povezanost utvrđena između regulacije CCND1/ciklina D1 i invazije po Breslowu otkrivena uglavnom preko imunohistokemijske prekomjerne ekspresije proteina ciklina D1 [122]. Naši rezultati pokazuju samo trend porasta ekspresije ciklina D1 u Breslow kategoriji > 1.5mm, bez statističke značajnosti. S druge strane, amplifikacija gena CCND1 ne pokazuje povezanost s patološkim značajkama melanoma. Ovo opažanje moglo bi se objasniti višestrukim aktivnim onkogenim putevima u melanomu koji konvergiraju u regulaciji CCND1/ciklina D1 bez genetske amplifikacije. Isto tako, primijećena je značajno veća učestalost abnormalnosti CCND1/ciklin D1 u primarnom tumoru u

usporedbi s udaljenim metastazama. Takvo opažanje odgovara i našim rezultatima gdje smo utvrdili veći median ekspresije u grupi primarnih melanoma u odnosu na uzorke metastaza melanoma. Zanimljiva je činjenica da smo dokazali povećanu ekspresiju ciklina D1 uz podatak o širenju primarnog melanoma u regionalni limfni čvor. Čini se da su procesi stanice koji uzorkuju prekomjernu ekspresiju ciklina D1 važni u razvoju agresivnijih oblika melanoma.

Mehanizmi regulacije CCND1/ciklin D1 povezani s CCND1 genom i njegovom amplifikacijom nisu česti u melanomima. Izvješćima govore da se ovaj gen amplificiran u samo 4% slučajeva. Učestalost amplifikacije varira ovisno o tipu melanoma, primijećena je najčešće kod akralnih melanoma (11%), a amplifikacija je pronađena samo u 1% slučajeva melanoma sinusa koje su proučavali Turri-Zanoni i sur. [122, 123]. Ekspresija ciklina D1 u našoj ispitivanoj grupi slična je u svim anatomskim lokalizacijama melanoma kože. Melanomi s amplificiranjem CCND1 imaju velik broj kopija gena i često su u korelaciji s razinama ekspresije ciklina D1 proteina. Međutim, opisani su i slučajevi prekomjerne ekspresije ciklina D1 bez amplifikacije gena, što predstavlja 25% melanoma u seriji koju su objavili Bastian i sur. Ova zapažanja su važna jer ukazuju na to da ciklin D1 može ispoljavati svoje onkogeno djelovanje drugim putovima osim mijenjanjem pripadajućeg gena [124]. U studiji Gerami i sur. utvrđena je korelacija amplifikacije CCND1 gena i prognoze preživljenja pacijenata, dok su Vizkeleti i sur. amplifikaciju CCND1 gena povezali s ulceracijom melanoma, ali uz izostanak korelacije sa preživljenjem [125,126]. Curtin i sur. navode rijetke slučajeve amplifikacije CCND1 gena u kožnim melanomima [127]. Smalley i sur. su pokazali povezanost povećane ekspresije ciklina D1 i rezistencije na terapiju BRAF inhibitorima u BRAF V600E mutiranim melanomima [128]. Tufano i sur. u svojoj studiji pružaju nove elemente koji povezuju ekspresiju PD-L1 sa staničnom proliferacijom [129]. O odnosu između ekspresije PD-L1 i proliferacije prvi su izvijestili Xue i sur., koji su istraživali proteinske profile PD-L1 i KI-67 u bolesnika s gliomom, Prirodna varijabilnost proliferativnog kapaciteta uočena među stanicama tumora značajno utječe na progresiju tumora i terapijsku učinkovitost [130]. Zhang i sur. u svom priopćenju iznose vrlo zanimljive podatke o utjecaju CDK4/6 inhibitora na povećanu ekspresiju PD-L1 [131]. Čini se da ciklin D1 u kompleksu s kinazama utječe na razgradnju PD-L1 molekule. Rezultati našeg istraživanja ipak govore o pozitivnoj korelaciji između ekspresija PD-L1 i ciklin D1 proteina stanica melanoma. Rezultati studije Assaf i sur.

isto pokazuju na stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke [132]. U tom agresivnom obliku tumora zabilježen je bolji odgovor na neoadjuvantnu kemotapiju u slučaju ekspresije PD-L1 i ciklina D1, koji su i tada bili u pozitivnoj korelaciji. Čini se da kontrola proliferaciji stanica posredovana kompleksom kojeg čini i ciklin D1 utječe na regulaciju izražaja PD-L1 molekule. Svakako su zanimljivi i rezultati koji povezuju ekspresiju ciklina D1 s ekspresijom PD-1 proteina. Chen i sur. navode kako prekomjerna ekspresija ciklina D1 može utjecati i na aktivaciju imunološkog odgovora [133]. Takav zaključak ide u prilog značajno većoj ekspresiji ciklina D1 u tumorskim stanicama kada njihov TIL svrstamo u kategoriju BRISK B za koju znamo da označava direktnu infiltraciju tumorskog tkiva T limfocitima.

Čini se da su putevi mitohondrijske apoptoze od posebne važnosti za melanom i aktiviraju se kao odgovor na različite podražaje. Antiapoptotski proteini kao što su Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1 visoko su izraženi, a visok omjer Bcl-2/Bax korelira s otpornošću na apoptozu. Regulacija ekspresije Bcl-2 pripisuje se transkripcijskom faktoru povezanom s mikroftalmijom, dok ekspresija Bcl-xL može ovisiti o aktivnosti NF- κ B. Zbog svoje uloge, prekomjerna ekspresija Bcl-2 smanjuje osnovnu apoptozu i osjetljivost stanica melanoma na proapoptotske podražaje. Pronađena je i prognostička vrijednost proapoptotskih Bcl-2 proteina. Naime, smanjeni Bax i Bak u primarnim melanomima u korelaciji su s nepovoljnom prognozom. U literaturi postoji nekoliko izvješća koja opisuju interakcije između proteina iz obitelji Bcl-2 i puta PD-1/PD-L1 [133,134]. Međutim, rezultati dostupnih studija dali su samo teorijsku osnovu za klinička ispitivanja koja se trenutno provode. Struktura proteina athanogen-1 (BAG-1) povezanog s Bcl-2 ne dopušta njegovu klasifikaciju u obitelj Bcl-2. Vežući se s Bcl-2 sudjeluje u jednom od puteva koji inhibiraju apoptozu. Povećana ekspresija PD-L1 neizravno, putem signalizacije zatvorene petlje (receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) / izvanstanične jednostruko regulirane kinaze (ERK)/PD-L1/BAG-1), inducira BAG-1 koji potiče fosforilaciju anti-apoptotskog kompleksa s Bcl-2. U mišjem modelu kronične bolesti presatka protiv domaćina, blokiranje ekspresije PD-L1 na tumorskim stanicama povećalo je razine Bcl-2, ali je smanjilo Bax i Bak u T limfocitima, povećavajući njihovo preživljavanje [135]. Rezultati našeg istraživanja na uzorcima tkiva melanoma, svakako doprinose zaključku kako postoji međusobna regulacija ove dvije molekule. Zanimljivo je da takva pozitivna sprega vjerojatno doprinosi upalnom

odgovoru jer je značajno viša ekspresija Bcl-2 proteina pronađena u melanomima s BRISK B kategorijom TIL-a.

Nedavna meta analiza učinka terapije anti-PD-1 (nivolumab i pembrolizumab) ispitala je dvadeset studija, sedam u bolesnika s melanomom. Potvrdila je da je ukupni odgovor bio značajno veći u tumorima pozitivnim na PD-L1, odnosno s ekspresijom većom od 5% [136]. Upravo su slični rezultati kod drugih tumora skrenuli pozornost na istraživanje regulacije ekspresije PD-L1. Znamo kako je IHC nalaz i postotak pozitivnih stanica na PD-L1 samo „screenshot“ dinamične promjene ekspresije. Dokazano je kako IFN- γ te ostali citokini tumorskog upalnog infiltrata reguliraju ekspresiju PD-L1. Također, literatura govori i o mutacijama važnim u regulaciji, kao što je JAK1 i JAK2 mutacija u MM. Alys Lo u svojoj dizertaciji istražuje mogućnost regulacije prepisivanja PD-L1 gena sa strane MITF i to na staničnim linijama melanoma kao i na animalnim modelima. CHIP sekvencioniranje korišteno je u svrhu procjenu razine MITF i acetilacije histona H3 na lizin 27 (H3K27Ac) u blizini gena PD-L1. Poznati geni ovisni o MITF, otkriveni su 6,45 kb uzvodno od mjesta početka transkripcije PD-L1 u ljudskim melanocitima [137]. Isto sugerira da bi ova regija mogla biti aktivni pojačivač koji pokreće transkripciju PD-L1 na način ovisan o MITF-u. Također, u istoj studiji utvrđena je veza amplifikacije MITF gena i ekspresije PD-L1 molekule. U našem istraživanju povećanu razinu MITF proteina također prati i visoka ekspresija PD-L1. Također, razlika u ekspresiji PD-L1 je bila statistički značajna ovisno o tomu postoji li MITF amplifikacija ili ne postoji, kako na uzorcima primarnog melanoma tako i u grupi metastaza. Razina proteinske ekspresije MITF-a je kritična za stanice melanoma. Visoka razina stimulira diferencijaciju, proliferaciju i preživljenje, a niska podržava starenje stanice i usmjerava stanicu u apoptozu. Istraživana je i uloga MITF kao biomarkera u imunoterapiji. Zanimljivi su rezultati koji ističu kako stanice s manjom ekspresijom ovog proteina pokazuju veću rezistenciju na imunoterapiju [138]. Onkogen BRAF V600E stimulira aktivnost MITF-a fosforilacijom ERK-a, što usmjerava MITF u degradaciju i na taj način reducira razinu MITF proteina potrebnu za preživljenje i proliferaciju. S druge strane BRAF V600E stimulira transkripciju MITF-a putem pojačane aktivacije transkripcijskog faktora BRN-2. Na taj način se postiže da, unatoč djelomičnoj razgradnji u proteosomu, opstaje dovoljna količina MITF proteina, da bi se održavala proliferacijska sposobnost stanice [139].

Neke studije kao regulator proteinske ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule spominju i određene enzime prisutne u tumorskom mikrookolišu. Miyazawa i sur. dolaze do zanimljivih rezultata u kojima opisuju protektivnu vrijednost MMP-13 [140]. Do sada je ovaj proteolitički enzim bio označen kao jedan od glavnih mehanizama tumorske invazije. Poznata je i povećana prisutnost MMP na površini stanica melanoma, kao i u okolišu tumora. Huntington i sur. sugerirali su da je konstitutivna ekspresija MMP-1 povezana s aktivacijom mutacije BRAF V600 puta RAS/RAF/MEK/ERK. U tri ispitivane stanične linije melanoma, aktivacija ovog puta je posredovana mutacijom BRAF V600, a u jednoj staničnoj liniji autokrinim djelovanjem faktora rasta fibroblasta [141]. Heterogenost tumora i aktivacija imunološkog sustava značajni su čimbenici koji utječu na preživljenje bolesnika i izbor odgovarajuće terapije. Pokušaj blokiranja MMP-a u terapijske svrhe nije pokazao ohrabrujuće rezultate. Nekoliko faktora rasta (EGF, PDGF, bFGF, VEGF) i citokina (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β) mogu utjecati na *de novo* sintezu MMP. Naši rezultati utvrđuju značajnu povezanost u ekspresiji MMP-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita u TIL-u ispitivanih melanoma. Nadalje, Aguirre i sur. ističu kako inhibicija aktivnosti MMP s inhibitorima MMP ili anti-MMP-10 neutralizirajućim protutijelima obnavlja PD-L1 ekspresiju na stanicama fibroblasta [142]. Ipak, u ovom istraživanju nije pronađena korelacija aktivnosti enzima MMP-1 i MMP-13 s ekspresijom molekula PD-1/PD-L1 signalnog puta.

U analizi bolesnika s uznapredovalim melanomom liječenih pembrolizumabom u KEYNOTE-001 studiji, procijenjena je stopa OS nakon 5 godina u ukupnoj populaciji i kod onih koji prethodno nisu bili onkološki aktivno liječeni. Postotak bolesnika s trajnim odgovorom bio je veći u onih koji prethodno nisu primali drugu terapiju nego u svih pacijenata. Ovi podaci, koji predstavljaju najdulje praćenje pembrolizumaba, potvrđuju trajno antitumorsko djelovanje pembrolizumaba u uznapredovalom i metastatskom melanomu. Sigurnosni profil pembrolizumaba u bolesnika s melanomom djelomično je utvrđen kroz KEYNOTE-001 [92].

Petogodišnje stope OS-a opažene kod pacijenata u terapiji pembrolizumabom u ovoj analizi bile su značajno više od onih prijavljenih za monoterapiju ipilimumabom (12,3% naspram 28,4%). Kao i kod ovdje predstavljenih rezultata [pembrolizumab, stope 5-godišnjeg OS: 34% (svi pacijenti) naspram 41% (bolesnici koji prethodno nisu bili liječeni)], nešto više stope 5-godišnjeg preživljenja postignute su s ipilimumabom u pacijenata koji prethodno nisu bili liječeni [ipilimumab, 5-godišnje stope OS: 12,3%–

28,4% (svi pacijenti) naspram 21,4%–49,5% (neliječeni pacijenti)] [93,94,96]. Nivolumab u monoterapiji pokazao je stopu OS-a od 34% i medijan OS-a od 17,3 mjeseci nakon \geq 45-mjesečnog praćenja u bolesnika koji su prethodno intenzivno liječeni. Plato u OS-u primijećen je nakon otprilike 48 mjeseci, što ukazuje na dugoročnu korist kod nekih pacijenata. Biomarkeri za predviđanje odgovora na imunoterapiju kod uznapredovalih zloćudnih bolesti opsežno se proučavaju, a neki su i klinički potvrđeni. Oni se mogu detektirati i mjeriti u tumorskom tkivu ili u perifernoj krvi. Tkivni biomarkeri odobreni od strane FDA za solidne tumore uključuju PD-L1, opterećenje mutacija tumora (TMB) i mikrosatelitsku nestabilnost (MSI). Kako je to slučaj i u velikim kliničkim studijama, ekspresija PD-1 i PD-L1 nije imala utjecaj na PFS kod ispitivane grupe pacijenata liječenih imunoterapijom [91]. Zaključci koje donosi i ova studija temelj su modernog shvaćanja daljnjeg poboljšanja učinkovitosti imunoterapije. Sada je gotovo pa sigurno da se strategija predviđanja boljeg odgovora na liječene imunoterapijom krije upravo u razumijevanju regulacije signalnog puta PD-1 / PD-L1. Složeni mehanizmi spomenute regulacije pa i mehanizmi otpornosti ograničavaju otkriće pojedinačnih prognostičkih i prediktivnih biomarkera. Zaključci ovakvih studija mogli bi biti korisni u identificiranju kliničkih skupina pacijenata s najvećom koristi imunoterapije.

6. ZAKLJUČCI

1. Ekspresija molekula PD-1 i PD-L1 nije se statistički značajno razlikovala kod različitih anatomskih lokalizacija melanoma. ($p=0.59$)
2. Ekspresija PD-L1 molekule bila je statistički značajno veća u nodularnim melanomima što ukazuje na činjenicu njezine pozitivne regulacije u agresivnijim oblicima melanoma s dominantno vertikalnim načinom rasta. ($p=0.06$)
3. Činjenicu povišene ekspresije PD-L1 proteina u invazivnijim oblicima melanoma može potkrijepiti i podatak o statistički značajno višoj ekspresiji kod melanoma sa širenjem malignih stanica u limfni čvor čuvar. ($p=0.002$)
4. Ključne molekule istraživanog signalnog puta, PD-1 i PD-L1 jače su izražene u melanomima svrstanim u kategoriju Breslow > 1.5 mm. ($p= 0,013$ i $p=0.009$)
5. Većina istraživanih primarnih melanoma posjeduje TIL u kategoriji NON BRISK A, što označuje infiltraciju limfocitima na rubovima melanoma, ali diskontinuirano u ne više od četiri sloja (43% uzoraka ispitivane grupe)
6. Analiza rezultata pokazala je da postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 na membrani stanica melanoma i PD-1 ekspresije na limfocitima ($p =0.005$)
7. Pronađene su razlike u izražaju ispitivanih molekula ovisno o smještaju TIL-a. Ekspresija PD-L1 molekule na tumorskim stanica gotovo uvijek iznosi $> 50\%$ kada je TIL u kategoriji BRISK B. S druge strane, vidljivo je kako u slučaju smještaja limfocita na rubovima melanoma, ekspresija PD-L1 molekule ima statistički značajno manje razine. U kategoriji BRISK B statistički je značajna razlika u ekspresiji PD-1 molekule limfocita u odnosu na kategoriju NON BRISK A, kojoj pripada većina analiziranih uzoraka.
8. Utvrđeno je prisustvo CD20 pozitivnih B limfocita u TIL-u 18 (22%) istraživanih melanoma. Iako nema razlike u ekspresiji PD-1 molekula kada TIL čine i B limfociti, verificirano je da je median ekspresije PD-L1 značajno manji u slučaju prisustva CD20⁺ limfocita. ($p=0.002$)
9. Nismo dokazali dominantno prisustvo određenih podtipova limfocita (CD8⁺, CD4⁺ ili Treg) u nekom od kategorija TIL-a po BRISK klasifikaciji. Također, nije utvrđena povezanost u regulaciji ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule s dominantnim prisustvom nekih od podtipova T limfocita u TIL-u.

10. Analizom naših rezultata dokazano je kako proteini uključeni u regulaciju staničnog puta i apoptoze tumorske stanice (ciklin D1, Bcl-2 i MITF) reguliraju ekspresiju PD-L1 proteina na stanici tumora te utječu i na izraženost PD-1 molekula na limfocitima oko tumora
- a. Dokazana je statistički značajna korelacija ekspresije PD-1 i PD-L1 proteina s ekspresijom ciklina D1 u citoplazmi tumorskih stanica. ($p < 0.001$ u oba slučaja)
 - Utvrđena je statistički značajno veća ekspresija ciklina D1 u tumorskim stanicama kada njihov TIL svrstamo u kategoriju BRISK B
 - Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije ciklina D1 s prisutnosti neke od određenih podvrsta T limfocita
 - Utvrđena je statistički značajna povećana ekspresija ciklina D1 kada su u TIL-u prisutni B limfociti
 - b. Postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom proteina PD-1/PD-L1 signalnog puta (u oba slučaja $p < 0.001$).
 - Utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji ovog proteina kod nodularnog melanoma u odnosu na druge ispitivane histološke podtipove
 - Utvrđena je statistički značajno veća ekspresija Bcl-2 proteina u tumorskim stanicama kada njihov TIL svrstamo u kategoriju BRISK B
 - c. Utvrđena je statistički značajna povezanost između ekspresije proteina MITF s ekspresijom proteina PD-1/PD-L1 signalnog puta inhibicije limfocita (u oba slučaja $p < 0.001$).
 - Ekspresija MITF proteina statistički se značajno razlikuje u grupama primarnog melanoma trupa i ekstremiteta
 - Utvrdili smo statistički značajnu povišenu ekspresiju MITF proteina u uznapredovanim kliničkim stadijima melanoma

11. Utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije metaloproteinaza, podvrste kolagenaza (MMP-1) s ekspresijom proteina PD-1 i PD-L1 signalnog puta ($p=0.059$) ($p=0.723$). Također, ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije MMP-13 s ekspresijom proteina PD-1 i PD-L1 ($p=0.173$) ($p=0.510$).
 - a. Postoji značajna povezanost u ekspresiji MMP-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita u TIL-u ispitivanih melanoma ($p=0.006$).
12. U analizi povezanosti PD-1 ekspresije, uzoraka melanoma prije liječenja imunoterapijom, s udjelom određenih vrsta limfocita u TIL-u pronašli smo statistički značajnu povezanost s ekspresijom foxp3+ na Treg limfocitima ($p=0.001$).
13. Ekspresija PD-1 i PD-L1 proteina, u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom, bila je značajno veća u slučaju TIL-a gdje se limfociti nalaze unutar tumorskog tkiva (BRISK B i NON BRISK B)
14. MITF amplifikacija je potvrđena u 9 uzoraka, odnosno u njih 29% grupe pacijenata koji su liječeni imunoterapijom. Razlika u ekspresiji PD-L1 je bila statistički značajna ovisno o tomu postoji li MITF amplifikacija ili ne postoji (Mann-Whitney U test, $p=0,008$). (Slika 34.) Protein PD-1 nije bio statistički značajno ovisan o MITF amplifikaciji. ($p=0.127$). Rezultati ovisnosti PD-L1 ekspresije o MITF amplifikaciji potvrđeni su i u grupi metastaza melanoma.
15. Median vremena do progresije bolesti (PFS) u ispitivanoj grupi pacijenata liječenih imunoterapijom iznosio je 22 mjeseca (95%, CI 16.2 do 29.4). Prosječno vrijeme praćenja pacijenata ove grupe bilo je 47 mjeseci (u rasponu od 0.03 do 51 mjeseca). Nije utvrđen statistički značajan utjecaj na PFS u grupama različite ekspresije PD-1 i PD-L1 molekule. Nije bilo statistički značajne razlike u PFS-u u grupama klasifikacije TIL-a.
16. U grupi uzoraka metastaza melanoma, $n=31$, potvrdili smo rezultat koji ukazuje na moguću regulaciju ekspresije PD-L1 molekule od strane MITF proteina i njegovih interakcija u tumorskim stanicama. Ekspresija je bila statistički značajno veća i kod prisutne amplifikacije MITF gena (utvrđene u 10 uzoraka metastaza melanoma).

7. LITERATURA

- [1] Liskay G, Kiss Z, Gyulai R i sur. Changing Trends in Melanoma Incidence and Decreasing Melanoma Mortality in Hungary Between 2011 and 2019: A Nationwide Epidemiological Study. *Front Oncol.* 2021;10:612-615.
- [2] Memon A, Bannister P, Rogers I i sur. Changing epidemiology and age-specific incidence of cutaneous malignant melanoma in England: An analysis of the national cancer registration data by age, gender and anatomical site, 1981-2018. *Lancet Reg Health Eur.* 2021;2:10-24.
- [3] Arnold M, Singh D, Laversanne M i sur. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol.* 1;158(5):495-503.
- [4] Leiter U, Keim U, Garbe C. Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1268:123-139
- [5] Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J i sur. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer.* 2013;132(2):385-400.
- [6] Barbaric J, Sekerija M, Agius D i sur. Disparities in melanoma incidence and mortality in South-Eastern Europe: Increasing incidence and divergent mortality patterns. Is progress around the corner? *Eur J Cancer.* 2016;55:47-55
- [7] Forsea AM, Del Marmol V, Stratigos A, Geller AC. Melanoma prognosis in Europe: far from equal. *Br J Dermatol.* 2014;171(1):179-82.
- [8] Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Bilten br. 42 Zagreb. 2020.
- [9] Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 2005 Jan;41(1):28-44.
- [10] Easton D. The role of atypical mole syndrome and cutaneous naevi in the development of melanoma. *Cancer Surv.* 1996;26:237-49.
- [11] Djavaid AR, Stonesifer C, Fullerton BT, Wang SW, Tartaro MA, Kwinta BD, Grimes JM, Geskin LJ, Saenger YM. Etiologies of Melanoma Development and Prevention Measures: A Review of the Current Evidence. *Cancers.* 2021;13(19):4-14.
- [12] Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S i sur. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. *Int J Oncol* 2018;52: 1071-1080.

- [13] Guy GP Jr, Watson M, Seidenberg AB, Hartman AM, Holman DM, Perna F. Trends in indoor tanning and its association with sunburn among US adults. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(6):1191-1193.
- [14] Jeter JM, Bowles TL, Curiel-Lewandrowski C, i sur. Chemoprevention agents for melanoma: A path forward into phase 3 clinical trials. *Cancer.* 2019;125(1):18-44.
- [15] Jallad KN. Chemical characterization of sunscreens composition and its related potential adverse health effects. *J Cosmet Dermatol.* 2017;16(3):353-357.
- [16] Watts CG, Drummond M, Goumas C i sur. Sunscreen Use and Melanoma Risk Among Young Australian Adults. *JAMA Dermatol.* 2018;154(9):1001-1009.
- [17] Koumaki D, Papadakis M, Kouloumvakou S, Krasagakis K. Awareness, knowledge, and attitudes towards sun protection among patients with melanoma and atypical mole syndrome. *World J Clin Oncol.* 2022;13(7):587-598.
- [18] Chan AK, Han SJ, Choy W i sur. Familial melanoma-astrocytoma syndrome: synchronous diffuse astrocytoma and pleomorphic xanthoastrocytoma in a patient with germline CDKN2A/B deletion and a significant family history. *Clin Neuropathol.* 2017;36(5):213-221.
- [19] Kang S, Barnhill RL, Mihm MC Jr, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Melanoma risk in individuals with clinically atypical nevi. *Arch Dermatol.* 1994;130:999–1001.
- [20] Scolyer RA, Rawson RV, Gershenwald JE, Ferguson PM, Prieto VG. Melanoma pathology reporting and staging. *Mod Pathol.* 2020;33:15-24.
- [21] Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR i sur. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):472-492.
- [22] Elder DE, Eguchi MM, Barnhill RL, Kerr KF, Knezevich SR, Piepkorn MW, Reisch LM, Elmore JG. Diagnostic error, uncertainty, and overdiagnosis in melanoma. *Pathology.* 2023;55(2):206-213.
- [23] Ackerman AB. Malignant melanoma: a unifying concept. *Hum Pathol.* 1980;11(6):591-5.
- [24] Piltin MA, Glasgow AE, Habermann EB, Hieken TJ. Intermediate-thickness melanoma: A population-based study of surgical quality metrics. *Surgery.* 2023 Mar;173(3):626-632.
- [25] Mishra K, Barnhill RL, Paddock LE i sur. . Histopathologic variables differentially affect melanoma survival by age at diagnosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32:593–600.

- [26] Vecchiato A, Pasquali S, Menin C i sur. . Histopathological characteristics of subsequent melanomas in patients with multiple primary melanomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28:58–64.
- [27] Ferrone CR, Porat LB, Panageas KS i sur. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA*. 2005;294:1647–54.
- [28] Eggermont AMM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2014;383(9919): 816-827.
- [29] Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ i sur. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(4):770-784.
- [30] Marquette A, Bagot M, Bensussan A, Dumaz N. Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications. *Arch Immunol Ther Exp*. 2007;55(6):363-372.
- [31] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell W i sur. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1263-1284.
- [32] Michailidou C, Jones M, Walker P, Kamarashev J, Kelly A, Hurlstone AF. Dissecting the roles of Raf- and PI3K-signalling pathways in melanoma formation and progression in a zebrafish model. *Dis Model Mech*. 2009;2(7-8):399-411.
- [33] Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, Kelley SL. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol*. 2006;33(4):392-406.
- [34] Flaherty KT, Infante JR, Daud A i sur. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367(18): 1694-1703.
- [35] Tang Y, Durand S, Dalle S, Caramel J. EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):21-54.
- [36] Pedri D, Karras P, Landeloos E, Marine JC, Rambow F. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *FEBS J*. 2022;289(5):1352-1368.
- [37] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(2):97-110.
- [38] Sinnberg T, Levesque MP, Krochmann J i sur. Wnt-signaling enhances neural crest migration of melanoma cells and induces an invasive phenotype. *Mol Cancer*. 2018 17;17(1):59.

- [39] Tarhini AA, Gogas H, Kirkwood JM. IFN- α in the treatment of melanoma. *J Immunol.* 2012;189(8):3789-93.
- [40] Nardone B, Hammel JA, Raisch DW, Weaver LL, Schneider D, West DP. Melanoma associated with tumour necrosis factor- α inhibitors: a Research on Adverse Drug events And Reports (RADAR) project. *Br J Dermatol.* 2014;170(5):1170-2.
- [41] Zhu AS, Mustafa T, Connell JP, Grande-Allen KJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta suppress myofibroblast activation via nuclear factor kappa B signaling in 3D-cultured mitral valve interstitial cells. *Acta Biomater.* 2021;127:159-168.
- [42] Ballotti R, Cheli Y, Bertolotto C. The complex relationship between MITF and the immune system: a Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Mol Cancer.* 2020;19(1):170-173.
- [43] Pan F, Wang Q, Li S i sur. Prognostic value of key genes of the JAK-STAT signaling pathway in patients with cutaneous melanoma. *Oncol Lett.* 2020;19(3):1928-1946.
- [44] Kim N, Kim S, Lee MW i sur. MITF Promotes Cell Growth, Migration and Invasion in Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Activating the RhoA/YAP Signal Pathway. *Cancers (Basel).* 2021;13(12):2920.
- [45] Talty R, Bosenberg M. The role of ferroptosis in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2022;35(1):18-25.
- [46] Atkins MB. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(7):2353-2358.
- [47] Emmett MS, Dewing D, Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. *Am J Cancer Res.* 2011;1(7):852-68
- [48] Rajabi P, Neshat A, Mokhtari M, Rajabi MA, Eftekhari M, Tavakoli P. The role of VEGF in melanoma progression. *J Res Med Sci.* 2012 Jun;17(6):534-9.
- [49] Filimon A, Preda IA, Boloca AF, Negroiu G. Interleukin-8 in Melanoma Pathogenesis, Prognosis and Therapy-An Integrated View into Other Neoplasms and Chemokine Networks. *Cells.* 2021;11(1):120-124.
- [50] Jouve N, Bachelier R, Despoix Ni sur. CD146 mediates VEGF-induced melanoma cell extravasation through FAK activation. *Int J Cancer.* 2015;137(1):50-60
- [51] Halaban R, Ghosh S, Baird A. bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1987;23(1):47-52

- [52] Ardizzone A, Bova V, Casili G i sur. Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Cancer: Biological Activity, Targeted Therapies, and Prognostic Value. *Cells*. 2023;12(7):1002-1007.
- [53] Zamolo G, Grahovac M, Žauhar G, Vučinić D, Kovač L, Brajenić N, Grahovac B. Matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-2, and MMP-13 are overexpressed in primary nodular melanoma. *J Cutan Pathol*. 2020;47(2):139-145.
- [54] Docampo MJ, Cabrera J, Rabanal RM, Bassols A. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res*. 2011;72(8):1087-96.
- [55] Niland S, Riscanevo AX, Eble JA. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):146-151.
- [56] Niland S, Eble JA. Hold on or Cut? Integrin- and MMP-Mediated Cell-Matrix Interactions in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):238.
- [57] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):87-90.
- [58] Zhu J, Petit PF, Van den Eynde BJ. Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(5):835-847.
- [59] Horton BL, Gajewski TF. Back from the dead: TIL apoptosis in cancer immune evasion. *Br J Cancer*. 2018;118(3):309-311.
- [60] Upadhyay R, Boiarsky JA, Pantsulaia Gi sur. A Critical Role for Fas-Mediated Off-Target Tumor Killing in T-cell Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2021;11(3):599-613.
- [61] Avery-Kiejda KA, Zhang XD, Adams LJ, Scott RJ, Vojtesek B, Lane DP, Hersey P. Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. *Clin Cancer Res*. 2008;14(6):1659-68.
- [62] Vucic D, Kaiser WJ, Miller LK. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol*. 1998;18(6):3300-9.
- [63] Katunarić M, Jurišić D, Petković M, Grahovac M, Grahovac B, Zamolo G. EGFR and cyclin D1 in nodular melanoma: correlation with pathohistological parameters and overall survival. *Melanoma Res*. 2014;24(6):584-91.

- [64] Gruber F, Kastelan M, Brajac I i sur. Molecular and genetic mechanisms in melanoma. *Coll Antropol.* 2008;32 Suppl 2:147-52.
- [65] Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol.* 2001;54(3):229-35.
- [66] Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(7):1249-60.
- [67] Dilshat R, Fock V, Kenny C i sur. MITF reprograms the extracellular matrix and focal adhesion in melanoma. *Elife.* 2021;10:e63093.
- [68] Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2015;135(2):352-358.
- [69] Sánchez-Del-Campo L, Martí-Díaz R, Montenegro MF i sur. MITF induces escape from innate immunity in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):117.
- [70] Thomas NE, Busam KJ, From L i sur. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol.* 2013;31(33):4252-9.
- [71] Hussein MR, Elasers DA, Fadel SA, Omar AE. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):316-24.
- [72] Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(7):869-75.
- [73] Cho SY, Park SY, Bae YK i sur. Standardized Pathology Report for Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2021;24(1):1-21.
- [74] Betof Warner A, Corrie PG, Hamid O. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy in Melanoma: Facts to the Future. *Clin Cancer Res.* 2023;29(10):1835-1854.
- [75] Peltonen K, Kiviharju TM, Järvinen PM, Ra R, Laiho M. Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Res.* 2005;18(3):196-202.
- [76] Leko V, Rosenberg SA. Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell.* 2020;38(4):454-472.

- [77] He J, Xiong X, Yang H i sur. Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response. *Cell Res.* 2022;32(6):530-542.
- [78] Klarquist JS, Janssen EM. Melanoma-infiltrating dendritic cells: Limitations and opportunities of mouse models. *Oncoimmunology.* 2012;1(9):1584-1593.
- [79] Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 1997;73(3):309-16.
- [80] Lotze MT. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Ann Surg.* 1997;226(1):1-5
- [81] Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):412.
- [82] Malissen B, Grégoire C, Malissen M, Roncagalli R. Integrative biology of T cell activation. *Nat Immunol.* 2014;15(9):790-7.
- [83] Kaunitz GJ, Cottrell TR, Lilo M i sur. Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles. *Lab Invest.* 2017;97(9):1063-1071.
- [84] Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
- [85] Amarnath S, Mangus CW, Wang JC i sur. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2011;3(111):111-120.
- [86] Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH i sur. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* 2017;19(6):1189-1201.
- [87] Garofalo C, De Marco C, Cristiani CM. NK Cells in the Tumor Microenvironment as New Potential Players Mediating Chemotherapy Effects in Metastatic Melanoma. *Front Oncol.* 2021;11:754-57.
- [88] Bosisio FM, Wilmott JS, Volders N i sur. Plasma cells in primary melanoma. Prognostic significance and possible role of IgA. *Mod Pathol.* 2016;29(4):347-58.
- [89] Ladányi A, Kiss J, Mohos A i sur. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(12):1729-38.
- [90] Bardi GT, Smith MA, Hood JL. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine.* 2018;105:63-72.
- [91] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF i sur. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.
- [92] Zhang Q, Huo GW, Zhang HZ, Song Y. Efficacy of pembrolizumab for advanced/metastatic melanoma: a meta-analysis. *Open Med (Wars).* 2020;15(1):447-456.

- [93] Robert C, Schachter J, Long GV i sur. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2521-32.
- [94] Luke JJ, Rutkowski P, Queirolo P i sur. Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy in completely resected stage IIB or IIC melanoma (KEYNOTE-716): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet.* 2022;399(10336):1718-1729.
- [95] Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R i sur. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2017;377(14):1345-1356.
- [96] Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R i sur. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2022;40(2):127-137.
- [97] Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA i sur.. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117-22.
- [98] Ugurel S, Houben R, Schrama Di sur. Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res.* 2007;13(21):6344-50
- [99] Hodis E, Watson IR, Kryukov GV i sur. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150(2):251-63.
- [100] Thierauf J, Veit JA, Affolter A i sur. Identification and clinical relevance of PD-L1 expression in primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Melanoma Res.* 2015;25(6):503-9.
- [101] Lee ML, Tomsu K, Von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res.* 2000;10(1):81-92.
- [102] Massi D, Mihic-Probst D, Schadendorf D, Dummer R, Mandalà M. Dedifferentiated melanomas: Morpho-phenotypic profile, genetic reprogramming and clinical implications. *Cancer Treat Rev.* 2020;88:102060.
- [103] Višnjić A, Kovačević P, Veličkov A, Stojanović M, Mladenović S. Head and neck cutaneous melanoma: 5-year survival analysis in a Serbian university center. *World J Surg Oncol.* 2020;18(1):312-314.
- [104] Haist M, Stege H, Kuske M, Bauer J, Klumpp A, Grabbe S, Bros M. Combination of immune-checkpoint inhibitors and targeted therapies for melanoma therapy: The more, the better? *Cancer Metastasis Rev.* 2023;42(2):481-505.

- [105] Kakavand H, Wilmott JS, Menzies AM i sur. PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Define Different Subsets of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2015;21(14):3140-8.
- [106] Takeuchi H, Kitajima M, Kitagawa Y. Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Sci.* 2008;99(3):441-50.
- [107] Tarhini AA, Zahoor H, Yearley JH, i sur. Tumor associated PD-L1 expression pattern in microscopically tumor positive sentinel lymph nodes in patients with melanoma. *J Transl Med.* 2015;13:319.
- [108] Caraban BM, Matei E, Cozaru GC i sur. PD-L1, CD4+, and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) Expression Profiles in Melanoma Tumor Microenvironment Cells. *J Pers Med.* 2023;13(2):221.
- [109] Obeid JM, Erdag G, Smolkin ME i sur. PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome. *Oncoimmunology.* 2016;5(11):e1235107.
- [110] Ballotti R, Cheli Y, Bertolotto C. The complex relationship between MITF and the immune system: a Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Mol Cancer.* 2020;19(1):170.
- [111] de Moll EH, Fu Y, Qian Y i sur. Immune biomarkers are more accurate in prediction of survival in ulcerated than in non-ulcerated primary melanomas. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(9):1193-203.
- [112] Nicolau AA, Caraban BM, Gheorghe E i sur. Proteomic Implications of Tumoral Infiltrating Lymphocytes in Melanoma: PD-L1, CD4 and CD8—Short Review. *ARS Med. Tomitana* 2020;3:117–121.
- [113] Kümpers C, Jokic M, Haase O i sur. Immune Cell Infiltration of the Primary Tumor, Not PD-L1 Status, Is Associated With Improved Response to Checkpoint Inhibition in Metastatic Melanoma. *Front Med.* 2019;6:27.
- [114] Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram". *Science.* 2016;352(6286):658-60.
- [115] Jacquelot N, Yamazaki T, Roberti MPi sur. Sustained Type I interferon signaling as a mechanism of resistance to PD-1 blockade. *Cell Res.* 2019;29(10):846-861.
- [116] Wang S, Yi X, Wu Z i sur. CAMKK2 Defines Ferroptosis Sensitivity of Melanoma Cells by Regulating AMPK–NRF2 Pathway. *J Invest Dermatol.* 2022;142(1):189-200.

- [117] Piras F, Colombari R, Minerba L i sur. The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer*. 2005;104(6):1246-54.
- [118] Ladányi A. Emberi daganatokat infiltráló immunsejtek funkcionális és prognosztikai jelentősége [Function and prognostic significance of immune cells infiltrating human tumors]. *Magy Onkol*. 2004;48(1):49-56.
- [119] Cioplea M, Nichita L, Georgescu D i sur.. FOXP3+ in Melanoma with Regression: Between Tumoral Expression and Regulatory T Cell Upregulation. *J Immunol Res*. 2020;2020:e5416843.
- [120] Li Z, Dong P, Ren M i sur. PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3+(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J Cancer*. 2016;7(7):784-93.
- [121] Willsmore ZN, Harris RJ, Crescioli S i sur. B Cells in Patients With Melanoma: Implications for Treatment With Checkpoint Inhibitor Antibodies. *Front Immunol*. 2021;11:622442.
- [122] González-Ruiz L, González-Moles MÁ, González-Ruiz I, Ruiz-Ávila I, Ramos-García P. Prognostic and Clinicopathological Significance of CCND1/Cyclin D1 Upregulation in Melanomas: A Systematic Review and Comprehensive Meta-Analysis. *Cancers*. 2021;13(6):1314.
- [123] Turri-Zanoni M, Salzano G, Lambertoni A, Giovannardi M, Karligkiotis A, Battaglia P, Castelnuovo P. Prognostic value of pretreatment peripheral blood markers in paranasal sinus cancer: Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio. *Head Neck*. 2017;39(4):730-736.
- [124] Bastian L, Schroeder MP, Eckert Ci sur. PAX5 biallelic genomic alterations define a novel subgroup of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2019 Aug;33(8):1895-1909.
- [125] Gerami P, Li G, Pouryazdanparast P i sur. A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(6):808-17.
- [126] Vízkeleti L. Géneltérések biológiai szerepe és prognosztikai jelentősége humán malignus melanomákban [Biological role and prognostic significance of genetic alterations in human malignant melanomas]. *Magy Onkol*. 2015;59(3):268-72.
- [127] Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T i sur.. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-47.

- [128] Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M i sur. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2876-83.
- [129] Tufano M, D'Arrigo P, D'Agostino M i sur. PD-L1 Expression Fluctuates Concurrently with Cyclin D in Glioblastoma Cells. *Cells.* 2021;10(9):2366.
- [130] Xue S, Hu M, Li P i sur. Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma. *Oncotarget.* 2017;8(30):49702-49712.
- [131] Zhang J, Bu X, Wang H i sur. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature.* 2018;553(7686):91-95.
- [132] Assaf M, Rashed H, Ibrahim D i sur. Immunohistochemical Expression of Cyclin D1 and PDL1 With TILs Density in Prediction of the Response to Neoadjuvant Chemotherapy Treatment in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Prensa Med Argent.* 2020;106(2):1-7.
- [133] Najem A, Krayem M, Salès i sur. P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. *Eur J Cancer.* 2017;83:154-165.
- [134] Vučinić D, Grahovac M, Grahovac B, Vitezić BM, Kovač L, Belušić-Gobić M, Zamolo G. PD-L1 expression is regulated by microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in nodular melanoma. *Pathol Res Pract.* 2022;229:153725.
- [135] Kuszczak B, Wróbel T, Wicherska-Pawłowska K, Rybka J. The Role of BCL-2 and PD-1/PD-L1 Pathway in Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):1-17.
- [136] Yang J, Dong M, Shui Y i sur. A pooled analysis of the prognostic value of PD-L1 in melanoma: evidence from 1062 patients. *Cancer Cell Int.* 202;20:96.
- [137] Lo, Jennifer Alys. Regulation of the Inflamed Tumor Phenotype in Melanoma Immunotherapy Harvard. Harvard University, 2016.
- [138] Maleki Vareki S, Garrigós C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;116:116-124.
- [139] Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest.* 2017;97(6):649-656.
- [140] Hira-Miyazawa M, Nakamura H, Hirai M, Kobayashi Y, Kitahara H, Bou-Gharios G, Kawashiri S. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck

squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. *Int J Oncol.* 2018;52(2):379-388.

[141] Huntington JT, Shields JM, Der CJ, Wyatt CA, Benbow U, Slingluff CL Jr, Brinckerhoff CE. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33168-76.

[142] Aguirre A, Blázquez-Prieto J, Amado-Rodríguez L i sur. Matrix metalloproteinase-14 triggers an anti-inflammatory proteolytic cascade in endotoxemia. *J Mol Med.* 2017;95(5):487-497.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Clark klasifikacija melanoma – opis invazije slojeva kože

Tablica 2. Osmo izdanje sustava određivanja stadija Američkog odbora za rak (American Joint Committee on Cancer - AJCC)

Tablica 3. Kliničke i patološke karakteristike ispitivane skupine pacijenata primarnih melanoma.

Tablica 4: Karakteristike protutijela korištenih za imunohistokemijske analize

Tablica 5. Popis korištenih primera i njihove karakteristike

Tablica 6. Izražene p vrijednosti međusobne usporedbe IHC PD-L1 ekspresije primarnih melanoma u grupama prema BRISK kategorijama

Tablica 7. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije ciklina D1 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora

Tablica 8. Izražene p vrijednosti međusobne usporedbe IHC ciklin D1 ekspresije primarnih melanoma u grupama prema BRISK kategorijama

Tablica 9. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije Bcl-2 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora

Tablica 10. Izražene p vrijednosti međusobne usporedbe IHC Bcl-2 ekspresije primarnih melanoma u grupama prema BRISK kategorijama

Tablica 11. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije Bcl-2 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora

Tablica 12. Prikazi p vrijednosti dobivenih Kruskal-Wallis testom analiziranih grupa po anatomskoj lokalizaciji primarnog melanoma, ovisno o ekspresiji MITF proteina

Tablica 13. Kliničke i patološke karakteristike ispitivane skupine pacijenata primarnih melanoma liječenih imunoterapijom

Tablica 14. Prikaz analize korelacije, odnosno Pearsonovog koeficijenta korelacije i p vrijednosti međusobne povezanosti IHC ekspresije PD-L1 s ostalim ispitivanim proteinima tumorske stanice i limfocita oko tumora u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom

POPIS SLIKA

Slika 1. Shematski prikaz određivanja stadija melanoma

Slika 2. Prikaz prekomjerne aktivacije puta RAS–RAF–MEK–ERK u patogenezi melanoma. Preuzeto iz rada Scolyer i sur. [20]

Slika 3. Prikaz interakcije citotoksičnog limfocita i tumorske stanice kao i kaskada signalnih puteva reguliranih IFN- γ . Preuzeto iz rada Nardone i sur. [40]

Slika 4. Faktori angiogeneze u melanomu, ključni za sprječavanje hipoksije tumorskog tkiva kao i metastaziranje. Preuzeto iz rada Raiabi i sur. [48]

Slika 5. Enzimi matriks metaloproteinaza u funkciji remodeliranja tumorskog mikrookoliša. Preuzeto iz rada Docampo i sur. [54]

Slika 6. Prikaz utjecaja MITF proteina u imunomodulaciji stanice melanoma. Preuzeto iz rada Dilshat i sur. [67]

Slika 7. Modificirana BRISK klasifikacija shematski prikazuje distribuciju limfocita u TIL-u. . Modificirano prema Betof i sur. [74]

Slika 8. Box & whisker dijagram odnosa PD-1 ekspresije u grupama prema histološkom tipu ispitivanih primarnih melanoma; ($p=0.06$)

Slika 9. Box & whisker dijagram odnosa PD-L1 ekspresije u grupama prema histološkom tipu ispitivanih primarnih melanoma; ($p=0.01$)

Slika 10. Box & whisker dijagram odnosa PD-L1 u grupama melanoma prema podatku prisutnosti invazije tumorskih stanica u limfnom čvoru čuvaru; ($p=0.002$)

Slika 11. Box & whisker dijagram odnosa PD-L1 u grupama na osnovu Breslow kategorije 1 < 1.5mm te kategorija 2 – Breslow > 1.5mm; ($p=0.009$)

Slika 12. Imunohistokemijsko bojanje na PD-L1 stanica melanoma i difuzna ekspresija PD-L1 proteina na membrani melanomske stanice (povećanje x200)

Slika 13. Raspodjela melanoma na osnovu određene BRISK kategorije.

Slika 14. Imunohistokemijsko bojanje na CD3 limfocita TIL-a: A- infiltracija limfocita među stanicama melanoma u BRISK B kategoriji; B – periferno smješteni limfociti u > 4 sloja u BRISK A kategoriji (povećanje x200)

Slika 15. Dijagram raspršenja - postoji statistički značajna povezanost između ekspresije proteina PD-L1 i PD-1 ekspresije na limfocitima primarnih melanoma; ($r = 0.48$; $p < 0.05$)

Slika 16. Box & whisker dijagram usporedbe IHC PD-L1 ekspresije prema BRISK kategorijama; ($p < 0.001$)

Slika 17. Box & whisker dijagram usporedbe IHC PD-1 ekspresije prema BRISK kategorijama; ($p < 0.001$)

Slika 18. Box & whisker dijagram usporedbe IHC PD-L1 ekspresije u slučaju prisustva CD20⁺ limfocita u TIL-u; $p = 0.002$

Slika 19. Box & whisker dijagram usporedbe IHC CD4⁺ pozitiviteta u različitim histološkim tipovima melanoma; $p = 0.034$

Slika 20. Dijagram raspršenja – u usporedbi ispitivanih podvrsta T limfocita utvrđena je negativna korelacija između prisustva CD8⁺ i CD4⁺ limfocita ($r = - 0.894$, $p < 0.01$).

Slika 21. Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2, MITF i ciklin D1 stanica melanoma i difuzna ekspresija tih proteina u citoplazmi i jezgri (ciklin D1) i melanomske stanice

Slika 22. Dijagram raspršenja – povezanost između ekspresije PD-1 molekule limfocita i ekspresije ciklina D1 tumorske stanice ($r = 0.519$, $p < 0.001$).

Slika 23. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije PD-L1 molekule i ciklina D1 ($r = 0.787$, $p < 0.001$)

Slika 24. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije ciklina D1 u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar; $p = 0.003$

Slika 25. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije ciklin D1 proteina u slučaju prisutnosti B limfocita u TIL-u; $p = 0.015$

Slika 26. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom proteina PD-1

Slika 27. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom proteina PD-L1

Slika 28. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije Bcl-2 u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar; $p = 0.005$

Slika 29. Box & whisker dijagram je statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina kod nodularnog melanoma u odnosu na druge ispitivane histološke podtipove; $p = 0.034$

Slika 30. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina MITF s ekspresijom proteina PD-1; $p < 0.001$

Slika 31. Dijagram raspršenja – statistički značajna povezanost između ekspresije proteina Bcl-2 s ekspresijom PD-L1; $p < 0.001$

Slika 32. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike ekspresije MITF proteina u tumorskim stanicama melanoma sa širenjem u limfni čvor čuvar; $p=0.022$

Slika 33. Box & whisker dijagram statistički značajne razlike MITF proteina u uznapredovanim kliničkim stadijima melanoma

Slika 34. Dijagram raspršenja – povezanost ekspresije MMP-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita; $p = 0.006$

Slika 35. Box & whisker dijagram statistički značajno veće ekspresije PD-1 u grupi A klasifikacije TIL-a, $p=0.018$

Slika 36. Dijagram raspršenja – povezanost ekspresije PD-1 i prisutnosti foxp3+ pozitivnih Treg limfocita; $p = 0.001$

Slika 37. Box & whisker dijagram statistički značajno veće ekspresije PD-L1 u grupi A klasifikacije TIL-a, $p=0.012$

Slika 38. Box & whisker dijagram ekspresije PD-L1 proteina u grupi pacijenata liječenih imunoterapijom ovisno o tomu postoji li MITF amplifikacija ili ne postoji (Mann-Whitney U test, $p=0,008$)

Slika 39. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama na osnovu PD-L1 ekspresije (grupa 1 – ekspresija od 1 do 25% te grupa 2 melanomi s PD-L1 > 25%)

Slika 40. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama na osnovu PD-1 ekspresije (grupa 1 – ekspresija < 1%, grupa 2 ekspresija od 1 do 25% te grupa 3 melanomi s PD-1 > 25%)

Slika 41. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama po mjestu infiltrata limfocita.

Slika 42. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje kako nema statistički značajne razlike u ispitivanim grupama po BRISK klasifikaciji

Slika 43. Dijagram raspršenja – povezanost ekspresije PD-L1 i ekspresije MITF proteina u uzorcima metastaza melanoma; $p = 0.004$

POPIS POKRATA

AJCC - Američki odbor za rak (eng. American Joint Committee on Cancer)

APC – antigen prezentirajuće stanice (eng. antigen presenting cells)

Bcl- 2 - član porodice anti-apoptotičkih proteina (eng. B-cell lymphoma 2)

bFGF - faktor rasta fibroblasta

BRAF - Serin/treonin protein kinaza; (eng. v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

CDK2 - ciklin ovisna kinaza 2

CDK4 - ciklin ovisna kinaza 4

CDKN2A – gen inhibitora ciklin ovisne kinaze 2A(eng. cyclin dependent kinase inhibitor 2a)

CTLA-4 - citotoksični T limfocitni antigen-4

DC - dendritičke stanice

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)

EMT - epitelno-mezenhimalna tranzicija (prijelaz)

EU - Europska unija

FAMMM - obiteljski sindrom atipičnih madež-melanoma (eng. familial atypical multiple mole melanoma)

IFN- γ - interferon gama

IHC - imunohistokemija

KIT – receptor tirozin kinaze (eng. receptor tyrosine kinase)

MAPK/ERK signalni put - Signalni put citoplazmatskih kinaza (Ras-Raf-MEK-ERK) koje prenose signal od receptora na površini stanične membrane do jezgre, odnosno DNA)

MC1R - hormon koji veže receptor melanokortina 1

MITF - Transkripcijski faktor udružen s mikroftalmijom (eng. Microphthalmia associatedtranscription factor)

MMP - matriks metaloproteinaza

MSH - hormon koji stimulira melanocyte

NK - prirodno ubilačke stanice (eng. natural killer cell)

PCRs - populacijski registri raka (eng. population-based cancer registries)

PD-1 - Protein programirane smrti stanice 1 (eng. Programmed Cell Death Protein 1)

PD-L1 - ligand proteina programirane smrti stanice 1 (eng. Programmed Cell Death Protein 1 Ligand)

PI3K-Akt – eng. phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B

PIGF - faktor rasta placente

TCR - T-stanični receptor

TERT – gen reverzne transkriptaze telomeraza (eng. telomerase reverse transcriptase)

TIL - limfociti koji infiltriraju tumor (eng. tumor-infiltrating lymphocytes)

TMA - kivni mikroarej (eng. Tissue microarray)

TNF α - čimbenik nekroze tumora

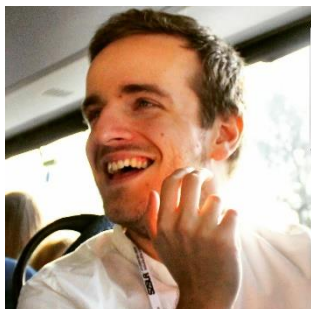
Treg – regulacijske T-stanice (eng. regulatory T cells)

UV - ultravioletno, ultraljubičasto

VEGF - faktor rasta krvih žila (eng. Vascular endothel growth factor A)

ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE



Damir Vučinić

📍 Ive Šodića 30, Kostrena, 51221, Republika Hrvatska

☎ 051288845 📠 0959095807

✉ damir.vucinic@gmail.com

Spol Muški | Datum rođenja 31/101992 | Državljanstvo Hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

Demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci (2013. do 2018.)

Demonstrator na Zavodu za opću patologiju i patološku anatomiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci (2015. do 2018.)

Liječnik na Zavodu za hitnu medicinu Primorsko - Goranske županije (svibanj 2019. do listopad 2019.)

Specijalizant onkologije i radioterapije na Klinici za radioterapiju i onkologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka (studenj 2019. do danas)

Naslovni asistent na Medicinskom fakultetu u Rijeci, Katedra za onkologiju i radioterapiju (2022. do danas.)

OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

farmaceutski tehničar (2007. – 2011.)

Medicinska škola u Rijeci

studij medicine (2012.- 2018.)

Medicinski fakultet u Rijeci, Sveučilište u Rijeci

doktor medicine (2018.)

Medicinski fakultet u Rijeci, Sveučilište u Rijeci

poslijediplomski (doktorski) studij Biomedicina (2018. do danas)

Medicinski fakultet u Rijeci, Sveučilište u Rijeci

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski jezik

Ostali jezici

engleski jezik

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija /	Govorna produkcija	
engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C1

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik

Komunikacijske vještine

▪ dobre komunikacijske vještine stečene tijekom studija i organizacije studentskih projekata

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

▪ sposobnost organiziranja i planiranja; timski rad
▪ član organizacijskog odbora „The international biomedical student congress of Rijeka- "BRIK 2017"“

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik

Stupnjevi: [Temeljni korisnik](#) - [Samostalni korisnik](#) - [Iskusni korisnik](#)
[Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu](#)

Vozačka dozvola kategorija B

Stipendije korisnik stipendije Općine Kostrena (2008. do 2018.)

Članstva član European Society of Radiotherapy and Oncology (ESTRO)

Projekti Član Studentske sekcije i Uredništva znanstveno stručnog časopisa Medicina Fluminensis (2017. – 2018. godine)
 Doktorand na projektu „Regulacija molekula PD-1 / PD-L1 signalnog puta u malignom melanomu“ voditeljice: prof.prim.dr.sc. Gordane Zamolo, dr.med. financiranog od strane Sveučilišta u Rijeci (2019.)
 Suradnik na projektu „ Molekularni markeri u prekanceroznim lezijama i invazivnim karcinomima larinksa“ voditeljice: prof.dr.sc. Tamare Braut, dr.med. financiranog od strane Sveučilišta u Rijeci (2019.)
 Klinička studija: - 20170734 - Protocol Title: POWER: Real World Data of 1st line panitumumab treatment in combination with chemotherapy in non resectable wild type (WT) RAS metastatic colorectal cancer (mCRC) patients in Austria, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Hungary, Poland, Slovenia, Romania, Russia an Observational Ambidirectional Study

Znanstveni radovi Kongresni sažeci:

1. Vučinić. Damir; Belac-Lovasić, Ingrid; Bolf, Lana Prikaz slučaja hitnog stanja u onkologiji – sindrom gornje šuplje vene // 2. Kongres hitne medicine Rijeka 2016. (sažetak, ostalo)
2. Vučinić. Damir; Vuksan, Ivan; Marijić, Blažen; Kujundžić, Milodar; Braut, Tamara; Žauhar, Gordana; Zamolo, Gordana Mean platelet volume as prognostic and diagnostic biomarker in laryngeal cancer // Fourth Global Student's Conference of Biomedical Sciences, Beograd 2017. (sažetak, ostalo)
3. Vučinić, Damir; Skočilić, Iva; Belac-Lovasić, Ingrid; Pavlović Ružić, Ira; Dekanić, Andrea; Zamolo, Gordana; Krstulja, Mira; Lovasić, Franjo Unusual locations of renal clear cell carcinoma metastases – report of two cases // International Biomedical Student Congress Rijeka, 2017 (sažetak, ostalo)
4. Skočilić, Iva; Vučinić, Damir; Belac-Lovasić, Ingrid; Pavlović Ružić, Ira; Lovasić, Franjo; Dekanić, Andrea Radiation pneumonitis – a rare side effect of radiation therapy in breast cancer treatment. Case report // International Biomedical Student Congress Rijeka, 2017 (sažetak, ostalo)
5. Vučinić, Damir; Skočilić Iva; Belac-Lovasić, Ingrid; Bokovica, Ana-Marija; Mavrinac, Martina; Lovasić, Franjo; Zamolo, Gordana Left ventricular ejection fractions in HER2-positive breast cancer patients undergoing trastuzumab treatment // ZIMS - Zagreb International Medical Summit 2017 (sažetak, ostalo)
6. Blaženka Grahovac, Maja Grahovac, Gordana Žauhar, Damir Vučinić, Gordana Zamolo. Matrix Metalloproteinases MMP-1, MMP-2 and MMP-13 are Overexpressed in Primary Nodular Melanoma. // The World Congress on Advanced Treatments and Technologies in Skin Cancer, April 2019 in Vienna, Austria.
7. Damir Vučinić, Dag Zahirović, Ingrid Belac-Lovasić, Leo Kovač, Margita Belušić-Gobić, Blaženka Grahovac, Mirna Šitum, Gordana Zamolo. REGULATION OF PD-1/PD-L1 PATHWAY IN MALIGNANT MELANOMA – A PILOT STUDY. Hrvatski onkološki kongres

2020. (poster prezentacija)
8. Damir Vučinić, Leo Kovač, Margita Belušić-Gobić, Maja Grahovac, Blaženka Grahovac, Dag Zahirović, Ingrid Belac-Lovasić, Gordana Zamolo. PD-L1 expression is regulated by microphthalmia transcription factor (mitf) in nodular melanoma. *Lib Oncol.* 2021;49(Suppl 1):83–140. Hrvatski onkološki kongres 2021. (poster prezentacija)
 9. Damir Vučinić, Renata Dobrila-Dintinjana. Analiza Bioelektrične impedance u prosudbi nutritivnog statusa onkoloških bolesnika. 13. kongres Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ; Šibenik 2021. (sažetak, ostalo)
 10. Damir Vučinić. Imunonutricija – ključan saveznik imunoterapije? 14. kongres Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ; Rovinj 2022. (sažetak, ostalo)
 11. Iva Skočilić, Đeni Smilović Radojčić, Damir Vučinić, Ivona Jerković, Nela Maričić, Milan Radojčić. Correlation between breast size and dosimetric parameters for radiotherapy of breast cancer. II. Serbian Radiation Oncology Congress, Vrdnik 2022. (sažetak, ostalo)
 12. Damir Vučinić, Đeni Smilović Radojčić, Iva Skočilić, Marina Špondreht, Maja Mlakić, Maja Marček, Milan Radojčić. The decreased mean platelet volume in patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. II. Serbian Radiation Oncology Congress, Vrdnik 2022. (sažetak, ostalo)
 13. Jasna Marušić, Ivona Jerković, Damir Vučinić, Iva Skočilić, Renata Dobrila-Dintinjana, Marin Golčić, Arnela Redžović, Nevena Polić, Anita Beg, Ivana Mikolašević. Ambulatory chemotherapy - single center experience with elastomeric pumps. *Libri Oncol. Suppl.* 1 Vol. 51 (2023) (sažetak, ostalo)
 14. Damir Vučinić, Leo Kovač, Iva Skočilić, Ivona Jerković, Jasna Marušić, Ivana Mikolašević, Gordana Zamolo. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in nodular melanoma. *Libri Oncol. Suppl.* 1 Vol. 51 (2023) (sažetak, ostalo)
 15. Iva Skočilić, Damir Vučinić, Marin Golčić, Laura Radoš, Ivona Jerković, Doris Kolovrat, Ana Glavan Čosić, Petra Cotić, Eleonora Cini Tešar, Ani Mihaljević Ferrari, Jasna Marušić, Ivana Mikolašević. Clinical outcomes and toxic effects of immune checkpoint inhibitors among older patients with cancer - a single-centre experience. *Libri Oncol. Suppl.* 1 Vol. 51 (2023) (sažetak, ostalo)
 16. Jasna Marušić, Iva Skočilić, Damir Vučinić, Ivona Jerković, Doris Kolovrat, Marin Golčić, Renata Dobrila-Dintinjana, Ivana Mikolašević. Organizing and implementing a multidisciplinary approach in Daily Oncology Hospital, Clinical Center Rijeka. *Libri Oncol. Suppl.* 1 Vol. 51 (2023) (sažetak, ostalo)
 17. Doris Kolovrat, Iva Skočilić, Ivona Jerković, Damir Vučinić, Jasna Marušić, Sanja Ropac, Lana Bolf Perić, Petra Cotić, Ana Glavan Čosić, Renata Dobrila-Dintinjana, Ivana Mikolašević. The diagnostic accuracy of PIVKA-II and AFP in differentiating HCC and non-malignant high-risk groups in patients with NAFLD related chronic liver disease. *Libri Oncol. Suppl.* 1 Vol. 51 (2023) (sažetak, ostalo)

Objavljeni „in-extenso“ radovi:

1. Bečančić A, Vučinić D, Pereza N, Ostojčić O. Student section of Medicina Fluminensis—a guarantee for a bright future. *Medicina Fluminensis* 2017;54:4-5 (uvodnik)
2. Vučinić D, Dekanić A, Zamolo G, Belušić-Gobić M, Belac-Lovasić I, Batinac T. Kaposi's sarcoma in an HIV-negative chronic lymphocytic leukemia patient without immunosuppressive therapy: A case report. *SAGE Open medical case reports*. 2018;9: doi: 10.1177/2050313X18799239
3. Belac-Lovasić I, Lovasić F, Bukovica AM, Skočilić I, Vučinić D. Multidisciplinarni tim u svakodnevnoj kliničkoj praksi zbrinjavanja bolesnica s rakom dojke. *HAZU.* 2018;28:77-86.
4. Damir Vučinić, Ivan Vuksan, Tamara Braut, Blažen Marijić, Gordana Žauhar, Andrea Dekanić, Mira Krstulja, Gordana Zamolo. Srednji volumen trombocita kod karcinoma grkljana—uloga u određivanju stadija karcinoma. *Medicina Fluminensis* 2018;4:400-405
5. Vučinić D, Zahirović D, Manestar D, Belac-Lovasić I, Braut T, Kovač L, Jonjić N, Zamolo G. (2019). Recurrent amelanotic melanoma of nasal cavity: Biological variability and unpredictable behavior of mucosal melanoma. A case report. *Clinics and Practice*, 9(2). <https://doi.org/10.4081/cp.2019.1157>
6. Zubović A, Belušić-Gobić M, Harmicar D, Marušić J, Vučinić D, Zamolo G. Pancreatic Carcinoma Metastatic to the Gingiva. *Clinics and Practice*. 2021; 11(1):58- 64. <https://doi.org/10.3390/clinpract11010010>
7. Braut, Tamara, Mira Krstulja, Blažen Marijić, Diana Maržić, Milodar Kujundžić, Gordana Zamolo, Damir Vučinić, Eduard Oštarijaš. "Tip of the iceberg: Immunohistochemical markers reveal malignant transformation underneath a vocal polyp surface." *Medicina Fluminensis* 57, br. 2 (2021): 171-176. https://doi.org/10.21860/medflum2021_371640
8. Vučinić D, Marušić J, Grahovac B, Šitum M, Zamolo G. Primjena imunoterapije kod onkoloških bolesnika s COVID-19 – opasnost ili obrana. *Medicina Fluminensis [Internet]*. 2022; 58(1):55-60. https://doi.org/10.21860/medflum2022_271157

Objavljeni radovi u CC bazi/ SCOPUS Q1/Q2:

1. Tamara Braut, Mira Krstulja, Blažen Marijić, Diana Maržić, Milodar Kujundžić, Gordana Brumini, Damir Vučinić, Eduard Oštarijaš. Immunohistochemical analysis of vocal cord polyps applying markers of squamous cell carcinogenesis. *Pathology-Research and Practice* 2019;215:144-150
2. Zamolo G, Grahovac M, Žauhar G, Vučinić D, Kovač L, Brajenić N, Grahovac B. Matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-2, and MMP-13 are overexpressed in primary nodular melanoma. *J Cutan Pathol.* 2019;1–7. <https://doi.org/10.1111/cup.13603>
3. Vučinić D, Grahovac M, Grahovac B, Vitezić BM, Kovač L, Belušić-Gobić M, Zamolo G. PD-L1 expression is regulated by microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in nodular melanoma. *Pathol Res Pract.* 2022 Jan;229:153725. doi: 10.1016/j.prp.2021.153725.
4. Tesar EC, Mikolasevic I, Skocilic I, Redjovic A, Vucinic D, Marusic J, Djordjevic G. Prostate Cancer Scoring Index for Risk of Progression of Radioresistant Disease. *J. Pers. Med.* 2023, 13, 870. <https://doi.org/10.3390/jpm13050870>