

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

ZDENKA ŠITUM ČEPRNJA

IZRAŽAJ LOXL3, NES, SNAI1 I OCT4 U RAZVOJU MELANOMA

Doktorski rad

Split, 2026.

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Voditelj rada: prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Katarini Vukojević, na potpori, strpljivom vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ove disertacije. Njezini savjeti, stručnost i dostupnost u svakom koraku istraživanja bili su mi neprocjenjiva podrška i uvelike su oblikovali ovaj rad.

Zahvaljujem i svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, posebice Neli, Marinu i Aniti na pomoći i podršci koja je ovaj proces učinila lakšim i ispunjenijim.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji, na neizmjernoj podršci, razumijevanju i strpljenju koje su mi pružali sve ove godine.

Bez njihove ljubavi i vjere u mene ovaj put ne bi bio moguć.

SADRŽAJ

1. UVOD	9
1.1. Melanocitne promjene kože	10
1.1.1. Melanom.....	11
1.1.2. Epidemiologija melanoma.....	11
1.1.3. Razvoj melanoma i rizični čimbenici za nastanak melanoma.....	14
1.1.4. Klinička slika melanoma	20
1.1.5. Dijagnoza melanoma.....	26
1.1.6. Stadij bolesti i prognoza	29
1.1.7. Liječenje melanoma	32
1.2. Uloga LOXL3, NES, SNAI1 i OCT4 u tumorigenezi	34
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	37
2.1. Ciljevi istraživanja.....	38
2.2. Hipoteze istraživanja	38
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	39
3.1. Ispitanici	40
3.2. Metode.....	40
3.2.1. Histološka analiza	40
3.2.2. Imunofluorescencijska analiza	41
3.2.3. Lančana reakcija polimerazom i analiza	43
3.3. Statističke analize	44
4. REZULTATI.....	46
4.1. Histološka analiza (H&E bojenje) displastičnog madeža, melanoma <i>in situ</i> te BRAF+ i BRAF– metastatskog melanoma.....	47
4.2. Izražaj LOXL3	48
4.3. Izražaj NES	51
4.4. Izražaj SNAI1.....	53
4.5. Izražaj OCT4.....	54
5. RASPRAVA.....	58
6. ZAKLJUČAK	66
7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	68
8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	71
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU.....	73

10. LAIČKI SAŽETAK NA ENGLISKOM JEZIKU	76
11. LITERATURA.....	78
12. ŽIVOTOPIS	92

POPIS OZNAKA I KRATICA

AJCC – engl. American Joint Committee on Cancer, Američki zajednički odbor za rak

AKT – protein-kinaza B

ALM – akrolentiginozni melanom (engl. acral lentiginous melanoma)

ANOVA – analiza varijance (engl. analysis of variance)

ASR – dobno-standardizirana stopa (engl. age-standardized rate)

BAP1 – engl. BRCA1-associated protein 1

BRAF – engl. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

CDH1 – engl. cadherin 1 (E-kadherin)

CDKN2A – engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

cDNK – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

CGH – komparativna genomska hibridizacija (engl. comparative genomic hybridization)

CI – interval pouzdanosti (engl. confidence interval)

CTLA-4 – engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DM – dezmoplastični melanom (engl. desmoplastic melanoma)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ECM – izvanstanični matriks (engl. extracellular matrix)

EFS – preživljenje bez događaja (engl. event-free survival)

EIF1AX – engl. eukaryotic translation initiation factor 1A X-linked

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. epithelial-mesenchymal transition)

ERK – izvanstanično signalno regulirana kinaza (engl. extracellular signal-regulated kinase)

ESMO – engl. European Society for Medical Oncology

FISH – fluorescencijska in situ hibridizacija (engl. fluorescence in situ hybridization)

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GLOBOCAN – baza podataka o incidenciji i smrtnosti od raka (Međunarodna agencija za istraživanje raka)

GNA11 – engl. G protein subunit alpha 11

GNAQ – engl. G protein subunit alpha q

H&E – hematoksilin i eozin

HIF – engl. hypoxia-inducible factor, čimbenik izazvan hipoksijom

HRAS – engl. HRas proto-oncogene, GTPase

IARC – engl. International Agency for Research on Cancer, Međunarodna agencija za istraživanje raka

KIT – engl. KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

KLF4 – engl. Kruppel-like factor 4

LDH – laktat-dehidrogenaza

LMM – lentigo maligna melanom

LOX – lizil-oksidaža (engl. lysyl oxidase)

LOXL1 – engl. lysyl oxidase-like 1

LOXL2 – engl. lysyl oxidase-like 2

LOXL3 – engl. lysyl oxidase-like 3

LOXL4 – engl. lysyl oxidase-like 4

MAPK – mitogenom aktivirana protein-kinaza (engl. mitogen-activated protein kinase)

MEK – engl. mitogen-activated protein kinase kinase

MIS – melanom in situ (engl. melanoma in situ)

mRNK – glasnička ribonukleinska kiselina

MSS – preživljenje specifično za melanom (engl. melanoma-specific survival)

NANOG – engl. Nanog homeobox

NES – nestin

NF1 – engl. neurofibromin 1

NM – nodularni melanom

NRAS – engl. neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

NTC – negativna kontrola bez kalupa (engl. no template control)

OCT4 – engl. octamer-binding transcription factor 4 (POU5F1)

PBS – fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. phosphate-buffered saline)

PD-1 – engl. programmed cell death protein 1

PDM – primarni dermalni melanom (engl. primary dermal melanoma)

PI3K – fosfoinozimid-3-kinaza (engl. phosphoinositide 3-kinase)

PRRX1 – engl. paired related homeobox 1

PTEN – engl. phosphatase and tensin homolog

RCM – reflektancijska konfokalna mikroskopija (engl. reflectance confocal microscopy)

RNK – ribonukleinska kiselina

RRX – Rhodamine Red-X (fluorescentna boja)

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju (engl. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)

SD – standardna devijacija (engl. standard deviation)

SEER – engl. Surveillance, Epidemiology, and End Results

SF3B1 – engl. splicing factor 3b subunit 1

SLNB – biopsija limfnoga čvora čuvara (engl. sentinel lymph node biopsy)

SNAI1 – engl. snail family transcriptional repressor 1

SPF – zaštitni faktor od sunca (engl. sun protection factor)

SSM – površinsko šireći melanom (engl. superficial spreading melanoma)

STAT3 – engl. signal transducer and activator of transcription 3

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TERT – engl. telomerase reverse transcriptase

TMA – tkivni mikroniz (engl. tissue microarray)

TNM – klasifikacija proširenosti tumora (engl. tumor, node, metastasis)

TP53 – engl. tumor protein p53

UNG – uracil-N-glikozilaza (engl. uracil-N-glycosylase)

UPF – faktor zaštite od ultraljubičastog zračenja (engl. ultraviolet protection factor)

UV – ultraljubičasto (zračenje)

WNT – engl. Wingless-related integration site

1. UVOD

1.1. Melanocitne promjene kože

Melanocitne promjene kože raznolika su skupina tvorbi podrijetlom iz melanocita, pigmentnih stanica koje su smještene pretežno u epidermisu i odgovorne za sintezu melanina. Raspon ovih promjena je širok i proteže se od klinički i histološki dobroćudnih melanocitnih madeža, preko genetski intermedijarnih lezija graničnoga biološkog ponašanja, sve do melanoma, jednog od najzloćudnijih tumora u ljudi (1). Iako se naizgled radi o morfološki sličnim promjenama, one se znatno razlikuju po svojoj kliničkoj prezentaciji, histopatološkim karakteristikama, molekularnim obilježjima i biološkom potencijalu (1, 2). Tradicionalna klasifikacija melanocitnih tumora temeljila se prvenstveno na njihovim histološkim obilježjima, uz zasebne kriterije za dobroćudnost i zloćudnost. Međutim, suvremeni molekularni uvidi otkrili su da različite vrste melanocitnih promjena nose specifične mutacijske profile, koji ne samo da pomažu u preciznijem dijagnostičkom razvrstavanju, već i upućuju na različite mehanizme nastanka i progresije (2, 3). Dok je za razvoj melanocitnoga madeža (nevusa) obično dovoljna jedna inicijalna mutacija, razvoj melanoma uključuje složene kombinacije genetskih promjena koje dovode do poremećaja u regulaciji više signalnih putova, uključujući aktivaciju protoonkogeni i gubitak funkcije tumorsupresorskih gena (3). U tome je kontekstu posebnu pozornost privukla skupina prijelaznih promjena koje se po svojim genetskim i biološkim karakteristikama nalaze između dobroćudnih madeža i melanoma. Te promjene, uz inicijalnu mutaciju koja aktivira signalni put mitogenom aktivirane protein-kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), najčešće nose i dodatne pokretačke (engl. *driver*) mutacije, zbog čega imaju povišen rizik od zloćudne preobrazbe (4). Za te je, genetski intermedijarne promjene, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) uvela naziv *melanocitom*, ograničivši pojam *nevus* na promjene s isključivo inicijalnom mutacijom, bez dodatnih patogenih zbivanja. Melanocitom bi se dijagnostički trebao označiti dodatnim klasifikatorom koji upućuje na njegovu molekularnu podskupinu, primjerice *WNT-aktivirani duboko penetrirajući melanocitom* (engl. *Wingless-related integration site*, WNT). Ipak, unatoč sve preciznijem genetskom razumijevanju, kliničke smjernice za zbrinjavanje melanocitoma, uključujući preporuke za širinu ekscizije ili potrebu za reekscizijom, još uvijek nisu jasno definirane (2, 4). Dakle, iako melanocitne promjene dijele zajedničko podrijetlo iz melanocita, razlikuju se prema stupnju genetske složenosti i kliničkom ponašanju: od dobroćudnih nevusa, preko melanocitoma s potencijalom za progresiju, do melanoma izraženoga malignog potencijala. Upravo to kontinuirano, spektralno poimanje razvoja melanocitnih promjena

omogućuje dublje razumijevanje njihove biologije te otvara mogućnosti za precizniju dijagnostiku i individualizirano liječenje (1, 4).

U nastavku će biti detaljnije obrađeni melanocitni madeži, s posebnim naglaskom na displastične nevuse, koji svojim morfološkim i molekularnim obilježjima predstavljaju važnu kariku u razumijevanju prijelaza iz dobroćudne u zloćudnu promjenu.

1.1.1. Melanom

Melanom je zloćudni tumor koji nastaje iz melanocita, stanica podrijetlom iz neuralnoga grebena ili prekursora Schwannovih stanica. Najčešće se pojavljuje na koži, ali može zahvatiti i sluznice, primjerice sluznicu usne šupljine i anogenitalnu sluznicu, zatim cilijarno tijelo, šarenicu i konjunktivu oka te meningealne ovojnice. Zbog velike sklonosti ranom hematogenom i limfogenom metastaziranju pripada među najagresivnije tumore kože i sluznica te je odgovoran za 75 % smrti uzrokovanih tumorima kože (1, 5).

1.1.2. Epidemiologija melanoma

Posljednja četiri desetljeća bilježi se porast incidencije melanoma u svijetu, posebice među bijelom populacijom s velikom izloženošću suncu (6). Godišnje se bilježi porast incidencije melanoma od 3 do 7 %, ovisno o promatranoj populaciji, te prema tome melanom kože spada među tumore s najbržim rastom incidencije u bijeloj populaciji (1). Prema projekcijama broja novooboljelih i umrlih, ako se zadrže stope zabilježene 2020. godine, očekuje se da će broj novooboljelih od melanoma do 2040. godine porasti za više od 50 %, dosegnuvši približno 510 000 novih slučajeva godišnje u svijetu. Istodobno se predviđa porast broja smrtnih ishoda uzrokovanih melanomom za oko 68 %, s 57 000 u 2020. godini na procijenjenih 96 000 u 2040. godini (7).

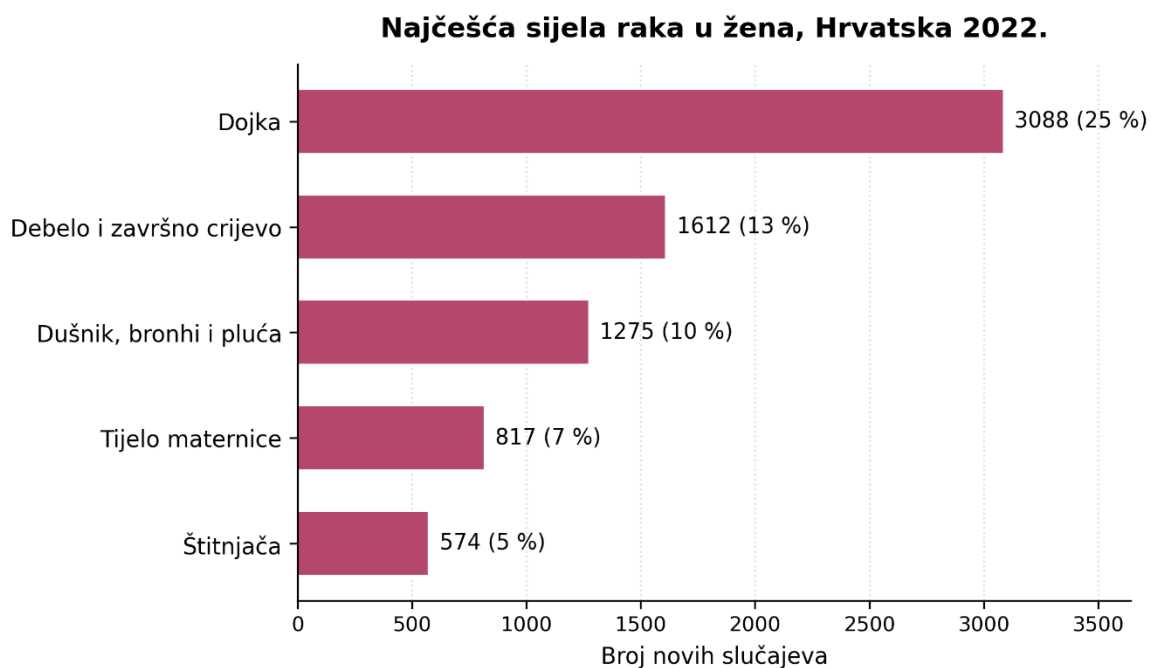
Posljednji podaci Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) iz baze GLOBOCAN za 2022. godinu pokazuju kako je incidencija melanoma kože u svijetu iznosila 331 722 novooboljela, što melanom svrstava na 17. mjesto među svim vrstama raka po učestalosti. Također, zabilježeno je 58 667 smrtnih slučajeva povezanih s melanomom, čime se našao na 22. mjestu po smrtnosti među svim vrstama raka. Globalno su zabilježene i značajne razlike u incidenciji melanoma u različitim dijelovima svijeta, pa je tako najveća incidencija utvrđena u Australiji i Novom Zelandu, gdje su dobno-standardizirane stope incidencije (engl. *Age-Standardized Rate*, ASR) iznosile 49,5 na 100 000 stanovnika. Dobno-standardizirane stope incidencije za Sjevernu Europu iznosile

su 35,6, za Sjevernu Ameriku 28,4 te za Zapadnu Europu 24,5 na 100 000 stanovnika. Nasuprot tome, najniže stope incidencije zabilježene su u Africi i dijelovima Azije, s ASR ispod 1 na 100 000 stanovnika (8).

Prema posljednjim dostupnim podacima Registra za rak Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo, u Republici Hrvatskoj su 2022. godine zabilježena 994 novooboljela od melanoma (536 muškaraca i 458 žena), a stopa incidencije iste je godine bila 25,78 na 100 000 stanovnika, odnosno 28,81/100 000 za muškarce i 22,96/100 000 za žene. Melanom je prema učestalosti pojavljivanja na 10. mjestu te predstavlja 3,8 % svih zloćudnih tumora u Republici Hrvatskoj (9). Najčešća sijela raka u muškaraca i žena u 2022. godini prikazana su na Slici 1 i Slici 2.



Slika 1. Najčešća sijela raka u muškaraca u 2022. godini. (Preuzeto i prilagođeno prema Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2022. godini [Internet://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2022-godini/]. Zagreb: HZJZ; 2024)



Slika 2. Najčešća sijela raka u žena u 2022. godini. (Preuzeto i prilagođeno prema Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2022. godini [Internet: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2022-godini/>]. Zagreb: HZJZ; 2024)

Melanom kože najčešće se dijagnosticira u osoba starijih od 55 godina, s vrhuncem incidencije između 65. i 74. godine života. Prema podacima programa nadzora, epidemiologije i konačnih ishoda (engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*, SEER) medijan dobi pri postavljanju dijagnoze iznosi 66 godina (10). Iako je rijedak u djece i adolescenata, spada u najčešće vrste raka u mlađih odraslih osoba, u dobnoj skupini od 15 do 29 godina. U toj je dobnoj skupini melanom treći najčešće dijagnosticirani rak kod muškaraca i žena (11). Zanimljivo, dok incidencija melanoma u starijoj populaciji kontinuirano raste, u mlađih odraslih osoba posljednjih se godina bilježi stabilizacija, pa i blagi pad incidencije, što se dovodi u vezu s uspješnijim mjerama primarne prevencije i promjenom navika u izlaganju UV zračenju (12). Ovaj zloćudni tumor se može razviti bilo gdje na koži tijela, ali je zamijećena razlika u učestalosti pojedinih lokalizacija ovisno o spolu. U muškaraca najčešće nastaje na trupu, leđima i ramenima, dok se kod žena najčešće razvija na udovima, osobito na nogama. Ova se razlika u anatomske raspodjeli tumači stilom života, kulturom, načinom odijevanja i običajima te akutnim intermitentnim izlaganjem ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV) zračenju (13).

U ranoj fazi melanom je izlječiva bolest, s petogodišnjim preživljenjem od 99 % (1, 14). Međutim, kod bolesnika kojima je melanom dijagnosticiran u uznapređovalom stadiju mogućnosti liječenja i dalje su ograničene, pa preživljenje ostaje nisko. Upravo zbog toga melanom ostaje jedan od najagresivnijih tumora, a njegov visok potencijal za metastaziranje čini rano prepoznavanje širenja bolesti ključnim. To naglašava potrebu za pronalaženjem novih biljega koji bi omogućili precizniju procjenu biološkog ponašanja tumora i ujedno poslužili kao podloga za razvoj i racionalnu primjenu novih metoda liječenja (1).

1.1.3. Razvoj melanoma i rizični čimbenici za nastanak melanoma

Melanom je zloćudni tumor koji nastaje zloćudnom preobrazbom melanocita, stanica smještenih u bazalnome sloju epidermisa, folikulu dlake, šarenici, sluznicama i meningealnim ovojnicama. Glavna je uloga melanocita sinteza pigmenta melanina, koji se potom skladišti u melanosomima i prenosi dendritičkim nastavcima u obližnje keratinocyte. Unutar keratinocita melanosomi se smještaju u području oko jezgre i na taj način štite jezgrinu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) od oštećenja nastalih izlaganjem UV zrakama (15).

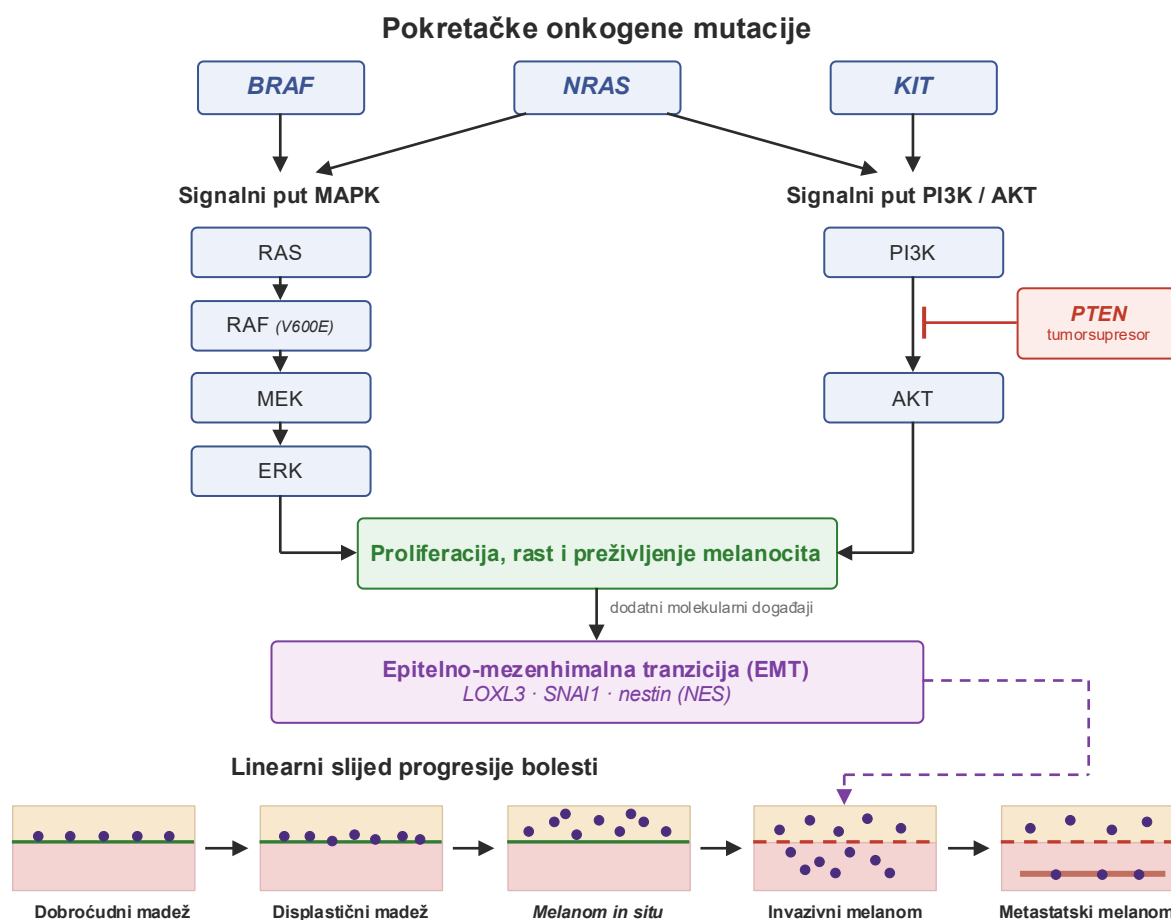
Početni onkogeni događaji u razvoju melanoma kože uključuju gene *BRAF*, *NRAS* i *KIT*, koji sudjeluju u dvama ključnim signalnim putovima: MAPK i fosfoinozimid-3-kinazi (PI3K). Signalni put MAPK obuhvaća proteine RAS/RAF/MEK/ERK te ima značajnu ulogu u patogenezi različitih vrsta zloćudnih tumora tako što prenosi izvanstanične signale do jezgre, gdje potiče izražaj gena odgovornih za staničnu proliferaciju i diferencijaciju te na taj način regulira proliferaciju, rast, apoptozu, transformaciju i migraciju tumorskih stanica.

U razvoju melanoma kože najčešće je poremećen signalni put MAPK, pri čemu čak do 90 % melanoma pokazuje aberantnu aktivaciju ovoga puta. Prisutnost onkogene mutacije u genu *BRAF* rezultira kontinuiranom aktivnošću BRAF-a te posljedičnom aktivacijom MEK-a i puta MAPK, neovisno o signalizaciji putem kaskade RAS/RAF. Ta aberantna aktivacija potiče nekontrolirani rast i diobu melanocita, što doprinosi razvoju i progresiji melanoma. Mutacija V600E gena *BRAF*, koja nastaje zamjenom valina glutaminskom kiselinom na kodonu 600, pronađena je u više od 90 % stečenih melanocitnih madeža i oko 50 % melanoma kože (16). Druga najčešća mutacija koja uzrokuje aberantnu aktivaciju signalnih putova MAPK i PI3K jest ona u genu *NRAS* koja je prisutna u 15 – 30 % melanoma. Važno je znati da se mutacije gena *BRAF* i *NRAS* u pravilu međusobno isključuju, a istodobne mutacije obaju gena rijetko su dokumentirane. U normalnim uvjetima aktivnost gena *BRAF* i *NRAS* potiče staničnu proliferaciju i nastanak madeža s ograničenim potencijalom rasta. Međutim, istraživanja su

pokazala da se melanom može razviti i iz dobroćudnih melanocitnih madeža, linearnim slijedom od prekursorskih promjena poput displastičnih madeža, preko melanoma *in situ*, do invazivnog melanoma (17).

Drugi najčešće aktivirani signalni put u melanomu kože jest put PI3K/AKT, koji ima ključnu ulogu u regulaciji staničnoga preživljenja, rasta, metabolizma i apoptoze, regulirajući na taj način homeostazu stanica. Glavni negativni regulator ovoga signalnog puta jest tumorsupresorski gen *PTEN*, te upravo njegova inaktivacija dovodi do pojačane aktivacije PI3K/AKT i povećanoga staničnog preživljenja i proliferacije (18). Značajno je da gubitak PTEN-a često koegzistira s mutacijama u genu *BRAF*, što rezultira pojačanim zajedničkim učinkom na progresiju melanoma. Kombinacija ovih genetskih promjena povezana je s povećanom pokretljivošću tumorskih stanica, stvaranjem lamelipodija i većim metastatskim potencijalom (19).

Upravo opisana aktivacija signalnih putova MAPK i PI3K/AKT pokreće početne korake u nastanku melanoma, no za napredovanje benigne melanocitne promjene u invazivni i metastatski melanom potrebni su dodatni molekularni događaji. Među čimbenicima koji sudjeluju u toj tranziciji posebnu su pozornost privukli enzim LOXL3 (engl. *lysyl oxidase-like 3*), transkripcijski čimbenik SNAI1 (engl. *Snail family transcriptional repressor 1*), protein nestin (NES) i transkripcijski čimbenik OCT4 (engl. *octamer-binding transcription factor 4*), zbog svoje uloge u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), regulaciji rasta tumora, staničnoj diferencijaciji, stjecanju i održavanju obilježja tumorskih matičnih stanica te metastaziranju (20-23). Pokazalo se da LOXL3 surađuje s onkogenim BRAF-om u poticanju melanomageneze te da u mišjem modelu s aktiviranim genom *Braf* i gubitkom gena *Pten* doprinosi rastu tumora, plastičnosti melanomskih stanica i metastatskom širenju, dijelom kroz modulaciju EMT-a posredovanu transkripcijskim čimbenikom SNAI1 (20). (Slika 3)

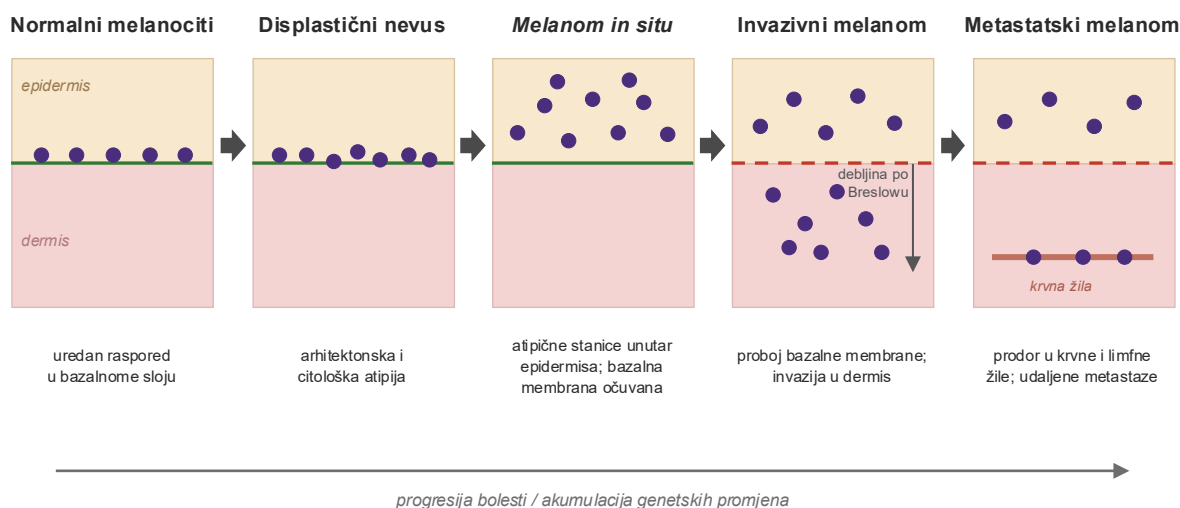


Slika 3. Shematski prikaz molekularnoga puta nastanka i progresije melanoma. Početni onkogeni događaji uključuju gene BRAF, NRAS i KIT te aktivaciju dvaju ključnih signalnih putova: MAPK (RAS–RAF–MEK–ERK, s mutacijom BRAF V600E) i PI3K/AKT, koji je negativno reguliran tumorsupresorskim genom PTEN. Aktivacija tih putova potiče proliferaciju, rast i preživljenje melanocita. Za napredovanje benigne melanocitne promjene u invazivni i metastatski melanom potrebni su dodatni molekularni događaji, osobito epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) posredovana biljezima LOXL3, SNAI1 i nestinom (NES). U donjem je dijelu prikazan linearni slijed progresije bolesti, od dobroćudnoga madeža, preko displastičnoga madeža i melanoma *in situ*, do invazivnoga i metastatskoga melanoma. Slika je djelo autorice.

Napredak tehnologija sekvenciranja nove generacije omogućio je podroban uvid u mutacijski krajolik melanoma, koji se ubraja među zloćudne tumore s najvećim mutacijskim opterećenjem. Većina utvrđenih promjena nosi obilježja mutageneze posredovane UV zračenjem, ponajprije prijelaza citozina u timin (C>T) na dipirimidinskim mjestima, čime se

izloženost suncu izravno povezuje s genomskom nestabilnošću melanocita. Uz već opisane pokretačke mutacije gena *BRAF* i *NRAS*, u melanomu su prepoznati i drugi ponavljajući pokretački događaji, inaktivacija tumorsupresorskih gena *NF1*, *TP53* i *CDKN2A* te mutacije u promotoru gena *TERT*, koji zajednički pridonose neograničenom proliferativnom potencijalu tumorskih stanica (24).

Suvremeni modeli melanomageneze temelje se na postupnome nizu genomskih promjena kojima dobroćudna melanocitna proliferacija napreduje prema invazivnom melanomu. Analizom pojedinačnih područja unutar istih promjena pokazano je da dobroćudni madeži u pravilu nose izoliranu pokretačku mutaciju gena *BRAF*, dok se prijelazom u displastične madeže i melanom *in situ* postupno pridružuju dodatne genomske promjene, poput mutacija u promotoru gena *TERT* i inaktivacije gena *CDKN2A*, a s pojavom invazije i bialelni gubitak tumorsupresorskih gena (25). Time je model linearnoga napredovanja, od prekursorske promjene do invazivnoga melanoma, dobio čvrstu molekularnu potvrdu. (Slika 4)



Slika 4. Shematski prikaz razvoja melanoma. Razvoj melanoma prikazan je kao postupni slijed promjena melanocita: od urednoga rasporeda u bazalnome sloju epidermisa, preko displastičnoga nevusa s arhitektonskom i citološkom atipijom te melanoma *in situ* u kojem su atipične stanice ograničene na epidermis uz očuvanu bazalnu membranu, do invazivnoga melanoma koji probija bazalnu membranu i prodire u dermis te metastatskoga melanoma koji se širi krvnim i limfnim žilama u udaljena tkiva. Debljina invazije u dermis odgovara debljini tumora po Breslowu. Slika je djelo autorice.

Osim promjena u samome slijedu DNK, u nastanku i napredovanju melanoma sve se veće značenje pridaje epigenetičkim mehanizmima. Poremećaji obrasca metilacije DNK, pri čemu se izmjenjuju opća hipometilacija genoma i lokalna hipermetilacija promotora tumorsupresorskih gena, kao i promjene u razini 5-hidroksimetilcitozina, pridonose utišavanju zaštitnih gena i pojačanoj aktivnosti onkogeni. Za razliku od mutacija, epigenetičke su promjene potencijalno reverzibilne, zbog čega predstavljaju osobito zanimljivu metu za razvoj novih terapijskih pristupa (26).

Kao i kod drugih zloćudnih tumora, dvije su skupine rizičnih čimbenika važne za nastanak melanoma: čimbenici domaćina i okolišni čimbenici. Etiološki čimbenici vezani uz domaćina jesu: obiteljska sklonost nastanku melanoma, prethodno dijagnosticiran melanom ili nemelanomski zloćudni tumor kože, tip i broj madeža, fototip kože te postojanje imunosupresije. Najvažniji okolišni čimbenik za razvoj melanoma jest izloženost ultraljubičastom (UV) zračenju. Pritom se osobito štetnim pokazalo intermitentno, intenzivno izlaganje suncu koje dovodi do opekline, za razliku od kronične, kumulativne izloženosti, a poseban rizik nose teške opekline zadobivene u djetinjstvu i adolescenciji (1, 27, 28). Uz sunčevo zračenje, važan je čimbenik i izloženost umjetnim izvorima UV zračenja, prije svega uređajima za tamnjenje kože (solarijima), čija je uporaba, osobito u mlađoj životnoj dobi, povezana sa znatno povećanim rizikom od melanoma (29).

Otpribliže 5 do 10 % melanoma razvija se u osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom melanoma, iako to nije nužno posljedica pojedinačne genske mutacije. Taj oblik nasljednog melanoma, tzv. obiteljski melanom, definiran je s barem dvama slučajevima melanoma među rođacima u prvome koljenu. Procjenjuje se da jedna trećina bolesnika s obiteljskim melanomom ima mutacije gena *CDKN2A*, dok su mutacije u genu *CDK4* rjeđe. U nekim obiteljima nositelji mutacija gena *CDKN2A* pokazuju i povećan rizik za razvoj karcinoma gušterače, tumora živčanog sustava i karcinoma bubrega (30). Osim navedenih, opažene su mutacije i u sljedećim genima: *MC1R*, *NRAS*, *BRAF*, *BAP1* i *POT1* (1, 31). Prepoznavanje bolesnika s nasljednom sklonošću melanomu omogućuje pravodobnu provedbu preventivnih i probirnih mjera, kako u pojedinca tako i u njegovih srodnika (3). Upravo je taj slijed spoznaja objedinjen u suvremenim preglednim radovima koji sažimaju napredak u razumijevanju, dijagnostici i liječenju kožnoga melanoma tijekom posljednjega desetljeća (32).

Što se tiče osobne anamneze o prethodnom melanomu ili zloćudnom nemelanomskom tumoru kože, prema istraživanjima bolesnici koji su već liječeni od melanoma imaju devet puta veći rizik za razvoj novog melanoma; taj je rizik najveći u prvoj godini te je zadržan i nakon više od 20 godina praćenja. Također, bolesnici liječeni od zloćudnih nemelanomskih tumora

kože imaju povećan rizik od razvoja melanoma, a taj se rizik povezuje ponajviše sa stilom života i navikama pri izlaganju suncu (33, 34). Prema procjenama samo oko 30 % melanoma nastaje iz postojećih melanocitnih madeža, dok ostatak nastaje *de novo* (35). Unatoč tome, najvažniji rizični čimbenik za razvoj melanoma kože jest ukupan broj melanocitnih madeža, pa osobe koje imaju 100 ili više madeža na koži imaju 8 do 10 puta povećan rizik za razvoj melanoma (36). Važan je čimbenik rizika i prisutnost atipičnih melanocitnih madeža, pa tako u osoba s pet ili više atipičnih promjena možemo očekivati šest puta veći rizik od razvoja melanoma. Prema epidemiološkim studijama, rizik zloćudne preobrazbe pojedinog madeža procjenjuje se na jedan melanom na nekoliko stotina atipičnih madeža te jedan melanom na nekoliko tisuća dobroćudnih melanocitnih madeža (1, 6).

S obzirom na fototip kože, istraživanja su pokazala da od melanoma najčešće obolijevaju osobe svijetle puti, crvenkaste ili svijetle boje kose te plavih ili zelenih očiju, s pjegama, koje pri izlaganju suncu brzo zadobiju opekline (37). Što se pak tiče okolišnih utjecaja, već je dugi niz godina UV zračenje prepoznato kao najvažniji čimbenik u etiopatogenezi melanoma. Cijeli je spektar UV zračenja SZO klasificirala kao karcinogen skupine 1. Prema najnovijoj procjeni IARC-a iz 2025. godine, 83 % svih novih slučajeva kožnog melanoma u svijetu 2022. godine bilo je pripisivo izloženosti UV zračenju, odnosno približno 267 000 od 332 000 slučajeva, pri čemu je udio bio veći u muškaraca (86 %) nego u žena (79 %). U regijama s pretežno svjetloputom populacijom, poput Australije i Novog Zelanda, Sjeverne Europe i Sjeverne Amerike, više od 95 % slučajeva melanoma pripisuje se UV zračenju (6, 38). Prvi pokazatelji etiološke uloge UV zračenja u razvoju melanoma proizašli su iz opažanja da je incidencija melanoma povećana među bijelom populacijom koja živi najbliže ekvatoru. Primjerice, učestalost i smrtnost od melanoma u Australiji 5 do 10 puta su veće nego u Europi (39).

Važno je naglasiti da se najopasnijim smatra intermitentno izlaganje UV zrakama, odnosno povremeno intenzivno izlaganje koje često rezultira opeklinama sa stvaranjem mjehura. Rizik od razvoja melanoma usko je povezan s pojavom opekline od sunca u djetinjstvu. Zanimljivo je da su opekline zadobivene tijekom djetinjstva i adolescencije značajno povećavale rizik od razvoja melanoma, dok one u odrasloj dobi nisu pridonosile daljnjem porastu rizika, što dodatno naglašava potrebu za zaštitom od sunca u najosjetljivijim skupinama (27, 40). Smatra se da svaka opekline od sunca praćena pojavom mjehura (opeklina II. stupnja) prije 15. godine života povećava rizik razvoja melanoma za 3,2 %, neovisno o drugim čimbenicima rizika, kao što su boja očiju, boja kose ili ukupna izloženost UV zračenju (28). Prema novijim spoznajama, melanomi koji se javljaju u srednjoj životnoj dobi najčešće

nastaju na područjima kože s niskim stupnjem kroničnog oštećenja od sunca (engl. *low chronic sun damage*, low-CSD) i često pokazuju somatske mutacije gena *BRAF* ili *NRAS* te su povezani s povećanim brojem melanocitnih madeža. Upravo se ti melanomi povezuju s povremenom izloženošću UV zrakama u djetinjstvu. Nasuprot tome, melanomi koji se pojavljuju u starijoj životnoj dobi, osobito lentigo maligna tip melanoma, najčešće se razvijaju na područjima kože s visokim stupnjem kroničnog oštećenja od sunca (engl. *high-CSD*), poput glave i vrata. Oni imaju genetske promjene koje nastaju pod utjecajem UV zraka i očituju se mutacijama u genima kao što su *TP53*, *CDKN2A*, *NF1* te u promotoru gena *TERT* (1, 41).

Konačno, važno je naglasiti i rizik od razvoja melanoma uslijed izlaganja umjetnim UV zrakama u solarijima. Procjenjuje se da je godišnje oko 10 000 slučajeva melanoma u SAD-u, Europi i Australiji povezano s korištenjem solarija. Korištenje solarija učestalo je među adolescentima i mladim odraslim osobama te je upravo izlaganje umjetnom UV zračenju prije 35. godine života pokazalo statistički značajno povišen rizik od razvoja melanoma. Godine 2009. IARC je solarije klasificirao kao karcinogen skupine 1 za ljude (29). Nakon te objave korištenje solarija u razvijenim se zemljama znatno smanjilo, osobito među adolescentima, dijelom i zbog uvođenja zakonskih ograničenja pristupa maloljetnicima (42). Dodatni napor u području zakonodavstva i edukacije javnosti bit će ključni u rješavanju ovoga važnog javnozdravstvenog problema (1, 29).

Naposljetku, sve navedeno upućuje na to da je upravo izloženost UV zrakama jedini rizični čimbenik za razvoj melanoma koji se može uspješno prevenirati. Učinkovita zaštita od UV zračenja podrazumijeva izbjegavanje namjerne izloženosti sunčevu ili umjetnom UV zračenju u svrhu tamnjenja kože, uz primjenu fotozaštitnih mjera na otvorenome kada je UV indeks viši od 3 te boravak u zatvorenim prostorima pri UV indeksu 8 ili višem. Pod pojmom fotozaštite podrazumijeva se boravak u sjeni, korištenje zaštitne odjeće (dugi rukavi i hlače) s visokim faktorom zaštite tkanine (engl. *Ultraviolet Protection Factor*, UPF 50 ili viši), šešira sa širokim obodom i sunčanih naočala te redovito nanošenje fotozaštitnih krema širokog spektra i visokoga zaštitnog faktora (engl. *Sun Protection Factor*, SPF 30 – 50) na dijelove kože koji nisu prekrivene odjećom (6, 43, 44).

1.1.4. Klinička slika melanoma

Glavno kliničko obilježje melanoma jest pigmentirana promjena koja se anamnestički, tijekom vremena, mijenja, bilo da raste, bilo da pokazuje promjene u obliku i/ili boji. Tipične makroskopske značajke sažete su u tzv. ABCDEFG pravilu, koje uključuje: asimetriju

promjene (engl. *Asymmetry*), nepravilne rubove uz neoštru ograničenost od okolne kože (engl. *Borders*), nejednoliku pigmentaciju (engl. *Colour*), promjer veći od 5 mm (engl. *Diameter*), uzdignutost promjene ili promjenu izgleda tijekom vremena (engl. *Elevation, Evolution*), specifičan subjektivni osjećaj bolesnika, primjerice svrbež, peckanje ili bol (engl. *Feeling*) te rast (engl. *Growth*) (6). Nodularni melanom pritom često odstupa od klasičnoga ABCDE obrasca jer može biti simetričan, oštro ograničen i ujednačene boje, zbog čega su za njegovo prepoznavanje predložena dopunska obilježja „EFG“ (engl. *Elevated, Firm, Growing*), uzdignuće, čvrstoća i rast (45). Rjeđe se melanom može prikazati kao hipopigmentirana ili amelanotična promjena, što otežava njegovo prepoznavanje (6).

Izvorno su opisana četiri glavna podtipa primarnog melanoma kože, temeljena na obrascima njegova rasta. Međutim, novo izdanje klasifikacije SZO za tumore kože iz 2023. godine prepoznaje devet glavnih podtipova melanoma: melanom niskoga stupnja kroničnog oštećenja od sunca (low-CSD), lentigo maligna melanom (high-CSD), dezmozoplastični melanom, Spitz melanom, akralni melanom, melanom sluznice, melanom nastao u sklopu divovskoga kongenitalnog madeža, melanom nastao u plavome madežu te melanom oka (1, 2). Ta se klasifikacija temelji na tzv. evolucijskim putovima nastanka melanoma, koji objedinjuju podrijetlo tumora, mutagene te pokretačke genske promjene, a prvi su ih cjelovito razradili Bastian i suradnici (46).

Različita su molekularna obilježja identificirana ovisno o anatomske lokalizaciji i razini izloženosti suncu. Tako su melanomi koji nastaju na područjima kože s niskim stupnjem kroničnog oštećenja od sunca najčešće lokalizirani na trupu i ekstremitetima te često imaju mutaciju gena *BRAF*. Melanomi koji nastaju kao posljedica visoke kronične izloženosti suncu češće se nalaze u području glave i vrata te su skloniji mutacijama gena *NRAS* i drugih *RAS* gena. Melanomi koji nisu povezani s izloženošću suncu uglavnom se nalaze na akralnim površinama ili sluznicama, a karakterizirani su mutacijom gena *KIT* (6). Ta se molekularna raznolikost odražava i u mutacijskome opterećenju: melanomi povezani s UV zračenjem nose visok broj točkastih mutacija s prepoznatljivim UV potpisom, dok melanomi zaštićenih područja pokazuju nisko mutacijsko opterećenje i češće promjene u broju kopija gena (46). Dodatni oblici uključuju primarni melanom središnjega živčanog sustava te nodularni, nevoidni i dermalni melanom.

Ipak, u svakodnevnoj se kliničkoj praksi najčešće koristimo izvornom klasifikacijom, temeljenom na obrascima rasta melanoma, pa tako razlikujemo površinsko šireći melanom (engl. *superficial spreading melanoma*, SSM), nodularni melanom (NM), lentigo maligna melanom (LMM) i akrolentiginozni melanom (ALM) (1, 2).

Površinsko šireći melanom podtip je melanoma koji odgovara melanomu niskoga stupnja kroničnog oštećenja od sunca (low-CSD) i najčešći je oblik melanoma kože u osoba svijetle puti. Taj podtip čini 60 do 70 % svih melanoma i najčešće se dijagnosticira u dobi od 40 do 60 godina. Javlja se na bilo kojem dijelu tijela, najčešće na trupu i leđima u muškaraca te na nogama i trupu u žena. Na molekularnoj razini najčešće nosi mutaciju gena *BRAF*, ponajprije V600E, što ga svrstava u low-CSD evolucijski put nastanka melanoma (46).

U početnoj, horizontalnoj (radijalnoj) fazi rasta SSM se prezentira kao asimptomatska makula smeđe do crne boje, s izraženim varijacijama u pigmentaciji te nepravilnim, neoštro ograničenim rubovima. Može nastati *de novo* ili iz postojećega madeža. Ta faza, u kojoj su atipični melanociti ograničeni na epidermis (pagetoidno se šire prema površini) i eventualno papilarni dermis, može trajati od nekoliko mjeseci do više godina, a melanom otkriven u toj fazi izlječiv je u velikoj većini slučajeva. Nakon horizontalne faze može uslijediti brža, vertikalna faza rasta, koja se klinički očituje pojavom papule ili nodusa te nosi bitno veći metastatski potencijal; moguć je i nastanak ulceracije (47).

Fenomen regresije obilježje je i do dvije trećine slučajeva površinsko širećega melanoma i klinički se očituje sivkastim ili depigmentiranim područjima unutar tumora. Regresija odražava reakciju imunološkog sustava domaćina na tumor, no zbog djelomičnoga razaranja tumorskoga tkiva može otežati točnu procjenu debljine tumora po Breslowu (48). Iako je SSM podtip koji najčešće nastaje u sklopu prethodnoga madeža, rizik da pojedini madež tijekom života progredira u melanom iznimno je nizak (1).

Nodularni melanom drugi je najčešći podtip melanoma u osoba svijetle puti. Najčešće se dijagnosticira u šestome desetljeću života, s nešto većom učestalošću u muškaraca nego u žena. Čini otprilike 15 do 25 % svih melanoma i može se pojaviti bilo gdje na tijelu, najčešće na trupu, glavi i vratu. Iako NM nema jasnu povezanost s izlaganjem UV zračenju, taj se histološki oblik može pojaviti u sklopu većine podtipova melanoma prema klasifikaciji SZO iz 2023. godine (1, 2).

Klinički se NM obično očituje kao plava, smeđa ili crna papula ili nodus, koji može ulcerirati i krvariti, a u nekim slučajevima može biti i amelanotičan, tj. ružičaste do crvene boje. Karakterizira ga brz rast tijekom nekoliko tjedana do mjeseci. Za razliku od ostalih podtipova, NM od početka raste u vertikalnoj fazi, bez prethodne, sporije horizontalne (radijalne) faze, pa se najčešće smatra tumorom nastalim *de novo*. Zbog izostanka radijalne faze i simetrična, oštro ograničena izgleda ujednačene boje, NM često ne zadovoljava klasične ABCDE kriterije, zbog čega mu je klinička dijagnoza otežana (49).

Upravo zbog takva biološkog ponašanja NM često promiče ranom otkrivanju te se dijagnosticira u uznapredovaloj fazi, s većom debljinom tumora po Breslowu i posljedično lošijom prognozom. Iako čini tek 15 do 20 % svih melanoma, odgovoran je za približno 40 % smrtnih ishoda povezanih s melanomom, što ga čini klinički najznačajnijim agresivnim podtipom (50).

Lentigo maligna melanom nastaje uslijed visoke kronične izloženosti suncu i čini oko 10 do 15 % svih kožnih melanoma. Bilježi se porast incidencije ovoga tipa tumora, koji prati starenje populacije i promjene u obrascima izlaganja suncu (51). LMM se najčešće dijagnosticira u sedmome desetljeću života, ali se može javiti i u mlađih osoba s izraženom kumulativnom izloženošću UV zračenju. Razvija se na kronično oštećenoj koži, najčešće na licu, nosu i obrazima te na vlasištu starijih muškaraca s androgenom alopecijom.

U kliničkoj se slici prikazuje kao polagano rastuća, asimetrična makula u nijansama od žućkastosmeđe do tamnosmeđe ili crne boje, s varijacijama u pigmentaciji i nepravilnim, neoštro ograničenim rubovima. Zbog spore, dugotrajne radijalne faze rasta i sličnosti s dobroćudnim promjenama poput solarnih lentigina ili seboroične keratoze, LMM se često kasno prepoznaje (52). Invazivni se oblik očituje kao papula ili nodus koji se razvija unutar preegzistentne makule, koju označavamo kao lentigo maligna, odnosno melanom *in situ* tipa lentigo maligna.

Lentigo maligna smatra se melanomom *in situ*, a procjenjuje se da približno 5 % tih promjena tijekom života napreduje u invazivni melanom, premda novije studije upućuju na to da bi taj rizik mogao biti i znatno viši, do 20 %, te da raste s trajanjem promjene (52).

Akralni lentiginozni melanom relativno je rijedak podtip melanoma kože koji se najčešće dijagnosticira u sedmome desetljeću života. Karakteristično se javlja na dlanovima, tabanima ili u području nokta (*subungvalno*). ALM čini približno 2 do 5 % svih melanoma, a njegova je apsolutna incidencija slična među svim rasnim i etničkim skupinama. Međutim, budući da osobe tamnijega fototipa kože rjeđe razvijaju melanome povezane s UV zračenjem, ALM čini nerazmjerno veći udio dijagnosticiranih melanoma u crnačkoj (do 34 %), azijskoj (do 22 %) i latinoameričkoj populaciji (oko 9 %) (53).

Klinički se ALM očituje kao asimetrična makula smeđe do crne boje, s varijacijama u pigmentaciji i nepravilnim rubovima, te se većinom dijagnosticira u uznapredovalom stadiju bolesti. Taj se podatak objašnjava nedostatkom svijesti o riziku nastanka melanoma na akralnim lokalizacijama, osobito u osoba tamnije puti, koje inače imaju nizak ukupni rizik od melanoma, zatim kliničkom sličnošću s dobroćudnim promjenama i traumatskim oštećenjima kože i nokta te odgađanjem biopsije zbog mogućega funkcionalnog i estetskog oštećenja pri kirurškim

zahvatima na akralnim regijama (54). Dodatnu dijagnostičku poteškoću predstavljaju amelanotični oblici ALM-a, koji zbog izostanka pigmentacije još lakše promiču ranom prepoznavanju (54).

U otprilike jedne trećine bolesnika postavi se pogrešna primarna klinička dijagnoza ALM-a, što često dovodi do znatnog kašnjenja u postavljanju ispravne dijagnoze i liječenja. Primjerice, kada promjena ima verukozna obilježja, može biti pogrešno liječena kao obična bradavica (55).

Melanom u području nokta (*subungvalni melanom*) podvrsta je akralnoga lentiginoznog melanoma koja se može razviti iz matriksa, ležišta ili nabora nokta, a klinički se očituje kao smeđa ili crna longitudinalna pruga ili kao hiperpigmentacija koja se širi na hiponihij te bočne ili proksimalne rubove nokta (Hutchinsonov znak). Svojim rastom dovodi do razaranja ploče i distrofije nokta, uz nastanak ulceracije i krvarenja. Valja razlikovati pravi Hutchinsonov znak od tzv. pseudo-Hutchinsonova znaka, prividnoga širenja pigmenta vidljivog kroz prozirni nabor nokta, koje se javlja u dobroćudnim promjenama (56).

ALM i genetski predstavlja zaseban podtip melanoma te se razlikuje od ostalih kožnih oblika. Za razliku od melanoma povezanih s UV zračenjem, rijetko nosi mutacije gena *BRAF*, a najčešće je obilježen aktivirajućim mutacijama gena *KIT*, koje se češće nalaze u akralnim i sluzničkim melanomima (57).

Od ostalih oblika melanoma ističu se amelanotični melanom, dezmoplastični melanom, melanom s obilježjima Spitz madeža, melanom koji nastaje u plavome madežu, primarni dermalni melanom, melanom sluznice te melanom oka. Amelanotični melanom oblik je bez vidljive pigmentacije, a sva četiri glavna podtipa (SSM, NM, LMM, ALM) mogu biti amelanotična, što uvelike otežava njihovo prepoznavanje. Zbog ružičaste do crvenkaste boje često se klinički zamjenjuje s dobroćudnim ili drugim zloćudnim promjenama, poput bazocelularnog ili planocelularnog carcinoma (58).

Dezmoplastični melanom (DM) histološki se definira prisutnošću vretenastih melanocita i izražene stromalne fibroze. Klinički se očituje kao plak ili nodus boje okolne kože, ružičast ili crven, lokaliziran na koži izloženoj suncu. Zbog atipične prezentacije dijagnoza se često postavlja u uznapredovalim stadijima bolesti. DM se može razviti *de novo*, iz postojećega LMM-a, ALM-a ili SSM-a, a rjeđe na sluznicama. U usporedbi s ostalim oblicima melanoma DM je skloniji infiltrativnom rastu i perineuralnoj invaziji (*neurotropizmu*), zbog čega su česte nepotpune ekscizije i lokalni recidivi (59).

Nadalje, valja spomenuti i spitzoidne melanome, unutar kojih se izdvaja Spitz melanom, tzv. zloćudni oblik iz obitelji Spitz tumora s jasno definiranim genetskim obilježjima. Za razliku

od konvencionalnih melanoma, Spitz melanom ne nosi pokretačke mutacije gena BRAF, NRAS ni NF1, nego je obilježen aktivirajućom mutacijom gena HRAS ili, češće, fuzijama kinaza koje aktiviraju signalni put MAPK, najčešće onih koje zahvaćaju gene ALK, ROS1, NTRK1, NTRK3, RET, MET, BRAF i MAP3K8. Zbog nedostatka široko prihvaćenih patohistoloških kriterija za postavljanje pouzdane dijagnoze razvijeno je nekoliko molekularnih metoda, poput fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), komparativne genomske hibridizacije (CGH), analize izražaja gena i sekvenciranja nove generacije (60). Prema važećoj klasifikaciji SZO, upravo prisutnost karakteristične fuzije kinaze ili mutacije gena HRAS, uz spitzoidnu morfologiju, definira tumor kao pripadnika obitelji Spitz (2).

Melanom koji nastaje u plavome madežu (*engl. melanoma ex blue nevus*, ranije *malignant blue nevus*) rijedak je oblik dermalnoga zloćudnog tumora melanocitnog podrijetla. Najčešće se nalazi na glavi, osobito u vlasištu, a klinički se očituje kao plavkast do crn, duboko smješten nodus ili papula. Klinički je tijek bolesti agresivan, s visokom stopom recidiva i metastaza. Po svojim se molekularnim i histopatološkim obilježjima taj tumor podudara s melanomom oka, s kojim dijeli isti obrazac genetskih promjena. U pridruženome plavom madežu mogu se naći mutacije gena *GNAQ* ili *GNAI1*, dok zloćudni dio tumora dodatno nosi mutacije gena *BAP1*, *SF3B1* ili *EIF1AX*. Pritom se gubitak funkcije gena BAP1 povezuje s osobito lošom prognozom i visokim metastatskim potencijalom, dok se mutacije gena SF3B1 i EIF1AX povezuju s povoljnijim ishodom (61).

Još jedan rijedak oblik jest primarni dermalni melanom (*engl. primary dermal melanoma*, PDM), koji histološki oponaša kožne ili limfne metastaze melanoma, a klinički nalikuje cisti ili drugom dermalnom tumoru. Karakteriziran je smještajem u dermisu ili potkožju, bez zahvaćanja epidermisa i bez regresije, zbog čega se teško prepoznaje i najčešće se prezentira debljinom od tri do devet milimetara. Budući da se histološki gotovo ne može razlikovati od metastaze melanoma, dijagnoza se postavlja isključivanjem, nakon što se anamnezom i slikovnom obradom cijeloga tijela isključi prethodni ili istodobni primarni melanom, odnosno druga metastatska bolest. Unatoč histološkoj sličnosti s metastatskim melanomom, primarni dermalni melanom ima neočekivano povoljnu prognozu: petogodišnje preživljenje kreće se od 73 do 100 %, za razliku od znatno lošijeg preživljenja u metastatskoj bolesti istoga stadija. Zbog te bitne prognostičke razlike ispravno prepoznavanje ovoga podtipa presudno je za odgovarajuće liječenje i praćenje bolesnika (62).

Melanomi sluznice rijedak su oblik melanoma i obuhvaćaju promjene koje se javljaju u usnoj šupljini, nazofarinksu, larinksu te anogenitalno. Najčešće se nalaze u blizini mukokutanih prijelaza, na granici pločastoga i cilindričnog epitela, a čine približno 1 % svih melanoma. Za

razliku od kožnih melanoma, nastanak melanoma sluznice nije povezan s izloženošću UV zračenju, a molekularno se razlikuje po tome što rijetko nosi mutaciju gena *BRAF*, a češće mutacije gena *KIT*, *NRAS* i *NF1*. Otprilike jedna trećina melanoma sluznice amelanotična je, što uz njihovu skrivenu lokalizaciju dodatno otežava rano prepoznavanje. Zbog svoje kliničke prezentacije i teško dostupne lokalizacije melanomi sluznice najčešće se dijagnosticiraju u lokalno uznapredovalom stadiju te imaju lošu prognozu. Uobičajeni prognostički pokazatelji kožnoga melanoma, poput debljine tumora po Breslowu i ulceracije, kod melanoma sluznice ne omogućuju pouzdanu procjenu ishoda, pa je za njih uveden zaseban sustav određivanja stadija (63).

Naposljetku, melanom oka čini oko 5 % svih melanoma, a dijelimo ga na konjunktivalni i uvealni (64). Konjunktivalni melanomi pokazuju sličnosti s kožnim melanomima te nose mutacije gena *BRAF*, *NRAS* ili *NF1*, a rjeđe *PTEN* i *KIT*. Najčešće se javljaju na bulbarnome dijelu konjunktive, a mogu nastati *de novo*, iz postojećega madeža ili iz primarne stečene melanocitoze s atipijom. Klinički se očituju kao pigmentirana ili amelanotična promjena. Za razliku od uvealnih melanoma, konjunktivalni se, poput kožnih, mogu širiti i limfogenim putem, pa u obradi ima mjesta i za procjenu regionalnih limfnih čvorova (65).

Uvealni melanomi molekularno se bitno razlikuju te najčešće nose somatske mutacije gena *GNAQ* ili *GNA11*, dok su mutacije gena *BRAF* i *NRAS* iznimno rijetke. Dodatne genetske promjene, osobito inaktivacija gena *BAP1*, povezane su s osobito visokim rizikom od metastaziranja i lošom prognozom. Zbog odsutnosti limfne drenaže unutar oka uvealni se melanomi šire gotovo isključivo hematogenim putem, pri čemu je jetra najčešće i prvo mjesto metastaza (66).

1.1.5. Dijagnoza melanoma

Dijagnoza melanoma temelji se na pregledu cijele kože, dostupnih sluznica i kožnih adneksa. Pritom se traže promjene koje zadovoljavaju jedno ili više prethodno navedenih obilježja ABCDEFG pravila, promjene koje se izgledom razlikuju od ostalih madeža u istoga bolesnika (tzv. znak ružnoga pačeta, engl. *ugly duckling sign*) (67) te promjene čiji se razvoj može pratiti kada je dostupna dokumentacija s prethodnih pregleda, u obliku kliničkih nalaza s opisom dermatoskopskoga statusa ili fotodokumentacije. Upravo je rano prepoznavanje melanoma ključno za poboljšanje ishoda i preživljenja oboljelih (6).

Pri svakom je pregledu kožnih promjena nužna primjena dermatoskopije jer je upravo ta metoda pokazala značajno veću dijagnostičku točnost u odnosu na kliničku procjenu golim

okom. Metaanalizom kliničkih ispitivanja potvrđeno je da dodavanje dermatoskopije kliničkom pregledu znatno povećava dijagnostičku točnost, s osjetljivošću od približno 89 % i specifičnošću od 79 % (68).

Karakteristična dermatoskopska obilježja melanoma jesu atipična pigmentna mrežica, nepravilne smeđe i crne točke i globule, nepravilne linije, tamne mrlje, sjajne bijele linije ili kristalne strukture te postojanje regresije. U slučaju invazivnog melanoma nalaze se i plavo-bijeli veo te polimorfne krvne žile. Amelanotični melanomi najčešće nemaju pigmentnih struktura te ih obilježavaju polimorfne krvne žile i sjajne bijele linije (69), dok ALM na koži okrajina obilježava paralelni uzorak grebena i nepravilna pigmentacija. Subungvalni se melanom obično očituje kao pigmentirana uzdužna pruga ispod nokta, a dermatoskopski se prikazuje nepravilnim linijama različite boje i debljine te širenjem pigmenta na okolnu kožu. Za LMM na licu postavljen je dermatoskopski model progresije koji obuhvaća četiri uzorka: anularno-granularni uzorak, uzorak s asimetrično pigmentiranim folikularnim otvorima, romboidne strukture te u kasnim fazama, izraženu neovaskularizaciju s crvenim romboidnim strukturama.

Zbog svega navedenoga dermatoskopiju treba primjenjivati pri pregledu svake pojedine kožne promjene, a ne samo klinički sumnjivih, budući da omogućuje otkrivanje najfinijih morfoloških odstupanja prije nego što melanom postane klinički prepoznatljiv. Preporučuje se i fotodokumentiranje svih promjena predviđenih za probatornu biopsiju ili kiruršku eksciziju u cijelosti (6).

Ipak, valja imati na umu da se ne prezentiraju svi melanomi tipičnim kliničkim obilježjima te da 10 do 25 % melanoma, unatoč primjeni dermatoskopije, može ostati neprepoznato. Za dijagnostički izazovne promjene, koje dermatoskopski ne pokazuju specifična obilježja melanoma, uveden je pojam melanoma bez karakterističnih obilježja (engl. *featureless melanoma*) (70). Budući da su ponekad upravo bolesnici ti koji prvi primijete takvu promjenu, svaku promjenu koja izaziva njihovu zabrinutost treba pomno analizirati i, prema potrebi, biopsirati odnosno kirurški odstraniti (1).

Zahvaljujući napretku umjetne inteligencije razvijeni su i algoritmi dubokoga učenja (engl. *deep learning*) za analizu dermatoskopskih slika. U eksperimentalnim uvjetima pojedini su modeli u prepoznavanju melanoma dosegli dijagnostičku uspješnost usporedivu s onom iskusnih dermatologa, a u nekim su ispitivanjima nadmašili i prosjek skupine liječnika. Iako takvi sustavi obećavaju kao potpora u probiru i donošenju odluka, njihova klinička primjena zahtijeva daljnju prospektivnu validaciju, pa se zasad promatraju kao nadopuna, a ne zamjena za stručnu liječničku prosudbu (71).

Refleksijska konfokalna mikroskopija (engl. *reflectance confocal microscopy*, RCM) neinvazivna je metoda koja omogućuje prikaz kože na staničnoj razini te tako premošćuje jaz između dermatoskopije i patohistološke analize. Metaanalize su pokazale da uporaba te metode, kao dodatka dermatoskopiji u dijagnostički dvojbenim promjenama, poboljšava dijagnostičku točnost i pridonosi smanjenju broja nepotrebnih biopsija, s osobitom vrijednošću u procjeni promjena na licu te u razlikovanju ranoga melanoma od dobroćudnih pigmentnih promjena (72).

Uz kliničku prosudbu i dermatoskopiju, u ranom se otkrivanju melanoma sve veća pozornost pridaje sustavnome praćenju promjena tijekom vremena. Fotografitiranje cijeloga tijela uz sekvencijsku digitalnu dermatoskopiju (engl. *total-body photography and sequential digital dermoscopy*) omogućuje usporedbu istih promjena i prepoznavanje suptilnih odstupanja koja upućuju na zloćudnost, čime se povećava osjetljivost otkrivanja melanoma i istodobno smanjuje broj nepotrebnih ekscizija dobroćudnih promjena, osobito u bolesnika s brojnim madežima i povišenim rizikom za razvoj melanoma (73).

U analizi dijagnostički zahtjevnih melanocitnih promjena, u kojima ni patohistološka analiza ne omogućuje jednoznačno razlikovanje dobroćudne od zloćudne promjene, kao pomoćna metoda mogu poslužiti molekularni testovi, poput analize profila ekspresije gena (engl. *gene expression profiling*). Takvi testovi pružaju dodatne informacije o biološkom ponašanju promjene i mogu pomoći u odlučivanju o daljnjem postupanju, no njihove rezultate uvijek treba tumačiti u kliničko-patološkom kontekstu pojedinog tumora (74). Usporedno se razvija i tekuća biopsija (engl. *liquid biopsy*), kojom se iz uzorka krvi analiziraju cirkulirajuća tumorska DNK, cirkulirajuće tumorske stanice i izvanstanične vezikule, s potencijalnom ulogom u ranom otkrivanju, procjeni proširenosti bolesti, praćenju odgovora na liječenje i pravodobnom prepoznavanju povrata bolesti (75).

Svaka klinički sumnjiva promjena koja se kirurški odstrani mora biti podvrgnuta patohistološkoj analizi, koja predstavlja zlatni standard u dijagnostici melanoma. Patohistološka se dijagnoza temelji na nizu arhitekturnih, citomorfoloških i dodatnih obilježja koja upućuju na zloćudnost melanocitne promjene. Arhitekturno su promjene asimetrične i slabo ograničene od okolnoga tkiva, a gnijezda melanocita nepravilno su raspoređena u epidermisu, različitih veličina i oblika te često konfluiraju. Epidermalno prevladavaju pojedinačni melanociti nad gnijezdima, uz povremeni gubitak međustaničnih veza, te se često protežu duž adneksalnih struktura (folikula dlaka i žlijezda). Pojedini melanociti i manja gnijezda mogu dosežati visoko iznad dermoepidermalne granice, sve do gornjih slojeva epidermisa. Izostaje jasno sazrijevanje melanocita prema dubljim slojevima dermisa.

Citomorfološki su melanomi obilježeni atipičnim melanocitima s izraženim nuklearnim polimorfizmom, učestalim mitozama i nekrozom. Dodatna obilježja zloćudnosti jesu prisutnost regresije, osobito kada zahvaća više od 75 % promjene, aktinička elastoza kože te nakupine plazma-stanica u dnu promjene (1).

Patohistološki bi nalaz, prema pravilima struke, trebao sadržavati dijagnozu i kliničko-patološki podtip melanoma, debljinu tumora u milimetrima (prema Breslowu), anatomske razinu invazije prema Clarku (I–IV), prisutnost ili odsutnost ulceracije i regresije, postojanje mikrosatelita, udaljenost od bočnih i dubokih rubova, broj mitozu po mm² te podatke o perineuralnoj ili limfovaskularnoj invaziji i o infiltraciji tumora limfocitima (6). Ti su parametri temelj određivanja patološkoga stadija prema TNM klasifikaciji, pri čemu se debljina tumora po Breslowu i prisutnost ulceracije izdvajaju kao najvažniji neovisni prognostički čimbenici i određuju T kategoriju. U bolesnika s invazivnim melanomom procjena statusa sentinel-limfnoga čvora daje dodatnu, često i presudnu prognostičku informaciju te usmjerava daljnje liječenje (76). U uznapredovaloj se bolesti dodatno preporučuje molekularno testiranje na pokretačke mutacije, prije svega gena *BRAF*, koje uz prognostičko ima i prediktivno značenje za primjenu ciljane terapije (2).

1.1.6. Stadij bolesti i prognoza

Svrstavanje melanoma prema stadijima bolesti provodi se prema osmome izdanju klasifikacije AJCC-a (engl. *American Joint Committee on Cancer*) iz 2017. godine, izrađenoj na temelju analize međunarodne baze podataka s više od 46 000 bolesnika. Točno je određivanje stadija ključno za procjenu prognoze i planiranje daljnjega liječenja. Ta se klasifikacija temelji na obilježjima primarnoga tumora (T, engl. *tumour*), zahvaćenosti limfnih čvorova (N, engl. *lymph node*) i prisutnosti udaljenih metastaza (M, engl. *metastases*).

Kategorija T određuje se prema debljini tumora po Breslowu u milimetrima te prisutnosti ili odsutnosti ulceracije, dok mitotski indeks, za razliku od prethodnoga izdanja, više nije kriterij za određivanje T kategorije. Kategorija N označava prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima te *in transit* metastaza, mikrosatelita, satelita i potkožnih metastaza; prognostički su pritom najvažniji broj metastatski zahvaćenih limfnih čvorova (klinički okultna ili klinički očita zahvaćenost) te prisutnost satelitskih, mikrosatelitskih ili *in transit* metastaza. Naposljetku, kategorija M odnosi se na udaljene metastaze i temelji se na anatomske smještanju metastaza te razini laktat-dehidrogenaze (LDH) u serumu. Novost je osmoga izdanja zasebna podkategorija M1d za metastaze u središnjemu živčanom sustavu,

uvarena zbog njihove osobito loše prognoze, dok povišena vrijednost LDH, kao nepovoljan prognostički čimbenik, ostaje sastavnicom M kategorije (14). (Slika 5)

Na temelju TNM klasifikacije melanom se svrstava u kliničke, patohistološke i prognostičke stadije. Klinički stadij obuhvaća sve podatke dobivene kliničkim i radiološkim pregledom, dok se patohistološki stadij temelji na nalazu široke ekscizije, biopsije limfnoga čvora čuvara (engl. *sentinel lymph node biopsy*, SLNB) te, prema potrebi, nalazu regionalne limfadenektomije. Kombinacijom tih kategorija određuje se AJCC stadij bolesti, čime se omogućuje procjena preživljenja i usmjerava izbor terapijskoga pristupa (14).

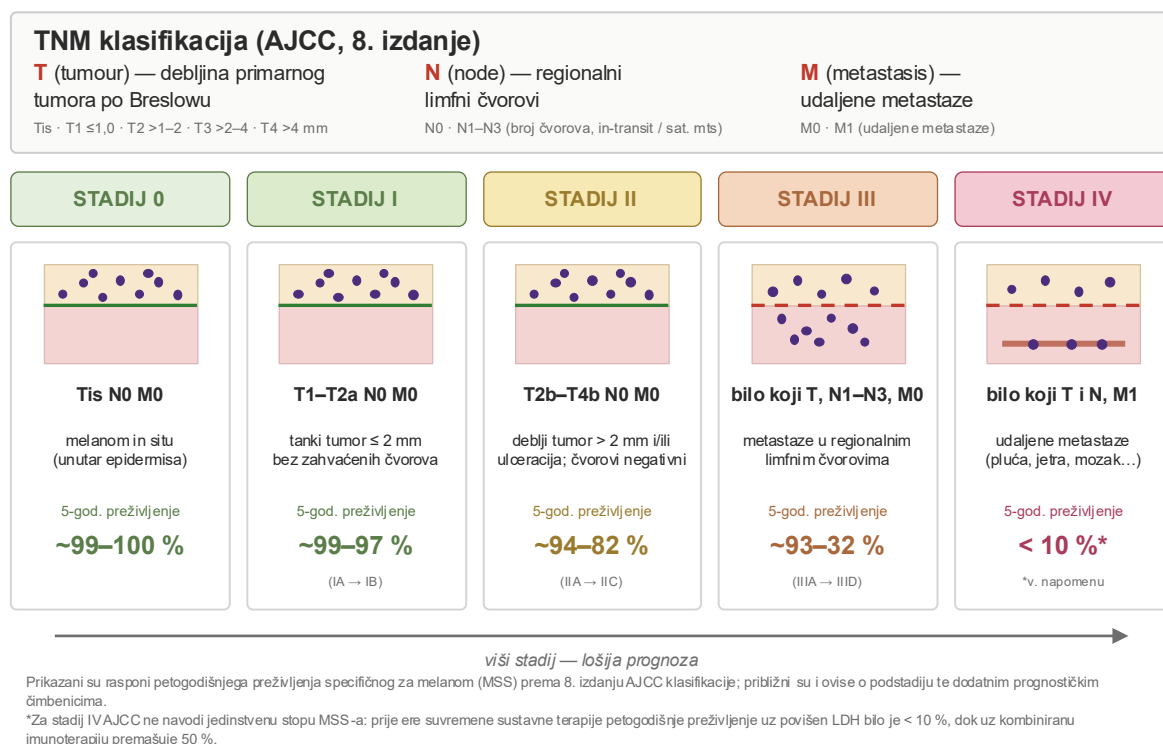
Stadij 0 označava melanom *in situ*, dok stadiji I i II označavaju lokaliziranu kožnu bolest. Važno je razlikovati bolesnike u stadiju IA (T1a, Breslow < 0,8 mm, bez ulceracije), za koji se u pravilu ne preporučuje SLNB, od bolesnika u stadiju IB (T1b, Breslow < 0,8 mm s ulceracijom ili 0,8 do 1 mm neovisno o ulceraciji; T2a, 1 – 2 mm bez ulceracije) i stadiju II, kod kojih se SLNB obično preporučuje. Stadij III bolesti uključuje metastatsku zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i/ili mikrosatelite, satelite te *in transit* metastaze. Naposljetku, stadij IV označava udaljene metastaze koje mogu zahvaćati kožu, udaljene limfne čvorove, visceralne organe i/ili središnji živčani sustav (14, 76).

Prognoza oboljelih od melanoma ovisi o stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Općenito, izvrsnu prognozu imaju bolesnici s lokaliziranim melanomom kože koji je kirurški uklonjen, stadija I i II. Petogodišnja specifična stopa preživljenja povezana s melanomom (engl. *Melanoma Specific Survival*, MSS) za bolesnike stadija IA (T1aN0M0) iznosi približno 99 %, dok u bolesnika s debljim (> 4 mm) i ulceriranim melanomom bez regionalnih metastaza (T4bN0M0; stadij IIC) iznosi oko 82 %. Osim patohistoloških obilježja tumora, i drugi klinički podaci dodatno utječu na prognozu u stadijima I i II, uključujući dob, spol i anatomske smještaj tumora. Primjerice, žene stadija I ili II imaju bolji MSS u usporedbi s muškarcima. Nadalje, smještaj primarnog melanoma na trupu, glavi (vlasištu) ili vratu povezan je s lošijom prognozom u usporedbi sa smještajem na udovima (14, 32).

Bolesnici stadija III čine heterogenu skupinu u pogledu rizika od razvoja udaljenih metastaza i MSS-a. Prema podacima AJCC-a, petogodišnja stopa preživljenja varira od 93 % za stadij IIIA do samo 32 % za stadij IIID. Međutim, u posljednjem se desetljeću, uvođenjem ciljane terapije i inhibitora kontrolnih točaka, preživljenje u stadijima III i IV značajno poboljšalo. Glavni prognostički čimbenici u stadiju III jesu obilježja primarnog tumora (debljina i postojanje ulceracije), broj zahvaćenih limfnih čvorova te tumorsko opterećenje. Tumorsko se opterećenje definira na temelju toga jesu li metastaze u limfnim čvorovima mikroskopske (klinički okultne, otkrivene SLNB-om) ili makroskopske (klinički očite) te

prema prisutnosti ili odsutnosti limfne diseminacije (mikrosatelitske, satelitske i *in transit* metastaze) (14, 32).

Nadalje, kod bolesnika stadija IV najvažniji je prognostički čimbenik anatomske smještaj udaljenih metastaza, pa lošiju prognozu imaju bolesnici s visceralnim metastazama u odnosu na one s kožnim, potkožnim ili metastazama u udaljene limfne čvorove. Prije ere suvremenih sustavnih terapija medijan preživljenja bolesnika s melanomom stadija IV iznosio je svega oko 6 do 9 mjeseci, dok je petogodišnja stopa preživljenja uz povišene vrijednosti LDH u serumu bila manja od 10 %. Dodatni čimbenici koji utječu na preživljenje jesu: početni smještaj metastaza, vrijeme potrebno za razvoj udaljenih metastaza, stadij bolesti koji je prethodio sistemskom širenju te ukupno tumorsko opterećenje u trenutku postavljanja dijagnoze. Kod bolesnika s neresektibilnim stadijem III i IV niže je tumorsko opterećenje povezano s boljim odgovorom na provedeno liječenje, što potvrđuje da bi ranije otkrivanje i liječenje metastatske bolesti poboljšalo dugoročne ishode (32).



Slika 5. Određivanje stadija melanoma prema TNM klasifikaciji (AJCC, 8. izdanje) . Stadij bolesti temelji se na obilježjima primarnoga tumora (T – debljina po Breslowu i ulceracija), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnosti udaljenih metastaza (M). Prikazani su stadiji od 0 (melanom *in situ*) do IV (udaljene metastaze) s pripadajućim približnim rasponima petogodišnjega preživljenja, koji opadaju s porastom stadija bolesti. Slika je djelo autorice.

1.1.7. Liječenje melanoma

Tijekom posljednjeg se desetljeća liječenje melanoma temeljito promijenilo, ponajprije zahvaljujući molekularnim testovima koji doprinose dijagnostici te uvođenju ciljanoga liječenja u bolesnika s mutacijom gena *BRAF*, kao i imunoterapije temeljene na inhibiciji kontrolnih točaka (1).

Nakon primarne kirurške ekscizije i postavljanja patohistološke dijagnoze melanoma kože potrebno je učiniti široku eksciziju postoperativnoga ožiljka, uz sigurnosne rubove prilagođene debljini primarnoga tumora, čime se smanjuje rizik od zaostatnoga tumora i satelitskih metastaza. Prema europskim smjernicama, za melanome *in situ* preporučuje se sigurnosni rub od 5 mm, za tumore debljine do 2 mm rub od 1 cm, a za one deblje od 2 mm rub od 2 cm. Ovo bi se konačno kirurško liječenje, po potrebi dopunjeno biopsijom limfnoga čvora čuvara (SLNB), trebalo provesti unutar četiri do šest tjedana od postavljanja dijagnoze (77).

Nadalje, odnedavno se već od stadija IIB i IIC preporučuje adjuvantna sistemska terapija inhibitorima PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*), pembrolizumabom ili nivolumabom, budući da ti bolesnici imaju klinički značajan rizik od povrata bolesti (77-79). Adjuvantna terapija inhibitorima PD-1 primjenjuje se i u bolesnika s potpuno resekiranim stadijem III (77, 80). U bolesnika s mutacijom gena *BRAF* V600 ciljana terapija inhibitorom BRAF-a dabrafenibom u kombinaciji s inhibitorom MEK-a trametinibom predstavlja alternativu imunoterapiji te ujedno jedinu mogućnost liječenja u onih s kontraindikacijama za imunoterapiju ili specifičnim komorbiditetima (77).

U liječenju stadija IV, bilo neresektabilne bolesti ili metastatskoga rasapa, imunoterapija čini temeljni oblik prve linije sustavnoga liječenja (77, 81). Monoterapija inhibitorima PD-1 preporučuje se bolesnicima s indolentnom slikom bolesti, nižim tumorskim opterećenjem i bez simptomatske visceralne zahvaćenosti. U bolesnika s agresivnijim fenotipom bolesti, povišenim vrijednostima LDH i opsežnim zahvaćanjem organa boljom se pokazala kombinirana imunoterapija inhibitorom PD-1 uz inhibitor CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), odnosno nivolumabom uz ipilimumab, no ta kombinacija znatno povećava rizik od razvoja imunološki posredovanih nuspojava (82). U bolesnika s mutacijom gena *BRAF* V600E ili V600K na raspolaganju je i ciljana terapija inhibitorima BRAF-a i MEK-a, koja rezultira visokom početnom stopom odgovora i brzim ublažavanjem simptoma, ali slabijom dugoročnom učinkovitošću u odnosu na imunoterapiju. Stoga se imunoterapija u većini slučajeva preferira kao terapija prvoga izbora, dok se ciljana terapija

rezervira za bolesnike u kojih je potrebno brzo smanjenje tumorske mase ili za one s kontraindikacijama za imunoterapiju (77, 83).

Naposljetku, radioterapija je zadržala svoje mjesto u liječenju primarnih neresektabilnih tumora (MIS, LMM), kao i u adjuvantnome liječenju desmoplastičnoga melanoma s visokim rizikom od recidiva (1, 77). Kod stadija IV bolesti radioterapija se primjenjuje pretežno u palijativne svrhe, radi ublažavanja simptoma uzrokovanih udaljenim metastazama, poput kontrole boli, kompresije kralježnične moždine, stabilizacije koštanih metastaza te liječenja presadnica u mozgu (77). Metastaze u središnjem živčanom sustavu mogu se liječiti stereotaksijskom radiokirurgijom, frakcioniranom stereotaksijskom radioterapijom ili, sve rjeđe, ozračivanjem cijeloga mozga, pri čemu se potonje primjenjuje isključivo palijativno, kada drugi oblici liječenja nisu izvedivi ili su se pokazali neuspješnima (84).

Zbrinjavanje bolesnika oboljelih od melanoma u svim stadijima bolesti danas je objedinjeno u međunarodnim smjernicama, koje na temelju razine dokaza i snage preporuke usmjeravaju dijagnostiku, liječenje i praćenje te omogućuju ujednačen i na dokazima utemeljen pristup (81). Uvođenje imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka i ciljane terapije korjenito je promijenilo ishode liječenja melanoma, i to ne samo u uznapredovaloj bolesti. Dokaz je tomu i pomak imunoterapije prema ranijim stadijima bolesti: u adjuvantnome liječenju potpuno resektiranoga melanoma stadija III primjena je pembrolizumaba, u usporedbi s placebom, značajno produljila preživljenje bez povrata bolesti (80).

U uznapredovaloj su bolesti dugoročni ishodi jednako uvjerljivi. Kombinirana imunoterapija inhibitorom PD-1 i inhibitorom CTLA-4 omogućuje petogodišnje preživljenje veće od 50 %, uz trajan odgovor u znatnoga udjela bolesnika kakav je prije uvođenja tih lijekova bio nezamisliv (82). Usporedno se u bolesnika s resektabilnom bolešću sve više istražuje neoadjuvantni pristup, primjena imunoterapije prije kirurškoga zahvata rezultirala je boljim preživljenjem bez događaja (engl. *event-free survival*, EFS) nego isključivo adjuvantna primjena, vjerojatno zahvaljujući poticanju snažnijega protutumorskog imunosnog odgovora dok je tumor još prisutan (85).

Istodobno se razvijaju personalizirani terapijski pristupi, poput individualiziranih cjepiva utemeljenih na neoantigenima. Kombinacija cjepiva na osnovi informacijske ribonukleinske kiseline (mRNA), mRNA-4157 (V940), s pembrolizumabom u ranim je istraživanjima dodatno produljila preživljenje bez povrata bolesti u odnosu na samu imunoterapiju (86). U bolesnika s metastatskom bolešću refraktornom na standardne pristupe mogućnost predstavlja i terapija tumor-infiltrirajućim limfocitima, koja je pokazala trajne odgovore u prethodno liječenih bolesnika (87).

Unatoč postignutom napretku, liječenje melanoma prate i važni izazovi. U bolesnika liječenih inhibitorima BRAF-a i MEK-a s vremenom se gotovo redovito razvija stečena otpornost, koja nastaje ponovnom aktivacijom signalnoga puta MAPK ili aktivacijom alternativnih signalnih putova, čime se ograničava dugoročna učinkovitost ciljane terapije (88). Usto, imunoterapija može izazvati imunološki posredovane nuspojave koje mogu zahvatiti gotovo svaki organski sustav, zbog čega je za njihovo pravodobno prepoznavanje i zbrinjavanje nužan multidisciplinarni pristup u skladu s postojećim smjernicama (89). Napokon, sve navedene terapijske mogućnosti počivaju na izrazitoj imunogenosti melanoma, tumora bogato infiltriranoga imunostimulirajućim stanicama, u kojemu sastav i funkcija tumorskoga imunostimulirajućeg mikrokoliša bitno utječu na tijek bolesti i odgovor na liječenje (90).

1.2. Uloga LOXL3, NES, SNAI1 i OCT4 u tumorigenezi

Enzim LOXL3 pripada obitelji lizil-oksidaza (engl. *lysyl oxidase*, LOX), koja se sastoji od pet članova: prototipa LOX i četiriju enzima sličnih LOX-u, LOXL1 – 4 (engl. *lysyl oxidase-like*, LOXL). Analiza aminokiselinskoga sastava ovih enzima pokazala je da najveću sličnost imaju LOXL3 i LOXL2, s homologijom od oko 69 %, dok je homologija između LOXL3 te LOX, LOXL1 i LOXL4 približno 50 %. Svi su članovi amin-oksidade, enzimi ovisni o bakru koji reguliraju ravnotežu izvanstaničnoga matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) tako što omogućuju kovalentno umrežavanje kolagenih i elastinskih vlakana u netopive oblike te tako povećavaju čvrstoću i stabilnost ECM-a (91). Istraživanja su pokazala da ti enzimi djeluju i unutarstanično te da sudjeluju u transkripciji gena, EMT-u, diferencijaciji i rastu tkiva. Uloga LOXL3 u embrionalnome razvoju prvi je put potvrđena na modelu vrste *Danio rerio*, gdje je nedostatak njegova ortologa *Loxl3b* uzrokovao kraniofacijalne deformacije. Slični su razvojni poremećaji, uključujući rascjep nepca, mikrognatiju i deformacije kralježnice, kao i rana smrtnost, zabilježeni u miševa s deficijencijom *Loxl3*. Mutacije u ljudskom genu *LOXL3* povezane su s pojavom Sticklerova sindroma, kolagenopatije koja se očituje mikrognatijom, glosoptozom, rascjepom nepca i teškom miopijom (91).

Nadalje, LOXL3 se povezuje s različitim bolestima oka i pluća. Snižen izražaj LOXL3 mogao bi biti značajan u razvoju keratokonusa, a njegova pojačana aktivnost, u vidu povećanog odlaganja ECM-a, u razvoju glaukoma. LOXL3 se pokazao pojačano izraženim i u idiopatskoj plućnoj fibrozi te u idiopatskoj plućnoj arterijskoj hipertenziji. U arterijskoj je hipertenziji zabilježen visok izražaj LOXL3 u srčanim fibroblastima i kardiomiocitima, što dovodi do pojačanog umrežavanja kolagena i remodeliranja ECM-a srca te posljedično do razvoja

hipertrofije klijetke i diastoličke disfunkcije srca (91). LOXL3 djeluje i na imunološki sustav: deacetilacijom transkripcijskoga čimbenika STAT3 prekida njegovu aktivnost, čime ograničava daljnju proliferaciju i diferencijaciju stanica, negativno regulira nastanak limfocita Th17 i Treg te tako pridonosi kontroli imunosnoga odgovora. Osim navedenoga, dokazana je i uloga LOXL3 u tumorigenezi. Tu ulogu ostvaruje supresijom izražaja gena za E-kadherin (*CDH1*), djelujući u interakciji s transkripcijskim čimbenikom Snai1, ključnim regulatorom EMT-a; ta interakcija pridonosi smanjenju izražaja *CDH1* te progresiji i metastaziranju tumora. Nadalje, LOXL3 utječe i na izražaj drugih proteina važnih za očuvanje genske stabilnosti i mitotsku kontrolu, kao što su BRCA2, RAD51, SMC1A, MSH2, SMC3 i NUMA1 (91, 92). Povećan izražaj LOXL3 dokazan je u melanomu, karcinomu želuca, dojke i jajnika, kolorektalnom karcinomu, hepatocelularnom karcinomu te u mijeloproliferativnim poremećajima (91). U melanomu se LOXL3 pokazao ključnim za preživljenje tumorskih stanica i očuvanje genomske stabilnosti, a u suradnji s onkogenim BRAF-om pridonosi nastanku i progresiji tumora (20, 92).

Nestin je protein koji pripada klasi VI intermedijarnih filamenata, izvorno prepoznat u neuralnim progenitorskim i matičnim stanicama tijekom razvoja središnjega živčanog sustava. Ima ulogu u organogenezi, staničnome metabolizmu i organizaciji citoskeleta, održavajući strukturu i stabilnost stanica. Kao biljeg matičnih stanica ima izravnu ulogu u regeneraciji tkiva te se njegov pojačan izražaj pokazao u fibrozi pluća, jetre i srca. Dokazana je i uloga nestina u tumorigenezi, ponajprije karcinoma pluća ne-malih stanica, jajnika, dojke, hepatocelularnoga karcinoma i glioblastoma (93). Snižen izražaj nestina povezan je sa smanjenom fosforilacijom ključnih signalnih proteina, uključujući Akt i GSK3 β , što rezultira inhibicijom signalnoga puta PI3K-Akt-mTOR i može dovesti do smanjenoga tumorskog rasta i migracijskog potencijala stanica (94). Drugi važan mehanizam povezan s nestinom jest njegov odnos s tumorsupresorskim proteinom p53: u normalnim stanicama p53 potiskuje izražaj nestina, pa gubitak ili poremećaj funkcije p53 dovodi do pojačanog izražaja nestina i nakupljanja nezrelih, progenitorskih stanica sklonih zloćudnoj preobrazbi (95). U melanomu je izražaj nestina povezan s migracijom, invazijom i progresijom bolesti, a izraženiji je u uznapredovalim stadijima nego u dobroćudnim madežima (96).

Transkripcijski čimbenik Snai1 ima ključnu ulogu u regulaciji EMT-a tijekom embrionalnoga razvoja, osobito u procesu migracije i diferencijacije stanica zametnih listića (97). Osnovna mu je funkcija supresija izražaja E-kadherina uz pojačan izražaj mezenhimalnih biljega, kao što su fibronektin, kolagen i matriks metaloproteinaze. Na taj način dovodi do gubitka epitelnih obilježja i stjecanja mezenhimalnog fenotipa te povećava pokretljivost i

invazivnost stanica (98). Osim toga, podržava funkciju matičnih stanica, obnovu tkiva i cijeljenje rana (99, 100). Povišen izražaj *SNAIL* zabilježen je u fibrozi organa i drugim upalnim bolestima, u kojima pridonosi staničnoj plastičnosti i otpornosti na apoptozu (101).

U kontekstu tumorigeneze *Snai1* se ističe kao ključni pokretač progresije tumora: potiče invaziju, metastaziranje te stjecanje obilježja matičnih stanica, što dovodi do razvoja otpornosti na terapiju i povećava rizik od povrata bolesti (21, 102, 103). Povišen izražaj ovoga transkripcijskog čimbenika utvrđen je u različitim vrstama zloćudnih tumora, uključujući karcinom dojke, pluća i jetre te melanom, a povezan je sa slabijom diferencijacijom tumora, kraćim preživljenjem i sveukupno lošijom prognozom (104, 105). U melanomu utišavanje *SNAIL* u pretkliničkim modelima zaustavlja metastaziranje i ublažava imunosupresiju tumorskoga mikookoliša, što dodatno potvrđuje njegovu ulogu u progresiji bolesti (106-108).

Transkripcijski čimbenik OCT4 (*POU5F1*) pripada obitelji POU, nazvanoj prema proteinima Pit-1, Oct-1/2 i Unc-86. Ključan je za održavanje pluripotentnosti i samoobnove embrionalnih matičnih stanica tako što sprječava njihovu diferencijaciju i održava ih nezrelima (109, 110). Tijekom embrionalnog razvoja njegov je izražaj vremenski i prostorno kontroliran, a njegov poremećaj dovodi do različitih razvojnih poremećaja (111). Fiziološki je izražen u germinativnim stanicama, dok je u somatskim stanicama potisnut. Međutim, patološka reaktivacija ovoga transkripcijskog čimbenika zabilježena je u brojnim stanjima, uključujući fibrozu, kronične upalne procese, regeneraciju tkiva te različite vrste tumora, gdje pridonosi staničnoj plastičnosti i otpornosti na apoptozu te potiče EMT (112, 113). U tumorima OCT4 ima ključnu ulogu u održavanju populacije tumorskih matičnih stanica, koje su odgovorne za invazivnost, otpornost na lijekove i povrat bolesti (114). Pojačan izražaj OCT4 pronađen je u različitim vrstama zloćudnih tumora, poput karcinoma vrata maternice, želuca, pluća, jajnika, rektuma i testisa, te je povezan s nepovoljnom prognozom, nižim stupnjem diferencijacije tumora i kraćim preživljenjem oboljelih (115-119). I u melanomu je pojačan jezgreni izražaj OCT4 povezan s većom debljinom tumora po Breslowu, ulceracijom i metastaziranjem te s agresivnijim biološkim ponašanjem i lošijim preživljenjem oboljelih (120).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

- Analizirati izražaj biljega LOXL3, SNAI1, NES i OCT4 u melanomima *in situ*, BRAF+ i BRAF– metastatskim melanomima te u displastičnim madežima.
- Analizirati suizražaj biljega LOXL3, SNAI1, NES i OCT4 u melanomima *in situ*, BRAF+ i BRAF– metastatskim melanomima te u displastičnim madežima.

2.2. Hipoteze istraživanja

- Izražaj proteina i gena LOXL3 veći je u skupini metastatskih melanoma nego u skupini displastičnih madeža i melanoma *in situ*.
- Izražaj SNAI1, NES i OCT4 veći je u skupini melanoma *in situ* nego u skupini displastičnih madeža.
- Izražaj SNAI1, NES i OCT4 veći je u skupini metastatskih melanoma nego u skupini displastičnih madeža.
- Suizražaj LOXL3, SNAI1, NES i OCT4 prisutan je u skupini metastatskih melanoma.

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno na Medicinskome fakultetu Sveučilišta u Splitu, uz suradnju Kliničkoga zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkoga bolničkog centra Split.

3.1. Ispitanici

Uvidom u medicinsku dokumentaciju baze podataka Kliničkoga zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkoga bolničkog centra Split izdvojeno je ukupno 45 uzoraka (Tablica 1) s patohistološkom dijagnozom displastičnog madeža (N = 10), melanoma *in situ* (N = 15) i metastatskog melanoma (BRAF+ N = 10, BRAF– N = 10), operiranih u Kliničkome bolničkom centru Split od 2017. do 2020. godine. Kriteriji za uključenje u studiju bili su jedna od triju dijagnoza (displastični madež, melanom *in situ* ili metastatski melanom), dostupnost parafinskih tkivnih blokova te potpuni klinički podaci. Kriteriji isključenja bili su nedostupnost medicinske dokumentacije ili nedovoljna količina tkiva za analizu. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkoga bolničkog centra Split (klasa: 520-03/24-01/95, urudžbeni broj: 2181-147/01-06/LJ.Z.24-02), u skladu s Helsinškom deklaracijom (121).

Tablica 1. Sociodemografska obilježja ispitanika.

Histološka dijagnoza	Broj bolesnika	Dob (godine)	Spol (M/Ž)
Displastični madež	10	36,9 ± 12,2	6/4
Melanom <i>in situ</i>	15	55,9 ± 10,9	9/6
BRAF+ melanom	10	60,8 ± 13,1	5/5
BRAF– melanom	10	65,3 ± 15,9	7/3

Dob je prikazana kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. M – muški spol; Ž – ženski spol.

3.2. Metode

3.2.1. Histološka analiza

Uzorci biopsija kože prikupljeni su u obliku parafinskih blokova. Tkivo je fiksirano u 4 %-tnoj otopini paraformaldehida u 0,1 M PBS-u preko noći, potom isprano radnim PBS-om, dehidrirano u uzlaznoj seriji otopina etanola (25 %, 50 %, 75 %, 90 % i 100 %) i u ksilenu te

uklopljeno u parafin. Rezovi debljine 5 μm izrađeni su mikrotomom i preneseni na predmetna stakalca. Svaki je deseti rez obojen hematoksilinom i eozinom (H&E) radi procjene histološke građe tkiva. Uzorci su najprije inkubirani u otopini Mayerova hematoksilina tijekom 15 minuta, zatim isprani mlakom tekućom vodom i uronjeni u otopinu eozina u trajanju od četiri do pet minuta. Nakon toga provedena je dehidracija serijom rastućih koncentracija etanola i ksilena, a uzorci su uklopljeni u kanada-balzam i prekriveni pokrovnim stakalcem. Tako obrađeni uzorci analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX40, Tokyo, Japan) kako bi se potvrdila prethodno postavljena dijagnoza i procijenila morfološka očuvanost tkiva prije imunofluorescencijskog bojenja. Bojenje hematoksilinom i eozinom osnovna je histološka metoda jer je tehnički jednostavna i jasno prikazuje brojne tkivne strukture. Hematoksilin plavo boji jezgru te dobro prikazuje jezgrine detalje i druge kisele sastojke, dok eozin različitim intenzitetom crveno boji citoplazmu, eritrocite te mišićno i vezivno tkivo.

3.2.2. Imunofluorescencijska analiza

Nakon deparafiniranja uzoraka u ksilolu i rehidracije u seriji etanola i destiliranoj vodi, antigeni su otkriveni kuhanjem uzoraka tijekom 30 minuta u 0,01 M citratnom puferu (pH 6,0) u kuhalu na paru pri 95 °C. Uzorci su potom ohlađeni na sobnu temperaturu, isprani u 0,1 M PBS-u, odvojeni PAP-olovkom te inkubirani 30 minuta s otopinom za blokiranje proteina (ab64226, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) radi sprječavanja nespecifičnog bojenja. Zatim su inkubirani preko noći u vlažnoj komori s primarnim protutijelima protiv LOXL3, SNAI1, nestina i OCT4. Nakon ispiranja PBS-om nanosena su sekundarna protutijela: Rhodamine Red™-X (RRX) konjugirano protutijelo za detekciju SNAI1 te Alexa Fluor® 488 konjugirano protutijelo za detekciju LOXL3, NES odnosno OCT4. Sva korištena primarna i sekundarna protutijela, s pripadajućim razrjeđenjima i proizvođačima, navedena su u Tablici 2. Uzorci su potom inkubirani u vlažnoj komori tijekom jednog sata, isprani PBS-om te inkubirani s bojilom za jezgre DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) u trajanju od jedne minute. Naposljetku su uklopljeni medijem Immu-Mount i prekriveni pokrovnim stakalcem.

Uzorci su pregledani na fluorescencijskom mikroskopu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) i snimljeni digitalnom kamerom (Nikon DS-Ri2, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) uz softver NIS-Elements F (verzija 5.22.00). Radi kvantifikacije imunoekspresije proteina od interesa analizirano je najmanje deset nepreklapajućih reprezentativnih vidnih polja, snimljenih pri ukupnom povećanju $\times 1000$ uz uporabu imerzijskog ulja (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) i

konstantno vrijeme ekspozicije. Zeleni signal tumačen je kao pozitivna imunoekspresija LOXL3, NES odnosno OCT4, a crveni kao pozitivna imunoekspresija SNAI1.

Tablica 2. Primarna i sekundarna protutijela korištena u imunofluorescencijskoj analizi.

Protutijelo	Naziv / klon	Proizvođač (kat. br.)	Razrjeđenje
Anti-LOXL3	Rabbit Anti-LOXL3	Merck KGaA (SAB4301652)	1 : 100
Anti-SNAI1	Goat Anti-SNAI1	Abcam (ab53519)	1 : 500
Anti-NES	Rabbit Anti-Nestin (SP103)	Abcam (ab105389)	1 : 100
Anti-OCT4	Rabbit polyclonal Anti-OCT4	Merck KGaA (AB3209)	1 : 100
Anti-Goat (RRX)	Donkey Rhodamine Red-X AffiniPure Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (705-295-003)	1 : 300
Anti-Rabbit (AF488)	Donkey Alexa Fluor 488 AffiniPure Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (711-545-152)	1 : 300

RRX – Rhodamine Red-X; AF488 – Alexa Fluor 488; H+L – teški i laki lanci imunoglobulina. Sekundarno protutijelo Anti-Rabbit (AF488) korišteno je za detekciju LOXL3, NES i OCT4, a Anti-Goat (RRX) za detekciju SNAI1.

Mikrofotografije su obrađene pomoću softvera ImageJ (verzija 1.54, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Sjedinjene Američke Države) radi kvantitativne procjene imunoreaktivnosti stanica (122-124). Slike su pripremljene za analizu oduzimanjem crvenoga signala od zelenoga fluorescencijskog signala te primjenom medijan-filtra polumjera 2,0 piksela. Određivanjem praga metodom granične vrijednosti („triangle“) i uporabom opcije „analyze particles“ izmjeren je postotak površine presjeka prekriven pozitivnim signalom. Dobivene su vrijednosti uprosječene po skupinama. S obzirom na moguće varijacije među ocjenjivačima, analizu su neovisno provela tri iskusna histologa, postavljajući pozadinske granične vrijednosti pomoću negativnih kontrolnih slika. Pouzdanost među ocjenjivačima procijenjena je analizom međurazredne korelacije. Intenzitet imunoreaktivnosti procijenjen je

semikvantitativno, u četiri stupnja: odsutnost reaktivnosti (–), blaga reaktivnost (+), umjerena reaktivnost (++) i jaka reaktivnost (+++). Mikrofotografije su, za potrebe prikaza, dodatno obrađene i sastavljene pomoću softvera Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države), uz primjenu funkcija za oduzimanje pozadine i prilagodbu kontrasta radi smanjenja pozadinske fluorescencije i optimizacije kontrasta između kanala.

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom i analiza

Iz svakoga je parafinskog bloka iglom zaokruženo i izdvojeno po 5 mm² tkiva displastičnih madeža ili melanoma, pri čemu je izbjegnuto okolno zdravo i nekrotično tkivo. Ukupna RNK (ribonukleinska kiselina) izolirana je iz 24 uzorka (displastični madež n = 6, melanom *in situ* n = 6, BRAF⁺ n = 6 i BRAF[–] n = 6). Odabrano je tkivo rezano na rezove debljine 6 µm i pohranjeno u sterilne mikroepruvete bez RNaza. Izolacija RNK provedena je kompletnom High Pure RNA Paraffin (kat. br. 03270289001, Roche, Basel, Švicarska), prema uputama proizvođača.

Protokol je započeo deparafinizacijom tkiva, ispiranjem u etanolu i centrifugiranjem pri najvećoj brzini tijekom dvije minute. Osušenom talogu dodani su proteinaza K i pufer za lizu tkiva (engl. *tissue lysis buffer*) radi homogenizacije stanica i razgradnje proteina, nakon čega je stanični lizat inkubiran preko noći. Sljedećega su dana dodani pufer za vezanje (engl. *binding buffer*) i etanol, a otopina je prenesena u spin-kolonu. Vezana je RNK isprana puferom za ispiranje te eluirana iz kolone puferom za eluiranje (engl. *elution buffer*). Zaostala DNK razgrađena je inkubacijom eluata s DNazom I. Koncentracija ukupne RNK u svakom uzorku izmjerena je uređajem QubitTM Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države), a svi su uzorci razrijeđeni do najniže izmjerene koncentracije. Reverzna transkripcija 1,34 ng ukupne RNK u komplementarnu DNK (cDNK) provedena je kompletnom High-Capacity Reverse Transcriptase (kat. br. 4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, Sjedinjene Američke Države), prema uputama proizvođača. Za daljnju kvantifikaciju izražaja gena 20 µL cDNK pohranjeno je na –80 °C. Izražaj gena analiziran je metodom RT-qPCR na uređaju Applied Biosystems Fast 7500 (Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države), uporabom smjese TaqMan Fast Advanced Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države), koja sadrži uracil-N-glikozilazu (UNG) AmpErase i inertnu referentnu boju ROX. Za ljudske gene *LOXL3*, *SNAIL*, *NES* i *OCT4* korištene su gotove TaqMan probe (Applied Biosystems, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države), a kao endogeni kontrolni gen korišten je *GAPDH* (gen za

glicerinaldehid-3-fosfat-dehidrogenazu). Oznake korištenih proba navedene su u Tablici 3. Reakcija je provedena uporabom 2 μ L predloška cDNK, 1 μ L probe TaqMan i 10 μ L univerzalne smjese TaqMan Master Mix. Svi su uzorci cDNK analizirani u duplikatu. Negativna kontrola (NTC) sadržavala je sve komponente smjese Master Mix i vodu bez nukleaza umjesto cDNK. Protokol se sastojao od početnog zagrijavanja na 50 °C tijekom dviju minuta radi aktivacije uracil-N-glikozilaze, potom dviju minuta pri 95 °C radi aktivacije polimeraze te, naposljetku, 40 amplifikacijskih ciklusa (3 sekunde pri 95 °C i 30 sekundi pri 60 °C). Za analizu rezultata korištena je komparativna Ct-metoda ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (125) radi procjene relativnih promjena u izražaju ciljnih gena, pri čemu je referentna vrijednost postavljena na razinu izražaja u uzorcima displastičnih madeža.

Tablica 3. Geni i pripadajuće TaqMan probe korištene u analizi RT-qPCR.

Gen	Naziv gena	TaqMan oznaka eseja
<i>LOXL3</i>	lizil-oksidaza slična 3	Hs01046945_m1
<i>SNAIL</i>	Snai1 obiteljski transkripcijski represor 1	Hs00195591_m1
<i>NES</i>	Nestin	Hs01895061_u1
<i>OCT4</i>	oktamer-vezujući transkripcijski čimbenik 4 (POU5F1)	Hs00707120_s1
<i>GAPDH</i>	glicerinaldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (endogena kontrola)	Hs99999905_m1

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju. Kao endogena kontrola korišten je gen GAPDH.

3.3. Statističke analize

Statistička analiza podataka dobivenih obradom mikrofotografija provedena je softverskim paketom GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, Sjedinjene Američke Države). Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$, a svi su intervali pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI) izraženi na razini od 95 %. Za potvrdu normalne raspodjele podataka korišten je Shapiro-Wilkov test. Podaci su analizirani jednosmjernom analizom varijance (engl. *one-way ANOVA*) s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Postotak površine zahvaćene signalom izražen je kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Za

podatke dobivene metodom RT-qPCR također je korištena jednosmjerna analiza varijance s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi; rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD, uz prag statističke značajnosti $P < 0,05$.

Pri primjeni metode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ kao kalibrator je korištena prosječna vrijednost ΔC_t uzoraka displastičnih madeža, na temelju koje su izračunate relativne promjene izražaja gena u svim ostalim uzorcima u odnosu na displastični madež.

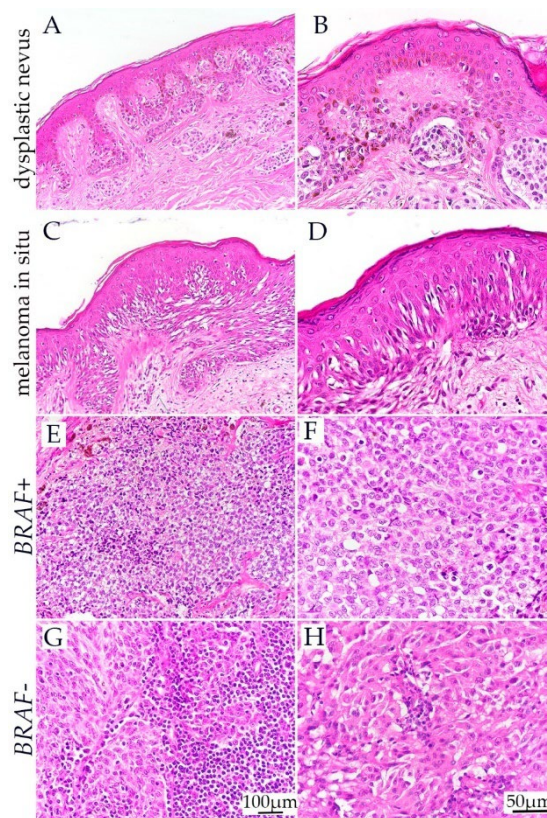
4. REZULTATI

Na preparatima bojenima H&E utvrđene su morfološke razlike između displastičnih madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanoma. Imunofluorescencijskom metodom analiziran je izražaj i suizražaj biljega LOXL3, OCT4, NES i SNAI1, s različitim intenzitetom i obrascima izražavanja signala fluorescencije. Kvantitativna procjena imunoreaktivnosti biljega OCT4, NES i SNAI1 provedena je na uzorcima displastičnih madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanoma određivanjem postotka površine pozitivnog signala fluorescencije u području epidermisa. Dobiveni su rezultati prikazani kao postotni udjeli ukupne površine epidermisa s pozitivnom imunoreaktivnošću. Analiza RT-qPCR provedena je na bioptatima kože istih uzoraka radi određivanja promjene relativne razine izražaja promatranih mRNK među displastičnim madežima, melanomima *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanomima.

4.1. Histološka analiza (H&E bojenje) displastičnog madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– metastatskog melanoma

Histološkim pregledom uzoraka displastičnih madeža utvrđen je poremećaj arhitekture i citološka atipija. Poremećaj arhitekture uključivao je prisutnost junkcijskih „ramena“ uz dermalnu komponentu, povezivanje nakupina melanocita između susjednih izduženih epidermalnih grebena, suprabazalno raspršenje melanocita ograničeno na donje slojeve epidermisa, koncentričnu i lamelarnu fibroplaziju oko izduženih epidermalnih grebena te žarišno nepravilan limfocitni infiltrat. Citološka je atipija bila obilježena uvećanim jezgrama s različitim stupnjem nepravilnosti, zbijanjem kromatina, hiperkromazijom te različito izraženim nukleolima.

Slična atipična obilježja uočena su i u melanomima *in situ* te u metastatskim melanomima. Međutim, u tim su slučajevima bila praćena dodatnim obilježjima, kao što su izraženo pagetoidno širenje melanocita, opsežna i kontinuirana bazalna proliferacija atipičnih melanocita, izraženija citološka atipija, mitoze te, kod invazivnih melanoma, izostanak sazrijevanja dermalne komponente. (Slika 6)



Slika 6. Bojenje H&E melanocitnih promjena uključenih u istraživanje. Displastični madež karakteriziran je arhitektonskim poremećajem i umjerenom citološkom atipijom (A, B). Melanom *in situ* prikazuje konfluentnu proliferaciju melanocita s izraženom atipijom duž bazalnog sloja epidermisa, uz pagetoidno širenje melanocita, ali bez invazivne komponente (C, D). Invazivni dijelovi BRAF+ i BRAF– melanoma sastoje se od kohezivnih nakupina neoplastičnih melanocita (E – H). Slika je iz istraživanja za doktorat.

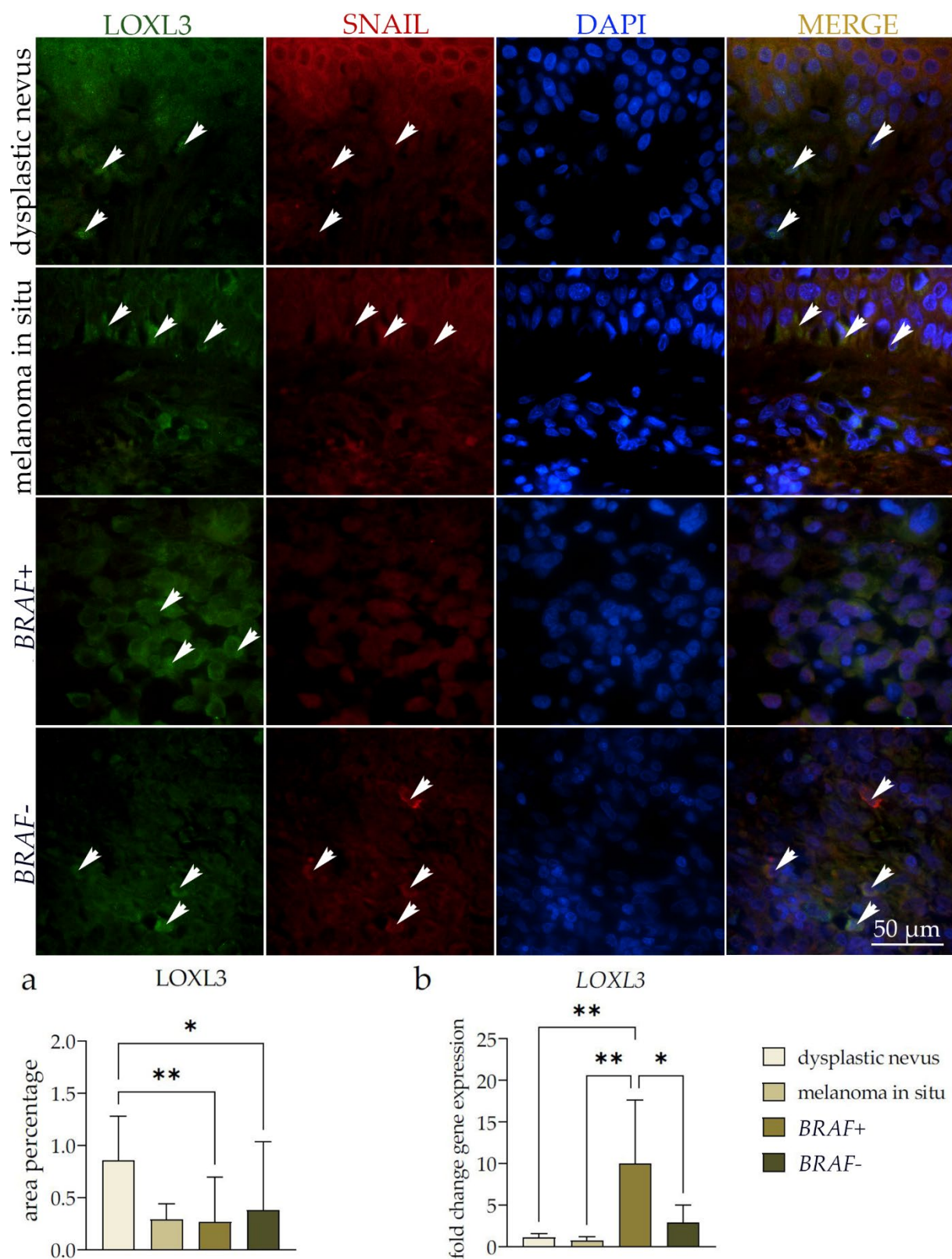
4.2. Izražaj LOXL3

Obrazac imunofluorescencijske obojenosti proteina LOXL3 u svim je analiziranim tkivnim uzorcima varirao od negativnoga do točkastoga u području jezgre i citoplazme. Signal obojenja proteina LOXL3 bio je široko raspoređen kroz sve slojeve epidermisa u stanicama gnijezda melanocita displastičnih madeža te u tumorskim stanicama bazalnoga sloja epidermisa u uzorcima melanoma *in situ*. U usporedbi s ostalim uzorcima tkiva, najsnažnija imunoreaktivnost LOXL3 zabilježena je u epitelu uzoraka BRAF+ i BRAF– metastatskih melanoma.

Suizražaj LOXL3 i SNAI1 uočen je sporadično u perinuklearnome području svih analiziranih uzoraka tkiva. Statistički značajno najveći postotni udio površine prekrivene

signalom LOXL3 zabilježen je u displastičnome madežu u usporedbi s BRAF⁺ ($P = 0,006$) i BRAF⁻ melanomom ($P = 0,027$) (Slika 7a).

Analiza izražaja gena metodom RT-qPCR pokazala je statistički značajno višu relativnu ekspresiju gena *LOXL3* u BRAF⁺ melanomu u odnosu na BRAF⁻ melanom ($P = 0,021$), displastični madež ($P = 0,004$) i melanom *in situ* ($P = 0,002$) (Slika 7b).



Slika 7. Imunoekspresija signala proteina LOXL3, SNAIL i DAPI te slika preklopljenih (engl. *Merge*) signala imunoekspresije LOXL3, SNAIL i DAPI u displastičnome madežu, melanomu *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanomu. Strelice označavaju obrasce izražaja LOXL3 i SNAIL u tkivu kože. Suizražaj proteina prikazan je strelicama na mikrofotografijama s preklopljenim

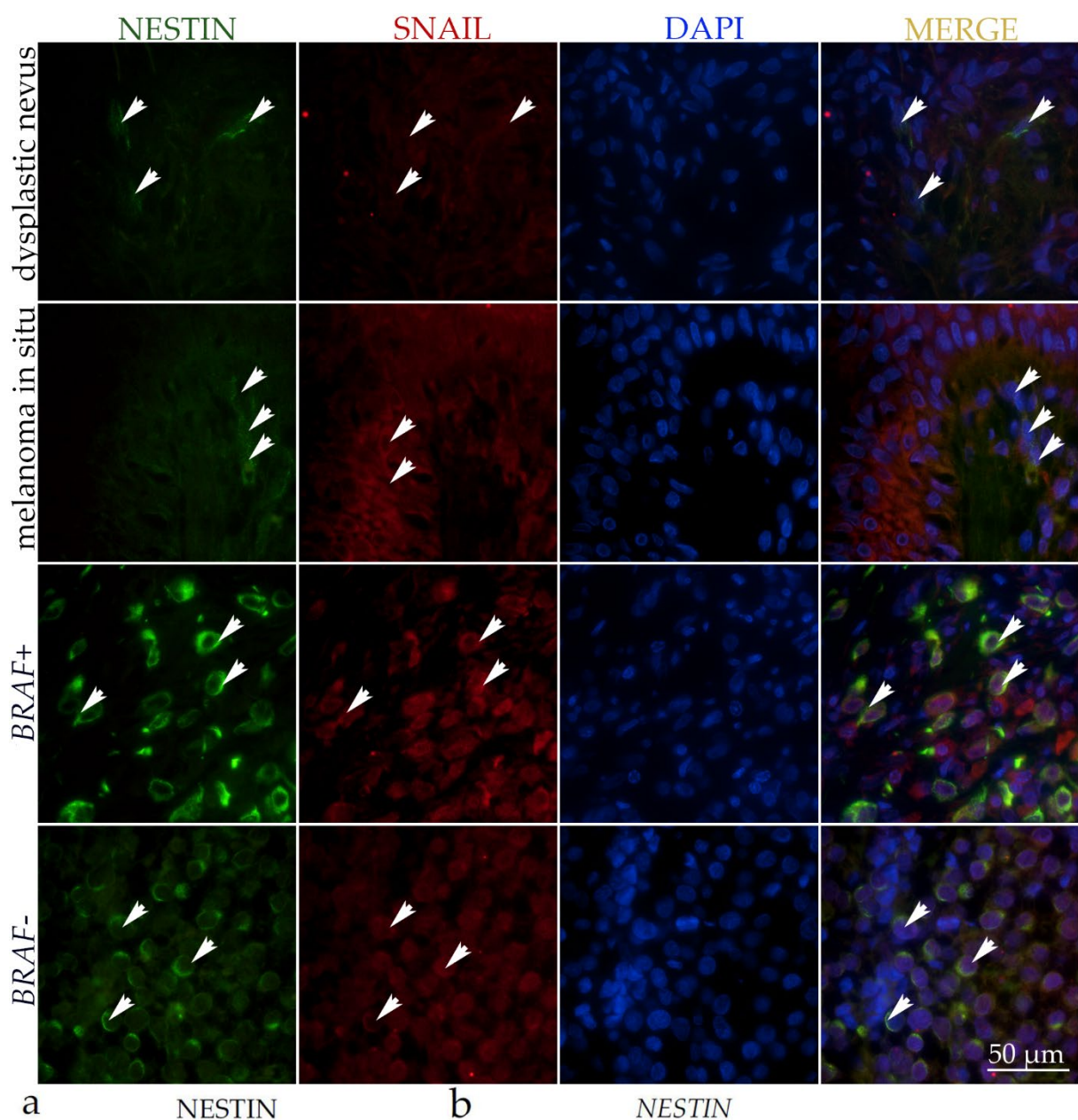
signalima imunoekspresije. Mikrofotografije su snimljene pri povećanju $\times 1000$. Postotci površine presjeka prekriveni pozitivnim signalom LOXL3 prikazani su u dijagramu a. U svakoj je skupini analizirano deset reprezentativnih mikrofotografija. Usporedba relativne promjene izražaja mRNK za *LOXL3* između displastičnog madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanoma prikazana je u dijagramu b. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) te analizirani jednosmjernom analizom varijance s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su s $P < 0,05$, * $P < 0,01$. Slika je iz istraživanja za doktorat.

4.3. Izražaj NES

Obrazac imunofluorescencijske obojenosti proteina nestina bio je prisutan kao blago difuzno obojenje koje se sporadično pojavljivalo u tumorskim stanicama gnijezda melanocita displastičnih madeža i melanoma *in situ*. U uzorcima BRAF+ melanoma uočeno je jako difuzno citoplazmatsko obojenje (Slika 8). U usporedbi s ostalim promatranim skupinama uzoraka, naj snažnija je imunoreaktivnost zabilježena u epitelu uzoraka BRAF+ melanoma, dok je umjerena imunoreaktivnost uočena u uzorcima BRAF– melanoma.

Suizražaj proteina NES i SNAI1 uočen je u stanicama melanoma (Slika 8). Postotni udio površine s pozitivnim signalom NES i analiza metodom RT-qPCR pokazali su slične rezultate u svim analiziranim skupinama uzoraka. Uzorci BRAF+ melanoma pokazali su statistički značajno veći postotni udio NES-pozitivnih stanica u odnosu na displastični madež ($P = 0,020$) i melanom *in situ* ($P = 0,016$) (Slika 8a).

Usporedbom relativne promjene izražaja mRNK za *NES* u svim analiziranim tkivima utvrđena je statistički značajno viša vrijednost ekspresije gena *NES* u BRAF+ melanomu u odnosu na displastični madež ($P = 0,036$) i melanom *in situ* ($P = 0,037$) (Slika 8b).



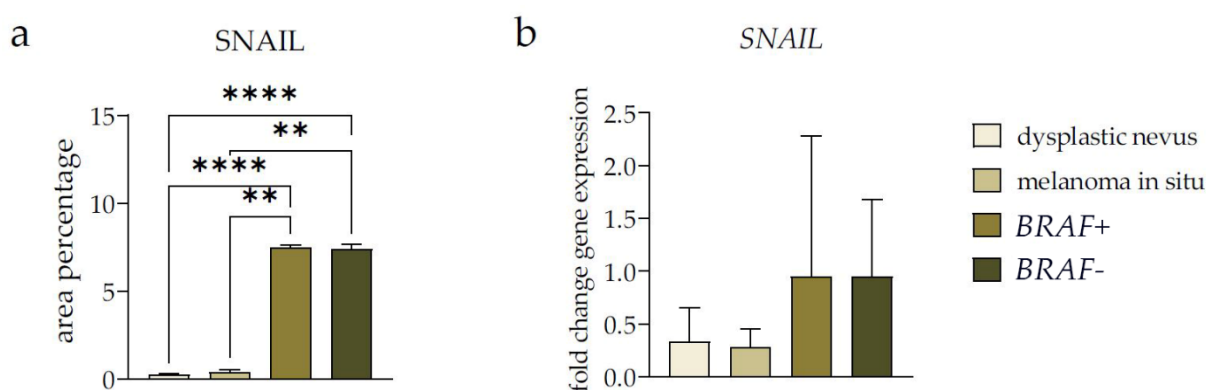
Slika 8. Imunoekspresija signala proteina NES, SNAIL i DAPI te slika preklopljenih signala imunoekspresije NES, SNAIL i DAPI u displastičnome madežu, melanomu *in situ* te BRAF+ i BRAF- melanomu. Strelice prikazuju obrasce izražaja NES i SNAIL u tkivu kože, dok strelice na preklopljenim mikrofotografijama označavaju područja gdje je zabilježen suizražaj tih dvaju

proteina. Mikrofotografije su snimljene pri povećanju $\times 1000$. Postotci površine presjeka prekriveni pozitivnim signalom NES prikazani su u dijagramu a. U svakoj je skupini analizirano deset reprezentativnih mikrofotografija. Usporedba relativne promjene izražaja mRNK za *NES* između displastičnog madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanoma prikazana je u dijagramu b. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) te analizirani jednosmjernom analizom varijance s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su s $P < 0,05$, * $P < 0,01$. Slika je iz istraživanja za doktorat.

4.4. Izražaj SNAI1

Imunofluorescencijski obrazac obojenosti proteina SNAI1 bio je prisutan kao točkasto obojenje jezgre i citoplazme u svim analiziranim uzorcima tkiva. U uzorcima BRAF+ melanoma uočeno je jako difuzno citoplazmatsko obojenje (Slika 8). Polukvantitativna analiza pokazala je umjerenu imunoreaktivnost u stanicama BRAF+ i BRAF– melanoma u usporedbi s ostalim promatranim skupinama.

Postotni udio stanica s pozitivnim signalom SNAI1 bio je statistički značajno viši u uzorcima BRAF+ i BRAF– melanoma u usporedbi s displastičnim madežom ($P < 0,01$) i melanomom *in situ* ($P < 0,001$) (Slika 9a). Analiza metodom RT-qPCR potvrdila je izražaj mRNK *SNAI1* u svim ispitivanim tkivima, bez statistički značajne razlike u relativnoj promjeni izražaja gena između uspoređivanih skupina. Najviša razina ekspresije mRNK *SNAI1* zabilježena je u BRAF+ i BRAF– melanomima (Slika 9b).



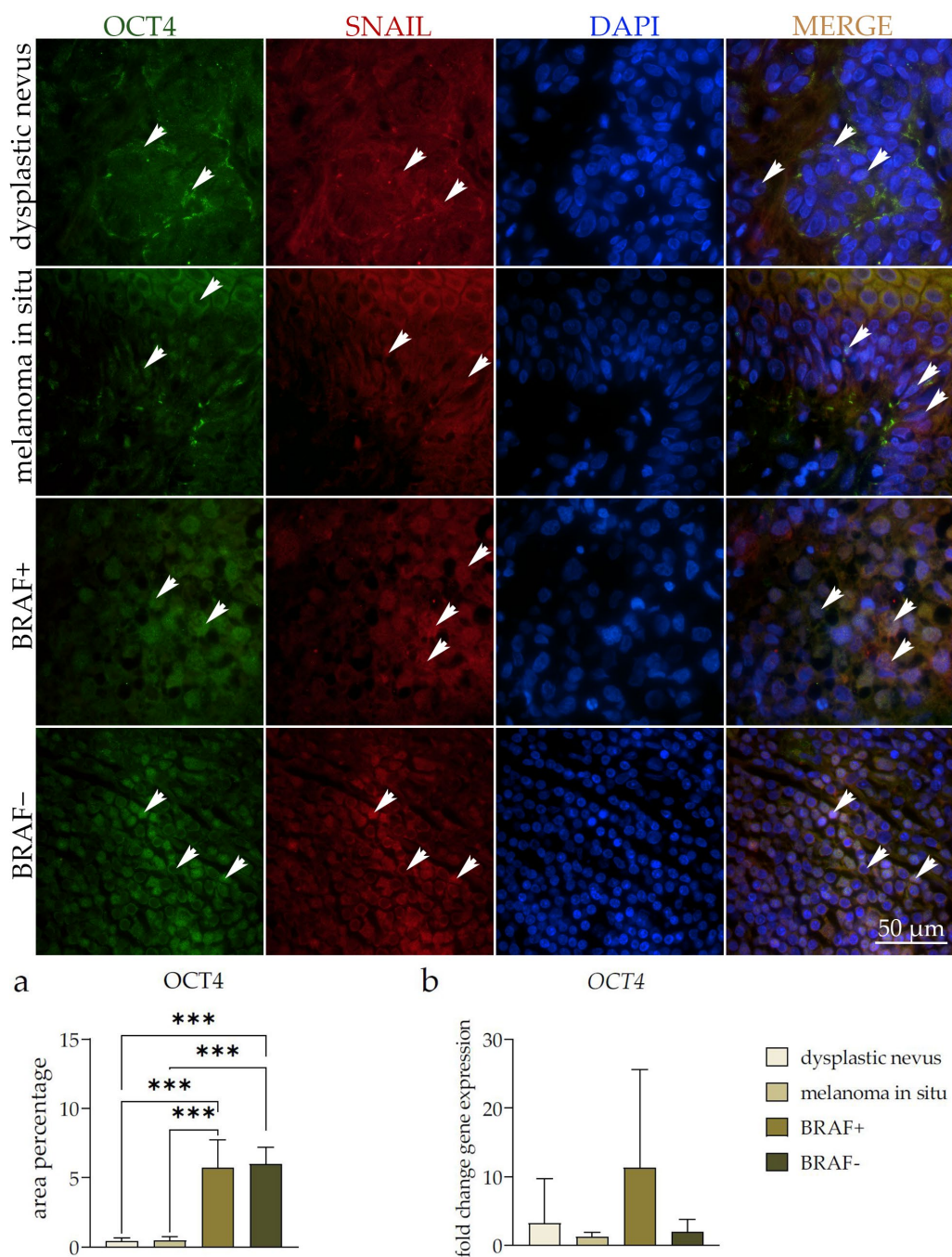
Slika 9. Postotci površine presjeka prekriveni pozitivnim signalom za SNAI1 prikazani su u dijagramu a. U svakoj je skupini analizirano deset reprezentativnih mikrofotografija. Usporedba relativne promjene izražaja mRNK za *SNAI1* između displastičnog madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanoma prikazana je u dijagramu b. Podaci su

prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) te analizirani jednosmjernom analizom varijance s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$. Slika je iz istraživanja za doktorat.

4.5. Izražaj OCT4

Protein OCT4 bio je izražen kao zeleni točkasti signal u jezgrama i citoplazmi stanica unutar tumorskih nakupina, u stromi te u endotelu krvnih žila strome (Slika 10). Suizražaj OCT4 i SNAI1 uočen je u svim analiziranim uzorcima tkiva.

Postotni udio stanica s pozitivnim signalom OCT4 bio je statistički značajno viši u uzorcima BRAF⁺ i BRAF⁻ melanoma u usporedbi s displastičnim madežom i melanomom *in situ* ($P < 0,001$) (Slika 10a). Analiza metodom RT-qPCR pokazala je izražaj mRNK *OCT4* u svim analiziranim uzorcima, bez značajne razlike u relativnoj promjeni ekspresije gena između promatranih fenotipova (Slika 10b).



Slika 10. Imunoekspresija signala proteina OCT4, SNAIL i DAPI te slika preklopljenih signala imunoekspresije OCT4, SNAIL i DAPI u displastičnome madežu, melanomu *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanomu. Strelice prikazuju obrasce izražaja OCT4 i SNAIL u tkivu kože. Suizražaj proteina prikazan je strelicama na mikrofotografijama s preklopljenim signalima imunoekspresije. Mikrofotografije su snimljene pri povećanju $\times 1000$. Postotci površine presjeka prekriveni pozitivnim signalom OCT4 prikazani su u dijagramu a. U svakoj je skupini analizirano deset reprezentativnih mikrofotografija. Usporedba relativne promjene izražaja mRNK za *OCT4* između displastičnog madeža, melanoma *in situ* te BRAF+ i BRAF– melanoma prikazana je u dijagramu b. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD

(okomita crta) te analizirani jednosmjernom analizom varijance s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su s *** $P < 0,001$. Slika je iz istraživanja za doktorat.

Zbirni prikaz izražaja svih analiziranih biljega na proteinskoj i transkripcijskoj razini, po istraživanim skupinama, prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Zbirni prikaz izražaja biljega LOXL3, NES, SNAI1 i OCT4 na proteinskoj i transkripcijskoj razini po ispitivanim skupinama.

Biljeg	DM	MIS	BRAF+	BRAF–	Najviši izražaj
LOXL3	↑↑↑	↑	↑	↑	displastični madež*
<i>LOXL3</i>	↑	↑	↑↑↑	↑	BRAF+ melanom*
nestin	↑	↑	↑↑↑	↑↑	BRAF+ melanom*
<i>NES</i>	↑	↑	↑↑↑	↑	BRAF+ melanom*
SNAI1	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	BRAF+ i BRAF–*
<i>SNAI1</i>	↑	↑	↑↑	↑↑	BRAF+ i BRAF– (n. z.)
OCT4	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	BRAF+ i BRAF–*
<i>OCT4</i>	↑	↑	↑	↑	bez razlike (n. z.)

DM – displastični madež; MIS – melanom in situ; n. z. – razlika nije statistički značajna.

Strelice označavaju relativnu razinu izražaja (↑ niska, ↑↑ umjerena, ↑↑↑ visoka / najviša). *

statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u odnosu na ostale skupine. Imena gena pisana su kurzivom, a proteina uspravno.

5. RASPRAVA

S porastom incidencije melanoma, jednog od najzloćudnijih tumora u ljudi te sve većim brojem mogućnosti liječenja i potencijalom ciljanja specifičnih proteina, razumijevanje njegove tumorigeneze nikada nije bilo važnije. Pregledom literature sve je više dokaza koji upućuju na to da se određeni biljezi, poput LOXL3, SNAI1 i NES, povezuju s nastankom i progresijom melanoma. Unatoč tomu, njihove specifične uloge, kao ni izražaj i suizražaj tih biljega u različitim skupinama melanoma i u displastičnim madežima kao prekursorima melanoma, nisu dosad temeljito istraženi.

Naše se istraživanje temelji na dvjema komplementarnim eksperimentalnim metodama, imunofluorescenciji i analizi izražaja gena metodom RT-qPCR, kojima smo na proteinskoj i transkripcijskoj razini ispitali izražaj LOXL3, SNAI1, NES i OCT4 te njihov suizražaj u displastičnim madežima, melanomu *in situ* te BRAF⁺ i BRAF⁻ melanomu. Isti su se metodološki pristupi pokazali vrijednima i u nedavnom istraživanju Vázquez-Naharra i suradnika (20), koji su na genetski modificiranom mišjem modelu melanoma istražili ulogu gena *Loxl3* u progresiji i diseminaciji bolesti. Na tom je modelu, u kontekstu aktivirajuće mutacije *Braf* V600E i gubitka *Pten*, delecija gena *Loxl3*, specifična za melanocyte, produljila latenciju nastanka melanoma, smanjila rast tumora i ograničila metastatsku diseminaciju u limfne čvorove. Dopunska istraživanja na mišjem modelu melanoma potvrdila su doprinos gena *Loxl3* progresiji i metastaziranju melanoma, dijelom regulacijom fenotipske preobrazbe (engl. *phenotype switching*) posredovane transkripcijskim čimbenicima *Snail* i *Prrx1*, pri čemu je u humanom melanomu prepoznata i nova os LOXL3-SNAI1-PRRX1, za koju se pretpostavlja da pridonosi staničnoj plastičnosti zloćudnih melanocita i dodatno funkcionalno povezuje LOXL3 i SNAI1. U skladu s tim, utišavanje gena *Loxl3* u staničnim linijama melanoma dovelo je do izrazitog smanjenja izražaja *Snail* u odnosu na kontrolu, što je potvrđeno i na proteinskoj razini te upućuje na to da bi *Loxl3* mogao regulirati izražaj i aktivnost *Snail* i tako poticati EMT i progresiju melanoma (20). Taj je odnos u skladu s ranijim spoznajama prema kojima srodni enzimi LOXL2 i LOXL3 izravno stupaju u interakciju sa SNAI1 i surađuju s njime u poticanju EMT-a i smanjenju izražaja E-kadherina (126).

Nestin je intermedijarni filament izvorno povezan s neuralnim matičnim i progenitorskim stanicama, koji je danas prepoznat kao biljeg tumorskih matičnih stanica čiji izražaj korelira s uznapredovalim stadijima brojnih zloćudnih tumora, uključujući melanom (127). U melanomu je izraženiji nego u dobroćudnim melanocitnim promjenama, a njegova se imunoreaktivnost pojačava s napredovanjem bolesti (128). Pojačan izražaj nestina pokazao se pouzdanim biljekom sklonosti metastaziranju i nepovoljnoj prognozi; u istraživanju na 130 primarnih melanoma i 32 metastaze melanoma u limfnim čvorovima, pozitivnost nestina u

stadijima I i II upućivala je na kraće preživljenje (22), a slično su potvrdili i Yamamoto i suradnici, u čijem je istraživanju pozitivan imunohistokemijski izražaj nestina, uz fascin i stariju životnu dob, bio statistički značajno povezan s pojavom metastaza (129). Funkcionalnu podlogu tih opažanja razjasnila su istraživanja na staničnim linijama humanog melanoma, u kojima je utišavanje izražaja nestina dovelo do smanjenja rasta, migracije i invazivnosti tumorskih stanica, što upućuje na to da nestin aktivno pridonosi metastatskom potencijalu melanoma (130).

Transkripcijski čimbenik OCT4 ključan je regulator pluripotentnosti i samoobnove embrionalnih matičnih stanica (111). Njegova je patološka reaktivacija prepoznata kao obilježje tumorskih matičnih stanica u brojnim zloćudnim tumorima, u kojima se pojačan izražaj povezuje s nižim stupnjem diferencijacije, sklonošću metastaziranju i nepovoljnom prognozom (23). U melanomu, tumoru izrazite stanične plastičnosti, OCT4 se povezuje s agresivnim biološkim ponašanjem. U istraživanju na bolesnicima s melanomom pozitivan izražaj OCT4 u jezgri tumorskih stanica bio je značajno povezan s prognostički nepovoljnim čimbenicima, debljinom tumora po Breslowu, razinom invazije po Clarku, ulceracijom i metastaziranjem, pri čemu je preživljenje bolesnika s pozitivnim jezgrinim izražajem OCT4 iznosilo 56 %, naspram 94,2 % u bolesnika s niskim izražajem (120). Funkcionalna istraživanja na staničnim linijama melanoma pokazala su da prekomjeren izražaj OCT4 (zajedno s NANOG-om) povećava pokretljivost i transendotelnu migraciju stanica stjecanjem ameboidnog načina kretanja, čime pridonosi njihovoj invazivnosti i agresivnosti (131). Budući da OCT4 potiče stjecanje obilježja matičnih stanica i sudjeluje u EMT-u, pretpostavlja se da bi mogao djelovati usklađeno s drugim regulatorima EMT-a, poput SNAI1, u održavanju invazivnog i slabo diferenciranog fenotipa stanica melanoma (131, 132).

Naše je istraživanje pokazalo znatan porast izražaja LOXL3 u BRAF⁺ melanomu u usporedbi s BRAF⁻ melanomom, displastičnim madežima i melanomom *in situ*. Taj nalaz upućuje na važnu ulogu LOXL3 u nastanku i progresiji melanoma, od prekursorskih promjena i *in situ* tumora do metastatske bolesti, što je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja (20, 92). Povezanost prekomjernog izražaja LOXL3 sa zloćudnom preobrazbom besmrtnih humanih melanocita izvorno je opisana na staničnim linijama. U melanocitima s mutacijom *BRAF* V600E (stanice HME1) prekomjeren je izražaj LOXL3 znatno pojačao rast neovisan o supstratu, prepoznatljivo obilježje zloćudne preobrazbe, te potaknuo migraciju i invazivnost stanica, dok je smanjenje njegova izražaja u tumorskim stanicama produljilo latenciju i usporilo rast tumora (92). Ti nalazi pokazuju da LOXL3 surađuje s onkogeno aktiviranim BRAF-om u zloćudnoj preobrazbi melanocita. Suradnja gena *Loxl3* i onkogen *Braf*, jedne od najčešćih

mutacija u humanom melanomu, potvrđena je i na genetski modificiranim mišjim modelima, na kojima je olakšavala razvoj i progresiju tumora (20). Usklađenost našeg nalaza s ulogom LOXL3 u progresiji melanoma dodatno potkrepljuje istraživanje Zhanga i suradnika (132), provedeno na tkivnom mikronizu (engl. *tissue microarray*) od 373 biopsije u različitim stadijima melanocitnih promjena, uz funkcionalne pokuse na staničnim linijama melanoma. Jači citoplazmatski izražaj proteina LOXL3 bio je povezan s uznapredovalim stadijima bolesti ($P < 0,001$), većom debljinom tumora i učestalijim mitozama, a bolesnici s višim izražajem LOXL3 imali su značajno lošiju prognozu ($P = 0,043$), pri čemu se LOXL3 u multivarijantnoj analizi pokazao neovisnim prognostičkim čimbenikom za preživljenje bolesnika s primarnim melanomom ($P = 0,04$). Funkcionalnu su podlogu tih opažanja potvrdili pokusi u kojima je utišavanje izražaja LOXL3 u staničnim linijama melanoma (A375 i WM-115) smanjilo proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica (132). Valja istaknuti da taj nalaz nije posve u skladu s navedenim rezultatima, budući da smo najviši izražaj proteina LOXL3 utvrdili u displastičnim madežima u usporedbi sa svim istraživanim podtipovima melanoma. Jedno od mogućih objašnjenja te razlike jest izbor referentne skupine: za razliku od istraživanja koja kao polazište uzimaju zdravu kožu, u našem su istraživanju referentnu točku činili displastični madeži, koji se smatraju prekursorima melanoma i u kojima je izražaj LOXL3 mogao već biti povišen (25, 133). K tome, naš se nalaz povišenog izražaja proteina LOXL3 u displastičnim madežima odnosi na proteinsku razinu, dok je na razini izražaja gena *LOXL3* najviša vrijednost zabilježena u BRAF+ melanomu. Takvo neslaganje između proteinske i transkripcijske razine nije neuobičajeno i može imati više bioloških uzroka (134). Razina mRNK ne mora se nužno podudarati s količinom funkcionalnog proteina, budući da glasnička RNK ne mora biti učinkovito prevedena, a novonastali protein može podlijevati posttranslacijskim preinakama, razgradnji ili promjenama stanične lokalizacije, zbog čega postaje slabije uočljiv imunofluorescencijom. S druge strane, već sintetizirani proteini mogu imati razmjerno dug poluvijek, što omogućuje njihovu trajnu imunoreaktivnost čak i kada su razine pripadajuće mRNK snižene. U skladu s tim, visok izražaj proteina LOXL3 uz nižu razinu mRNK u displastičnim madežima mogao bi odražavati nakupljanje stabilnog proteina dugog poluvijeka, dok visoka razina mRNK uz nešto slabiji proteinski signal u BRAF+ melanomu može upućivati na pojačanu transkripciju gena *LOXL3* koja još nije u cijelosti prevedena u protein ili na ubrzani obrt proteina (engl. *protein turnover*). Stoga proteinski i transkripcijski profil istoga biljega mogu odražavati različite faze njegove regulacije, što treba uzeti u obzir pri tumačenju izražaja LOXL3, ali i ostalih analiziranih biljega.

Najviši izražaj nestina u našem je istraživanju zabilježen u BRAF+ melanomu, u usporedbi s displastičnim madežima i melanomom *in situ*, dok između BRAF– skupine i ostalih skupina nije bilo statistički značajnih razlika. Sukladan je obrazac uočen i na transkripcijskoj razini, gdje je izražaj mRNK za *NES* bio značajno viši u BRAF+ melanomu nego u displastičnom madežu i melanomu *in situ*. Ti su rezultati u skladu s nalazima prijašnjih istraživanja: izražaj nestina u humanim je melanomima prvi put dokumentiran još devedesetih godina (135), a kasnija su istraživanja pokazala da se izražaj ovoga biljega postupno povećava tijekom napredovanja melanocitnih promjena, viši je u zloćudnim melanomima nego u dobroćudnim madežima te u metastatskim u odnosu na primarne tumore (136, 137). Takav stupnjeviti porast upućuje na ulogu nestina kao biljega progresije bolesti, pri čemu njegov izražaj prati svaki korak pretpostavljenoga razvoja tumora. S obzirom na to da displastični madeži predstavljaju prijelazni stupanj između dobroćudnih madeža i melanoma, u budućim bi istraživanjima bilo vrijedno usporediti izražaj nestina u dobroćudnim i displastičnim madežima te tako pobliže odrediti u kojoj se fazi melanocitne transformacije njegov izražaj počinje povećavati.

Izražaj *SNAIL* ispitali smo u displastičnim madežima i podskupinama melanoma te utvrdili viši izražaj proteina *SNAIL* u uzorcima BRAF+ i BRAF– melanoma nego u displastičnim madežima i melanomu *in situ*. Taj je nalaz u skladu s ranijim istraživanjem učinka prekomjernog izražaja *SNAIL* na humane stanične linije melanoma u hipoksičnim uvjetima, u kojem je povišen izražaj *SNAIL*, reguliran čimbenikom HIF-2 α , doveo do stjecanja obilježja stanica nalik tumorskim matičnima te do povećane sposobnosti migracije i metastaziranja (138). Time se potvrđuje uloga *SNAIL* kao snažnog represora epitelnih obilježja koji tumorske stanice aktiviraju kako bi se odvojile od susjednih stanica i stekle pokretljiv, invazivan fenotip (21, 105). Kao jedan od ključnih transkripcijskih čimbenika EMT-a, *SNAIL* u melanomu pokreće fenotipsku preobrazbu i pridonosi otpornosti na liječenje (139, 140). Sukladan obrazac uočili smo i na transkripcijskoj razini: izražaj mRNK za *SNAIL* bio je prisutan u svim ispitanim tkivima, a najviše vrijednosti, premda bez statistički značajne razlike među skupinama, zabilježene su u BRAF+ i BRAF– melanomu. Za razliku od *LOXL3*, kod kojega su se proteinska i transkripcijska razina razilazile, izražaj *SNAIL* pokazao je istosmjern trend na objema razinama, najviši u melanomu, što dodatno potkrepljuje njegovu ulogu u progresiji bolesti. Izostanak statistički značajne razlike na transkripcijskoj razini, uz jasniji obrazac na proteinskoj, može se, kao i pri tumačenju izražaja *LOXL3*, pripisati nepodudaranju razina mRNK i funkcionalnog proteina, primjerice, neučinkovitoj translaciji, posttranslacijskim preinakama i razgradnji proteina te razlikama u njihovu poluvijeku (134). Osim toga,

ograničena veličina uzorka mogla je pridonijeti varijabilnosti rezultata i dodatno naglasiti nesklad između dviju metoda.

U našem je istraživanju OCT4 bio izražen u jezgrama i citoplazmi tumorskih stanica, ali i u stromi te u endotelu krvnih žila, a postotni udio OCT4-pozitivnih stanica bio je statistički značajno viši u BRAF+ i BRAF– melanomu nego u displastičnim madežima i melanomu *in situ* ($P < 0,001$). Takav obrazac, s porastom izražaja OCT4 u invazivnim i metastatskim melanomima u odnosu na prekursorske promjene, u skladu je s dosadašnjim saznanjima o ulozi OCT4 u melanomu. Pokazano je da se OCT4 izražava u podskupini tumorskih stanica melanoma, pretežno u uznapredovalim stadijima bolesti; u jednom je istraživanju OCT4-pozitivne stanice bilo moguće otkriti u melanomima vertikalne faze rasta i metastatskim melanomima, ali ne i u melanomima radijalne faze rasta, što upućuje na povezanost izražaja OCT4 s progresijom bolesti (141). Osim toga, u melanomu se izražaj OCT4 povezuje s prognostički nepovoljnim obilježjima: pozitivan izražaj OCT4 u jezgri tumorskih stanica značajno je povezan s debljinom tumora po Breslowu, Clarkovom razinom invazije, ulceracijom i metastaziranjem te s kraćim preživljenjem bolesnika (120). Funkcionalna istraživanja rasvjetljavaju moguću ulogu OCT4 u opaženom obrascu. Pokazano je da već samo eksperimentalno povećanje izražaja OCT4 dovodi do dediferencijacije stanica melanoma u one nalik tumorskim matičnim stanicama, praćene reaktivacijom drugih embrionalnih transkripcijskih čimbenika, poput NANOG-a i KLF4, te povećanom tumorigenom i metastatskom sposobnošću; pritom je izražaj OCT4 u melanomu reguliran hipoksijom (141). U skladu s ulogom OCT4 u održavanju matičnih svojstava stanica, njegov pojačan izražaj, zajedno s NANOG-om, povećava pokretljivost i transendotelnu migraciju stanica melanoma stjecanjem ameboidnog načina kretanja (131). Time se može objasniti zašto je izražaj OCT4 izraženiji u agresivnijim, metastatskim melanomima, obrazac kakav smo uočili i u našem istraživanju. Za razliku od proteinske razine, analiza metodom RT-qPCR pokazala je izražaj mRNA za *OCT4* u svim analiziranim uzorcima, no bez statistički značajne razlike među promatranim skupinama. Takvo neslaganje proteinske i transkripcijske razine, kao što je već razmotreno pri tumačenju izražaja LOXL3 i SNAI1, može se pripisati nepodudaranju razina mRNA i funkcionalnog proteina, odnosno posttranslacijskim mehanizmima i razlikama u stabilnosti i poluvijeku proteina (134). Tomu valja pridodati i osobitost gena *OCT4*: za njega je opisan velik broj pseudogena i transkripcijskih inačica, zbog čega tumačenje njegova izražaja na transkripcijskoj razini može biti otežano i zahtijeva oprez (142). Naposljetku, suizražaj OCT4 i SNAI1 uočili smo u svim analiziranim uzorcima. O mogućem značenju toga nalaza podrobnije raspravljamo u nastavku, u kontekstu suizražaja svih analiziranih biljega.

Zanimljivo je da smo izražaj OCT4 uočili ne samo u tumorskim stanicama, nego i u stanicama strome te u endotelu krvnih žila. Sličan je obrazac opisan i u metastatskom melanomu, gdje su OCT4-pozitivne subpopulacije stanica nalik tumorskim matičnima utvrđene unutar tumorskih nakupina, u peritumorskoj stromi te u endotelu tumorskih krvnih žila (143). Takva raspodjela upućuje na to da OCT4-pozitivne stanice nisu ograničene na sam tumorski parenhim, što bi moglo odražavati njihovu ulogu u staničnoj plastičnosti i u oblikovanju tumorskoga mikrokoliša.

Središnji cilj našega istraživanja bio je ispitati suizražaj biljega LOXL3, NES, OCT4 i SNAI1 u razvoju melanoma te njihovu pretpostavljenu ulogu u EMT-u. Pregledom dostupne literature nismo pronašli prijašnja istraživanja koja bi opisivala suizražaj ovih biljega, premda su svi povezani s istim procesom EMT-a, koji predstavlja važnu prekretnicu u progresiji tumora.

U našem smo istraživanju utvrdili suizražaj LOXL3 i SNAI1 u perinuklearnom području svih istraživanih podskupina te suizražaj NES i SNAI1 u stanicama melanoma. Osim toga, suizražaj OCT4 i SNAI1 uočili smo u svim analiziranim uzorcima tkiva. Ti nalazi, u kombinaciji s ranijim spoznajama prema kojima LOXL3 i SNAI1 olakšavaju odvajanje i migraciju stanica iz primarnog melanoma (20, 104), dok nestin pojačava pokretljivost stanica i njihovu strukturnu reorganizaciju (144, 145), upućuju na određenu razinu međuovisnosti ili suradnje tih biljega tijekom EMT-a u melanomu. Suizražaj OCT4 i SNAI1 osobito je zanimljiv jer povezuje održavanje matičnih svojstava stanica s procesom EMT-a. Budući da OCT4 potiče dediferencijaciju i stjecanje obilježja tumorskih matičnih stanica (141), a SNAI1, uz pokretanje EMT-a i gubitak epitelnih obilježja, doprinosi i stjecanju svojstava nalik matičnima (106, 146), njihov istodobni izražaj u istim stanicama upućuje na moguće usklađeno djelovanje dvaju procesa koji zajedno pridonose invazivnom i slabo diferenciranom fenotipu stanica melanoma. Takvo opažanje otvara mogućnost da su matična svojstva i pokretljivost zloćudnih melanocita regulirani povezanim, možda i međuovisnim mehanizmima.

Naposljetku, spoznaje o ulozi LOXL3 u nastanku i progresiji melanoma, kojima pridonose i naši nalazi, otvaraju pitanje njegove vrijednosti kao potencijalne terapijske mete. Cijela je porodica lizil-oksidaza posljednjih godina prepoznata kao privlačna meta u onkologiji, budući da svojom izvanstaničnom katalitičkom aktivnošću preoblikuje izvanstanični matriks i tumorski mikookoliš, a unutarstanično, mehanizmima neovisnima o toj aktivnosti, utječe na signalne putove i transkripciju gena povezanih s progresijom tumora (147). U tom je kontekstu razvijeno više malomolekularnih inhibitora lizil-oksidaza, uključujući pan-LOX inhibitore te spojeve usmjerene ponajprije na LOXL2, kao i monoklonsko protutijelo simtuzumab; premda

su pojedini od njih ušli u ranu fazu kliničkih ispitivanja, njihova je selektivnost prema pojedinim članovima porodice i dalje ograničena, a klinička učinkovitost dosad nije potvrđena (148). Specifičan inhibitor usmjeren na LOXL3, kao ni ciljanje ovoga enzima u melanomu, još nisu istraženi, što uz njegovu ulogu u zloćudnoj preobrazbi melanocita i suradnju s onkogeno aktiviranim BRAF-om predstavlja obećavajuće područje za buduća istraživanja. S obzirom na to da smo povišen izražaj LOXL3 utvrdili već u prekursorskim promjenama i ranim stadijima melanoma, ovaj bi biljeg mogao biti zanimljiv ne samo kao terapijska meta u uznapredovaloj bolesti, nego i kao pokazatelj rane zloćudne preobrazbe. Prekidanje kaskade koja vodi do EMT-a moglo bi znatno utjecati na preživljenje bolesnika oboljelih od melanoma, pa bi vrijednost LOXL3 i ostalih ispitivanih biljega kao potencijalnih terapijskih ciljeva valjalo dodatno istražiti, i to na većim uzorcima te u prospektivnim istraživanjima.

Naposljetku, razjašnjavanje točne naravi odnosa među ovim biljezima, njihove funkcionalne međuovisnosti, zajedničke regulacije ili tek istodobnoga izražaja, zahtijeva daljnja mehanistička istraživanja, koja bi mogla otkriti djeluju li unutar zajedničke regulacijske mreže ili tek supostoje u istim fazama progresije melanoma.

6. ZAKLJUČAK

U ovome smo istraživanju, primjenom metoda imunofluorescencije i analize izražaja gena metodom RT-qPCR, ispitali izražaj i suizražaj biljega LOXL3, SNAIL, NES i OCT4 na proteinskoj i transkripcijskoj razini u displastičnim madežima, melanomu *in situ* te BRAF+ i BRAF– metastatskom melanomu.

Utvdili smo da je izražaj gena *LOXL3* najviši u BRAF+ melanomu, dok je na proteinskoj razini LOXL3 bio najizraženiji u displastičnim madežima, što upućuje na njegovu ulogu već u ranim stadijima melanocitne transformacije te na složenu, posttranslacijski uvjetovanu regulaciju ovoga biljega. Izražaj nestina, i na proteinskoj i na transkripcijskoj razini, bio je najviši u BRAF+ melanomu, što potvrđuje njegovu povezanost s progresijom bolesti. SNAIL je bio izraženiji u metastatskim melanomima nego u displastičnim madežima i melanomu *in situ*, uz istosmjern trend na objema razinama, čime se potkrepljuje njegova uloga pokretača EMT-a. Izražaj OCT4 bio je značajno viši u metastatskim melanomima nego u prekursorskim promjenama, što ga povezuje s agresivnijim, slabije diferenciranim fenotipom tumora.

Najznačajniji doprinos ovoga istraživanja jest opažanje suizražaja ispitivanih biljega: utvdili smo suizražaj LOXL3 i SNAIL, NES i SNAIL te OCT4 i SNAIL u stanicama melanoma. Prema našim saznanjima, suizražaj ovih biljega dosad nije bio opisan, a upućuje na moguću međuovisnost procesa EMT i održavanja matičnih svojstava stanica tijekom nastanka i progresije melanoma. Osim toga, ovo je istraživanje, prema našim saznanjima, prvo koje je ispitalo izražaj navedenih biljega u displastičnim madežima kao prekursorima melanoma.

Dobiveni rezultati upućuju na to da LOXL3, SNAIL, NES i OCT4 sudjeluju u nastanku i progresiji melanoma te da bi mogli imati ulogu u njegovoj zloćudnoj preobrazbi. Njihov suizražaj otvara mogućnost postojanja zajedničkih ili povezanih regulacijskih mehanizama koji bi mogli predstavljati potencijalne terapijske ciljeve. Za potvrdu tih pretpostavki i razjašnjenje točne naravi odnosa među ovim biljezima potrebna su daljnja istraživanja na većem broju uzoraka, kao i funkcionalna i mehanistička ispitivanja.

7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Izražaj LOXL3, NES, SNAI1 i OCT4 u razvoju melanoma

Uvod/Ciljevi

Melanom je zloćudni tumor melanocita čija incidencija raste, a čije rano prepoznavanje i liječenje ovise o razumijevanju molekularnih mehanizama njegova nastanka i progresije. Lizil-oksidaza slična 3 (LOXL3), nestin (NES), SNAI1 i OCT4 biljezi su povezani s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (EMT) i stjecanjem obilježja tumorskih matičnih stanica, no njihov izražaj i suizražaj u različitim stupnjevima razvoja melanoma dosad nije bio sustavno istražen. Ciljevi ovoga istraživanja bili su analizirati izražaj i suizražaj biljega LOXL3, SNAI1, NES i OCT4 u displastičnim madežima, melanomu *in situ* te BRAF⁺ i BRAF[−] metastatskom melanomu.

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno na 45 formalinom fiksiranih i parafinom uklopljenih uzoraka tkiva s dijagnozom displastičnog madeža (N = 10), melanoma *in situ* (N = 15) i metastatskog melanoma (BRAF⁺ N = 10, BRAF[−] N = 10), prikupljenih u Kliničkome bolničkom centru Split od 2017. do 2020. godine. Izražaj proteina LOXL3, SNAI1, NES i OCT4 te njihov suizražaj ispitani su metodom imunofluorescencije, a izražaj pripadajućih gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom uz reverznu transkripciju (RT-qPCR). Podaci su analizirani odgovarajućim statističkim metodama.

Rezultati

Izražaj proteina i gena LOXL3 bio je povišen u BRAF⁺ melanomu u odnosu na ostale skupine, dok je najviši proteinski signal LOXL3 zabilježen u displastičnim madežima. Izražaj nestina bio je najviši u BRAF⁺ melanomu, na proteinskoj i na transkripcijskoj razini. Izražaj proteina SNAI1 bio je viši u BRAF⁺ i BRAF[−] melanomu nego u displastičnim madežima i melanomu *in situ*. Udio OCT4-pozitivnih stanica bio je statistički značajno viši u BRAF⁺ i BRAF[−] melanomu nego u displastičnim madežima i melanomu *in situ* ($P < 0,001$), uz izražaj i u stromi te endotelu krvnih žila. Suizražaj LOXL3 i SNAI1, NES i SNAI1 te OCT4 i SNAI1 uočen je u analiziranim uzorcima.

Zaključci

Izražaj biljega LOXL3, NES, SNAI1 i OCT4 povezan je s progresijom melanoma, pri čemu su najizraženije razlike zabilježene u metastatskom, osobito BRAF⁺ melanomu. Uočeni

suizražaj tih biljega upućuje na njihovo moguće usklađeno djelovanje u EMT-u i stjecanju matičnih svojstava stanica melanoma. Ovi nalazi doprinose razumijevanju tumorigeneze melanoma i ukazuju na potencijalnu vrijednost navedenih biljega kao mete za daljnja istraživanja i moguće terapijske pristupe.

Ključne riječi: displastični nevus; melanom; metastatski melanom; BRAF; LOXL3; nestin; SNAIL; OCT4; epitelno-mezenhimalna tranzicija; tumorske matične stanice

8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Uvod/Ciljevi

Melanom je najopasniji oblik raka kože, a broj oboljelih iz godine u godinu raste. Kako bi se bolest ranije prepoznala i uspješnije liječila, važno je razumjeti kako melanom nastaje i kako se širi. U tome mogu pomoći takozvani biljezi, molekule koje se pojavljuju u tumorskim stanicama i mogu ukazati na to koliko je tumor agresivan. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati četiri takva biljega (LOXL3, nestin, SNAI1 i OCT4) u različitim stupnjevima razvoja melanoma i vidjeti pojavljuju li se zajedno.

Metode

Analizirani su uzorci kože 45 bolesnika, i to madeži s promjenama koje se smatraju prethodnicom melanoma, rani melanomi te uznapredovali (metastatski) melanomi. Uzorci su prikupljeni u Kliničkome bolničkom centru Split. Na njima su primijenjene dvije laboratorijske metode: jedna koja pod posebnim mikroskopom prikazuje spomenute biljege u obliku obojenih signala, i druga koja mjeri njihovu aktivnost na razini gena.

Rezultati

Pokazalo se da su ispitivani biljezi bili izraženiji u uznapredovalim melanomima nego u ranim promjenama i madežima, što znači da njihova pojava prati napredovanje bolesti. Osim toga, biljezi su se često pojavljivali zajedno u istim stanicama, što upućuje na to da bi mogli surađivati u procesima koji tumoru omogućuju da raste i širi se.

Zaključci

Rezultati pokazuju da su ova četiri biljega povezana s napredovanjem melanoma i da bi njihova zajednička pojava mogla biti važna za razumijevanje načina na koji bolest postaje agresivnija. Takve spoznaje mogu u budućnosti pomoći u razvoju novih načina za procjenu težine bolesti i, potencijalno, novih ciljanih terapija.

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Expression of LOXL3, NES, SNAIL1 and OCT4 in melanoma development

Background/Objectives

Melanoma is a malignant tumour of melanocytes with rising incidence, whose early recognition and treatment depend on understanding the molecular mechanisms of its development and progression. Lysyl oxidase-like 3 (LOXL3), nestin (NES), SNAIL1 and OCT4 are markers associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the acquisition of cancer stem cell features, yet their expression and co-expression across the stages of melanoma development have not been systematically investigated. The aims of this study were to analyse the expression and co-expression of LOXL3, SNAIL1, NES and OCT4 in dysplastic nevi, melanoma *in situ*, and BRAF⁺ and BRAF[−] metastatic melanoma.

Materials and Methods

The study was performed on 45 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples diagnosed as dysplastic nevus (N = 10), melanoma *in situ* (N = 15), and metastatic melanoma (BRAF⁺ N = 10, BRAF[−] N = 10), collected at University Hospital Centre Split between 2017 and 2020. The protein expression of LOXL3, SNAIL1, NES and OCT4 and their co-expression were assessed by immunofluorescence, and the expression of the corresponding genes by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Data were analysed using appropriate statistical methods.

Results

LOXL3 protein and gene expression was increased in BRAF⁺ melanoma compared with the other groups, whereas the highest LOXL3 protein signal was recorded in dysplastic nevi. Nestin expression was highest in BRAF⁺ melanoma at both the protein and transcriptional level. SNAIL1 protein expression was higher in BRAF⁺ and BRAF[−] melanoma than in dysplastic nevi and melanoma *in situ*. The proportion of OCT4-positive cells was significantly higher in BRAF⁺ and BRAF[−] melanoma than in dysplastic nevi and melanoma *in situ* ($P < 0.001$), with expression also observed in the stroma and vascular endothelium. Co-expression of LOXL3 and SNAIL1, NES and SNAIL1, and OCT4 and SNAIL1 was observed in the analysed samples.

Conclusions

The expression of LOXL3, NES, SNAI1 and OCT4 is associated with melanoma progression, with the most pronounced differences observed in metastatic, particularly BRAF+ melanoma. The observed co-expression of these markers suggests their possible coordinated role in EMT and in the acquisition of stem cell features by melanoma cells. These findings contribute to the understanding of melanoma tumorigenesis and point to the potential value of these markers as targets for further research and possible therapeutic approaches.

Keywords: dysplastic nevus; melanoma; metastatic melanoma; BRAF; LOXL3; nestin; SNAI1; OCT4; epithelial-mesenchymal transition; cancer stem cells

10. LAIČKI SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Background/Objectives

Melanoma is the most dangerous form of skin cancer, and the number of people affected is rising every year. To detect the disease earlier and treat it more successfully, it is important to understand how melanoma develops and spreads. So-called markers, molecules that appear in tumour cells, can help by indicating how aggressive a tumour is. The aim of this study was to examine four such markers (LOXL3, nestin, SNAIL and OCT4) at different stages of melanoma development and to see whether they appear together.

Methods

Skin samples from 45 patients were analysed, including moles with changes considered to be a precursor of melanoma, early melanomas, and advanced (metastatic) melanomas. The samples were collected at University Hospital Centre Split. Two laboratory methods were used: one that shows these markers as coloured signals under a special microscope, and another that measures their activity at the gene level.

Results

The markers studied were more strongly expressed in advanced melanomas than in early changes and moles, meaning that their appearance follows the progression of the disease. In addition, the markers frequently appeared together in the same cells, suggesting that they may cooperate in the processes that allow a tumour to grow and spread.

Conclusions

The results show that these four markers are linked to melanoma progression and that their joint appearance may be important for understanding how the disease becomes more aggressive. Such findings may, in the future, help in developing new ways to assess the severity of the disease and, possibly, new targeted therapies.

11. LITERATURA

1. Bologna JL, Schaffer JV, Cerroni L, urednici. *Dermatology*. 5. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2024.
2. Goldman-Lévy G, Barnhill R, Bastian BC, Kempf W, Elder D, Gerami P, i sur. WHO classification of skin tumours: key updates in the fifth edition. *Histopathology*. 2026;88:555-68.
3. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:345-58.
4. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:239-71.
5. Šitum M, Buljan M, urednici. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2020.
6. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Basset-Seguin N, i sur. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: diagnostics: update 2022. *Eur J Cancer*. 2022;170:236-55.
7. Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F, i sur. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. *JAMA Dermatol*. 2022;158:495-503.
8. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, i sur. *Global Cancer Observatory: Cancer Today* [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024 [citirano 2. srpnja 2026.]. Dostupno na: <https://gco.iarc.who.int/today/>
9. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2022. godini [Internet]. Zagreb: HZJZ; 2024 [citirano 12. svibnja 2025.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2022-godini/>
10. National Cancer Institute. SEER Cancer Stat Facts: melanoma of the skin [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute; [citirano 2. srpnja 2026.]. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
11. AIM at Melanoma Foundation. Age and risk [Internet]. [citirano 13. svibnja 2025.]. Dostupno na: <https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-101/understanding-melanoma/melanoma-risk-factors/age-and-risk/>
12. Reinhart JP, Campbell EH, Proffer SL, Crum OM, Todd A, Gibson LE, i sur. Incidence and mortality trends of primary cutaneous melanoma: a 50-year Rochester Epidemiologic Project study. *JAAD Int*. 2024;16:144-54.
13. Behbahani S, Maddukuri S, Cadwell JB, Lambert WC, Schwartz RA. Gender differences in cutaneous melanoma: demographics, prognostic factors, and survival outcomes. *Dermatol Ther*. 2020;33:e14131.

14. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, i sur. Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:472-92.
15. Ostrowski SM, Fisher DE. Biology of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35:29-56.
16. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, i sur. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med.* 2012;10:85.
17. Gosman LM, Țăpoi DA, Costache M. Cutaneous melanoma: a review of multifactorial pathogenesis, immunohistochemistry, and emerging biomarkers for early detection and management. *Int J Mol Sci.* 2023;24:15881.
18. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, i sur. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6:425.
19. Yasuta Y, Kaminaka R, Nagai S, Mouri S, Ishida K, Tanaka A, i sur. Cooperative function of oncogenic MAPK signaling and the loss of Pten for melanoma migration through the formation of lamellipodia. *Sci Rep.* 2024;14:1525.
20. Vázquez-Naharro A, Bustos-Tauler J, Floristán A, Yuste L, Oltra SS, Vinyals A, i sur. Loxl3 promotes melanoma progression and dissemination influencing cell plasticity and survival. *Cancers (Basel).* 2022;14:1200.
21. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The role of Snail in EMT and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2013;13:963-72.
22. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, i sur. The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol Rep.* 2010;23:17-24.
23. Mohiuddin IS, Wei SJ, Kang MH. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866:165432.
24. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, i sur. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150:251-63.
25. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, i sur. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med.* 2015;373:1926-36.
26. Fu S, Wu H, Zhang H, Lian CG, Lu Q. DNA methylation/hydroxymethylation in melanoma. *Oncotarget.* 2017;8:78163-73.
27. Dennis LK. Cumulative sun exposure and melanoma in a population-based case-control study: does sun sensitivity matter? *Cancers (Basel).* 2022;14:1008.

28. Mai JZ, Sargen MR, Linet MS, Ike E, Gorsuch BL, Alexander BH, i sur. Impact of personal sun sensitivity and ultraviolet radiation on the association between blistering sunburns and melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2025;93:483-5.
29. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012;345:e4757.
30. Pauley K, Khan A, Kohlmann W, Jeter J. Considerations for germline testing in melanoma: updates in behavioral change and pancreatic surveillance for carriers of CDKN2A pathogenic variants. *Front Oncol*. 2022;12:837057.
31. Plewig G, French L, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, i sur., urednici. *Braun-Falco's dermatology*. 4. izdanje. Berlin: Springer; 2022.
32. Long GV, Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2023;402:485-502.
33. Bradford PT, Freedman DM, Goldstein AM, Tucker MA. Increased risk of second primary cancers after a diagnosis of melanoma. *Arch Dermatol*. 2010;146:265-72.
34. Rohan TZ, Mandel JL, Yang HY, Banner L, Joffe D, Zachian R, i sur. Identifying subsets of cancer patients with an increased risk of developing cutaneous melanoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results-based analysis. *JID Innov*. 2024;5:100323.
35. Martín-Gorgojo A, Nagore E. Melanoma arising in a melanocytic nevus. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. 2018;109:123-32.
36. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17:459-68.
37. Bliss JM, Ford D, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Cristofolini M, Elwood JM, i sur. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer*. 1995;62:367-76.
38. Langselius O, Rumgay H, de Vries E, Whiteman DC, Jemal A, Parkin DM, i sur. Global burden of cutaneous melanoma incidence attributable to ultraviolet radiation in 2022. *Int J Cancer*. 2025;157:1110-9.
39. Moan J, Dahlback A, Setlow RB. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem Photobiol*. 1999;70:243-7.
40. Wu S, Han J, Laden F, Qureshi AA. Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:1080-9.

41. Mundra PA, Dhomen N, Rodrigues M, Mikkelsen LH, Cassoux N, Brooks K, i sur. Ultraviolet radiation drives mutations in a subset of mucosal melanomas. *Nat Commun.* 2021;12:259.
42. 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;76:1191-3.
43. Passeron T, Lim HW, Goh CL, Kang HY, Ly F, Morita A, i sur. Photoprotection according to skin phototype and dermatoses: practical recommendations from an expert panel. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021;35:1460-9.
44. Skin Cancer Foundation. Sun-protective clothing [Internet]. New York: Skin Cancer Foundation; [citirano 2. srpnja 2026.]. Dostupno na: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-prevention/sun-protection/sun-protective-clothing/>
45. Kelly JW, Chamberlain AJ, Staples MP, McAvoy B. Nodular melanoma. No longer as simple as ABC. *Aust Fam Physician.* 2003;32:706-9.
46. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;144:500-22.
47. Guerry D 4th, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D. Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol.* 1993;100:342-5.
48. Chopra A, Sharma R, Rao UNM. Pathology of melanoma. *Surg Clin North Am.* 2020;100:43-59.
49. Kalkhoran S, Milne O, Zalaudek I, Puig S, Malvehy J, Kelly JW, i sur. Historical, clinical, and dermoscopic characteristics of thin nodular melanoma. *Arch Dermatol.* 2010;146:311-8.
50. Dessinioti C, Dimou N, Geller AC, Stergiopoulou A, Lo S, Keim U, i sur. Distinct clinicopathological and prognostic features of thin nodular compared to thin superficial spreading melanoma. *Cancers (Basel).* 2021;13:3800.
51. Iznardo H, Garcia-Melendo C, Yélamos O. Lentigo maligna: clinical presentation and appropriate management. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020;13:837-55.
52. Kallini JR, Jain SK, Khachemoune A. Lentigo maligna: review of salient characteristics and management. *Am J Clin Dermatol.* 2013;14:473-80.

53. Huang K, Fan J, Misra S. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival in the United States, 2006-2015, an analysis of the SEER registry. *J Surg Res.* 2020;251:329-39.
54. Basurto-Lozada P, Molina-Aguilar C, Castaneda-Garcia C, Vázquez-Cruz ME, Garcia-Salinas OI, Álvarez-Cano A, i sur. Acral lentiginous melanoma: basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021;34:59-71.
55. Soon SL, Solomon AR Jr, Papadopoulos D, Murray DR, McAlpine B, Washington CV. Acral lentiginous melanoma mimicking benign disease: the Emory experience. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:183-8.
56. Nakamura Y, Fujisawa Y. Diagnosis and management of acral lentiginous melanoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2018;19:42.
57. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:4340-6.
58. Thomas NE, Krickler A, Waxweiler WT, Dillon PM, Busam KJ, From L, i sur. Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: a population-based study. *JAMA Dermatol.* 2014;150:1306-14.
59. Rex J, Paradelo C, Mangas C, Hilari JM, Fernández-Figueras MT, Ferrándiz C. Desmoplastic melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104:201-7.
60. Wiesner T, He J, Yelensky R, Esteve-Puig R, Botton T, Yeh I, i sur. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun.* 2014;5:3116.
61. Griewank KG, Müller H, Jakkett LA, Emberger M, Möller I, van de Nes JA, i sur. SF3B1 and BAP1 mutations in blue nevus-like melanoma. *Mod Pathol.* 2017;30:928-39.
62. Sidiropoulos M, Obregon R, Cooper C, Sholl LM, Guitart J, Gerami P. Primary dermal melanoma: a unique subtype of melanoma to be distinguished from cutaneous metastatic melanoma: a clinical, histologic, and gene expression-profiling study. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71:1083-92.
63. Williams MD. Update from the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: mucosal melanomas. *Head Neck Pathol.* 2017;11:110-7.
64. Kaštelan S, Pavičić AD, Pašalić D, Nikuševa-Martić T, Čanović S, Kovačević P, i sur. Biological characteristics and clinical management of uveal and conjunctival melanoma. *Oncol Res.* 2024;32:1265-85.

65. Larsen AC. Conjunctival malignant melanoma in Denmark: epidemiology, treatment and prognosis with special emphasis on tumorigenesis and genetic profile. *Acta Ophthalmol.* 2016;94 Thesis 1:1-27.
66. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, i sur. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:2191-9.
67. Grob JJ, Bonerandi JJ. The "ugly duckling" sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch Dermatol.* 1998;134:103-4.
68. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol.* 2008;159:669-76.
69. Menzies SW, Kreusch J, Byth K, Pizzichetta MA, Marghoob A, Braun R, i sur. Dermoscopic evaluation of amelanotic and hypomelanotic melanoma. *Arch Dermatol.* 2008;144:1120-7.
70. Menzies SW, Ingvar C, Crotty KA, McCarthy WH. Frequency and morphologic characteristics of invasive melanomas lacking specific surface microscopic features. *Arch Dermatol.* 1996;132:1178-82.
71. Haenssle HA, Fink C, Schneiderbauer R, Toberer F, Buhl T, Blum A, i sur. Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. *Ann Oncol.* 2018;29:1836-42.
72. Pezzini C, Kaleci S, Chester J, Farnetani F, Longo C, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy diagnostic accuracy for malignant melanoma in different clinical settings: systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34:2268-79.
73. Deinlein T, Michor C, Hofmann-Wellenhof R, Schmid-Zalaudek K, Fink-Puches R. The importance of total-body photography and sequential digital dermatoscopy for monitoring patients at increased melanoma risk. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2020;18:692-7.
74. Marks E, Jarell A, Ludzik J, Farberg AS, Rabinovitz HS, Phelps RG, i sur. A physician's guide to the use of gene expression profile ancillary diagnostic testing for cutaneous melanocytic neoplasms. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2023;16:12-20.
75. Kamińska P, Buszka K, Zabel M, Nowicki M, Alix-Panabières C, Budna-Tukan J. Liquid biopsy in melanoma: significance in diagnostics, prediction and treatment monitoring. *Int J Mol Sci.* 2021;22:9714.

76. Pathak S, Zito PM. Clinical guidelines for the staging, diagnosis, and management of cutaneous malignant melanoma. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citirano 2. srpnja 2026.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572149/>
77. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Basset-Seguin N, i sur. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: treatment - update 2022. *Eur J Cancer*. 2022;170:256-84.
78. Luke JJ, Rutkowski P, Queirolo P, Del Vecchio M, Mackiewicz J, Chiarion-Sileni V, i sur. Pembrolizumab versus placebo after complete resection of high-risk stage II melanoma (KEYNOTE-716): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*. 2022;399:1718-29.
79. Kirkwood JM, Del Vecchio M, Weber J, Hoeller C, Grob JJ, Mohr P, i sur. Adjuvant nivolumab in resected stage IIB/C melanoma (CheckMate 76K): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Nat Med*. 2023;29:2835-43.
80. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, i sur. Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma. *N Engl J Med*. 2018;378:1789-801.
81. Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U; ESMO Guidelines Committee. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30:1884-901.
82. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, i sur. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381:1535-46.
83. Ascierto PA, Mandalà M, Ferrucci PF, Guidoboni M, Rutkowski P, Ferraresi V, i sur. Sequencing of ipilimumab plus nivolumab and encorafenib plus binimetinib for untreated BRAF-mutated metastatic melanoma (SECOMBIT): a randomized, three-arm, open-label phase II trial. *J Clin Oncol*. 2023;41:212-21.
84. Tio M, Wang X, Carlino MS, Shivalingam B, Fogarty GB, Guminski AD, i sur. Survival and prognostic factors for patients with melanoma brain metastases in the era of modern systemic therapy. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31:509-15.
85. Patel SP, Othus M, Chen Y, Wright GP Jr, Yost KJ, Hyngstrom JR, i sur. Neoadjuvant-adjuvant or adjuvant-only pembrolizumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2023;388:813-23.

86. Weber JS, Carlino MS, Khattak A, Meniawy T, Ansstas G, Taylor MH, i sur. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study. *Lancet*. 2024;403:632-44.
87. Sarnaik AA, Hamid O, Khushalani NI, Lewis KD, Medina T, Kluger HM, i sur. Lifileucel, a tumor-infiltrating lymphocyte therapy, in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2021;39:2656-66.
88. Proietti I, Skroza N, Bernardini N, Tolino E, Balduzzi V, Marchesiello A, i sur. Mechanisms of acquired BRAF inhibitor resistance in melanoma: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2020;12:2801.
89. Haanen JBAG, Carbonnel F, Robert C, Kerr KM, Peters S, Larkin J, i sur.; ESMO Guidelines Committee. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28 Suppl 4:iv119-42.
90. Zilberg C, Ferguson AL, Lyons JG, Gupta R, Damian DL. The tumor immune microenvironment in primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol Res*. 2025;317:273.
91. Laurentino TS, Soares RDS, Marie SKN, Oba-Shinjo SM. LOXL3 function beyond amino oxidase and role in pathologies, including cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3587.
92. Santamaría PG, Floristán A, Fontanals-Cirera B, Vázquez-Naharro A, Santos V, Morales S, i sur. Lysyl oxidase-like 3 is required for melanoma cell survival by maintaining genomic stability. *Cell Death Differ*. 2018;25:935-50.
93. Nowogrodzka K, Jankowska-Konsur A. Emerging biomarker in carcinogenesis. Focus on nestin. *Postepy Dermatol Alergol*. 2022;39:1001-7.
94. Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2014;44:1118-30.
95. Tschaharganeh DF, Xue W, Calvisi DF, Evert M, Michurina TV, Dow LE, i sur. p53-dependent nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer. *Cell*. 2014;158:579-92.
96. Flørenes VA, Målandsmo GM, Faye R, Nesland JM, Holm R. Nestin expression is associated with aggressive cutaneous melanoma of the nodular type. *Mod Pathol*. 2013;26:1446-56.
97. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:155-66.

98. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, i sur. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2:84-9.
99. Rowe RG, Weiss SJ. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:567-95.
100. Murray SA, Gridley T. Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:10300-4.
101. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadrnagara K, Carstens JL, i sur. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015;21:998-1009.
102. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7:415-28.
103. Dong C, Wu Y, Yao J, Wang Y, Yu Y, Rychahou PG, i sur. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest.* 2012;122:1469-86.
104. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, i sur. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2:76-83.
105. Olmeda D, Jordá M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.* 2007;26:1862-74.
106. Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:62.
107. Tang X, Sui X, Weng L, Liu Y. SNAIL1: linking tumor metastasis to immune evasion. *Front Immunol.* 2021;12:724200.
108. Mullins RDZ, Pal A, Barrett TF, Heft Neal ME, Puram SV. Epithelial-mesenchymal plasticity in tumor immune evasion. *Cancer Res.* 2022;82:2329-43.
109. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, i sur. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998;95:379-91.
110. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, i sur. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005;122:947-56.

111. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development*. 2007;134:635-46.
112. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells*. 2008;26:3068-74.
113. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
114. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40:499-507.
115. Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis*. 2013;4:e760.
116. Jiang WL, Zhang PF, Li GF, Dong JH, Wang XS, Wang YY. Oct-4 is associated with gastric cancer progression and prognosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:517-22.
117. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4085-95.
118. Xie W, Yu J, Yin Y, Zhang X, Zheng X, Wang X. OCT4 induces EMT and promotes ovarian cancer progression by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Front Oncol*. 2022;12:876257.
119. Lambis-Anaya L, Fernández-Ruiz M, Liscano Y, Suarez-Causado A. High OCT4 expression might be associated with an aggressive phenotype in rectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15:3740.
120. Silva CTX, Saddi VA, Silva KSFE, Sugita DM, Guillo LA. Expression of the cancer stem cell marker OCT4 is associated with worse prognosis and survival in cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2021;31:439-48.
121. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310:2191-4.
122. Kelam N, Racetin A, Polović M, Benzon B, Ogorevc M, Vukojević K, et al. Aberrations in FGFR1, FGFR2, and RIP5 expression in human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Int J Mol Sci*. 2022;23:15537.

123. Lozić M, Filipović N, Jurić M, Kosović I, Benzon B, Šolić I, i sur. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and renin expression patterns in postnatal kidneys of Dab1^{-/-} (yotari) mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1284.
124. Paštar V, Lozić M, Kelam N, Filipović N, Bernard B, Katsuyama Y, i sur. Connexin expression is altered in liver development of yotari (dab1^{-/-}) mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22:10712.
125. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 2001;25:402-8.
126. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, i sur. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 2005;24:3446-58.
127. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2011;17:409-18.
128. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilková A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol.* 2007;34:370-5.
129. Yamamoto Y, Hayashi Y, Sakaki H, Murakami I. Evaluation of clinical and immunohistochemical factors relating to melanoma metastasis: potential roles of nestin and fascin in melanoma. *Diagnostics (Basel).* 2022;12:219.
130. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2013;133:1384-7.
131. Borrell A, Ghislin S, Deshayes F, Lauriol J, Alcaide-Loridan C, Middendorp S. Nanog and Oct4 overexpression increases motility and transmigration of melanoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:1145-54.
132. Zhang X, Su MW, Cheng Y, Martinka M, Wang G, Huang Y, i sur. Immunohistochemistry analysis reveals lysyl oxidase-like 3 as a novel prognostic marker for primary melanoma. *Melanoma Res.* 2021;31:173-7.
133. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol.* 2003;139:282-8.
134. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012;13:227-32.

135. Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O. Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res.* 1994;54:354-6.
136. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Nestin is highly expressed in advanced-stage melanomas and neurotized nevi. *Oncol Rep.* 2013;29:1595-9.
137. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2007;20:102-7.
138. Liu S, Kumar SM, Martin JS, Yang R, Xu X. Snail1 mediates hypoxia-induced melanoma progression. *Am J Pathol.* 2011;179:3020-31.
139. Tang Y, Durand S, Dalle S, Caramel J. EMT-inducing transcription factors, drivers of melanoma phenotype switching, and resistance to treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12:2154.
140. Zielińska MK, Ciężyńska M, Sulejczak D, Rutkowski P, Czarnecka AM. Mechanisms of resistance to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma and strategies to overcome it. *Biomolecules.* 2025;15:269.
141. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, i sur. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene.* 2012;31:4898-911.
142. Liedtke S, Enczmann J, Waclawczyk S, Wernet P, Kögler G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell.* 2007;1:364-6.
143. Yoganandarajah V, Patel J, van Schaijik B, Bockett N, Brasch HD, Paterson E, i sur. Identification of cancer stem cell subpopulations in head and neck metastatic malignant melanoma. *Cells.* 2020;9:324.
144. Su HT, Weng CC, Hsiao PJ, Chen LH, Kuo TL, Chen YW, i sur. Stem cell marker nestin is critical for TGF- β 1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res.* 2013;11:768-79.
145. Matsuda Y, Naito Z, Kawahara K, Nakazawa N, Korc M, Ishiwata T. Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis. *Cancer Biol Ther.* 2011;11:512-23.
146. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, i sur. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704-15.
147. Liburkin-Dan T, Toledano S, Neufeld G. Lysyl oxidase family enzymes and their role in tumor progression. *Int J Mol Sci.* 2022;23:6249.

148. Chopra V, Sangarappillai RM, Romero-Canelón I, Jones AM. Lysyl oxidase like-2 (LOXL2): an emerging oncology target. *Adv Ther (Weinh)*. 2020;3:1900119.

12. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Zdenka Šitum Čepnja

Datum rođenja: 4. srpnja 1992.

Državljanstvo: hrvatsko

E-adresa: zsitum@mefst.hr

Obrazovanje

2011. – 2017. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; doktorica medicine.

2021. – danas Doktorski studij „Biologija novotvorina“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu.

2022. – danas Poslijediplomski tečaj dermatoskopije i preventivne dermatoonkologije („Master of Science in Dermoscopy and Preventive Dermato-Oncology“), Medicinski fakultet u Grazu.

Radno iskustvo

2017. – 2018. Doktorica medicine, stažistica; Klinički bolnički centar Split.

2018. – 2019. Liječnica u Timu T1 hitne medicinske pomoći; Zavod za hitnu medicinu Dubrovačko-neretvanske županije, Dubrovnik.

2019. – 2024. Specijalizantica dermatovenerologije; Klinički bolnički centar Split.

2024. – danas Specijalistica dermatovenerologije; Klinički bolnički centar Split.

Stručno usavršavanje

2020. Osnovni i napredni tečaj dermatoskopije; Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb.

2023. Tečaj „Dermatoskopija u kliničkoj praksi“; Europska akademija dermatovenerologije (EADV).

2023. Ljetna škola dermatoskopije; Europska akademija dermatovenerologije (EADV).

2024. Napredni tečaj kirurgije; Europska akademija dermatovenerologije (EADV).

2026. ISCD tečaj dermatoskopije; Medicinski fakultet u Grazu (7. – 11. srpnja 2026.).

Članstva u strukovnim organizacijama

Hrvatska liječnička komora

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko dermatovenerološko društvo

Publikacije

1. Markota Čagalj A, **Šitum Čepnija Z**, Lešin Gaćina D, Petrić Duvnjak J, Pavić M, Gogić Salapić T, i sur. Personality traits and treatment adherence among parents of children with atopic dermatitis. *Medicina (Kaunas)*. 2026;62:59.
2. Pavić M, Markić J, Markota Čagalj A, **Šitum Čepnija Z**, Gogić Salapić T, Pavlić B, i sur. Beliefs about medicines and adherence to biologic therapy in patients with moderate-to-severe psoriasis: a cross-sectional study. *Medicina (Kaunas)*. 2025;61:2000.
3. **Šitum Čepnija Z**, Kelam N, Ogorevc M, Racetin A, Vukoja M, Čepnija T, i sur. Expression of LOXL3, NES, and SNAI1 in melanoma genesis and progression. *Cells*. 2024;13:1450.
4. Markota Čagalj A, Markić J, Vuković D, **Šitum Čepnija Z**, Gogić Salapić T, Buljan I, i sur. Linguistic validation and reliability of the Croatian version of the TOPICOP questionnaire. *Medicina (Kaunas)*. 2024;60:968.
5. Šitum M, Franceschi N, Ferara N, **Šitum Čepnija Z**. Treatment of actinic keratoses and field cancerization – Croatian perspective. *Rad Hrvat Akad Znan Umjet Med Znan*. 2024. doi: 10.21857/mwo1vcrojy.
6. Čepnija AR, Šamija Kuzmić R, **Šitum Čepnija Z**, Jakus N, Bečić K, Čepnija T. The effect of the COVID-19 pandemic on pediatric psychiatric health care in Croatia among children with neurological risk: a retrospective study. *PM R*. 2022. doi: 10.1002/pmrj.12914.

Kongresna priopćenja i sažeci

- **Šitum Čepnija Z**, Gogić Salapić T, Markota Čagalj A, Čepnija T, Pavić M. Izotretinoinom uzrokovane acne fulminans – prikaz bolesnika. 21. Prosinački dermatovenerološki simpozij, Zagreb; 2024. str. 95-9.
- Stipić A, **Šitum Čepnija Z**, Gogić Salapić T, Karaman I, Pezelj D, Tadić Đ, i sur. Neobična prezentacija limfoma tijekom liječenja neurološke bolesti. 21. Prosinački dermatovenerološki simpozij, Zagreb; 2024. str. 105-12.
- **Šitum Čepnija Z**, Markota Čagalj A, Gogić Salapić T, Drnas M, Sekulovski M, Vuković D, i sur. Survey of attitudes and knowledge regarding HPV vaccination among nursing students from the University of Split. 37th IUSTI Europe Congress, Zagreb; 2024. str. 77.

- **Šitum Čepnja Z**, Gogić Salapić T, Drnas M, Markota Čagalj A. Therapy-resistant mucous membrane pemphigoid affecting the oral cavity in a patient with a haematological malignancy: a case report (poster). Proljetni simpozij EADV, Malta; 16.–18. svibnja 2024.
- **Šitum Čepnja Z**, Gogić Salapić T, Drnas M, Mirić Kovačević L, Markota Čagalj A. (Un)usual nonmelanoma skin tumors. 8. Kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek; 25.–28. travnja 2024.
- Gogić Salapić T, **Šitum Čepnja Z**, Drnas M, Markota Čagalj A. Chronic lymphocytic leukemia-associated mucous membrane pemphigoid. 8. Kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek; 25.–28. travnja 2024.
- Drnas M, **Šitum Čepnja Z**, Gogić Salapić T, Markota Čagalj A. Differential diagnosis of lesions in the diaper region: a case report of napkin psoriasis (poster). 8. Kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek; 25.–28. travnja 2024.
- Mataija M, Madiraca Glasović D, Ferara N, Franceschi N, **Šitum Čepnja Z**, Vučić M, i sur. Kongenitalni melanom – prikaz slučaja. 5. Znanstveni simpozij multidisciplinarnih timova za melanom, Biograd na Moru; 1.–3. ožujka 2024.
- Ivanišević R, **Šitum Čepnja Z**, Karaman I, Čepnja T, Šitum M. Ružičasta lezija može biti i neneuralni granular cell tumor kože – prikaz bolesnika. 20. Prosinački dermatovenerološki simpozij, Zagreb; 2023. str. 78-83.
- **Šitum Čepnja Z**, Markota Čagalj A, Čepnja T, Vuković D, Puizina-Ivić N. The natural course of malignant melanoma – a case report (poster). 32. Kongres EADV, Berlin; 11.–14. listopada 2023.
- Puizina-Ivić N, Vanjaka Rogošić L, Vuković D, Bubić A, **Šitum Čepnja Z**, Gogić Salapić T. Liječenje psorijaze lokalnim pripravcima. U: Psorijaza: od imunopatogeneze do suvremene terapije. Rijeka; 2023. str. 69-86.
- **Šitum Čepnja Z**, Vuković D, Puizina-Ivić N. Vaccine-induced pityriasis lichenoides et varioliformis acuta in a 3-year-old child: a case report (poster). 31. Kongres EADV, Milano; 7.–10. rujna 2022.
- **Šitum Čepnja Z**, Ivanišević R, Puizina-Ivić N. When you see pink, it may be a non-neural granular cell tumor? A case report (poster). 31. Kongres EADV, Milano; 7.–10. rujna 2022.
- Gogić T, **Šitum Čepnja Z**, Markota Čagalj A, Mičunović J, Sekulovska M, Bubić A. Hair follicle immune privilege and its effect on alopecia areata treatment – what do we currently

know? 7. Kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice; 5.–8. svibnja 2022.

– Bojčić I, **Šitum Z.** Urtikarija. Tečaj trajnog obrazovanja „Suvremena terapija u dermatovenerologiji“; 28.–29. veljače 2020.

Pasivno sudjelovanje: 19. Kongres Europskog društva za dermatoonkologiju, Rim (20.–22. travnja 2023.); 2. Simpozij Internacionalne istraživačke skupine za kontaktni dermatitis, Split (31. ožujka – 2. travnja 2023.); 4. Znanstveni simpozij multidisciplinarnih timova za melanom, Rovinj (11.–13. studenoga 2022.).