



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Хелена В. Марић

**УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА DNA
МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЕ НА ТОК И ИСХОД МЕЛАНОМА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2020



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хелена В. Марић

**THE INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISMS ON DNA
METHYLTRANSFERASE ON MELANOMA FLOW AND OUTCOME**

Doctoral Dissertation

Крагујевац, 2020

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Хелена Марић
Датум и мјесто рођења: 11.06.1984. Фоча
Садашње запослење: Универзитетска болница Фоча
Докторска дисертација
Наслов: Утицај полиморфизама гена за DNA метилтрансферазе на ток и исход меланома
Број страница: 136
Број слика: 39 (графикона 13, табела 26)
Број библиографских података: 223
Установа и мјесто гдје је рад израђен: Војно медицинска академија Београд
Научна област (УДК):
Ментор: Проф. др Ружица Козомара
Оцјена и одбрана
Датум пријаве теме: 12.06.2017.
Број одлуке и датум прихватања теме: IV-03-829/40, 08.09.2017.
Комисија за оцјену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. проф. др Драгче Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. проф. др Јефта Козарски, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за уже научне области Пластична, реконструктивна и естетска хирургија и Микрохирургија и лечење опекотина, члан
3. проф. др Дејан Вуловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
4. проф. др Наташа Ђорђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан
5. проф. др Звонко Магић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Биологија са хуманом генетиком, члан
Комисија за оцјену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
1. Проф. др Берислав Векић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. Проф. др Бобан Ђорђевић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране, за ужу научну област Пластична и реконструктивна хирургија, члан
3. Научни саветник Данијела Максимовић, ИБИС Универзитета у Београду за ужу научну област Онкологија и генетика, члан
Датум одбране дисертације:

Doctoral dissertation identification page

Author
Name and surname: Helena Maric
Date and place of birth: 11.06.1984. Foca
Current employment: University hospital Foca
Doctoral dissertation
Title: Influence of gene polymorphisms for DNA methyltransferase on the course and outcome of melanoma
Number of pages: 136
Number of pictures: 39 (charts 13, tables 26)
Number of bibliographic data: 223
Institution and place where the work was made: Military Medical Academy Belgrade
Scientific field (UDC):
Mentor: MDA PhD Ruzica Kozomara
Assessment and defense
Topic application date: 12.06.2017.
Decision number and date of acceptance of the topic: IV-03-829/40, 08.09.2017.
Commission for the evaluation of the scientific basis of the topic and the fulfillment of the candidate's conditions: <ol style="list-style-type: none">1. Dragce Radovanovic, MDA PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Surgery, president2. Boban Djordjević, MD PhD, full professor at the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrower scientific fields of Plastic and Reconstructive Surgery, member3. Dejan Vulović, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Surgery, member4. Natasa Djordjevic, MD PhD, Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pharmacology and Toxicology, member5. Zvonko Magić, MD PhD, full professor at the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrower scientific field of Biology with Human Genetics, member
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation: <ol style="list-style-type: none">1. Berislav Vekić, MDA PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Surgery, president2. Jefta Kozarski, MD PhD, full professor at the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrower scientific fields of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery and Microsurgery and Treatment of Burns, member3. Science advisor Danijela Maksimović, IBIS University of Belgrade for the narrower scientific field of Oncology and genetics, member
Date of defense of the dissertation:

САЖЕТАК

УВОД: Ненормална метилација DNA има критичну улогу код великог броја различитих малигнитета укључујући меланом. Метилација DNA је катализована од стране DNA метилтрансфераза (DNMT) који су укључени у одржавање метилације (DNMT1) и де ново метилације (DNMT3A и DNMT3B).

ЦИЉ: Циљ ове дисертације је био да се одреде учесталости полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 и rs2424932), код 123 пацијената са меланомом и да се утврде разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са клиничким параметрима болести, стадијумом, нодалним статусом, Breslow индексом, бројем митоза, присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ: Полиморфизми у DNMT1 и DNMT3B гену су испитивани са предизајнираним SNP есејима методом алелске дискриминације на REAL-TIME апарату. Коришћени су комерцијално доступни есеји: *TaqMan SNPs* и *Universal TaqMan MasterMix Genotyping Assay* (Applied Biosystems, SAD), према протоколу произвођача.

РЕЗУЛТАТИ: Носиоци варијације генотипова DNMT1 rs2228612 су имали лошије изгледе за укупно преживљавање, као и преживљавање без рекуренције ($p=0.000$ и $p=0.000$). DNMT1 rs2228612 је повезан са улцерацијом ($p=0.045$), нодалним статусом ($p=0.030$), прогресијом ($p=0.007$) и стадијумом болести ($p=0.003$). Униваријантне анализе указују да лимфоцити који инфилтришу туморе (TIL) могу бити маркери добре прогнозе код пацијената са меланомом (HR=0.323, [0.127-0.855] 95% CI, $p=0.025$), док генотипска дистрибуција DNMT3B rs406193 полиморфизама је у значајној мјери повезана са присуством TILs ($p=0.012$). Мултиваријантна анализа је показала да је DNMT1 (rs2228612) алел независтан прогностички фактор код пацијената са меланомом (HR=12.126 [2.345-62.715] 95% CI), док је DNMT3B (rs2424932) изгубио своју значајност као прогностички фактор

ЗАКЉУЧАК: Резултати наших истраживања су показали по први пут да полиморфизам rs2228612 DNMT1 гена може бити удружен са смањеним укупним преживљавањем пацијената са меланомом. Такође, полиморфизам rs2424932 DNMT3B гена је показао снажан тренд удружености са прогресијом болести и ризиком за краће укупно преживљавање пацијената са меланомом. Полиморфизам rs406193 DNMT 3B гена је удружен са повећаним присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (TIL) које су добар прогностички маркер. Ови налази указују да даља истраживања у овом правцу могу потенцијално довести до открића нових молекуларних маркера и/или нових терапија.

КЉУЧНЕ РИЈЕЧИ: меланом, полиморфизам, DNA метилтрансфераза; DNMT1; DNMT3B; TIL; преживљавање.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Abnormal DNA methylation has a critical role in a wide variety of malignancies including melanoma. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMT) which are involved in maintenance of methylation (DNMT1) and de novo methylation (DNMT3A and DNMT3B).

OBJECTIVE: The aim of this dissertation was to determine the frequency of polymorphisms in the DNMT1 gene (rs2228611, rs2228612, rs2114724) and polymorphisms in the DNMT3B gene (rs406193 and rs2424932), at 123 patients with melanoma, and to determine differences in the frequency of genotypes of the polymorphisms examined, and correlation with clinical disease parameters, stage, nodal status, Breslow index, number of mitoses, presence of tumor infiltrating lymphocytes (TIL).

MATERIAL AND METHODS: Polymorphisms in the DNMT1 and DNMT3B gene were examined with pre-designed SNP essays by the allelic discrimination method on the REAL-TIME apparatus. Commercially available essays were used: TaqMan SNPs and Universal TaqMan MasterMix Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's protocol.

RESULTS: Carriers of DNMT1 genotype variation rs2228612 had a poorer chance of overall survival as well as recurrence-free survival ($p = 0.000$ and $p = 0.000$, respectively). DNMT1 rs2228612 was associated with ulceration ($p = 0.045$), nodal status ($p = 0.030$), progression ($p = 0.007$), and disease stage ($p = 0.003$). Univariate analyzes indicate that tumor infiltrating lymphocytes (TIL) may be markers of good prognosis in patients with melanoma (HR = 0.323, [0.127-0.855] 95% CI, $p = 0.025$), while the genotypic distribution of DNMT3B rs406193 polymorphisms is significantly related with the presence of TILs ($p = 0.012$). Multivariate analysis showed that the DNMT1 (rs2228612) allele was an independent prognostic factor in patients with melanoma (HR = 12.126 [2.345-62.715] 95% CI), while DNMT3B (rs2424932) lost its significance as a prognostic factor.

CONCLUSION: The results of our studies showed for the first time that the rs2228612 DNMT1 gene polymorphism may be associated with decreased overall survival of melanoma patients. Also, the rs2424932 DNMT3B gene polymorphism showed a strong trend in association with disease progression and risk for shorter overall survival of melanoma patients. The rs406193DNMT 3B gene polymorphism is associated with an increased presence of tumor infiltrating lymphocytes (TIL), which are a good prognostic marker. These findings indicate that further research in this direction could potentially lead to the discovery of new molecular markers and / or new therapies.

KEY WORDS: melanoma, polymorphism, DNA methyltransferase; DNMT1; DNMT3B; TIL; survival.

ЗАХВАЛНИЦА

Посебну захвалност дугујем мојим менторима, проф. др Маријану Новаковићу, проф. др Звонку Магићу и проф. др Ружици Козомари на инспирацији, савјетима и помоћи на изради ове докторске дисертације.

Хвала мојим колегама на корисним савјетима и помоћи.

Родитељима,

*мајци Ружици и оцу Вељку, за свако „издржи,“ „напријед,“ „можеш ти“
мојој Хани и Бојану, за сву љубав, доброту и разумјевање*

без вас, све ово не би имало смисла.

Мојој Хани на дар!

Садржај

1. УВОД	1
1.1. Меланом	2
1.2. Историјат меланома	2
1.3. Епидемиологија	3
1.4. Етиологија	3
1.5. Знаци и симптоми меланома	7
1.6. Начин раста меланома.....	9
1.7. Патохистолошка класификација меланома.....	11
1.8. Дијагноза меланома.....	22
1.8.1. Анамнеза	22
1.8.2. Клинички преглед	22
1.8.3. Дермоскопски преглед.....	23
1.8.4. Биопсија	23
1.8.5. Молекуларна дијагностика.....	24
1.8.6. Дијагностика регионалних метастаза.....	25
1.8.7. Ултразвучни преглед	25
1.8.8. Биопсија лимфног чвора.....	25
1.8.9. Компјутеризована томографија	25
1.8.10. Дијагностичке процедуре послје хистопатолошке дијагнозе локализованог примарног меланома	25
1.8.11. Дијагностичке процедуре послје дијагнозе локорегионалних метастаза. 26	
1.8.12. Дијагностичке процедуре послје дијагнозе удаљених метастаза.....	26
1.9. Терапија меланома.....	26
1.9.1. Хирушка терапија примарног меланома.....	26
1.9.2. Хирушка контрола регионалних лимфних чворова.....	27
1.9.3. Хирушки третман регионалних метастаза. Регионална дисекција лимфних басена.....	28
1.9.4. Хирушки третман рецидива и метастаза	29
1.9.5. Хирургија меланома код дјете.....	29

1.9.6.	Хирургија меланома код трудница.....	29
1.9.7.	Адјувантна терапија.....	29
1.9.8.	Хемиотерапија меланома.....	30
1.9.9.	Имунотерапија метастатског меланома.....	30
1.9.10.	Радиотерапија меланома.....	31
1.10.	Праћење пацијената са меланомом.....	32
1.11.	Полиморфизми нуклеотидне секвенце.....	32
1.12.	Епигенетичка регулација.....	33
2.	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	38
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	40
3.1.	Испитивани узорак.....	41
3.2.	Истраживачки поступак.....	41
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	46
4.1.	Опште карактеристике пацијената укључених у студију приликом постављања дијагнозе.....	47
4.2.	Клиничко-патолошке карактеристике пацијената који су укључени у студију.....	50
4.3.	Дистрибуција испитиваних полиморфизама у генима за ДНМТ1 и ДНМТ3Б према клиничко-патолошким карактеристикама пацијената.....	55
4.4.	Учесталост свих испитиваних полиморфизама у генима за ДНМТ1 и ДНМТ3Б у односу на поједине клиничко-патолошке карактеристике пацијената.....	64
4.5.	Повезаност укупног преживљавања пацијената са меланомом и периода без поновног јављања болести са испитиваним полиморфизмима.....	69
4.6.	Униваријантна и мултиваријантна анализа прогностичких фактора у односу на укупно преживљавање пацијената са меланомом.....	71
5.	ДИСКУСИЈА.....	73
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	81
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	85

1. УВОД

1.1. Меланом

Меланом је малигни тумор меланоцита, ћелија које продукују пигмент меланин (слика 1) (1, 2). То је један од најагресивнијих, солидних малигнух тумора који се доминантно јавља на кожи, али се може развити и на слузокожи, ретини, можданим овојницама или у било којем ткиву који садржи меланоците (3).

Прекурсори меланоцита се развијају у ектодерму (нервној крести) током првог триместра феталног живота. Потом мигрирају у различите дијелове тијела, кожу, слузокожу (горњи дио езофагуса, вулву, анус) и мождане овојнице.



Слика 1. Меланом коже. Преузето из Valch CM et al (3.).

1.2. Историјат меланома

Подаци кроз историју о овој болести су доста оскудни. Операцију меланома је први описао Џон Хунтер 1787. године. Конзервиран препарат тумора чува се у Енглеској у Хунтериан музеју Краљевског колеџа хирурга. Микроскопским прегледом 1968. године је утврђено да се ради о метастаском меланому (4). На Медицинском факултету у Паризу, 1804. године, француски љекар Рене Ленек, представио је меланом као посебан ентитет и то објавио у раду 1806. године (5). Енглески љекар Вилијам Норис је први објавио извјештај о меланому на енглеском језику 1820. године, а 1857. године исти аутор описује да постоји фамилијарна предиспозиција за развој меланома (6). Самјуел

Купер 1840. године доноси закључак да је узрапредовали меланом неизљечива болест и указује на велики значај раног откривања и хируршког отклањања меланома на прогнозу болести (7). Даљим прегледом литературе констатују се бројне студије о генетским и билошким факторима важним за патогенезу и прогресију меланома. Циљ тих студија је био откривање нових биомаркера који би били поуздани показатељи предикције и прогнозе меланома као и проналажење средстава и/или процедура који би повећали хомосензитивност, индуковали апоптозу и смањили метастатски потенцијал ћелија меланома (8-15).

1.3. Епидемиологија

Меланом данас представља озбиљан друштвено-економски проблем са константним растом инциденције (16). Према подацима Свјетске здравствене организације годишње у свијету се дијагностификује око 160.000 нових случајева меланома, а око 480.000 људи годишње умире од меланома (17). Меланом чини око 4% свих малигних тумора коже. Одговоран је за око 75% смртних исхода везаних за карцином коже па се сматра најагресивнијим малигним тумором коже (18).

Епидемиолошке студије о учесталости меланома показују да се број обољелих јако разликује према географском положају. Најучесталији је у Аустралији уз пораст декадне инциденције за 16% код особа мушког пола и за 24% код особа женског пола (19, 20). Инциденција у Северној америци и Европи мања је у поређењу са Аустралијом (19, 20). У Србији се годишње дијагностификује 500 нових случајева меланома. Према најновијим процјенама инциденција меланома у Србији износи код жена 7,4 и 11,2 /100.000 код мушкараца (16).

Меланом се најчешће јавља између 20. и 60. године живота, с врхом инциденције у петој деценији (21). Ријетко се јавља у дјечијој доби. Особе са једним или више рођака у првом кољену који имају позитивну породичну анамнезу на меланом су у већој опасности (6-10 пута) за настанак меланома од особа без оптерећене породичне анамнезе. Чешће се јавља код мушкараца и код припадника бијеле расе посебно сјеверозападних Европљана који живе у сунчаним предјелима (22). У погледу локализације код жена се чешће јавља на ногама, а код мушкараца на леђима.

1.4. Етиологија

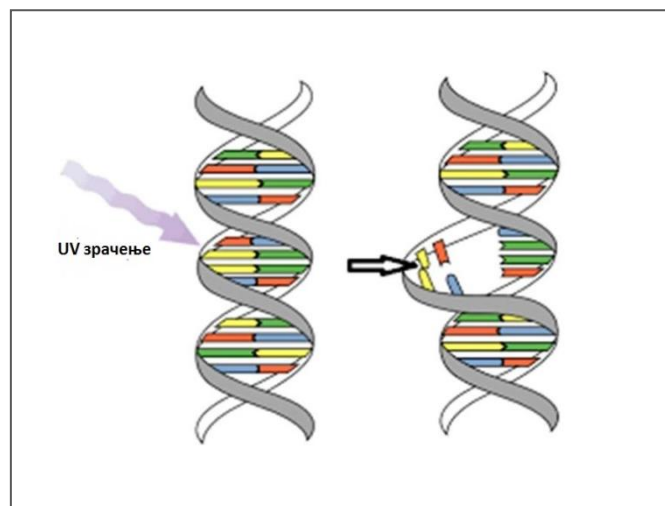
Етиологија меланома није у потпуности објашњена, али су познати неки фактори који повећавају ризик за равој болести. Познавање фактора ризика је од велике важности код процјене појединачног ризика за развој меланома, те за развој адекватног праћења и правилног савјетовања о понашању и заштити. Фактори ризика који могу индуковати настанак меланома могу се подијелити у двије групе: унутрашње и спољашње. Унутрашњи фактори се односе на наслеђени генотип и индивидуалну породичну историју док је главни спољашњи фактор изложеност сунцу.

Фактори ризика за настанак меланома су:

1. Изложеност сунцу

Око 95% UV (engl. *Ultra Violet*- UV) зрака који досежу Земљу су UVA зраци који продиру дубље у кожу, исти могу да индукују оксидативни стрес и мутације у ћелијама. Мањи дио зрака који досежу Земљу су UVB зраци које директно апсорбује DNA (енгл. *Deoxyribonucleic acid*- DNA) молекуле што може изазвати мутацију ћелија. Сматра се да су управо UVB зраци најважнији за настанак меланома (23). Оштећење DNA изазвано UV зрачењем ствара мутације у генима типично кроз димеризацију тимидина (слика 2), тако да се ове мутације преносе на нове генерације приликом диобе ћелија.

Митозе у ћелијама које носе мутације постају неконтролисане и у крајњој истанци покренуће стварање тумора ако се мутације јаве у протоонкогенима или тумор супресорским генима (24-26). Излагање сунцу може да буде интермитентно и континуирано. Интермитентно излагање је повремено, често врло интензивно и оно је посебно значајно за развој меланома изузев лентиго малигна гдје континуирано излагање сунцу има примат. Повремено екстремно излагање сунцу које резултује опекотинама сматра се ризиком за развој меланома (више од двије епизоде опекотина од сунчања прије 15 године живота, склоност ка опекотинама удружена са смањеном способношћу да се поцрни као и мултипле PUVA терапије (енгл. *Psoralen and UltraViolet A*) (27). Меланом се чешће јавља код људи који користе соларијуме, као и код људи који обављају административне и канцеларијске послове (28-30). Континуирано излагање сунцу је цјелогодишње и ризичније за развој базоцелуларног и планоцелуларног карцинома (31). У прилог предпоставци да је UV зрачење један од кључних фактора за развој меланома су и подаци епидемиолошких студија који показују повећан ризик за развој меланома код особа које су у дјетињству и пубертету живјели у мјестима са већом изложеношћу сунцу (32) као и већа инциденција меланома на дијеловима тијела изложеним сунцу (33).



Слика 2. Шематски приказ утицаја UV зрачења на димеризацији тимина

2. Пигментни младежи

Пигментни младежи играју важну улогу у настанку меланома. Наводи се да 40-50% меланома настаје из пигментних младежа, 10-20% из преканцерозних лезија, а 10% настаје на непромјењеној кожи (34). Људи са мултиплим атипичним младежима више од 50 или са диспластичним младежима (више од 5), као и особе са конгениталним меланоцитним младежима спадају у групу особа са повећаним ризиком за развој меланома (35). Клинички изглед диспластичног младежа је препознатљив. Величине су обично око 5mm и више у дијаметру са нејасним ивицама и ирегуларном пигментацијом. Особе са атипичним младежима имају повећан ризик да оболе од меланома (36), који нужно не мора да се развије на атипичној лезији. Хистолошки диспластичне младеже карактерише присуство архитектуралних аномалија као што су фузија епидермалних пречки, лимфоцитни инфилтрат у горњем дерму и нуклеарна атипична група меланоцита (37, 38).

3. Старост

Меланом се чешће јавља код млађих особа до 40 године живота. Код старијих особа обично има бољу прогнозу. Ријетко се јавља прије пубертета. Средња вриједност старости пацијената при постављању дијагнозе меланома је од 45 до 55 године (39).

4. Раса

Меланом се чешће јавља код припадника бијеле расе. Ријетко се јавља код припадника жуте и црне расе и то обично на непигментованим дијеловима тијела, субунгвално, на шакама и табанима. Морталитет је код њих јако висок јер се дијагностификује у касном стадијуму (39).

5. Генетичка основа

Око 8-12% болесника са меланомом имају позитивну породичну анамнезу, а неки од тих болесника имају наслеђену мутацију гена (40). Два се гена сматрају „главним меланомским генима“: тумор-супресор ген CDKN2A (инхибитор циклин зависне киназе) кодира протеин p16 и налази се на хромозому 9 и прото-онкоген CDK4 (циклин зависна киназа) који се налази на хромозому 12. CDKN2A аберације су откривене у 20% спорадичних меланома те 40% случајева меланома са позитивном породичном анамнезом (41). P16 игра важну улогу у регулацији ћелијског циклуса и може бити инактивиран метилацијом.

Резултати великих ретроспективних студија показују да су пацијенти који имају меланом у повећаном ризику да развију секундарно други примарни меланом. Инциденција мултиплих примарних меланома у овим студијама варира у опсегу од 1.3% до 8.0%. Већина фамилијарних меланома се наслеђује полигенетски, најчешће због варијација у CDKN2A (42) или због полиморфизама гена који кодира меланокортин и рецептор MC1R (43).

Коегзистенција меланома и атипичних младежа у оквиру фамилија је описана као В-К моле синдром (44) или синдром диспластичних невуса (45). Објављени су и подаци о фамилијарним генима за меланом на 1p36 (46) и 1p22 (47). Спорадичне мутацију у

BRAF (енгл. *B-Raf proto-oncogene*) или NRAS (енгл. *N-ras proto-oncogene*) су такође честе код меланома.

6. Тип коже

Повећан ризик да оболе од меланома имају људи свијетле коже са пјегама, плавих или зелених очију и плаве или црвене косе у поређењу са тамнопутим људима (48). Овај ризик корелира са ризиком осјетљивости коже на сунчево свијетло па је направљена подјела по фототиповима коже на 6 група класификованих према одговору коже након 30 минута излагања подневном сунчевом свијетлу у љетном раздобљу.

Табела 1. Класификација фототипова коже

Фототип	Конститутивна боја коже	Опекотине и способност да се црни	Моментално поцрне	Одложено поцрне
I	Слонова кост бијела	Лако изгоре, никада не поцрне	-	-
II	Бијела	Лако изгоре, минимално поцрне	+/-	+/-
III	Бијела	Изгоре и поцрне умјерено	+	+
IV	Беж, благо поцрнила	Минимално изгоре, поцрне умјерено	++	++
V	Умјерено браон или поцрнила	Ријетко изгоре, црне интезивно	+++	+++
VI	Тамно браон или црна	Никад не изгоре, црне интезивно	++++	++++

Тип 1 - тип коже код кога се увијек појаве опекотине, никад пигментација. Најчешће се среће код особа са изразито свијетлом пути, црвеном косом и плавим или зеленим очима.

Тип 2 - тип коже код кога се увијек појаве опекотине, понекад пигментација. Најчешће се јавља код особа свијетле пути са плавом косом и плавим очима.

Тип 3 - тип коже код кога се опекотине појављују понекад, пигментација увијек.

Тип 4 - тип коже код кога су опекотине ријетке, а пигментација је особито изражена.

Тип 5 - тип коже код изразито тамнопутих особа као што су Индијанци.

Тип 6 - особе црне коже (49).

Најосјетљивији на дјеловање UV зрака су људи са типом коже 1 и 2, а бројне студије показују да они имају и највећи ризик за развој меланома (49). Тако је инциденца меланома у Европи значајно већа код свијетлопутих Норвежана, Швеђана и Финаца него у тамнопутих Италијана и Шпанаца (50).

7. Остали фактори ризика

Xeroderma pigmentosum

То је ријетка насљедна болест која се насљеђује аутозомно-рецесивно, а карактерише се осјетљивошћу на сунце, оштећењима ока и 1000 пута увећаним ризиком за настанак кожних тумора укључујући и меланом (51). Она је удружена са мутацијама на бројним генима које су одговорне за генску нестабилност и канцергене мутације које настају након оштећења DNA због UV зрачења. Оштећење DNA је иреверзибилно и кумулативно.

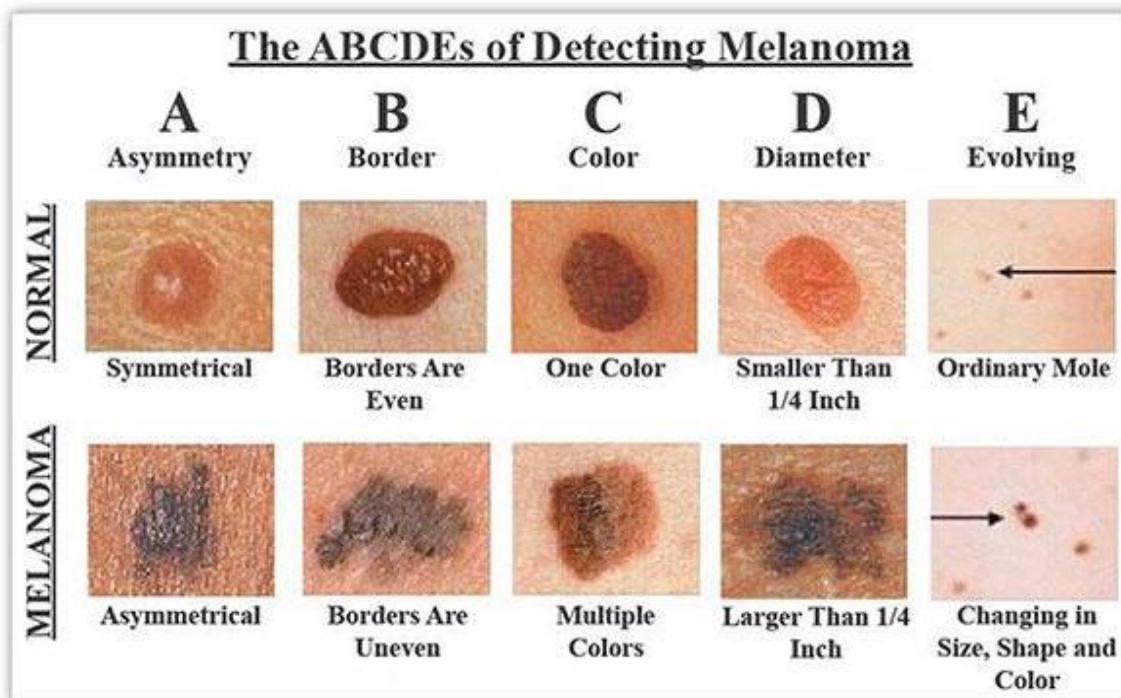
Не постоји лијек за ову болест. Заштита се састоји у избјегавању излагању сунчевој свијетлости, ношењу заштитне одјеће и наочара, као и коришћењу заштитних крема и препарата. Утврђено је да пацијенти који имају друге фамилијарне карциномске синдроме могу имати склоност ка настанку меланома и то је посебно уочено код породица са карциномом панкреаса, CNS, а и дојке као и у породицама са неурофиброматозом (52).

Имуносупресија

Особе које су на имуносупресивној терапији, нарочито пацијенти након трансплантације, због хроничне имуносупресивне терапије, су у повећаном ризику да развију меланом (53).

1.5. Знаци и симптоми меланома

Не постоји типична клиничка слика меланома. Меланом прати неуобичајна морфолошка разноликост, јер тумор може варирати у величини, облику, боји, дубини продора туморског ткива, као и секундарним промјенама типа стварања краста, ерозија, улцерација, крварења и влажења. Обично изгледа као браон или црна промјена са ирегуларним границама, бојом и симетријом. Може да се развије из постојећег младежа или да настане на предходно неизмјењеној кожи. Промјена облика, величине, боје младежа као и његове ограничености према околној кожи, као и субјективни осјећај свраба и бола су најчешћи рани знаци и симптоми меланома (54). У касније знаке спадају крварење, ерозије и улцерације (54). Меланом ока може да изазове бол као и проблеме са видом: замагљене слике, дупле слике, дјелимичан и комплетан губитак вида. Амеланотични меланом може да се јави као улцер или као промјена изгледа ожиљка па је компликован за дијагностику. Свјетска здравствена организација је дала ABCD (EF) критеријуме у сврху лакше и раније дијагностике меланома. Ови критеријуми укључују:



Слика 3. ABCD упозоравајући клинички знаци. На слици су приказани критеријуми на основу којих се може лакше и раније дијагностиковати меланом. Критеријуми обухватају постојање асиметрије, ирегуларности ивица, дијаметар и развој.

A - асиметрија (енгл. *assymetry*) - промјена је асиметрична.

B - ирегуларност ивица (енгл. *border*) - ивице су грубе, нејасне или са зарезима.

C - боја (енгл. *color*) - пигментација није униформна.

D - дијаметар (енгл. *diameter*) - меланоми су најчешће ширине веће од 6 mm, могу бити и мањи.

E - развој (енгл. *evolution*) - било који младеж или промјена на кожи која се мијења у облику, боји и величини и издиже изнад нивоа коже током времена, заслужује хируршко уклањање уз хистопатолошку анализу.

Ови критеријуми се не примјењују код нодуларних меланома. За њих постоји додатна EFG класификација:

E - елевација (енгл. *elevated*) - било која промјена на кожи без обзира на боју која је изнад нивоа коже.

F- чвор тврд на палпацију енгл. *firm to touch*) - Младеж или промјену тврду на палпацију треба хируршки уклонити.

G - континуирани раст (енгл. *growing*) - Младеж или промјену која континуирано расте треба хируршки уклонити посебно код особа старијих од 50 година.

Губитак апетита, мучнина, повраћање и главобоља као манифестације паранеопластичног синдрома могу да се јаве и код меланома. Метастазе у раном стадијуму меланома су могуће, али релативно ријетке, мање од петине рано дијагностификованих меланома метастазира. Меланом најчешће метастазира у CNS, потом јетру, плућа, кости и удаљене лимфне чворове (55).

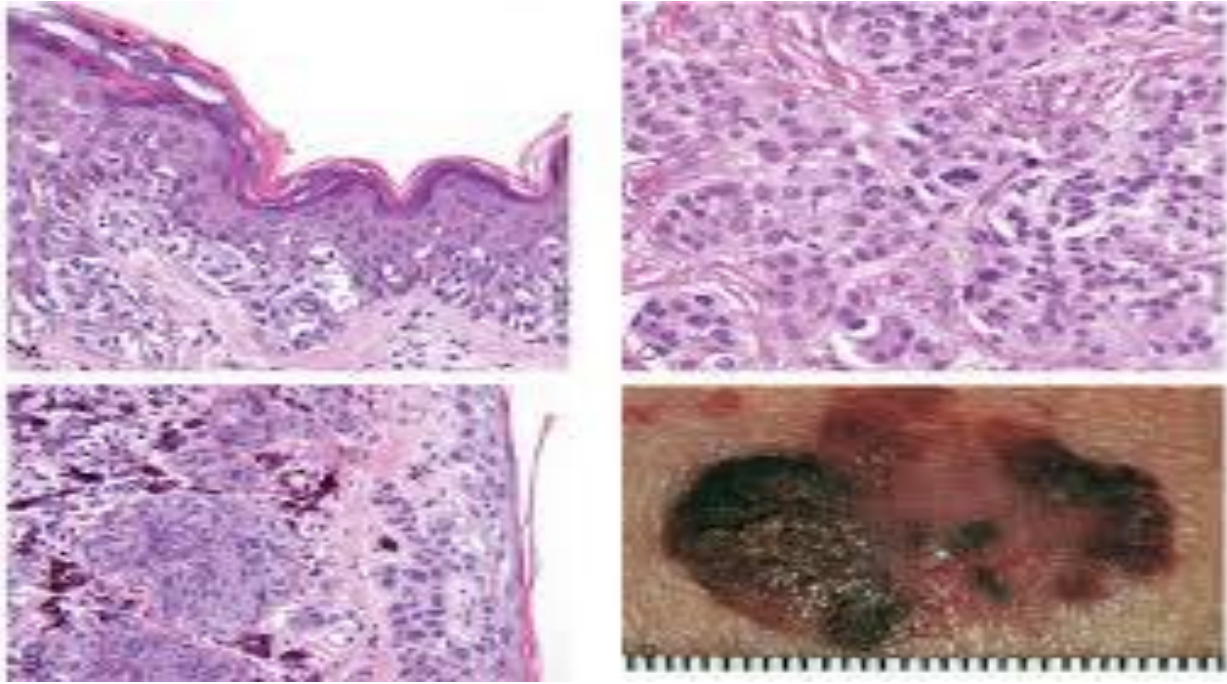
1.6. Начин раста меланома

Меланом се шири локалним урастањем, лимфогено и хематогено. Локално ширење је по типу радијалног (хоризонталног) и вертикалног раста.

Иницијално меланоми имају тенденцију радијалног раста који подразумјева ширење меланома кружно око промјене кроз епидерм и површне слојеве дерма, често у дужем временском периоду. У овој фази раста меланом нема тенденцију метастазирања и нема доказа о присутној ангиогенези. Вертикални раст подразумјева продирање меланома у дубину, у дубље слојеве дерма и поткожно ткиво. Клинички у овој фази се уочава појава нодуса на промјени која корелира са појавом ћелијског клона који се неконтролисано умножава и има метастатски потенцијал (56). Зависно од фазе раста меланома можемо процијенити потенцијалну способност метастазирања што је кључно за одређивање прогнозе и одабира прикладног облика лијечења (57).

А.

Ц.



Б.

Д.

Слика 4. Меланом. А. Радијални раст са неправилним гнездима и појединачним ћелијама меланома који се шире унутар епидерма. Б. Вертикални раст са нодуларним накупинама малигнућ ћелија које се шире дубоко у дерм. Ц. Ћелије меланома имају хиперхроматична једра, неједнаке величине и неправилног облика са упадљивим нуклеолусима. Често се види митозе и атипичне митозе. Д. Промјене су клинички обично веће од невуса са ирегуларним ивицама и пигментацијом. Макуларна поља одговарају суперфицијаној тј. радијалној фази раста, док издигнута поља често указују на инвазију дерма (вертикална фаза раста).

У развоју меланома може се издвојити 5 фаза

1. Бенигни меланоцитни невус
2. Меланоцитни невус са архитектуралном и цитолошком атипичном (диспластични невус).
3. Меланом - хоризонтална фаза раста.
4. Меланом - радијална фаза раста.
5. Метастаски меланом (56).

1.7. Патохистолошка класификација меланома

Хистолошки типови

Подјела меланома је базирана на комбинацији клиничких и хистолошких арактеристика. Хистолошки критеријуми су базирани на локацији меланоцита, начину њихове организације, цитолошким особинама, локализацији меланома и другим морфолошким карактеристикама.

Најчешћи хистолошки типови меланома су:

1. Суперфицијално ширећи меланом - *Superficial Spreading Melanoma* (SMM)

Представља најчешћи хистолошки тип меланома. Јавља се у око 70% случајева. Најчешће настаје *de novo*, мада се може развити из предходно постојећег невуса (конгениталног или диспластичног) код особа средње животне доби. Јавља се на свим дијеловима тијела, а најчешће на трупу код мушкараца, а на ногама код жена што указује на повезаност са интермитентним сунчањем. Типично је асимптоматски, са варијацијама у пигментацији и ирегуларним ивицама (58). Промјена је обично у облику плака са неправилним уздигнутим свијетло смеђим или смеђим подручјима на којима се налазе црвене, бијеле или плаве тачке или мали плаво-црни чворићи. Понекад је видљив ружичасти тон-упална реакција строме. Током радијалне фазе раста, која је најдуже заступљена, је раван са лако уздигнутим рубовима, док у вертикалној фази раста, површина постаје неравна и чвораста. Тада је тумор обично промјера већег од 1cm и често улцерисан на површини. У хистолошкој слици током радијалне фазе присутни су велики епителоидни меланоцити насумично разбацани по свим нивоима епидерма. Атипични меланоцити пролиферишу, неправилно се распоређују у епидерму појединачно или у накупинама, већином захватају горње дијелове епидерма. У дермису је присутан запаљенски инфилтрат. Радијална фаза раста траје обично дуго, након чега прелази у вертикалну фазу раста са инвазивним обликом тумора (50).



Слика 5. Суперфицијално ширећи меланом

2. Нодуларни меланом (NM)

То је други по учесталости хистолошки тип меланома. Јавља се од 10-15% свих меланома у средњој животној доби, подједнако код оба пола. Може настати било гдје на тијелу, али најчешће се развија на трupu, глави и врату. Најчешће настаје на непромјењеној кожи, ријетко на претходном невусу. Карактерише га брз раст и кратка анамнеза од неколико мјесеци до двије године. Нодуларни меланом има само вертикалну фазу раста чиме се објашњава изразита агресивност овог типа меланома. Одсуство радијалне фазе раста је

основна хистопатолошка карактеристика овог типа меланома (59). Расте у облику полипа или чвора те је често улцерисан и крвари. У хистолошкој слици присутни су епителоидни меланоцити који код узнапредовалог меланома продиру у ретикуларни дермис и поткожно ткиво. Меланомске ћелије расту и према површини што индукује настанак улцерација. Присутни су интрадермални сфероидални чворићи састављени од великих епителоидних меланоцита са израженим једрима док атипични меланоцити имају свијетла једра и изражена једарца (60).



Слика 6. Нодуларни меланом

3. Лентиго меланом – *Lentigo Melanoma (LMM)*

Овај тип меланома чини око 4-15% случајева. Оболијевају најчешће особе старије животне доби. Јавља се на дијеловима тијела изложеним сунцу углавном на лицу и врату. Има генерално бољу прогнозу од осталих типова меланома, али недавне студије показују да боља прогноза може бити везана за мању дебљину меланома у тренутку постављања дијагнозе. Обично се јавља као асимптоматска пљосната свијетло смеђа до смеђа макула, неправилног облика, промјера око 2-6 cm или мрља са црним тачкицама неправилно распоређеним по површини. Током дуге еволуције присутна је радијална фаза раста која након дугог времена прелази у вертикалну фазу раста. Хистолошку слику карактерише конфлуентни раст атипичних меланоцита дуж дермо-епидермалног споја који се често шире низ кожане наборе. Присуство вретенастих ћелија указује на инвазивну компоненту и може бити повезана са дезмопластичном реакцијом (61)



Слика 7. Лентиго меланом

4. Акрални лентигинозни меланом - *Acral Lentiginous Melanoma (ALM)*.

Јавља се око 5% свих случајева меланома код бијелаца, док је код особа афроамеричког и азијатског поријекла најчешћи тип меланома (60-72%). Налази се најчешће на кожи без длака, углавном на плантарној страни стопала, длановима, испод ноктију и на мукокутанним спојевима код старијих особа у 6-7 декади живота, чешће код мушкараца. Јавља се као неправилна смеђа или црна пигментација промјера већег од 3 mm. Промјена може бити и без пигмента. Посебан облик је субунгвални меланом који се клинички манифестује као пигментна уздужна трака испод нокта која изазива деформацију истог. Радијална и вертикална фаза раста су подједнако заступљене што утиче на агресивност у клиничком току и лошу прогнозу болести (50). Лоша прогноза је повезана са његовом локализацијом и касним откривањем. У хистолошкој слици током радијалне фазе раста присутна је пролиферација атипичних меланоцита дуж базалног слоја епидермиса и удружена је са акантозом епидермиса. Вертикална фаза укључује присуство и вретенастих ћелија (62).



Слика 8. Акрални меланом

Постоје и нове класификације меланома који их категоризују у:

1. Конвенционални меланоми са даљом субкласификацијом базираном на присуству или одсуству интраепидермалне компоненте:

- Интраепителни меланом
- Интраепителни меланом са инвазијом у дерм и поткожно ткиво
- Меланом са одсуством интраепителне компоненте.

2. На основу изгледа интраепителне компоненте дијеле се на:

- паџетоидне,
- лентигинозне,
- гњездасте,
- мјешовите (63).

3. Субкласификација конвенционалних меланома базирана на етиологији и локализацији дијели их на:

- соларни меланом,
- акрални меланом,
- мукозни меланом.

Ријетке варијанте меланома су:

- амеланотични меланом
- меланом у циновском длакавом невусу
- малигни плави невус
- меланом мукозних мембрана
- меланом са непознатом примарном локализацијом
- дезмопластични меланом
- невоидни меланом (50)

Стадијум болести и TNM - класификација

За класификацију меланома се примјењује TNM класификација Америчког здруженог комитета за рак (eng. American Joint Commite of Cancer - AJCC из 2009 године (64). TNM представља скраћеницу од три кључна параметра Т (*tumor* - тумор), N (*node* - чвор), M (*metastasis*-метастаза). Параметар Т описује величину примарног тумора и да ли је проширен на околна ткива, N описује да ли су захваћени регионални лимфни чворови, а M описује присуство удаљених метастаза. Она служи за одређивање степена проширености болести и помаже члановима онколошких тимова за процјену прогнозе болести као и за избор најбоље терапије (64). Ова класификација се темељи на научно утврђеним прогностичким факторима, а осмишљена је тако да сваки виши стадијум болести уједно представља и статистички значајно лошију прогнозу.

Биопсију тумора и дренажу лимфатика следи одређивање стадијума болести (64-68). Стадијум I и II представља локализовану болест, стадијум III болест са захваћеним регионалним лимфним чворовима, а стадијум 4 болест уз присуство удаљених метастаза. Код болесника са више примарних меланома стадијум болести се одређује у односу на меланом са најлошијим прогностичким карактеристикама.

Табела 2. Т класирање

Т класификација
Tis
Tx
T1
T2
T3
T4

Табела 3. N класирање

N Класификација
Nx
N0
N1
N2
N3

Табела 4. M класирање

M класификација
M1a
M1b
M1c

Табела 5. Клиничка класификација

Клинички стадијум	Примарни тумор (Pt)	Метастазе у регионалним лимфним жлијездама (N)	Нема M0
0	In situ тумори Tis	Нема No	Нема M0
IA	≤1mm без улцерације T1a	Нема No	Нема M0
IB	≤1mm са улцерацијом или бројем митоза ≥1mm ² T1b	Нема No	Нема M0
	1,01-2,0 mm без улцерације T2a	Нема No	Нема M0
IIA	1,01-2,0 mm са улцерацијом T2b	Нема No	Нема M0
	2,01-4,0 mm без улцерације T3a	Нема No	Нема M0
IIB	2,01-4,0 mm са улцерацијом T3b	Нема No	Нема M0
	>4,0 mm без улцерације T4a	Нема No	Нема M0
IIIC	>4,0 mm са улцерацијом T4b	Нема No	Нема M0
IIIA	Било која дебљина тумора без улцерације T(1-4)a	Микрометастазе у ≤3 лимфна чвора N1a,N2a	Нема M0
IIIB	Било која дебљина тумора са улцерацијом T(1-4)b	Микрометастазе у ≤3 лимфна чвора N1a,N2a	Нема M0
	Било која дебљина тумора без улцерације T(1-4)a	≤3 нодалне макрометастазе N1b,N2b	Нема M0
	Било која дебљина тумора без улцерације T(1-4)a	Сателитске и/или in transit метастазе без регионалних метастаза у лимфним чворовима N2c	Нема M0
IIIC	Било која дебљина тумора са улцерацијом T(1-4)b	≤3 нодалне макрометастазе или сателитске или in transit метастазе без регионалних метастаза у лимфним чворовима N1b,N2b,N2c,	Нема M0
	Било која дебљина тумора без улцерације T(1-4)b или без T(1-4)b	4 или више нодалних метастаза или лимфни чворови збрисане структуре или сателитске или in transit метастазе са метастазом у бар једном лимфном чвору N3	Нема M0
IV	Било који T	Било који N	Удаљене метастазе M1

Хистопатолошки прогностички параметри неопходни за одређивање стадијума болести

Као и ексцизију примарног меланома и биопсију лимфног чвора стражара треба прегледати на трајним препаратима користећи хематоксилин-еозин и имунохистохемијско бојење.

1. Дебљина меланома (eng. Breslow)

Овај параметар је укључен у АЈСС систем за процјену стадијума болести. Дебљину меланома (дубину инвазије) је први дефинисао као прогностички фактор патолог Александар Бреслов 1970. године (69). По њему се дубина инвазије реферише као дебљина по Бреслову. Бројне студије су потврдиле значај дебљине промјене као прогностичког фактора за меланом (70,71). Мјерење се најбоље може извршити употребом окуларног микрометра. Ако хируршка линија ресекције пролази кроз најдубљи дио меланома, дебљини треба да предходи ријеч „најмање“ (64, 72-77).

На основу дебљине по Бреслову меланоми се дијеле на пет стадијума:

Табела 6. Стадијум меланома на основу дебљине по Бреслову

Стадијум	Дебљина
Стадијум I	$\leq 0,75$
Стадијум II	0.75-1,5 mm
Стадијум III	1,51-2,25 mm
Стадијум IV	2,25-3,0 mm
Стадијум V	већа од 3.0 mm

2. Кларков (енгл. Clark) ниво инвазије

Кларков ниво инвазије описује ниво анатомске инвазије меланома у кожу (78). У ранијој АЈСС шеми за процјену стадијума проширености меланома то је био примарни фактор. Бројним студијама је потврђено да Кларков ниво инвазије има мању предиктивну вриједност и да је мање репродуцибилан у односу на дебљину меланома по Бреслову (64).

Постоји пет анатомских нивоа инвазије по Кларку који директно корелирају са лошим прогностичким импликацијама и то су:

- Ниво 1: интраепидермални (*in situ*) меланом
- Ниво 2: инвазија папиларног дерма без његовог испуњавања и ширења
- Ниво 3: испуњавање и проширење папиларног дерма
- Ниво 4: инвазија ретикуларног дерма
- Ниво 5: продор у поткожно масно ткиво

Прогностички фактори код меланома се могу подијелити у три групе:

А) Морфолошки (хистолошки) фактори:

- Дебљина промјене по Бреслову
- Ниво инвазије по Кларку

- Присуство улцерације
- Присуство митоза
- Микросателитоза
- Регресија
- Лимфоваскуларна инвазија и ангиотропизам
- Величина тумора
- Неуротропизам
- Тумор инфилтришући лимфоцити (TIL)
- Облик ћелија (вретенасте ћелије су удружене са бољом прогнозом од других типова ћелија)
- Хистолошки тип
- Вертикална фаза раста

Б) Клинички фактори

- Поодмакли клинички стадијум
- Прогноза је лошија што је пацијент старији
- Мушкарци имају лошију прогнозу
- Локална рекуренција
- Анатомска локализација (глава и врат, стопала и шаке имају лошију прогнозу)

Ц) Други фактори

- Повећан нуклеарни волумен
- Садржај DNA
- Пролиферација и индикације о покретљивости туморских ћелија
- Циркулишуће меланомске ћелије (РТ-ПЦР или имунохистохемија).

Улцерација

Улцерација код меланома се дефинише као одсуство свих слојева епидерма, укључујући рожнати слој уз ткивну реакцију - фибрин и полиморфонуклеарне леукоците. Кад је присутна улцерација, дебљина по Бреслову се мјери од базе улцерације до најдубље ивице инвазије. То је независан, негативан прогностички параметар, а сматра се знаком биолошки агресивнијег тумора који има већу способност метастазирања те упозорава на лошију прогнозу (64, 72-74). Интервал преживљавања код присутне улцерације се смањује без обзира на дебљину тумора, код тумора дебљих од 4mm и до 22% (79).

Митотски индекс

Митотски индекс се дефинише као број митоза по квадратном милиметру. Представља независан прогностички параметар за меланоме дебљине до 1mm (64, 72). Једна или више митоза означава б подстадијум за меланоме дебљине до 1 mm (64, 72). Бројне студије су показале да је повећан митотски индекс удружен са лошом прогнозом, посебно ако је број митоза већи од 6 по mm². Такође бројне студије су потврдиле да је број митоза бољи прогностички фактор од присуства улцерације. Прогноза је лошија ако је меланом локализован на трупцу и глави у односу на удове, ако се ради о нодуларном или површно ширећем меланому у односу на лентиго малигном меланому, те ако су болесници старије доби и мушког пола (60).

(Микро) сателитске / *in transit* метастазе

Сателитске метастазе су макроскопски видљиве, а микросателитске само под микроскопом. У посљедној ревизији AJCC TNM одређивање стадијума меланома, микросателити су дефинисани као туморска гнијезда већа од 0,05 mm на удаљености већој од 0,3 mm од примарног тумора (64, 73-76). Ријетко је присутна код меланома тањих од 1,5 mm, а петогодишње преживљавање код ових болесника је 36% у поређењу са 89% код болесника који нема присутну микросателитозу (80). Микросателитоза је удружена са повећањем метастазирања у регионалне лимфне чворове (од 12% до 53%) у туморима већим од 1,5 mm. (81).

Присутност и обим регресије

Регресија у меланому се дефинише као одсуство туморских ћелија у инвазивној компоненти уз појаву лимфоцитног инфилтрата, фиброзе и меланофага. Генерално се сматра лошом прогнозом посебно ако захвата више од 75% инвазивне компоненте. Постоје студије у којима је регресија повезана са бољом прогнозом (74-77).

Лимфоваскуларна инвазија

Васкуларна инвазија представља инвазију туморских ћелија у микроваскулатуру дермиса било „наслањањем“ на ендотел (инципијентна инвазија) или пенетрацијом ендотела и смјештањем у лумен крвног суда. Бројне студије су показале да васкуларна инвазија повећава ризик од релапса, метастазирања у регионалне лимфне чворове, стварању удаљених метастаза и смртог исхода (82-84). Недавне молекуларне анализе васкуларизације кутаних меланома показују да лимфоангиогенеза игра важну улогу у даљој карактеризацији природне васкулатуре везане за прогресију меланома (84, 85).

Тумор инфилтришући лимфоцити (ТИЛ)

Мјери се нивоом лимфоцитног инфилтрата на бази тумора у вертикалној фази раста (86). Лимфоцитни инфилтрат може бити дифузан, фокалан или одсутан. Фокална (*non-brisk*) означава фокалну инфилтрацију лимфоцита периферно или интратуморски. Дифузна (*brisk*) представља дифузну инфилтрацију периферно или интратуморски. Одсутна инфилтрација се карактерише одсуством лимфоцита или њиховог директног контакта са меланомским ћелијама.

Најчешће је присутна дифузна инфилтрација код танких меланома. Петогодишње и дестогодишње преживљавање код меланома у вертикалној фази са дифузним инфилтратом је 77% и 55%. Код меланома са фокалним инфилтратом 53% и 45%, а код меланома са одсутним инфилтратом 37% и 27% (87). Тумор инфилтришући лимфоцити могу бити важан нови терапијски модалитет за меланоме, али су неопходна даља истраживања (88, 89).

Неуротропизам

Захватање нервних снопова било перинеурално или интринеурално туморским ћелијама је неуротропизам и повезан је већом учесталашћу рецидива. Често је присутан у дезмопластичној варијанти меланома (77).

Прекурсорске лезије

Меланоми могу настати из пре-егзистирајућих меланоцитних пролиферација укључујући и диспластичне невусе (обично оних са ћелијском и архитектуралном атипичном тежег степена).

Типови ћелија у вертикалној фази раста меланома

Величина и изглед ћелија у дермису показују бројне варијације. Разликују се два типа ћелија епителоидне и вретенасте, мада су описани и мјешовити типови меланомских ћелија. Већина меланома има ова типа наведених ћелија од којих један тип доминира. Цитолшке особине меланомских ћелија карактеришу велика једра, истакнута једарца, дебеле и неправилне ћелијске мембране, митозе у дубоким дијеловима дермиса и атипичне митозе (60). Генерално, вретенасте ћелије су показатељ боље прогнозе.

Серумски маркери болести

LDH

Повећан ниво лактат дехидрогеназе (LDH) је најјачи независни прогностички фактор за метастатске меланоме. Код меланома је присутан изостанак продукције аденозин фосфата из глукозе кроз оксидативну фосфорилацију због хипоксичне средине која постоји код меланомским ћелија. У хипоксичним условима LDH катализује конверзију пирувата у лактат (64, 72). Повећан серумски ниво LDH указује на некрозу меланомских ћелија јер је то молекул који се не излучује. Повећан LDH је неповољан прогностички фактор, независан од локализације меланома и броја метастаза и корелира са смањеним преживљавањем код болесника са одмаклом болешћу (72). Серумске вриједности LDH су укорпорирани у AJCC систем за одређивање степена унапредовалости меланома. Болесници са повећаним нивоом серумског LDH или удаљеном метастазом припадају IV M1c стадијуму болести (90, 91). Повећан ниво серумског LDH је негативан предиктор одговора на терапију (92).

Протеин S100

Протеин S100 су мали, кисели молекули укључени у бројне ћелијске функције. Постоји преко 20 различитих ових протеина које кодирају различити гени. Међу бројним интрацелуларним функцијама у које су укључени протеин S100 издвајају се регулација хомеостазе калцијума и функционисање дијелова цитоскелета, контрола ензимске активности, фосфорилација протеина, транскрипциони фактори и друге (93) .

Протеин S100 се повезује са инфламацијом и карциногенезом преко екстрацелуларних функција који обухватају активацију леукоцита, макрофага и модулацију пролиферације. Поједини типови протеина S100 дјелују као тумор супресори, други као тумор промотори. Протеин S 100B је широко експримиран у хуманим ткивима (93, 94), у различитим малигнитетима укључујући и меланоме (95, 96). Године 1980-те пласирана је идеја да се експресија протеин S100B у хуманим меланомским ћелијама може користити у дијагностици меланома. Данас се рутински користи као имунохистохемијски маркер за меланоме (97, 98). Повећане вриједности серумског протеин S100 су присутне код прогресије болести, а смањење вриједности се јавља код регресије болести. Стога протеин S100 игра улогу у мониторингу болесника у току терапије (99). Постоје стања у којима се неспецифично повећава вриједност серумског протеин S100, као што су повреде бубрега или јетре, метастазе различитих карцинома у јетри и различите инфламаторне и инфективне болести.

HMВ-45

Користи се у патологији као имунохистохемијски маркер. Представља скраћеницу за хумано меланомско црнило (*Human Melanoma Black*). То је клон антитијела који реагују са антигеном присутним у меланоцитним туморима.

1.8. Дијагноза меланома

Рана дијагноза је темељни циљ и предуслов успјешног лијечења меланома. Детаљном анамнезом, клиничким и дермоскопским прегледом постављамо радну дијагнозу сумљиве пигментне промјене.

1.8.1. Анамнеза

У разговору са болесником треба обратити пажњу на породичну анамнезу у смислу постојања меланома или синдрома диспластичних невуса. Потом треба евидентирати симптоматологију везано за сумњиву пигментну промјену као што је промјена величине, облика и боје пигментне промјене, свраб, пецкање, крварење, настанак улцерације. Потребно је информисати се о ранијој трауми постојећих младежа, животним навикама, излагању UV зрачењу, коришћењу соларијума .

1.8.2. Клинички преглед

Након детаљно узете анамнезе слиједи клинички преглед суспектне пигментне промјене, инспекцијом и палпацијом уз евидентирање свих параметера важећих

ABCDE/EFG критеријума. Клинички преглед подразумјева преглед не само сумњиве промјене већ и преглед коже и видљивих слузница у одговарајућој освјетљеној просторији. Посебно треба обратити пажњу на интердигиталне, интертригинозне предјеле, гениталну регију и аднексе коже, косу и нокте.

1.8.3. Дермоскопски преглед

Након клиничког прегледа слиједи дермоскопски преглед сумњиве промјене. Дермоскопија је неинвазивна, једноставна, финансијски прихватљива дијагностичка метода која подразумјева преглед кожних промјена ручним дермоскопом, стереомикроскопом, камером или дигиталним имагинг системом. Увећања варирају од 6 до 100 пута. Дермоскопија помаже у доношењу одлуке коју промјену треба хируршки odstrанити и послати на хистопатолошку анализу као и у праћењу болесника. Савремени дермоскопи су повезани са камером и рачунаром што омогућава да се слике снимају, чувају и упоређују што је од велике користи посебно код особа са синдромом диспластичних невуса (100). Ако се дермоскопским прегледом установи да постоји сумња на меланом, промјена се мора хируршки odstrанити и послати на хистопатолошку анализу.

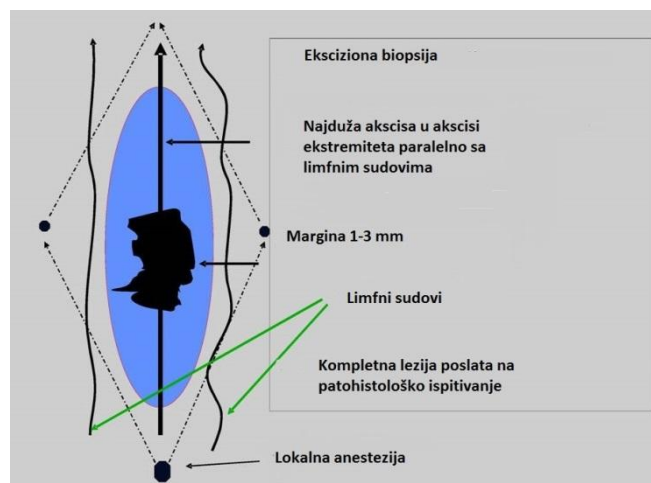
1.8.4. Биопсија

Хистопатолошка верификација потврђује или искључује меланом. На основу хистопатолошких карактеристика промјене доноси се одлука о даљем хируршком лијечењу које иде у правцу проширене ексцизије, биопсије лимфног чвора стражара и/или терапијске дисекције регионалног лимфног басена. (19, 68, 101-103)

Дијагностичке биопсије

1. Ексцизиона биопсија (енгл. *excisional biopsy*)

Подразумјева комплентно елиптично исјецање промјене ширине 1-3 mm од ивице промјене. Ексцизија захвата пуну дебљину коже и масно ткиво (19, 68, 101-103). Препоручује се директна сатура и затварање дефекта аутоотрасплантатом узетим са удаљеног дијела тијела или супротног екстремитета. Процедура се изводи у условима локалне инфилтративне (ромб) анестезије. Досадашње студије су дале примат локалној анестезији (19, 68, 101-104). Широка ексцизија примарне промјене у фази биопсије, као и затварање дефекта локалним кожним режњевима није индиковано јер компромитује лимфну дренажу и онемогућава извођење биопсије дренирајућег лимфног чвора-стражара уколико је препоручена (19, 68, 101-106).



Слика 9. Схема ексцизионе биопсије. Ексцизиона биопсија подразумијева хируршку технику узимања ткива ради патохистолошког испитивања.

2. Парцијална биопсија (енгл. *incisional biopsy*)

Парцијална биопсија подразумијева исјецање дијела тумора при чему се узима пуна дебљина коже са дијелом тумора који је највише измјењен (19, 68, 101-103, 107). Изводи се само на основу одлуке Онколошког конзилијума за меланом јер је повезана са највећим бројем рексизија. Парцијална биопсија се ради када комплетна ексцизиона биопсија није технички могућа из бројних разлога као што су лоше опште стање болесника, у случају када је клиничким и дермоскопским прегледом одређен низак степен сумње на меланом, потом уколико је промјена велика, типа лентиго малигне на лицу, врату и шакама, затим уколико комплетна ексцизија може створити велике функционалне и естетске деформитете (19, 68, 101-103, 107).

1.8.5. Молекуларна дијагностика

Молекуларна лабораторијска дијагностика обухвата анализу DNA/RNA (енгл. *Ribonucleic acid RNA*) и њихових продуката са циљем да помогне у откривању, класификацији, прогнози, одабиру лијечења и праћењу одговора на лијечење (108). Код болесника са меланомом индикована је молекуларна детекција BRAF, NRAS и SKIT мутација јер за то постоје лијекови инхибитори мутираних гена који су доступни у свијету. У узнапредовалом стадијуму меланома се ради детекција у BRAF гену чија се мутација може наћи у око 50% случајева меланома коже. NRAS мутације се могу наћи у око 15% случајева у узнапредованом стадијуму меланома коже, док је SKIT мутација забележена код 5% болесника (68, 109).

Детекција мутација у BRAF гену почиње изолацијом DNA из тестираног туморског ткива које ће бити лијечено. Патолог прави исјечке парафинског калупа на основу микроскопског препарата које садржи туморско ткиво и доставља у лабораторију (68,109).

1.8.6. Дијагностика регионалних метастаза

Метастазе у регионалним лимфним чворовима се могу дијагностификовати палпацијом, ултразвучним прегледом, биопсијом и компјутеризованом томографијом. Палпацијом можемо добити информацију о величини, облику, фиксираности за подлогу и кожу, изгледу коже изнад лимфног чвора и присутност бола при палпацији. Недостатак ове методе је у томе што је прилично субјективна, захтјева искуство испитивача и палпацији су доступни само већи лимфни чворови.

1.8.7. Ултразвучни преглед

Ултразвучни преглед нам омогућава преглед лимфних чворова величине 2 mm и веће. Примјеном доплер сонографије и квалитетнијих сонди можемо анализирати сљедеће карактеристике: однос дужине и ширине, губитак или ексцентричност хиперехогеног центра, тип васкуларизације, гранање крвних судова и индекс отпора. Анализом свих ових карактеристика постижемо тачност дијагнозе од 90% (110).

1.8.8. Биопсија лимфног чвора

Биопсија лимфног чвора у регионалним лимфним базенима може се спровести код палпабилних чворова помоћу специјалних игала закривљених на врху. Код непалпабилних чворова, а ултразвучно измјењених ради се аспирација танком иглом под контролом ултразвука, а добијени материјал се шаље на цитолошки преглед ради доказивања микрометастаза у лимфном чвору (111).

1.8.9. Компјутеризована томографија

Као дијагностичка метода резервисана је за регионалне лимфне чворове до којих се ултразвуком тешко може допријети као што је медијастинум.

1.8.10. Дијагностичке процедуре после хистопатолошке дијагнозе локализованог примарног меланом

Послије хистопатолошке верификације меланом неопходно је урадити сљедеће процедуре:

А) за меланоме ниског ризика (*in situ* меланом и меланом стадијума pT1a) - цјелокупни клинички преглед

Б) за меланом средњег и високог ризика (меланом стадијума pT1b - pT4b) - цјелокупни клинички преглед, LDH, протеин S100, ултразвучни преглед регионалних лимфних базена, абдомена и мале карлице.

У недостатку *SLNB*, потребно је урадити радиографију плућа и срца, ултразвучни преглед регионалних лимфних базена, абдомена и мале карлице, а уколико се ради о тумору pT4b стадијума болести умјесто радиографије плућа и срца потребно је урадити MSCT грудног коша (19, 68, 101-103).

1.8.11. Дијагностичке процедуре после дијагнозе локорегионалних метастаза

Локорегионалне метастазе се детектују клиничким и радиолошким прегледима и помоћу *SLNB*. За праћење прогресије болести потребно је одређивање концентрације LDH, S100 протеина. (19, 68, 101-103)

1.8.12. Дијагностичке процедуре после дијагнозе удаљених метастаза

Мерење LDH је индиковано за IV стадијум болести. Концентрација S100 протеина у серуму је сензитивнија у детекцији прогресије болести и одговора на терапију у IV стадијуму болести. За детекцију удаљених метастаза потребно је урадити компјутеризовану томографију грудног коша. ПЕТ скен иако користан није погодан за детекцију секундарних депозита у CNS-у (19, 68, 101-103).

1.9.Терапија меланома

1.9.1. Хирушка терапија примарног меланома

Хирушка терапија примарног меланома је измјењена посљедњих година на основу резулата бројних студија. Давне 1857. године *William Norris* доказујући агресивну природу меланома предложио је широку локалну ексцизију лезије, познату као скраћеница *WLE (wide local excision)* која је представљала стандард у хируршком лијечењу меланома (112). Адекватна ширина маргина није била дефинисана, тако да је она постала предмет бројних студија које су услиједиле. Мултипле проспективне, рандомизоване студије почињу да разматрају питање адекватних хируршких ресекционих маргина. Тако у студији Свјетске здравствене организације било је укључено 612 пацијената са меланомом тањим од 2 mm који су третирани широком локалном ексцизијом са маргинама од 1-3 cm. Локални рецидив на мјесту примарне лезије је детектован код 4 пацијента који су били у групи са маргинама од 1 cm, али није нађена статистички значајна вриједност у односу на укупно преживљавање (113). У студији *Intergroup Melanoma Trial*, 462 пацијента са меланомом на труп и проксималним дијеловима екстремитета је рандомизовано хируршки третирано са маргинама ресекције од 2 до 4 cm. Медијана десетогодишњег праћења за инциденцију локалног рецидива је била иста код пацијената којима је ексцизија учињена са маргинама од 2 cm и од 4 cm. Није пронађена статистички значајна разлика у укупном преживљавању (114). Све сљедеће студије су показале да нема статистички значајне разлике у укупном преживљавању у односу на ширину маргине код ексцизије меланома. Фактори за које је утврђено да значајно утичу на локалну рекуренцију су улцерација, дебљина меланома по Бреслову, као и анатомска локализација која показује да меланоми главе и врата имају много већи ризик од настанка локалног рецидива (114).

Циљ хируршке терапије да се добију слободне маргине без туморских ћелија како би се спријечио рецидив болести. Данас, златни стандард у хируршком лијечењу меланома је сљедећи: ексцизиона биопсија промјене којим се потврђује клиничка дијагноза. Потом слиједи друга хируршка интервенција, реексцизија.

Препоручене ширине маргина реексцизије према европским смјерницама за лијечење меланома су следеће:

Табела 7. Ширина маргина ресекције према дебљини меланома по Бреслову

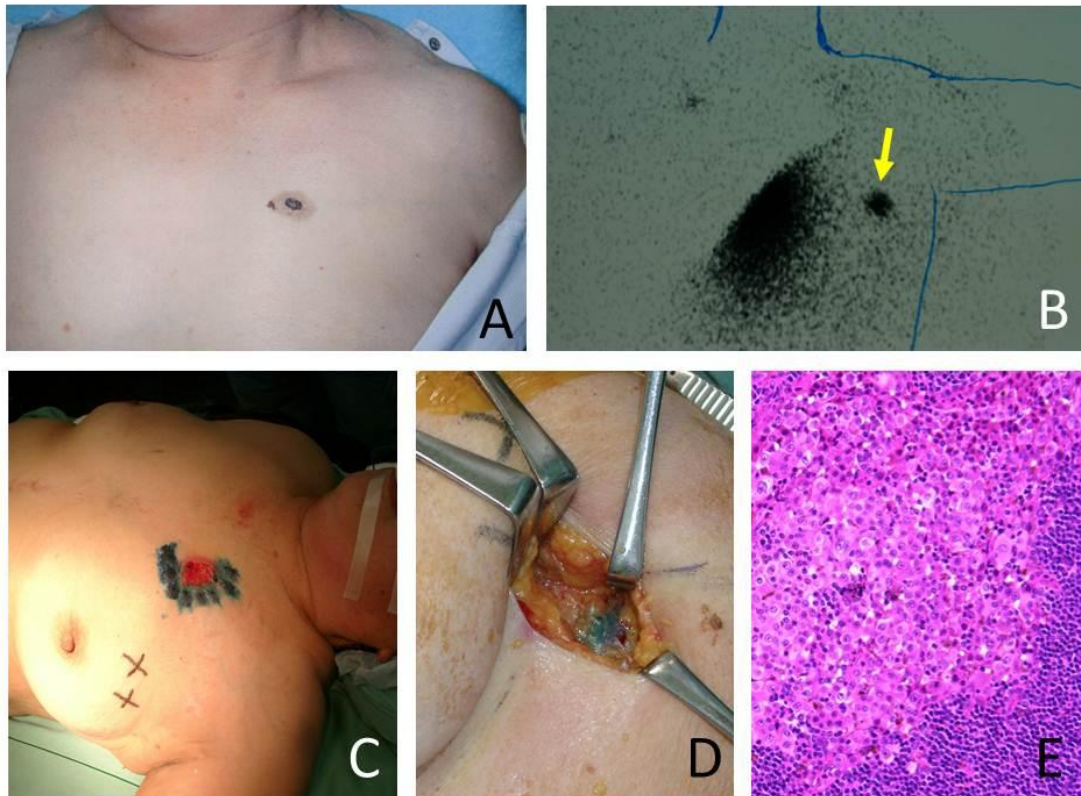
Дебљина по Бреслову	Маргине ресекције (cm)
Меланом <i>in situ</i>	0,5 cm
До 2 mm	1 cm
Преко 2 mm	2 cm

Најбоље је да се реексцизија уради у првих шест недеља након ексцизионе биопсије. На основу стадијума болести Онколошки конзилијум болести доноси одлуку да ли се треба у истом акту урадити и биопсија лимфног чвора стражара. Реексцизија се ради у локалној или општој анестезији. Настали дефект се може реконструисати различитим реконструктивним техникама које укључују директну сутуру, аутотрансплантат и локалне режњеве (19, 66-68, 103, 115). Мање маргине ресекције су дозвољене за функционалне регије као што су поглавина, лице, капци, усне и нос (19, 66-68, 103, 115-117). За акрални и лентигинозни субунгвални меланом је индикована функционална ампутација (19, 66-68, 103, 118).

1.9.2. Хирушка контрола регионалних лимфних чворова

Биопсијом лимфног чвора стражара се идентификују клинички непримјетне метастазе (непалпабилне и UZ недетектебилне) (66, 67, 68, 103, 19). Ова метода не утиче на укупно преживљавање (64, 119-124).

SLN је технички изазовна процедура код регије главе и врата због анатомских карактеристика и непредвидиве лимфне дренаже гдје се могу наћи мултипли лимфни дренажни базени. Према препорукама Европског удружења за нуклеарну медицину, Европског удружења за истраживање и лијечење карцинома за биопсију лимфног чвора стражара користи се двоструко мапирање (сцинтиграфија и метиленскоплаво пребојавање) (19, 64, 66, 67, 68, 103, 119).



Слика 10. Техника означавања и биопсија лимфног чвора стражара (SLNB). (A) Примарни меланом на лијевој страни предњег зида грудног коша. (B) Лимфосцинтиграфија показује акумулацију технецијума (^{99}Tc) који је интрадермално ињектован око примарног меланома у лијевој аксили. (C) Интрадермална ињекција метиленског плавог око примарног меланома. (D) Екplorација мјеста лимфног чвора стражара помоћу пробае гама камером. (E) Хистопатолошка детекција микроскопских метастаза у лимфном чвору.

1.9.3. Хирургија метастаза у регионалним лимфним чворовима. Терапијска дисекција регионалних лимфних басена

Индикација за терапијску дисекцију регионалног лимфног базена су клинички и радиолошки верификоване макрометастазе и микрометастазе детектоване биопсијом лимфног чвора стражара (19, 66-68, 103). Постоје стандардне хируршке технике којих се треба придржавати сходно принципима онколошке доктрине. У пазушној јами, дисекција подразумјева евакуацију сва три нивоа (спрата) лимфних чворова. Илијачна дисекција подразумјева уклањање свих лимфних чворова дуж илијачних крвних судова у случају детекције измјењених лимфних чворова дијагностификованих ултразвучно и/или СТ/MRI. Илијачна дисекција се може извести и у случају више од три позитивна лимфна чвора након дисекције ингвинума или уколико је позитиван Клокеов (*Cloquet*) лимфни чвор, али ова процедура није стандардна терапија и ради се само у неким центрима. (19, 66-68, 103)

Терапијска дисекција у регији главе и врата је специфична, изводи се функционална дисекција по посебним смјерницама. (19, 64, 66-68, 103, 119-124). Уколико је примарни меланом локализован на кожи поглавине иза ушне шкољке, а постоје клинички и

ултразвучно измјењени лимфни чворови, индикувана је селективна дисекција лимфних чворова врата са уклањањем лимфних чворова II, III, IV и V нивоа, ретроаурикуларних, окципиталних и нухалних лимфних чворова (125).

1.9.4. Хирургија локалног рецидива, сателитских и *in transit* метастаза

Локални рецидив се може јавити након некомплетно ексцидираног примарног меланома. Терапија избора је хирургија рецидива која подразумјева ексцизију у цјелости до клинички здравих рубова коже. За нересктабилне сателитске и *in transit* метастазе треба размотрити друге методе лијечења. (19, 66-68, 103).

1.9.5. Хирургија меланома код дјецe

Хирушка дијагноска и хирушка терапија примарног меланома код дјецe се не разликује од протокола који важи и за одрасле особе.

1.9.6. Хирургија меланома код трудница

Лимфосцинтиграфија је безопасна процедура за трудноћу и може се изводити. Уколико се планира општа анестезија, већина хирурга одлаже интервенцију до завршетка порођаја. С обзиром да су описане алергијске реакције на метиленско плавило, његова примјена је контраиндикувана у трудноћи (64).

1.9.7. Адјувантна терапија

Циљ ове терапије је да се продужи период без болести и укупно преживљавање пацијента обољелог од меланома. Већина рађених студија је показала да се овом терапијом може продужити раздобље ремисије код болесника са дисеминованом болешћу, па се код прогностичких повољних меланома нема смисла примјењивати (126). Ова терапија се разликује у различитим регионима. У Европи се интерферон примјењује у оквиру клиничких студија (127, 128). Британско удружење дерматолога сматра да интерферон не треба користи као стандард у адјувантној терапији (129). У САД-у, већина пацијената прима једногодишње високе дозе интерферона упркос споредним ефектима овог лијека (130). Мета анализа из 2011. године је показала да интерферон може да продужи вријеме до релапса болести, али да повећава преживљавање до пет година код само 3% пацијената. Нежељени споредни ефекти овог лијека знатно нарушавају квалитет живота (131).

Хемиотерапија у адјувантној терапији

Резултати најмање десет контролисаних студија показали су да примјена хемиотерапије не утиче на укупно преживљавање (132).

Терапија цитокинима

Не постоји јединствена препорука у давању интерферона (133). У Европи адјувантна терапија интерфероном се препоручује код пацијената са микро и макрометастазама у лимфним чворовима (стадијум IIB/C и III A/B/ C болести) или у оквиру клиничких студија (127, 128). Најчешћи нежељени ефекти интерферона су: грозница, малаксалост, главобоља, миалгије, депресија и суицидалне мисли (134, 135).

1.9.8. Хемиотерапија меланома

Према важећем АЈС систему хемиотерапија се не примјењује у стадијумима 0, I и II болести (101, 103).

Лијечење иноперабилних- *in transit* метастаза (III стадијум) болести

За меланоме локализоване на екстремитетима, уколико хируршка и радиотерапија нису могуће, хемиотерапија у виду локалне терапије може да се промјени. Топикални имиквимод се примјењује код дермалних, али се не може примјенити код субкутаних метастаза (136, 137). Студије су показале да се овим видом терапије остварује добар одговор, без доказа да ова терапија утиче на период преживљавања (136, 137). Као алтернатива изолованој перфузији може се користити хипертермијска перфузија екстремитета која је ефикаснија од изоловане перфузије (138).

Лијечење метастатског меланома у IV стадијуму болести

Примјена системске цитостатске терапије је индикована код метастатског меланома у IV стадијуму болести уколико нема таргет лијекова. (101, 103, 140-147). Дакарбазин је данас најчешће коришћен цитостатик код метастатског меланома и сматра се референтним лијеком за системску хемиотерапију (141). Као монотерапија такође се користе и цисплатин, карбоплатин и виндезин (142, 143). Полихемиотерапија која садржи цисплатин, виндезин и дакарбазин се може примјенити код пацијената са прогресијом болести. Она повећава стопу објективног одговора, али нема утицаја на укупно преживљавање (144). Биохемиотерапија, комбинација цитостатика са IL-2 или INF-alfa остварује већи степен објективног одговора без продужења периода преживљавања, али због значајног повећања токсичности не препоручује се у свакодневној пракси (145-147).

1.9.9. Имунотерапија метастатског меланома

Данас у свијету примјена имунотерапије у лијечењу метастатског меланома има све значајнију улогу. Циљ ове терапије да се активира сопствени имунски систем који би уништио ћелије меланома. То се односи на моноклонска антителија која блокирају цитотоксичне Т лимфоците и рецепторе за програмирану ћелијску смрт (101, 103, 148).

Интерлеукин-2

То је једна од опција за лијечење метастатског меланома која код малог процента пацијената остварује дуготрајне ремисије. Европска агенција за лијекове није одобрила примјену овог лијека због непостојања доказа о ефикасности из рађених студија (101, 103, 148-151). Студије су показале да интерлеукин 2 може да изазове комплетну и дуготрајну ремисију само код малог броја пацијента (152).

Iplimumab

Европска агенција за лијекове од 2013. године је одобрила примјену *ipilimumab* као прву линију терапије за пацијенте са узнапредовалом болешћу (154). Код пацијената са нормалним BRAF генотипом, *ipilimumab* се препоручује као примарна или секундарна терапијска опција у метастатској фази болести (101, 103, 148, 154). Он блокира молекулу на Т лимфоцитима чија је улога да индикује завршетак имунског одговора тако да стимулише имунски одговор против туморских ћелија. Увођење овог лијека је значајно измијенило иницијални третман код пацијената у IV стадијуму болести, али ипак овај лијек има и одређена ограничења као што су потенцијално озбиљне аутоимунске и токсичне ефекте и временски период од више мјесеци до појаве јасних клиничких одговора. Када се објективни одговори остваре, према најновијим подацима о праћењу пацијената, они остају дуготрајни (154).

Анти-PD-1 антитијела (*nivolumab* и *lamrolizumab*)

Анти-PD-1 је моноклонско антитијело које дјелује на рецептор програмиране смрти-1 (енгл. *Programmed cell death protein 1.PD1*). Анти-PD1 (*BMS-936558*) је показао охрабрујуће резултате у студијама фазе I и II. У недавно објављеним резултатима, RR је био 28% код болесника са меланомом (26 од 94 болесника) (16).

Таргет (циљана) терапија код узнапредовалог и/или метастатског меланома

Око 60% меланома има мутацију у BRAF гену. Клиничке студије су показале да BRAF инхибитори (*vemurafenib*) воде у потпуну регресију тумора код већине пацијената који има туморе са BRAF мутацијом (155, 156, 157). Према актуелним светским и европским водичима, BRAF инхибитори се препоручује као прва или примарна системска терапија за лијечење пацијената са узнапредовалим или метастатским BRAF позитивним меланомом (153, 158). Неки истраживачи вјерују да комбинација терепеутика који симултано блокирају различите метаболичке путање може да побољша ефикасност лијечења и спријечи даље мутирање туморских ћелија прије него буду уништене терапијом (159, 160).

1.9.10. Радиотерапија меланома

Данас постоје неуједначени ставови о примјени радиотерапије у лијечењу меланома. Студије су показале да радиотерапија може да смањи брзину локалне рекуренције болести али не може да продужи преживљавање (161). Радиотерапија као примарни терапијски приступ у лијечењу меланома се ријетко користи и употребљава се у случају када пацијенту из неког разлога није могуће спровести хируршко лијечење. У ту сврху се апликују дозе око 50 греја у 20 до 25 фракција.

Адјуванта постоперативна радиотерапија се може спровести код пацијената који имају ризик за локални релапс болести, а након процјене потенцијалне користи у односу на могуће терапијске компликације радиотерапијског третмана. Радиотерапија се успјешно може примијенити у палијативном лијечењу пацијената са болним метастазама у костима или у циљу спречавања патолошких фрактура (162). Радиоимунотерапија метастатских меланома је у фази испитивања.

1.10. Праћење пацијената са меланомом

Меланоми ниског ризика (стадијум *in situ* i IA): клинички преглед. Меланоми средњег ризика (стадијум IB-IIВ): клинички преглед, детекција сателитских и *in transit* метастаза, LDH, S100, ултразвучни преглед регионалних лимфних базена. За меланоме високог ризика (стадијум IIC-III): клинички преглед, детекција сателитских и *in transit* метастаза, LDH, S100, ултразвучни преглед регионалних лимфних базена. За IV стадијум иницијална дијагностика и касније дијагностичке процедуре зависе од примјењене терапије (16).

1.11. Полиморфизми нуклеотидне секвенце

Полиморфизми су различите варијанте једног истог гена. У здравој популацији јављају са учесталошћу већом од 1%, за разлику од мутација чија је учесталост мања од 1%. Да би се варијанта сматрала полиморфизмом, потребно је да учесталост најмање учестале варијанте у популацији не буде испод 0.01. Најчешћи тип генских полиморфизама у хуманом геному су полиморфизми појединачне нуклеотидне секвенце SNPs. Сви полиморфизми појединачних нуклеотида су публиковани у SNP бази података на сајту <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, и имају свој идентификациони број који садржи ознаку SNP (енгл. Reference sequence - rs) и јединствени серијски број полиморфизма (163).

То су стабилне генетичке промјене или варијације у геному, које карактерише измјена једног нуклеотида у молекулу DNA неког гена. Замјене се могу десити у кодирајућем дијелу генома-егзону што може имати различите ефекте на експресију гена, односно на синтезу протеина и/или функцију протеина. Знатно чешће се SNP срећу у некодирајућим регионима и тада могу имати биолошки ефекат јер могу утицати на везивање транскрипционих фактора и тиме утицати на ниво генске експресије. Замјене се могу десити у промоторском региону, другим узводним или изводним регулаторним секвенцама, или у интегрисаним регионима. Промјене у регулаторним секвенцама могу појачати или утишавати транскрипцију или могу створити ново или постојеће мјесто везивања некодирајућих, малих RNA (микр RNA), које имају кључну улогу у епигенетичкој регулацији генске експресије (164).

Генски полиморфизми би могли имати улогу превентивних, прогностичких или предиктивних молекуларних маркера код различитих типова комплексних обољења укључујући и меланом. Покренут је и велики међународни пројекат *Nar Map*, чији је циљ идентификација група хаплотипских блокова у хуманом геному односно у SNPs-у, који се везано наслеђују. Познавање и проучавање полиморфизама представља значајан извор за разумјевање генетичке основе великог броја обољења, укључујући и карциноме, услед чега су покренути пројекти студија асоцијације у геному (енгл. *Genome Wide Association Studies*), у којима се испитује повезаност одређених алелских варијанти гена са предиспозицијом за развијање комплексних обољења (165).

Фармакогенетика проучава повезаност генетских карактеристика појединца са ефикасношћу и токсичношћу лијекова. Разлике у одговору пацијената на терапију могу се објаснити полиморфизмима у генима. Полиморфизми гена за ензиме који метаболишу лијекове и протеине укључене у транспорт лијекова, могу утицати на дистрибуцију лијекова у организму, мјењајући на тај начин фармакокинетске особине лијека. Варијабилност на нивоу таргет протеина може смањити афинитет према лијеку

на мјесту његовог дејства и тиме утицати на фармакокинетске ефекте лијека. Полиморфизми у генима који кодирају рецепторе или протеине сигналних каскадних путева могу генерисати разлике у регулацији ћелијског циклуса или апоптозе. Полиморфизми у генима који кодирају ензиме укључене у метаболизам алкохола или супстанци дуванског дима могу смањити способност ензима да инактивишу про-карциногене или да повећају способност у активацији и превођену про-карциногена у карциногене, чиме се повећава ризик за настанак карцинома. Велики број студија указује да полиморфизми нуклеотидне секвенце имају кључну улогу у концепту индивидуализоване медицине, по коме би се за сваког појединачног пацијента медицинска терапија индивидуално прилагођавала и усклађивала на основу генетичког профила (163).

Уочене су значајне разлике у учесталости полиморфизама између хуманих популација, географских региона и етничких група, гдје SNP алели који су чести у једној популацији или етничкој групи могу бити ријетки у другој, што оправдава анализу учесталости SNP алела код различитих популација или субпопулацији.

Тенденција везаног наслеђивања уочена је код неких полиморфизама нуклеотидне секвенце још шездесетих година XX вијека. Показано је да се неки полиморфизми који су блиско лоцирани на истом хромозому наслеђују везано, као у блоковима. Термин неравнотежа везаности представља везано наслеђивање полиморфизама у тзв. хаплотипским блоковима, односно LD блоковима. Уколико су два полиморфизма ближа, мања је вјероватноћа да ће се током процеса размјене генетичког материјала током мејозе (енгл. *Crossing-over*), раздвојити у сљедећој генерацији. Данас је доступан велики број компјутерских програма за одређивање LD вриједности, за хаплотипске анализе и процјену повезаности специфичних хаплотипова са клиничким параметрима. Ово има велики практични значај за мапирање наследних обољења, јер за утврђивање везаности хаплотипских блокова није неопходно тестирати сваки полиморфизам, већ је довољно тестирати само један SNP у блоку.

Полиморфизми нуклеотидне секвенце генеришу разлике у једном нуклеотиду у оквиру секвенце DNA и извор су генетичке варијабилности у популацији. Посљедних година је за велики број тумора, укључујући и меланом утврђена повезаност у учесталости генотипова различитих полиморфизама са предиспозицијом за настанак тумора, као и са прогресијом болести (166, 167).

1.12. Епигенетичка регулација

Лијечење меланома је до скоро било само хируршко док је цитостатска терапија имала мало ефекта (74). Тек увођењем биолошке терапије наступа значајно побољшање у лијечењу и продужавању преживљавања пацијената са меланомом (168, 169). Ову терапију су омогућила сазнања из молекуларне генетике меланома. Епигенетичке промјене су наследне промјене генске експресије које за разлику од мутација немају промјену у примарној нуклеотидној секвенци (170). Осим што су митотски наследне ове промјене су и потенцијално реверзибилне, што пружа наду за увођењем епигенетичке терапије (171-173). Основни механизми епигенетичке регулације су метилација DNA, модификација хистона и утицај регулаторних некодирајућих RNA на генску експресију. Новија сазнања о учешћу модификације хистона у регрутовању DNA метилтрансферазе, метилацији DNA и микро RNA сугеришу да је иницијација епигенетичког утишавања комплексно регулисана и да се механизми међусобно преплићу.

DNA у ћелији је организована у хроматин, чија је основна јединица нуклеозом који се састоји од мултипротеинске структуре хистона. Хистонско језгро је октамер изграђен од 4 пара хистонских протеина: H3, H4, H2A и H2B. Постоје двије форме хроматина: транскрипционо активан еухроматин и транскрипционо неактиван хетерохроматин. До диференцирања фенотипа у различитим правцима захваљујући организацији хроматина и положају нуклеозома може доћи код ћелија са истом DNA секвенцом (173, 174).

Постоје различите форме хистонских протеина H2A, H3 и H4 које настају постраскрипционим модификацијама хистона у које спадају ацетилација и метилација. Ови поступци могу активирати или утишати одређени ген (171-174). Хистонски код представља комбинације хистонских модификација, које одређују интеракцију између DNA, хистонских и нехистонских протеина у региону хроматина (171).

Некодирајуће RNA (Eng. Non-coding RNAs-ncRNAs) су RNA поријеклом са оба ланца DNA које се транслацијом не преводе у протеине. Ту спадају и микро RNA, чија је улога у карциногенези до сада најбоље проучена. Неке од њих имају утицај на метилацију, на хроматин и хистонске протеине и на импринтинг гене (172). Велики број научника сматра да се у некодирајућим RNA транскрибује већина генома човјека (174).

Метилација DNA

Метилација DNA представља вид епигенетичке регулације који има битну улогу у развићу сисара и карциногенези. Процес метилације DNA је и механизам који одржава већи дио некодирајуће DNA у ћелијама виших сисара у транскрипционо инертном стању (репетитивне секвенце, инсертоване виралне секвенце, транспозони), осигурава касну репликацију, омогућава инактивацију једног X хромозома код женског пола, омогућава алелску ексклузију код Б лимфоцита и импринтинг гена код којих је само један алел експримиран у нормалном ткиву. У току процеса метилација метил група -CH₃ се везује за пети угљеников атом цитозина, и на тај начин настаје 5 - метил цитозин, тзв. пета база. Кључна епигенетичка модификација код сисара је DNA метилација цитозина лоцираног узводно од гуанозина у CpG динуклеотиду, која настаје након репликације (175). У реакцији модификације цитозина у метил-цитозин дозор метил групе је С - аденозил метионин, а ензими који катализују ову реакцију су фамилија ензима DNA - метилтрансферазе (DNMT). Дистрибуција CpG динуклеотида у геному је неравномјерна и ови динуклеотиди су груписани у тзв. CpG острвца (енгл. *CpG islands*). Ови региони су најчешће заступљени на мјестима почетка транскрипције, гдје око 50% гена у оквиру промотора има CpG острвца. Већина, око 80% CpG динуклеотида који нису у оквиру острваца су метиловани, док су у оквиру острваца промотора гена CpG динуклеотиди неметиловани, без обзира на то да ли је тај ген транскрибован.

Хиперметилација гена је једна од најчешћих епигенетичких промјена у хуманим туморима. Метилован цитозин је подложен спонтаној хидролитичкој деаминацији у тимидин. Уколико ова мутација не буде отклоњена репарационим механизмима слиједи нуклеотидна транзиција- замјена цитозина тимином, која је најчешћи вид генског полиморфизма у хуманој популацији. Тако је хиперметилација истовремено и предиспозиција за мутације, па се често означава као парамутација (171).

Процес метилације започиње убрзо након почетка репликације DNA, а завршава се око 1 минут након завршетка репликације. На експресију гена утицај метилације може бити

директан или индиректан. Директан утицај подразумјева да се усљед метилације мијења мјесто препознавања транскрипционог фактора. Индиректан утицај се односи на везивање специфичних протеина који имају афинитет за метиловани цитозин (176). Степен метилације у генима који имају највиши и најмањи степен експресије је виши у односу на интермедијарне гене (174).

У процесу карциногенезе епигенетичке промјене играју битну улогу. Метилација цитозина тумор-супресорских гена резултује појавом транскрипционо неактивног хроматина, а као последица инактивирају се ови гени што има утицаја на развој карцинома (177).

DNA метилтрансферазе

DNA метилтрансферазе (DNMT) су фамилија ензима који катализују метилацију цитозина у оквиру CpG динуклеотида, при чему је донор метил групе кофактор SAM (S-аденозин метионин) (171, 178, 179). У фамилију DNA метилтрансфераза спада 4 ензима: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B. DNMT1 је нуклеусни протеин који је дифузно локализован у нуклеоплазми током G1 и G2 фазе ћелијског циклуса, док је током S фазе повезан са мјестима репликације, што указује на повезаност метилације и репликације. DNMT1 је укључена у одржавање DNA метилације након репликације, а DNMT3A и DNMT3B су укључени у активну де ново метилацију. DNMT1 има 5 до 50 пута већи афинитет за везивање за хемиметиловану DNA и каталише трансфер метилгрупе на новонастали ланац DNA, кћерка ланац (180). DNMT3A и DNMT3B индикују де ново метилацију паразитских DNA секвенцији, катализују *de novo* метилацију током ембриогенезе или туморигенезе. *Knockout* врсте за било коју од DNMT су леталне. Неколико студија је показало повећане експресије DNMT ензима у већем броју типова карцинома, укључујући карцином дојке (DNMT3B) и плућа (DNMT1), гдје је утврђено да прекомјерна експресија DNMT директно корелира са лошом прогнозом (181, 182). Нека истраживања указују на то да DNMT3A и DNMT3B учествују у процесу деметилација чији механизми нису довољно разјашњени (178).

Ген за DNMT1 се налази на хромозому 19, позицији 19p13.2. Овај ензим се састоји из великог N - терминалног домена, чија је функција регулаторна и који је сачињен из више функционалних јединица који омогућавају да DNMT1 ступа у интеракције са различитим транскрипционим факторима. Ензим садржи и Ц-терминални домен, који је мањи (500 аминокиселина), и одговоран је за каталитичку функцију DNMT1. На основу новијих истраживања закључено је да и DNMT1 учествује у *de novo* метилацији. Утишавање тумор-супресорских гена и карциногенеза су последица хиперметилације ЦГ динуклеотида коју изазива повишена експресија DNMT1 (179).

Ген за DNMT3A се налази на хромозомској позицији 2p23, а за DNMT3B на 20q11.2. Ц -терминални домени оба ова ензима су слични, док се каталитички N – терминални домени разликују. DNMT3A има шири опсег активности од DNMT3B. Већа експресија DNMT3B је уочена код више типова карцинома, док је експресија DNMT3A благо повишена код појединих малигнитета, што указује на то да DNMT3 игра важну улогу у карциногенези. (179).

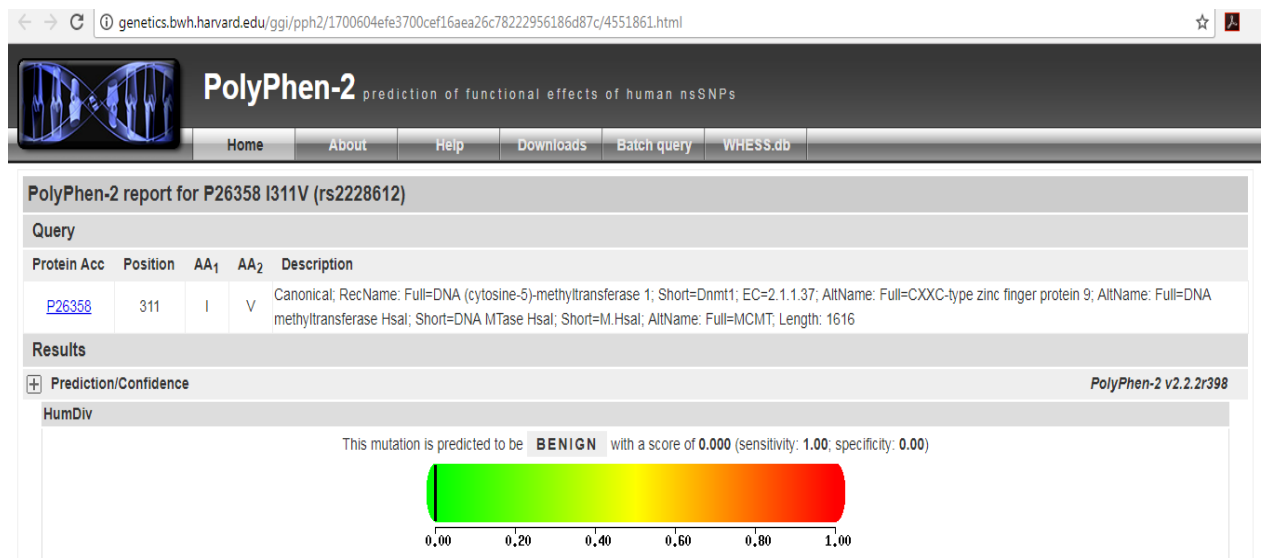
DNMT2 не учествује у метилацији DNA, већ у метилацији малих RNA молекула. Структура DNMT2 је високо конзервисана код свих еукариота (183).

Полиморфизми у генима за DNA метилтрансферазе

У *DNMT1* и *DNMT3B* генима су идентификовани бројни полиморфизми нуклеотидне секвенце. Велики интерес и много радова се односи за полиморфизме rs2228612 у *DNMT1* и rs406193 у *DNMT3B* генима.

Полиморфизам rs2228612 у *DNMT1* гену представља гену *missense* замјену тимина у цитозин што мијења аминокиселине изолеуцина (Ile) у валин (Val) на 311 позицији полипептидног ланца. Према подацима из базе 1 000 генома и SNP базе (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), цитозин је ријеђи алел (Engl. minor allele frequency - MAF).

Према *in silico* PolyPhen-2 програму за предикцију функционалних ефеката хуманих несинонимних полиморфизама (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), измјена rs2228612 у *DNMT1* гену се сматра бенигном (Слика 11).



Слика 11. Резултат PolyPhen-2 *in silico* анализе функционалног ефекта полиморфизама rs2228612 у *DNMT1* гену

Полиморфизам rs406193 у *DNMT3B* гену представља измјену цитозина у тимин, гдје је према базама 10000 генома и SNP бази тимин наведен као ређи алел. Овај полиморфизам је нефункционалан на нивоу протеина, али се може налазити у регулаторним дијеловима гена. Због значајне улоге *DNMT* гена у процесу метилације, постоје оправдане сумње да би постојање полиморфизама нуклеотидне секвенце могло бити повезано са клиничким карактеристикама пацијената са меланомом, као и ризиком за прогресију болести и преживљавање. Према нашим сазнањима, повезаност предходно наведених полиморфизама у *DNMT1* и *DNMT3B* генима није рађена код пацијената са меланомом у нашој земљи. Ранијим студијама рађеним у Србији на групи пацијената са оралним карциномом показано је да rs2228612 полиморфизам *DNMT1* гена асоцира са лошијим преживљавањем пацијената (184).

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

ОСНОВНИ ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА СУ:

1. Одредити учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193, rs2424932) код пацијената са примарним меланомом коже у различитим стадијумима болести.
2. Утврдити разлике у учесталости генотипова испитиваних полиморфизама и повезаност са:
 - клиничким параметрима болести,
 - стадијумом,
 - Breslow индексом,
 - бројем митоза,
 - присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (eng. Tumor infiltrating leukocytes - TIL),
 - факторима ризика,
 - годинама,
 - изложености сунцу,
 - фототипом коже, током и
 - исходом болести, односно са укупним преживљавањем (Kaplan - Meier).

ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Постоје разлике у учесталости генотипова полиморфизама у DNMT1 и/или DNMT3 гену између пацијената са унапредовалим стадијумом меланома (стадијум III, односно са метастазама лимфних чворова (N+)) у односу на пацијенте са раним стадијумом болести (I и II стадијум, без метастаза лимфних чворова (N-)).
2. Разлике у учесталости генотипова полиморфизама у DNMT генима могу бити маркер тока и исхода болести и корелирати са временом преживљавања.
3. Постојање разлика би указало на потенцијалну повезаност полиморфизама у DNMT генима са прогресијом меланома.

По нашим сазнањима полиморфизми у DNMT генима до сада нису истраживани код пацијената са меланомом у нашој популацији, те су дефинисани и циљеви истраживања.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

2.1. Испитивани узорак

Подаци о пацијентима и анализираним узорцима

По одобрењу идејног пројекта поштујући све нормативе и прописе у пољу медицинске етике и биоетике спроведена је клиничка, неинтервентна, ретроспективна студија у периоду од 2015. и 2016. године на 123 пацијента који су лијечени у оквиру Амбуланте за меланом, Клинике за кожне и полне болести, Клинике за пластичну и реконструктивну хирургију, Института за патологију и судску медицину, Института за медицинска истраживања - одсјека за молекуларну генетику, Војно Медицинске Академије Београд. Студија је спроведена као академско и непрофитно истраживање према принципима добре клиничке праксе и Хелсиншке декларације из 2008. године. Прије извођења студије протокол истраживања и друга потребна документација су достављени ради мишљења и сагласности Етичком комитету ВМА и добијено је одобрење истог.

Подаци о демографији, клиничко патолошким карактеристикама, клиничком стадијуму, току болести и стопи преживљавања су обезбјеђени из болничких регистара.

Од 123 пацијента укључених у студију, 53 пацијента су били мушкарци, а 70 пацијената су биле жене старосне доби од 18 до 75 година код којих је постављена дијагноза меланома (клиничким критеријумом, ексцизионом биопсијом и патохистолошки), урађена реексцизија и детекција сентинел лимфних чворова.

Пацијенти су били разврстани у двије групе:

1. Експериментална група: постављена дијагноза меланома, болесници у III стадијуму, односно са метастазама у лимфним чворовима (N+)
2. Контролна група: постављена дијагноза меланома, болесници у I и II стадијуму болести, односно без метастаза у лимфним чворовима (N-)

Учесталост полиморфизама и повезаност са клиничко патолошким параметрима у групи пацијената са унапредовалим стадијумом болести односно са метастазама лимфних чворова (III стадијум) су упоређивани у односу на пацијенте са раним стадијумом болести (I и II стадијум).

Искључујући критеријуми ове студије су били пацијенти:

1. млађи од 18 и старији од 75 година
2. са недефинисаним стадијумом болести
3. недостатком детекција сентинел лимфних чворова
4. постојањем других малигних болести
5. предходна радио и/или хемиотерапија

2.2. Истраживачки поступак

Сви пацијенти су потписали добровољни пристанак за учешће у студији.

Након постављања дијагнозе меланома ексцизионом биопсијом и патохистолошком верификацијом, сви су пацијенти представљени конзилијуму за меланом ВМА у Београду. Затим је, свим пацијентима урађена реексцизија и детекција SLNB, патохистолошка и имунохистохемијска дијагностика.

Свим пацијентима укљученим у студију одређивала се учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193, rs2424932).

ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЈЕРЕ У СТУДИЈИ

Као независне варијабле праћени су: пол, старост, лабораторијске анализе, локализација, активност болести, патохистолошки налаз, хистолошки тип, компликације, TNM класификација тумора.

Као зависне варијабле праћена је учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193, rs2424932).

Збуњујуће варијабле:

- удружене болести
- лијекови које узимају пацијенти
- навике пацијената (пушач, конзумирање алкохола, кафе)

Патохистолошка обрада ткива

Патохистолошка обрада ткива је рађена на Институту за патологију и судску медицину ВМА у Београду. Клиничко патолошке карактеристике примарног меланома, као и статус сентинел лимфних чворова, је утврђивао искусни патолог коме нису били познати клинички резултати лијечења, а у складу са препорукама Америчког здруженог комитета за рак (*eng. American Joint Commite on Cancer- AJCC*) из 2009. године. Код сумљивих лезија у смислу постојања меланома коже рађена је комплетна ексцизиона биопсија и патохистолошка обрада. 10% пуферизовани формалин је кориштен као фиксатив да би се ткиво сачувало од могућих оштећења и ексцидирана лезија је потапана у исти. Прије саме обраде исјечка, мјерене су његове димензије, димензије саме лезије, удаљеност од најближе ресекционе линије и нотирани у милиметрима. Након тога је урађена дехидратација уклапањем ткива у парафин. Потом је ткиво просвјетљивано и импрегнирано парафином, чиме је прављено уклапање ткива у парафински блок који је резан микротомом. Микротомом су прављени резови ткива дебљине 5-10 микрона који су потом постављани на предметно стакло и преперат је бојен хематоксилин-еозин методом (HE). S100 протеин и НМВ-45 моноклонско антитијело које је добијено екстракцијом меланома су коришћени за имунохистохемијску анализу.

За сваког пацијента је узиман један парафински калуп гдје ја патохистолошком анализом потврђена највећа концентрација туморског ткива. Прављено је 10 исјечака ткива дебљине 10 микрона са калупом и настављена даља обрада узорка.

Хистопатолошки прогностички параметри који су кориштени у овој студији за одређивање стадијума болести су дебљина тумора по Бреслову (енгл. *Breslow*), број митоза, присуство улцерације, регресије, нодални статус и тумор инфилтришући лимфоцити (TIL), као и статус лимфних чворова стражара. У предходно обрађеном ткиву са формалином и парафином је утврђивано присуство тумор инфилтришући лимфоцити (TIL) и они су категоризовани у три категорије: одсутни, *non brisk* и *brisk*.

1. Одсутни TIL се карактерише одсуством лимфоцита или њиховог директног контакта са меланомским ћелијама.
2. Фокална (*non-brisk*) TIL означава фокалну инфилтрацију лимфоцита дуж периферије или да су лимфоцити присутни у једној или више тачака унутар тумора.
3. Дифузна (*brisk*) TIL представља дифузну инфилтрацију дуж периферије или инфилтрију читаву базу тумора.

Изолација DNA, DNMT1 и DNMT3B генотипизација

Генетичке анализе су рађене на Институту за медицинска истраживања ВМА у Београду.

Свим пацијентима се венепункцијом узимало 5 ml периферне крви у коју је додат антикоагуланс и иста чувана у замрзивачу на -20°C до екстракције DNA. Полиморфизми гена су испитивани са предизајнираним SNP есејима методом алелске дискриминације на REAL-TIME апарату.

У нашој студији, DNA је изолована из периферне крви пацијента коришћењем комерцијалног кита *Blood Prep Isolation Kit* (Qiagen, Germany), у складу са протоколом произвођача. Након лизирања ћелијске мембране ослобађа се унутрашњи садржај ћелије. Како је DNA везана за протеине у хроматину, неопходно их уклонити коришћењем протеиназе К, која дигестира ћелијске протеине и омогућава ослобађање DNA из нуклеопротеинског комплекса. Након додавања протеиназе К у узорак, узорак се инкубира 10 минута на температури која је оптимална за активност протеиназе К ($50-55^{\circ}\text{C}$). Апсолутним етанолом је извршена преципитација DNA. Након центрифугирања колоне на $10.000\text{ G}/1\text{ min.}$, уклања се етанол, након чега се узорак раствара у комерцијалном TE пуферу (*Elution Buffer*).

Након изолације DNA, квалитет изоловане DNA је провјераван помоћу електрофорезе на 2% агарозном гелу.

Електрофореза је метод који омогућава раздвајање фрагмената DNA молекула на основу њихове величине и наелектрисања у пољу једносмјерне струје.

Основни принцип електрофоретског раздвајања заснован је на чињеници да честице различитог наелектрисања и различите масе, под утицајем електричног поља за исто вријеме прелазе различите путање на агарозном носачу. DNA молекули се крећу у електричном пољу насталом доводом напона. DNA као негативно наелектрисан молекул на неутралном рН креће се у смјеру аноде. Брзина кретања наелектрисаних молекула у електричном пољу зависи од њихове величине (масе или дужине), наелектрисања или конформације, као и величине пора гела и јачине примјењеног електричног поља.

За прављење 2% агарозног гела потребно је 0.6 g агарозе у праху и 24.4 ml 0.5 x TBE пуфера (4.5 mM Tris-baza, 87 mM борне киселине, 0.5 mM EDTA, рН=8). Агароза у праху се раствара у 0.5 x TBE пуферу и загријава до кључања. Након тога, раствор се охлади до 70°C . Током хлађења умрежавају се полимери на такав начин да се формира матрикс (гел) са равномјерним порима, чија величина зависи од концентрације раствора агарозе. Наредни корак је додавање 3.5 μl етидијум- бромида (EtBr). EtBr је интеркалирајући агенс који се умеће између ланаца двоструког хеликса DNA и има способност да флуоресцира под UV свјетлошћу због чега се користи за визуелизацију DNA. Интензитет флуоресценције пропорционална је количини DNA молекула у датом

„траци“ на гелу. Нуклеинске киселине у чије је ланце инкорпориран EtBr распознају се као свијетле траке на гелу.

Прије наношења на гел, 7 μ l узорка се мјеша са 3 μ l боје (6 x loading buffer: 0.25% бром-фенол плаво, 0.25% ксилен-цијанол, 20% фикол 400) која омогућава визуализацију узорка на гелу. Као и праћење његовог кретања кроз гел.

Електрофореза се одвијала при напону 80V и струји 35-40mA, око 30min. На крају гел се посматра под краткоталасном UV свјетлошћу транслуминатора. Уколико је изолована DNA доброг квалитета, није фрагментисана, под UV свјетлошћу уочићемо јасно видљиве траке на гелу.

Ланчана реакција полимеразе, PCR метода (енгл. *Polymerase chain reaction*), представља реакцију која омогућава *in vitro* умножавање (амплификацију) одређеног фрагмента DNA и аналогна је репликацији DNA која се одвија у свим живим организмима. Основни принцип PCR методе је селективна амплификација жељене секвенце DNA молекула (гена или дио гена) више милиона до милијарду пута.

Real time PCR је метода која омогућава PCR амплификацију и квантификацију PCR продуката помоћу флуориметрије. Ова метода омогућава да се континуирано прати амплификација циљне секвенце кроз сваки циклус у реалном времену. На тај начин се добија информација о присутности одређене секвенце, али исто тако и у којој количини је она присутна.

Алелска дискриминација је метода помоћу које се могу одредити генетске варијанте појединачног нуклеотидног полиморфизма одређене секвенце. Полиморфизми и DNMT1 (rs2228611, rs2228612, rs2114724) и DNMT3 (rs406193 и rs2424932) одређивани су алелском дискриминацијом на Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Коришћени су комерцијално доступни есеји: TaqMan SNPs Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) у концентрацији 40x и 2x Universal TaqMan MasterMix (Applied Biosystems, Foster city, CA, SAD).

За *real time* квантификацију наших узорака користили смо TaqMan есеј који поред одговарајућих прајмера садржи и двије флуоресцентно обојене пробе, комплементарне са циљном секвенцом геномске DNA која садржи SNP од интереса до интереса. У ту сврху се обично користе 2 TaqMan пробе које се разликују у једној бази од интереса и обиљежене су различитим бојама, те емитују различиту флуоресценцију. TaqMan проба је кратак, једноланчани сегмент DNA који се комплементарно везује за одређени PCR продукт након прве фазе PCR реакције-денатурације DNA. На 5' крају TaqMan пробе садрже репортерске флуоресцентне боје (R –репортер) VIC и FAM, док је за 3' крај везан пригушивач (Q - quencher). Када је TaqMan проба слободна или везана за DNA молекулу, пригушивачка проба блокира емисију флуоресценције за репортерске боје. Након денатурације DNA (на високој температури) у фази хлађења када се за DNA матрицу везују прајмери, долази до везивања и TaqMan пробе за специфичан регион за DNA (једна TaqMan проба по једном молекулу DNA матрице). Након тога у фази у којој Taq полимеразе додаје нуклеотид (3'-5' полимеразном активношћу), истовремено долази и до уклањања TaqMan пробе са DNA матрице (5'-3' егзонуклеазном активношћу) у раствор. Овим процесом удаљава се пригушивач од репортера и емитује флуоресценција од стране репортерске боје (јер се пригушивачка боја више не налази на одговарајућом удаљености од репортера и нема блокаде емисије). Интезитет флуоресценције одговара количини амплификата у реакцији (185).

Једна TaqMan проба је комплементарна проба *wild type* алелу, док је друга проба комплементарна мутираном алелу. Уколико апарат детектује једну боју- присутан је један алел; уколико детектује другу боју - присутан је други алел; док детекција смјеше ових боја означава присуство хетерозигота. Дакле, током одвијања Dакле, PCR-а у реалном времену мјери се промјена интензитета флуоресценције боја којима су пробе обиљежене (185).

Помоћу real time PCR-а детекција PCR амплификације врши се у експоненцијалној фази, у којој се амплификације најбрже дешава, а реакција је у овој фази високо специфична и прецизна. Threshold је вриједност која се задаје RQ-PCR апарату, као ново флуоресценције коју треба да детектује за појединачан узорак. Узорци се међусобно разликују по броју циклуса којим је потребан да достигну задату вриједност флуоресценције, а то је Ct вриједност (што је већа почетна количина генетичког материјала у узорку, то му је потребно мање циклуса да достигне задату флуоресценцију тј. мања је Ct вриједност).

Статистичка анализа

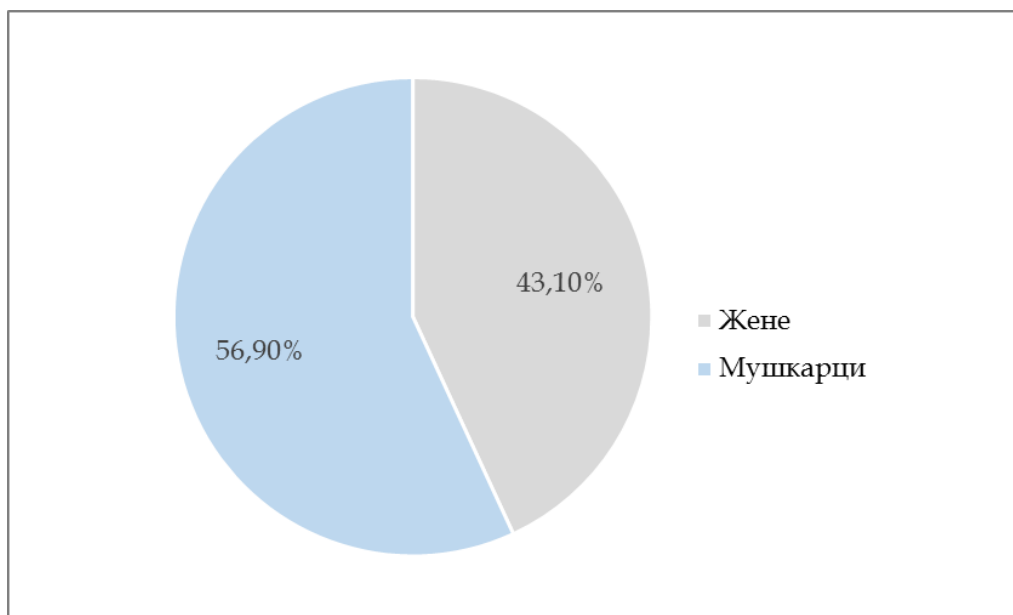
Добијени подаци су анализирани у статистичком програму SPSS 20.0. Непараметријске промјенљиве су анализирание χ^2 тестом или Fisher-овим тестом. Асоцијације су сматране значајним када су p вриједности мање од 0.05. Укупно преживљавање је рачунато из података од датума дијагнозе до смрти из било ког разлога. Преживљавање без рекуренције (RFS) је рачунато од времена постављања дијагнозе до првог уочавања рекуренције или смрти из било ког разлога. Уколико пацијент није имао епизоду рекуренције или је умро, RFS је цензурисан у вријеме посљедњег праћења. Укупно преживљавање ће бити процјењивано помоћу Kaplan-Meier метода, а значајност је одређивана long-rank тестом. Сви резултати су значајни када је p вриједност мања од 0.05. Соx пропорционалне анализе регресије ризика су извршене како би се процјенили омјери ризика (HR) са интервалом повјерења од 95% (95% CI). Варијабле које су утврђене да су битне у униваријантној анализи, укључујући и оне са нивоима значајности испод 20% су накнадно анализирание у мултиваријабилној Соx-овој регресији. Соx-ов модел је урађен користећи метод корак по корак, који је извадио варијабле са p мање од 0.1. Обрађени резултати су приказани табеларно и графички.

РЕЗУЛТАТИ

У овом раду испитивана је учесталост појаве полиморфизама у генима за ензим DNA метил трансферзу 1 и 3Б и њихова повезаност са демографским и клиничко-патолошким параметрима код болесника са меланомом. Добијени резултати су статистичким методама упоређивани са испитиваним параметрима да би се испитало постојање повезаности полиморфизама у генима за DNA метил трансферазе са клиничко-патолошким параметрима и утврдио њихов прогностички значај.

3.1. Опште карактеристике пацијената укључених у студију приликом постављања дијагнозе

У ову студију је укључено укупно 123 пацијената обољелих од меланома, њих 70 (56,9%) било је мушког пола, док је преосталих 53 пацијената (43,1%) било женског пола (графикон 1).



Графикон 1. Дистрибуција пацијената обољелих од меланома према полу.

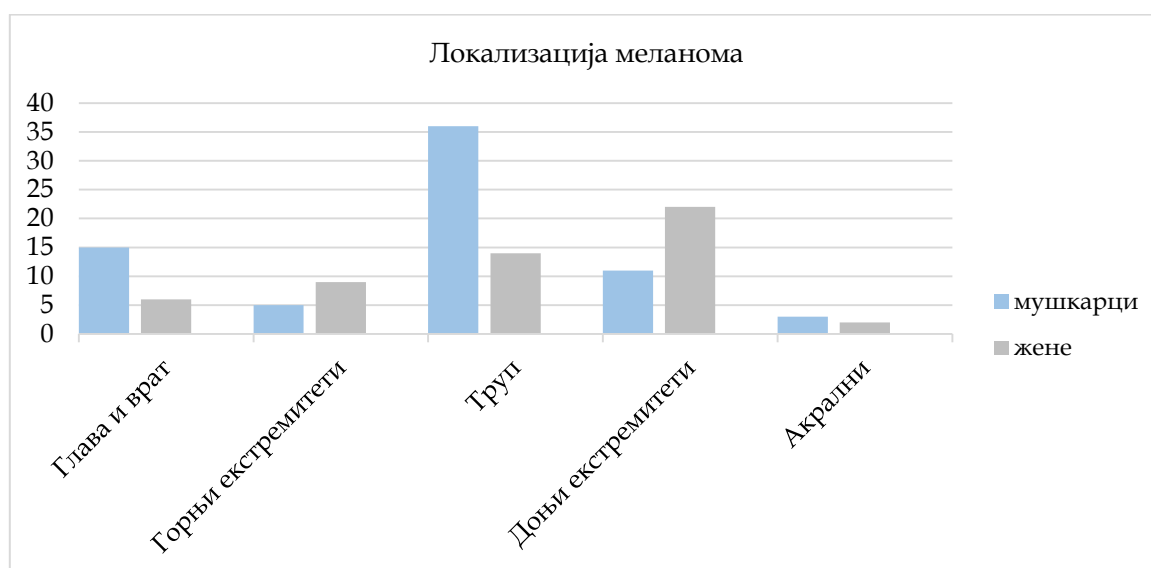
Када је у питању локализација болести, код највећег броја пацијената меланом је био локализован на трupu 50, затим на доњим екстремитетима 33, код 21 пацијента болест је била локализована у предјелу главе и врата, код 14 на доњим екстремитетима, и најмање код 5 на акралном дијелу тијела. Између група пацијената подијељених према полу уочена је висока статистички значајна разлика ($\chi^2=156,513$; $p=0,002$) у односу на локализацију болести. Код мушкараца је скоро двоструко већа заступљеност тумора на трupu (51,4%) него код жена (26,4%). Сличан је налаз у и у односу на главу и врат наспрам 11,3% код жена. Код жена је била већа учесталост тумора локализованих на екстремитетима, и то доњих екстремитета скоро троструко више него код мушкараца, и горњих екстремитета 2.5 пута више код жена него код мушкараца (табела 1 и графикон 2).

Табела 1. Опште карактеристике пацијената укључених у студију приликом постављања дијагнозе. Приказана је расподјела према полу и локализацији меланوما.

Опште карактеристике пацијената	ПОЛ		ЛОКАЛИЗАЦИЈА Број (%)					X ²	p
			Глава и врат	Горњи екстремитети	Труп	Доњи екстремитети	Акрални		
	м	70	15 (21,4)	5 (7,1)	36 (51,4)	11 (15,7)	3 (4,3)		
ж	53	6 (11,3)	9 (17,0)	14 (26,4)	22 (41,5)	2 (3,8)			
УКУПНО	123	21 (17,1)	14 (11,4)	50 (40,7)	33 (26,8)	5 (4,1)			

*м мушки пол

*ж –женски пол



Графикон 2. Опште карактеристике пацијената укључених у студију приликом постављања дијагнозе. Приказана је расподјела према полу и локализацији меланوما.

Табела 2 показује клинички стадијум пацијената обољелих од меланوما. Од укупно 123 обољела пацијента највећи број 38 (30,9%) је било у IB стадијуму. Стадијум IIA и IIB је имало 22 пацијента, док је у стадијуму IIIA било њих 22 (17,9%). У трећем стадијуму A је било њих 9 (7,3%), у IIB њих 19 (15,4%) док је IIIA стадијум имало њих 12 (9,8%). Између група пацијената подијељених према полу није уочена статистички значајна разлика у односу на клинички стадијум меланوما (табела 2 и графикон 3).

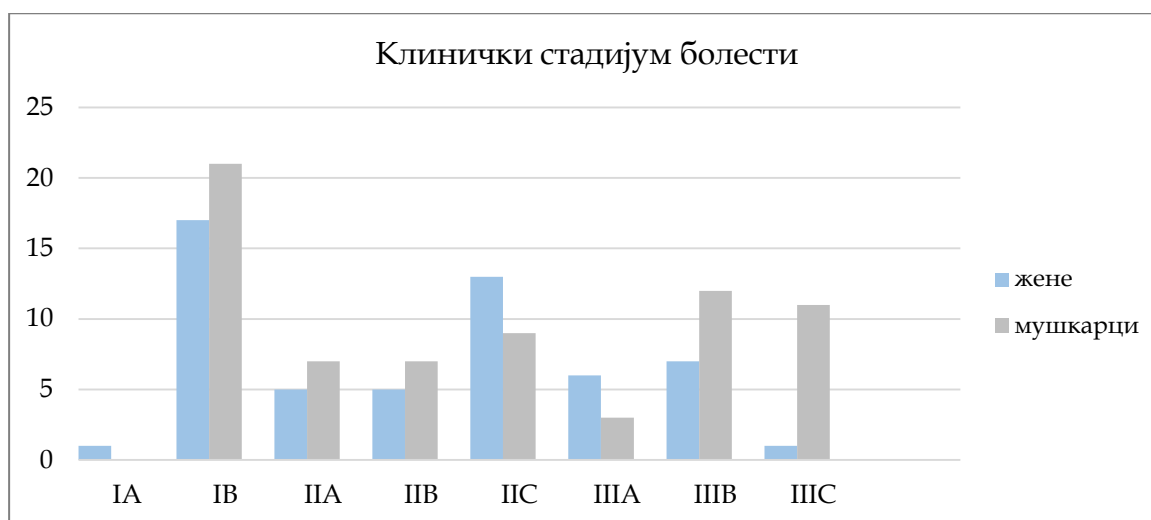
Табела 2. Опште карактеристике пацијената укључених у студију приликом постављања дијагнозе меланома.

Опште карактеристике пацијената	ПОЛ		КЛИНИЧКИ СТАДИЈУМ Број (%)							χ^2	p	
			IA	IB	IIA	IIB	III	IIIA	IIIB			IIIC
	м	ж										
	м	70	0 (0)	21 (30)	7 (10)	7 (10)	9 (13)	3 (4)	12 (17)	11 (16)	12,662	0,069
	ж	53	1 (2)	17 (32)	3 (6)	5 (9)	13 (24)	6 (11)	7 (13)	1 (2)		
УКУПНО		123	1 (0,8)	38 (30,9)	10 (8,1)	12 (9,8)	22 (17,9)	9 (7,3)	19 (15,4)	12 (9,8)		

*м – мушки пол

*ж – женски пол

Приказана је расподела према полу и клиничком стадијуму болести.



Графикон 3. Опште карактеристике пацијената укључених у студију приликом постављања дијагнозе. Приказана је расподела према полу и клиничком стадијуму меланома.

3.2. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената који су укључени у студију

Мјерењем Бреслов дебљине, улцерације (присуство/одсуство), митозе (повећана митоза или не) и тумор-инфилтришућих лимфоцита уочена је слична дистрибуција пацијената са Бреслов дебљином (< 4 и ≥ 4), као и са или без мутација или митозе у испитиваној групи пацијената (табела 3, графикон 4, 5 и 6). Мјерењем степена инфилтрације тумора са лимфоцитима код највећег броја пацијената (58) нађена је non-brisk инфилтрација (графикон 7).

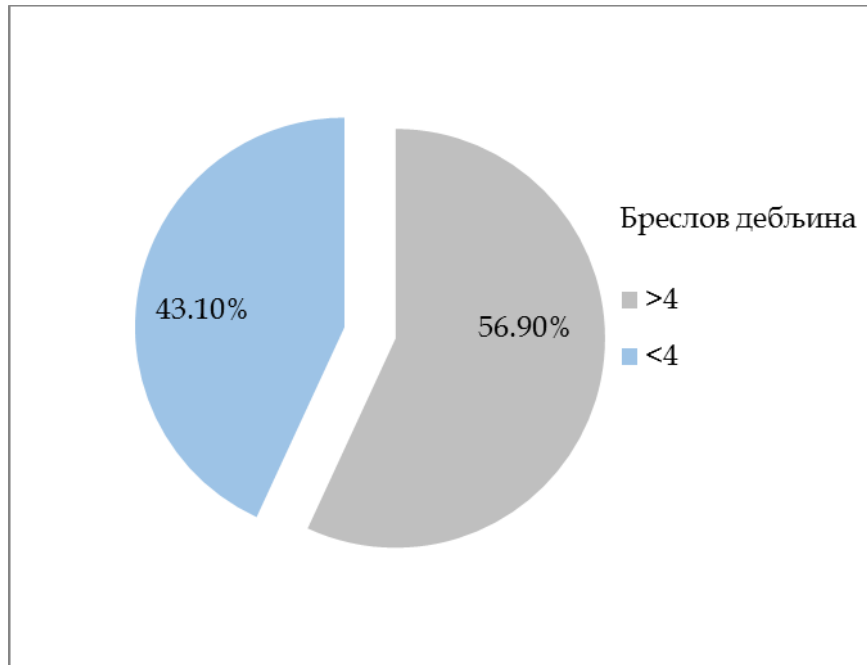
Табела 3. Клиничко-патолошке карактеристике (Бреслов дебљина, улцерација, митоза, ТИЛ) пацијената који су укључени у студију.

ВАРИЈАБЛЕ Број (%)	Бреслов дебљина		Улцерација		Митоза		ТИЛ	
	≥ 4	< 4	без	са	без	са	нема	non-brisk brisk
УКУПНО	≥ 4	70 (56,9)	без	52 (42,3)	без	66 (53,6)	нема	11 (8,9)
	< 4	53 (43,1)	са	71 (57,7)	са	57 (46,4)	non-brisk	58 (47,1)
							brisk	26 (21,0)

*м – мушки пол

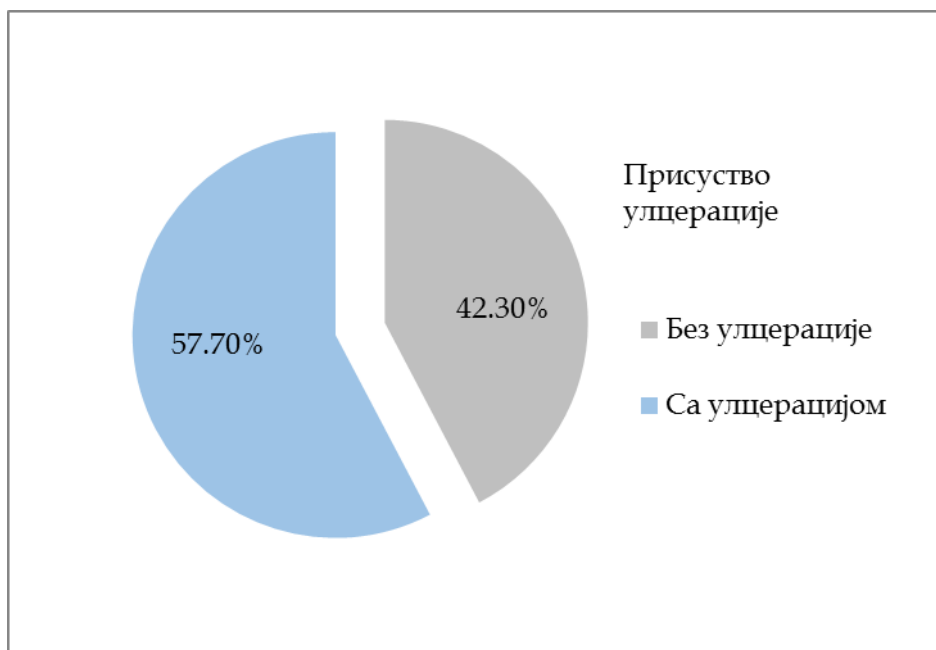
*ж – женски пол

*ТИЛ–тумор инфилтришући лимфоцити



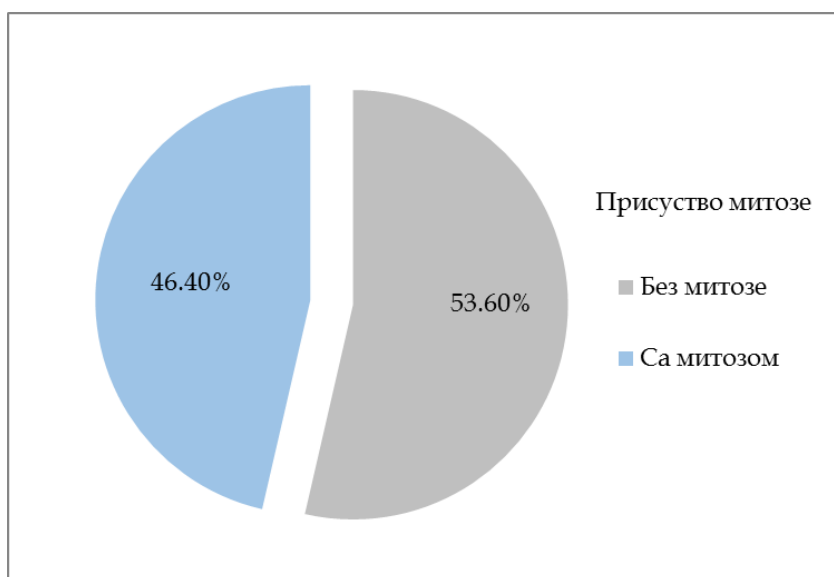
Графикон 4. Учесталост Бреслов дебљине међу пацијентима обољелих од меланома.

Од укупног броја пацијената обољелих од меланома њих 71 (57,7%) имало је улцерацију, док је преосталих 52 (42,3%) било без улцерације (графикон 5).



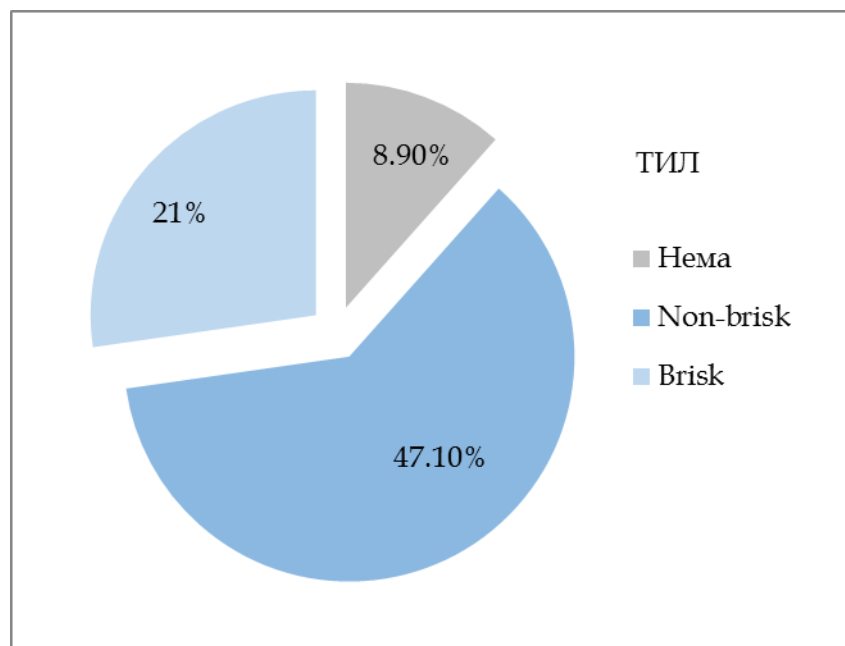
Графикон 5. Учесталост улцерације међу пацијентима обољелих од меланома.

Графикон 6 показује да од укупног броја пацијената обољелих од меланома њих 66 (53,6%) имало је митозу, док је преосталих 57 (46,4%) било без митозе (графикон 6).



Графикон 6. Учесталост митозе међу пацијентима обољелих од меланома.

Тумор инфилтришуће лимфоците није имало 11 (8,9%) пацијената, non-brisk је имало њих 58 (47,1%), док је brisk имало њих 26 (21%) (графикон 7).



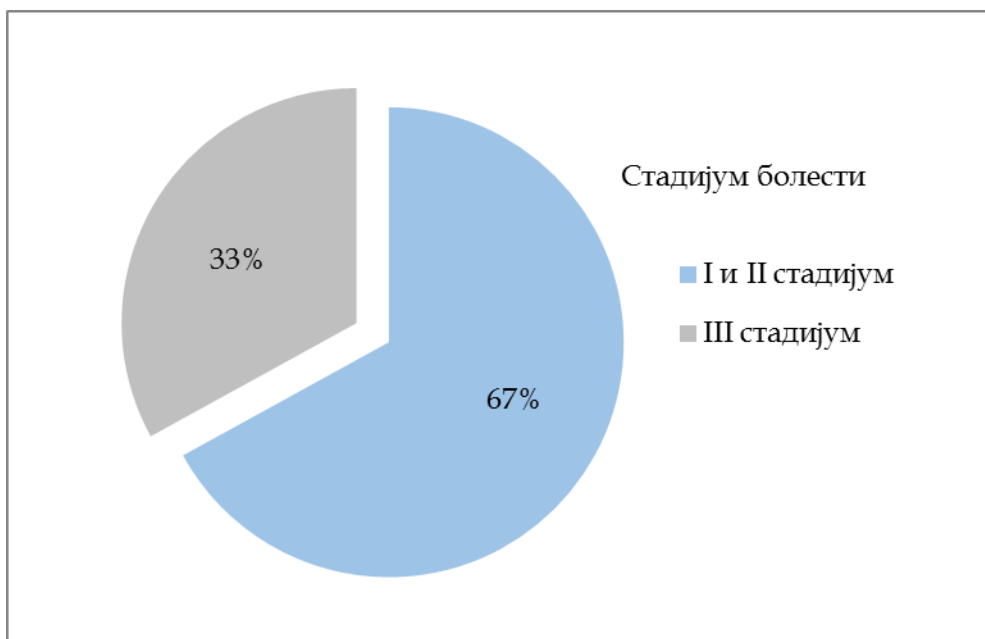
Графикон 7. Присуство тумор инфилтришућих лимфоцита (ТИЛ) у туморском ткиву код пацијената обољелих од меланом.

У нашој групи пацијената највећи број пацијената се налазио у првом и другом стадијуму болести (83), а мањи број (40) у трећем стадијуму болести (табела 4. графикон 8). Дистрибуција величине тумора у испитиваној групи пацијената је била слична, 57 пацијената има величину T1/2, док 66 има величину тумора T3/4 (графикон 9).

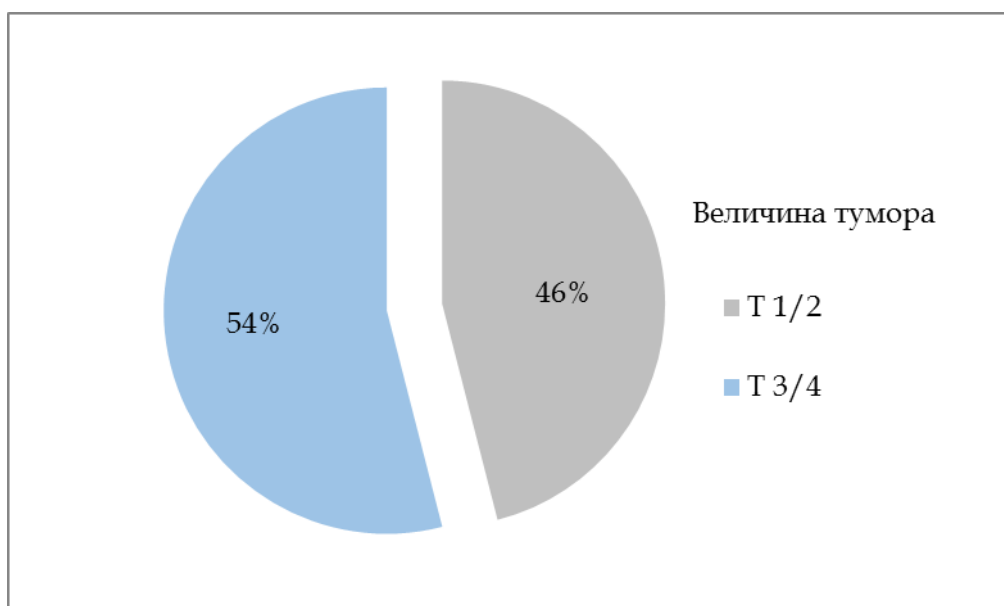
Табела 4. Клиничко-патолошке карактеристике (стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија болести) пацијената са меланомом који су укључени у студију.

ВАРИЈАБЛЕ Број (%)	Стадијум (III vs I and II)		Величина тумора (T3/T4 vs T1/T2)		Нодални статус		Прогресија	
	I/II	III	T1/2	T3/4	N -	N +	-	+
УКУПНО	83 (67)	40 (33)	57 (46)	66 (54)	83 (67)	40 (33)	102 (83)	21 (17)

Графикон 8 показује да је највећи број пацијената са меланомом, њих 83 (67%) у I и II стадијуму болести, док је мањи број, њих 40 (33%) у III стадијуму болести (графикон 8).

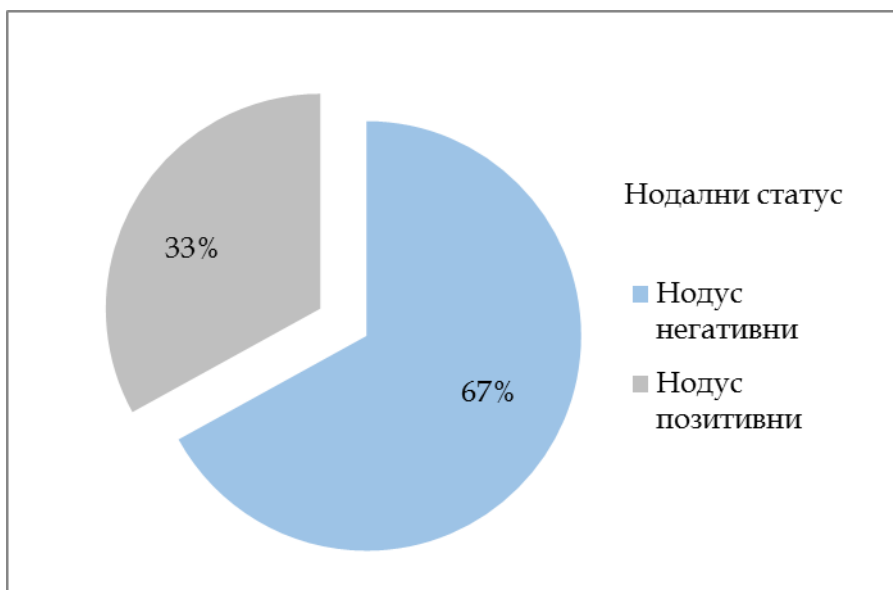


Графикон 8. Стадијум болести код пацијената обољелих од меланома.



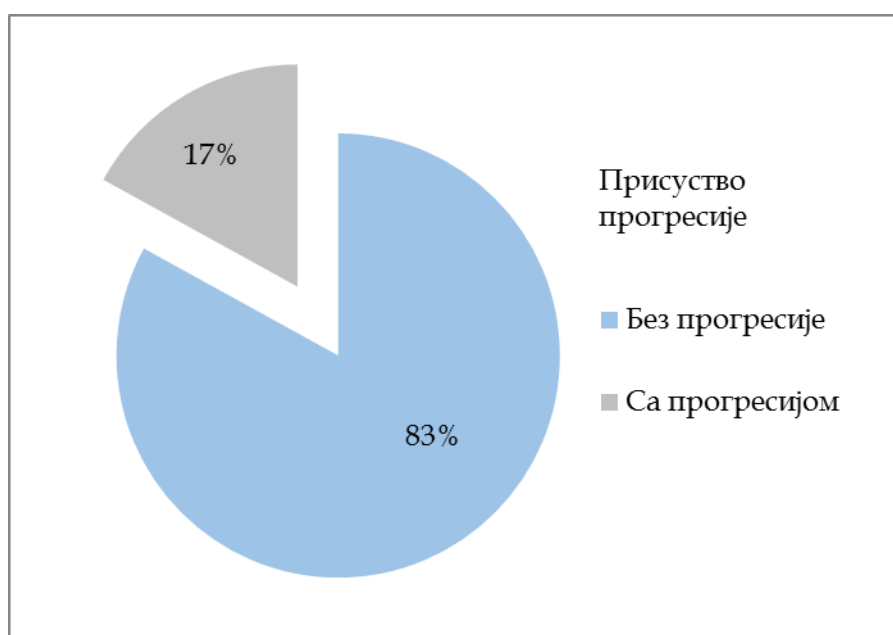
Графикон 9. Величина тумора код пацијената обољелих од меланома.

За разлику од претходног налаза, код знатно већег броја пацијената је утврђен негативан нодални статус (83), док је њих 40 имало позитивни нодални статус (графикон 10).



Графикон 10. Нодални статус код пацијената обољелих од меланома.

Још већа разлика је утврђена кад је на основу патолошког налаза испитивана прогресија болести. Већина пацијената у испитиваној групи (102) није имала прогресију, док је код свега 21 пацијента меланом био прогресиван (графикон 11).



Графикон 11. Присуство прогресије код пацијената обољелих од меланома.

3.3. Дистрибуција испитиваних полиморфизама у генима за ДНМТ1 и ДНМТ3Б према клиничко-патолошким карактеристикама пацијената

Испитивањем учесталости појаве генотипова (wt, хетерозигот и мутирани) у ДНМТ1 гену (*rs2228612*, *rs2228611* и *rs2114724*) и ДНМТ3Б гену (*rs406193* и *rs2424932*) утврђена је статистички значајно учесталија појава хетерозигота *rs2228611* ДНМТ1 код мушкараца у односу на женски пол ($p=0,042$). Мушки пол је такође статистички значајно имао већу заступљеност мут генотипа *rs2114724* у ДНМТ1 гену ($p=0,003$) у односу на женски пол (табела 5).

Табела 5. Дистрибуција полиморфизама гена за ДНМТ1 и ДНМТ3Б према полу у испитиваној групи пацијената.

варијабле		Укупно број	ДНМТ1 (A201G, rs2228612)			ДНМТ1 (rs2228611)			ДНМТ1 (rs2114724)			ДНМТ3Б (C501T, rs406193)			ДНМТ3Б (rs2424932)		
			wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
пол	мушки	70	58	12	0	26	34	10	37	23	19	56	14	0	29	23	28
	женски	53	42	9	2	23	15	15	29	19	5	35	17	1	24	20	9
	<i>p</i> *		НС			0.042			0.003			НС			НС		

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Удруженост полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена са полом и патолошким карактеристикама (бреслов дебљина, улцерација, митоза и ТИЛ) пацијената обољелих од меланома је приказана у табели 6. Статистичка обрада је показала да између група испитаника подијељених према полу, бреслов дебљини, постојању митоза и ТИЛ није уочена статистички значајна разлика у односу на дистрибуцију генотипова и алела *rs2228612* ДНМТ1 гена. Међутим, уочена је статистички значајна разлика ($p=0,045$) између група пацијената подијељених према постојању улцерација. Пацијенти са улцерацијама су у значајно већем броју имали wt генотип, њих 62, у односу на 37 пацијената без улцерација (табела 6).

Табела 6. Удруженост полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена са полом и клиничко-патолошким карактеристикама (бреслов дебљина, улцерација, митоза и ТИЛ) пацијената обољелих од меланома

ВАРИЈАБЛЕ												
ГЕНОТИП		Пол		Бреслов дебљина		Улцерација		Митоза		ТИЛ		
		М	Ж	≥ 4	< 4	без	са	-	+	нема	non-brisk	brisk
ДНМТ1 (<i>rs2228612</i>)	wt	58	42	64	36	37	62	54	46	10	45	23
	хет	12	9	15	16	14	7	12	9	1	11	3
	мут	0	2	1	1	1	2	0	2	0	2	0
УКУПНО		70	53	80	53	52	71	66	57	11	58	26
<i>P</i>		НС		НС		0,045		НС		НС		

* м - мушки пол;

* ж –женски пол;

*ТИЛ-тумор инфилтришући лимфоцити

*wt, хет, мут - wild type/хетерозигот, мутирани генотип

**p*<0.05 је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Упоредјујући удруженост полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена са клиничко-патолошким карактеристикама уочена је висока статистички значајна разлика у односу на стадијум болести (*p*=0,003), нодални статус (*p*=0,003) и прогресију тумора (*p*=0,007). Ови резултати су такође показали да је wt генотип значајно учесталији код пацијената са I/II стадијумом болести и код пацијената са негативним нодалним статусом (74 пацијента) у односу на 24 пацијента који су у III стадијуму болести и имају позитиван нодални статус. Пацијенти са прогресивним тумором значајно чешће су хетерозиготи, а рјеђе се налази wt генотип (табела 7).

Табела 7. Удруженост полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена са клиничко-патолошким карактеристикама (стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора) пацијената обољелих од меланома.

ВАРИЈАБЛЕ									
ГЕНОТИП		Стадијум (III vs I and II)		Величина тумора (T3/T4 vs T1/T2)		Нодални статус		Прогресија	
		I/II	III	T1/2	T3/4	N -	N +	-	+
ДНМТ1 (<i>rs2228612</i>)	wt	74	26	47	53	74	26	84	16
	хет	9	12	10	11	9	12	18	3
	мут	0	2	0	2	0	2	0	2
УКУПНО		83	40	57	66	83	40	102	21
<i>p</i>		0,003		НС		0,003		0,007	

*м -мушки пол

* ж –женски пол

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

**p*<0.05 је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Статистички значајне разлике између група пацијената подијељених на групе у односу на бреслов дебљину, улцерације, митозу и ТИЛ у врсти полиморфизма *rs2228611* ДНМТ1 гена нису уочене (Табела 8). Нађено је да пацијенти мушког пола у значајно већем броју имају хетерозиготни генотип у односу на жене ($p=0,042$), док жене у већем броју имају мутирани генотип *rs2228611* ДНМТ1 гена.

Табела 8. Удруженост полиморфизма *rs2228611* ДНМТ1 гена са полом и клиничко-патолошким карактеристикама (bresлов дебљина, улцерација, митоза и ТИЛ) пацијената обољелих од меланома.

ВАРИЈАБЛЕ												
		Пол		Бреслов дебљина		Улцерација		Митоза		ТИЛ		
		М	Ж	≥ 4	< 4	0	1	-	+	нема	non-brisk	brisk
ГЕНОТИП ДНМТ1 (<i>rs2228611</i>)	wt	26	23	30	19	18	32	27	22	4	24	9
	хет	34	15	33	16	20	28	25	24	5	22	12
	мут	10	15	17	8	14	11	14	11	2	12	5
УКУПНО		70	53	80	43	52	71	66	57	11	58	26
<i>p</i>		0,042		НС		НС		НС		НС		

*м - мушки пол

*жс - женски пол

*ТИЛ-тумор инфилтришући лимфоцити

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Између група пацијената обољелих од меланома подијељених у односу на клиничко-патолошке карактеристике као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора, није уочена статистички значајна разлика у односу на учесталост врсте испољеног генотипа ДНМТ1 (*rs2228611*) (табела 9).

Табела 9. Удруженост полиморфизма *rs2228611* ДНМТ1 гена са клиничко-патолошким карактеристикама (стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора) пацијената обољелих од меланома.

ВАРИЈАБЛЕ									
		Стадијум (III vs I and II)		Величина тумора (T3/T4 vs T1/T2)		Нодални статус		Прогресија	
		I/II	III	T1/2	T3/4	N -	N +	-	+
ГЕНОТИП ДНМТ1 (<i>rs2228611</i>)	wt	33	16	22	27	31	18	42	7
	хет	37	12	22	27	37	12	40	9
	мут	13	12	13	12	15	10	20	5
УКУПНО		83	40	57	66	83	40	102	21
<i>p</i>		НС		НС		НС		НС	

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Пацијенти мушког пола су значајно чешће имали мутрани генотип *rs2114724* ДНМТ1гена у односу на жене ($p=0,003$). Разлике у полиморфизму у односу на бреслов дебљину, улцерације, митозу и ТИЛ нису уочене (Табела 10).

Табела 10. Удруженост полиморфизма *rs2114724* ДНМТ1гена са полом и клиничко-патолошким карактеристикама (бреслов дебљина, улцерација, митоза и ТИЛ) пацијената обољелих од меланома.

ВАРИЈАБЛЕ												
		Пол		Бреслов дебљина		улцерација		митоза		ТИЛ		
		М	Ж	≥ 4	< 4	0	1	-	+	нема	non-brisk	brisk
ГЕНОТИП ДНМТ1 (<i>rs2114724</i>)	wt	31	29	44	22	30	37	36	30	6	30	14
	хет	20	19	29	13	19	23	20	22	4	20	8
	мут	19	5	7	8	3	11	10	5	1	8	4
УКУПНО		70	53	80	43	52	71	66	57	11	58	26
<i>p</i>		<i>0,003</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		

*м - мушки пол

*ж - женски пол

*ТИЛ-тумор инфилтришући лимфоцити

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Статистичком обрадом резултата нису нађене статистички значајне разлике између полиморфизма *rs2114724* ДНМТ1 гена и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора (табела 11).

Табела 11. Удруженост полиморфизма *rs2114724* ДНМТ1гена са клиничко-патолошким карактеристикама (стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора) пацијената обољелих од меланома.

		ВАРИЈАБЛЕ							
		Стадијум (III vs I and II)		Величина тумора (T3/T4 vs T1/T2)		Нодални статус		прогресија	
		I/II	III	T1/2	T3/4	N -	N +	-	+
ГЕНОТИП ДНМТ1 (<i>rs2114724</i>)	wt	42	24	29	37	42	24	55	11
	хет	31	11	21	21	31	11	36	6
	мут	10	5	7	8	10	5	11	4
УКУПНО		83	40	57	66	83	40	102	21
<i>p</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>	

*м - мушки пол

*ж - женски пол

*wt, хет, мут - wild type/хетерозигт, мутирани генотип

Статистичка анализа је показала да између учесталости полиморфизма *rs406193(Ц501Т)* ДНМТ 3Б гена и пола, као и клиничко патолошких карактеристика као што су бреслов дебљина, присуство улцерација, митоза није уочена значајна разлика. Међутим, статистички значајна разлика је уочена у односу на ТИЛ. Значајно је већи број пацијената са wt генотипом који имају non-brisk ТИЛ у односу на оне гдје ТИЛ не постоји или је присутан brisk (табела 12).

Табела 12. Удруженост полиморфизма *rs406193 (Ц501Т)* ДНМТ1гена са полом и клиничко-патолошким карактеристикама (бреслов дебљина, улцерација, митоза и ТИЛ) пацијената обољелих од меланома.

ВАРИЈАБЛЕ												
		Пол		Бреслов дебљина		Улцерација		Митоза		ТИЛ		
		М	Ж	≥ 4	< 4	0	1	-	+	нема	non-brisk	brisk
ГЕНОТИП ДНМТ3Б <i>rs406193 (Ц501Т)</i>	wt	56	35	60	31	38	52	46	45	4	42	22
	хет	14	17	19	12	13	19	19	12	7	16	4
	мут	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
УКУПНО		70	53	80	43	52	71	66	57	11	58	26
<i>p</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		0,012		

*м - мушки пол

*ж - женски пол

*ТИЛ-тумор инфилтришући лимфоцити

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Такође, статистички значајна разлика у учесталости полиморфизма *rs406193(Ц501Т)* ДНМТ 3Б гена и клиничко-патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора, није уочена (табела 13).

Табела 13. Удруженост полиморфизма rs406193 (Ц501Т) ДНМТ1 гена са клиничко-патолошким карактеристикама (стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора) пацијената обољелих од меланома.

		ВАРИЈАБЛЕ							
		Стадијум (III vs I and II)		Величина тумора (Т3/Т4 vs Т1/Т2)		Нодални статус		прогресија	
		I/II	III	T1/2	T3/4	N -	N +	-	+
ГЕНОТИП ДНМТ3Б rs406193 (Ц501Т)	wt	62	29	40	51	62	29	77	29
	хет	20	11	16	15	20	11	24	11
	мут	1	0	1	0	1	0	1	0
УКУПНО		83	40	57	66	83	40	102	21
<i>p</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>	

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Статистичка анализа је показала да између учесталости полиморфизма rs2424932 ДНМТ гена и пола, као и клиничко патолошких карактеристика као што су бреслов дебљина, присуство улцерација, митоза и ТИЛ није уочена статистички значајна разлика (табела 14).

Табела 14. Удруженост полиморфизма *rs2424932* ДНМТ 3Б гена са полом и клиничко-патолошким карактеристикама (бреслов дебљина, улцерација, митоза и ТИЛ) пацијената

ВАРИЈАБЛЕ												
		Пол		Бреслов дебљина		Улцерација		Митоза		ТИЛ		
		М	Ж	≥ 4	< 4	0	1	-	+	нема	non-brisk	brisk
ГЕНОТИП ДНМТ3Б <i>rs2424932</i>	wt	29	24	36	17	20	33	22	28	4	24	11
	хет	23	20	27	16	17	25	28	15	4	24	8
	мут	8	9	17	10	15	13	13	14	2	10	7
УКУПНО		70	53	80	43	52	71	66	57	11	58	26
<i>p</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		

*м - мушки пол

*ж - женски пол

*ТИЛ-тумор инфилтришући лимфоцити

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

**p*<0.05 је болдовано, *НС*-нема статистички значајне разлике

Такође, статистички значајна разлика у учесталости полиморфизма *rs2424932* ДНМТ 3Б гена и клиничко-патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора, није уочена (Табела 15). Међутим, уочен је изразити тренд повезаности wt и одсуства прогресије меланома.

Табела 15. Удруженост полиморфизма *rs2424932* ДНМТ 3Б гена са клиничко-патолошким карактеристикама (стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора) пацијената обољелих од меланома.

ВАРИЈАБЛЕ									
		Стадијум (III vs I and II)		Величина тумора (T3/T4 vs T1/T2)		Нодални статус		прогресија	
		I/II	III	T1/2	T3/4	N -	N +	-	+
ГЕНОТИП ДНМТ3Б <i>rs2424932</i>	wt	36	17	24	29	37	16	48	5
	хет	30	13	20	23	28	15	31	12
	мут	17	10	13	14	18	9	23	4
УКУПНО		83	40	57	66	83	40	102	21
<i>p</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		<i>НС</i>		0,054	

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

**p*<0.05 је болдовано, *НС*-нема статистички значајне разлике

Табела 16 приказује разлике у учесталости полиморфизама ДНМТ1 и ДНМТ3Б гена код пацијената са меланомом у односу на пол. Статистичка анализа је показала да између група пацијената подијељених према полу постоји статистички значајна разлика у односу на полиморфизам ДНМТ1 *rs2228611* (*p*=0,042) и ДНМТ1 *rs2114724* гену (*p*=0,003). Када је у питању ДНМТ1 *rs2228611* полиморфизам, пацијенти мушког пола у значајно већем броју имају хетерозиготни генотип у односу на жене, такође, жене у значајно већем броју имају мутирани генотип. Такође, пацијенти мушког пола су значајно чешће имали мутациони генотип у односу на жене када је у питању ДНМТ1 *rs2114724* полиморфизам (Табела 16).

Табела 16. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према полу

Варијабла	укупно Број		ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	Хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	Мут
Пол	М	70	58	12	0	26	34	10	37	23	19	56	14	0	29	23	28
	Ж	53	42	9	2	23	15	15	29	19	5	35	17	1	24	20	9
	<i>n</i>		НС			0.042			0.003			НС			НС		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

3.4. Учесталост свих испитиваних полиморфизама у генима за ДНМТ1 и ДНМТ3Б у односу на поједине клиничко-патолошке карактеристике пацијената

Пацијенти су у односу на Бреслов дебљину подјелени у двије групе (≥ 4 и < 4). Статистичком обрадом резултата пацијената подјелених на групе у односу на Бреслов дебљину није уочена статистички значајна разлика у учесталости било које генетичке варијанте полиморфизама између група пацијената (Табела 17).

Табела 17. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према Бреслов дебљини.

Варијабла	укупно Број		ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	Хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
Breslow	≥ 4	80	64	15	1	30	33	17	44	29	7	60	19	1	36	27	17
	< 4	43	36	6	1	19	16	8	22	13	8	31	12	0	17	16	10
	<i>n</i>		НС			НС			НС			НС			НС		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Између група пацијената подијелених према постојању улцерација уочена је статистички значајна разлика ($p=0,045$) само у односу на ДНМТ1 rs2228612 генетичку варијанту, при чему су пацијенти са улцерацијама у значајно већем броју имали wt генотип, у односу на пацијенте без улцерација (Табела 18).

Табела 18. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према постојању улцерација.

Варијабла	укупно Број		ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
Митоза	-	66	54	12	0	27	25	14	36	20	10	46	19	1	25	28	13
	+	57	46	9	2	22	24	11	30	22	5	45	12	0	28	15	14
	P		<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, *НС*-нема статистички значајне разлике

Када су пацијенти подјелени у односу на постојање митоза није уочена статистички значајна разлика у учесталости било које генетичке варијанте испитиваних полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима (Табела 19).

Табела 19. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према постојању митоза.

Варијабла	укупно Број		ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			Wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
Улцера- ција	0	52	37	14	1	18	20	14	30	19	3	38	13	1	20	17	15
	1	71	62	7	2	32	28	11	37	23	11	52	19	0	33	25	13
	p		0.045			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, *НС*-нема статистички значајне разлике

Тумор инфилтришући лимфоцити (ТИЛ) су испитивани од стране патолога након коришћења одговарајућих маркера и према прихваћеним критеријумима пацијенти су подјелени у три групе (без инфилтрације, non-brisk и brisk). Уочена је статистички значајна разлика ($p=0,012$) између ДНМТЗБ *rs406193* полиморфизма у односу на ТИЛ. Значајно је већи број пацијената са wt генотипом који имају non-brisk ТИЛ у односу на оне гдје ТИЛ не постоји или је присутан brisk. Међутим, значајна разлика у односу на друге генетичке варијанте није уочена (Табела 20).

Табела 20. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТЗБ генима у испитиваној групи пацијената према постојању тумор инфилтришућих лимфоцита.

Варијабла		укупно Број	ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 <i>rs2228612</i>			ДНМТ1 <i>rs2228611</i>			ДНМТ1 <i>rs2114724</i>			ДНМТЗБ <i>rs406193</i>			ДНМТЗБ <i>rs2424932</i>		
			wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
ТИЛ	нема	11	10	1	0	4	5	2	6	4	1	4	7	0	4	5	2
	non-brisk	58	45	11	2	24	22	12	30	20	8	42	16	0	24	24	10
	brisk	26	23	3	0	9	12	5	14	8	4	22	4	0	11	8	7
	<i>p</i>		<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			0.012			<i>НС</i>		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип

* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Упоређујући удруженост полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена у односу на стадијум болести уочена је висока статистички значајна разлика када су упоређиване групе пацијената са I/II стадијумом болести у односу на пацијенте који су у III стадијуму болести ($p=0,003$). Ови резултати су показали да је wt генотип значајно учесталији код пацијената са I/II стадијумом болести у односу на пацијенте који су у III стадијуму. Статистички значајна разлика у односу на остале генетичке варијанте није уочена (Табела 21).

Табела 21. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према стадијуму меланома.

Варијабла		укупно Број	ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
Стадијум М (III vs I and II)	I/II	83	74	9	0	33	37	13	42	31	10	62	20	1	36	30	17
	III	40	26	12	2	16	12	12	24	11	5	29	11	0	17	13	10
	<i>P</i>		<i>0.003</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип
* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Када је у питању подјела пацијената на групе у односу на величину тумора није уочена статистички значајна разлика у учесталости било које генетичке варијанте тј. полиморфизама између група пацијената (Табела 22).

Табела 22. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према величини тумора.

Варијабла		укупно Број	ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
Величина тумора (T3/T4 vs T1/T2)	T1/2	57	47	10	0	22	22	13	29	21	7	40	16	1	24	20	13
	T3/4	66	53	11	2	27	27	12	37	21	8	51	15	0	29	23	14
	<i>p</i>		<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>			<i>НС</i>		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип
* $p < 0.05$ је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Упоредјујући удруженост полиморфизма rs2228612 ДНМТ1 гена са нодалним статусом уочена је висока статистички значајна разлика ($p=0,003$). Ови резултати су показали да је wt генотип значајно учесталији код пацијената са негативним нодалним статусом у односу на пацијенте који имају позитиван нодални статус. Статистички значајна разлика у односу на остале генетичке варијанте није уочена (Табела 23).

Табела 23. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према нодалном статусу

Варијабла		укуп но Број	ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	Хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут
Нодални статус	N -	83	74	9	0	31	37	15	42	31	10	62	20	1	37	28	18
	N +	40	26	12	2	18	12	10	24	11	5	29	11	0	16	15	9
	P		0.003			НС			НС			НС			НС		

*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип
*p<0.05 је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

Упоредивањем фреквенције генотипова полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена у односу на прогресију тумора уочена је висока статистички значајна разлика (p=0,007). Ови резултати су показали да пацијенти са прогресивним тумором значајно чешће имају хетерозиготни, а значајно ређе wt генотип. Статистички значајна разлика у односу на остале генетичке варијанте није уочена (Табела 24).

Табела 24. Дистрибуција полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима у испитиваној групи пацијената према прогресији тумора.

Варијабла		укуп но Број	ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ														
			ДНМТ1 rs2228612			ДНМТ1 rs2228611			ДНМТ1 rs2114724			ДНМТ3Б rs406193			ДНМТ3Б rs2424932		
			wt	хет	мут	wt	Хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	мут	wt	хет	Мут
Прогресија	-	102	84	18	0	42	40	20	55	36	11	77	24	1	48	31	23
	+	21	16	3	2	7	9	5	11	6	4	14	7	0	5	12	4
	p		0.007			НС			НС			НС			НС		

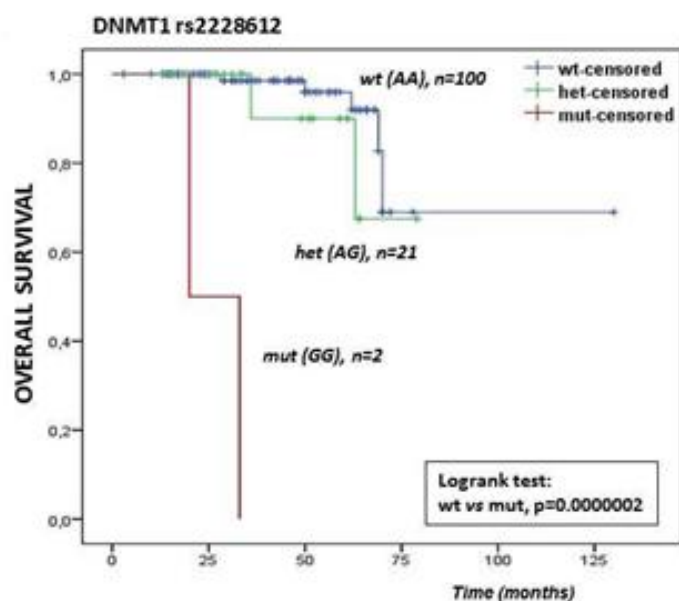
*wt, хет, мут - wild type, хетерозигот, мутирани генотип
*p<0.05 је болдовано, НС-нема статистички значајне разлике

3.5. Повезаност укупног преживљавања пацијената са меланомом и периода без поновног јављања болести са испитиваним полиморфизмима.

Након што је одређена учесталост појаве испитиваних полиморфизама у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима, њихова дистрибуција према полу, локализацији, клиничком стадијуму болести, присуству улцерација, Бреслов дебљини, величином тумора, митози, нодалном статусу, степеном инфилтрације са лимфоцитима и прогресијом тумора урађено је и испитивање асоцијације испитиваних генотипова са наведеним клиничко-патолошким карактеристикама. Даља испитивања су била усмерена на испитивање повезаности генотипова у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима са укупним преживљавањем пацијената и периодом без поновног јављања болести. Укупно преживљавање је израчунавано од дана постављања дијагнозе па све до смртог исхода из било ког разлога. Период без поновног јављања болести је израчунаван од времена постављања дијагнозе па до прве појаве било ког знака релапса болести или смртог исхода. Каплан-мајерове криве преживљавања су упорђиване употребом log-rank теста. Користећи наведене параметре и статистичке методе нађена је једино повезаност полиморфизмама у гену за ДНМТ1 (*rs2228612*) са укупним преживљавањем и повезаност периода без појаве болести пацијената и полиморфизмима у гену за ДНМТ1 (*rs2228612*). Из тог разлога ће у овом раду бити приказани само ови резултати, док резултати (графикони) у којима није нађена повезаност генотипова у ДНМТ1 и ДНМТ3Б генима са укупним преживљавањем пацијената и периодом без поновног јављања болести нису приказани.

Графикон 12 приказује повезаност укупног преживљавања (OS-Overall Survival) пацијената са меланомом у односу на различите генотипове ДНМТ1 (*rs2228612*) полиморфизма. Укупно преживљавање је процјењивано Каплан-Мајеровом методом. Криве преживљавања су међусобно поређене log-rank тестом и утврђено је постојање високе статистички значајне разлике у преживљавању пацијената са wt генотипом у односу на пацијенте са мутираним генотипом.

Анализом кривих преживљавања, уочава се да при поређењу групе пацијената са мутираним генотипом у односу на оне са wt генотипом, особе које имају мутирани генотип (полиморфизмом у гену за *rs2228612* ДНМТ1) имају статистички значајно лошије укупно преживљавање ($p=0,0000002$). Није уочена статистички значајна повезаност у укупном преживљавању пацијената са меланомом који имају хетерозиготни генотип упоређујући их са пацијентима који су носиоци wt генотипа (Графикон 12).



*OS-Overall Survival (укупно преживљавање)

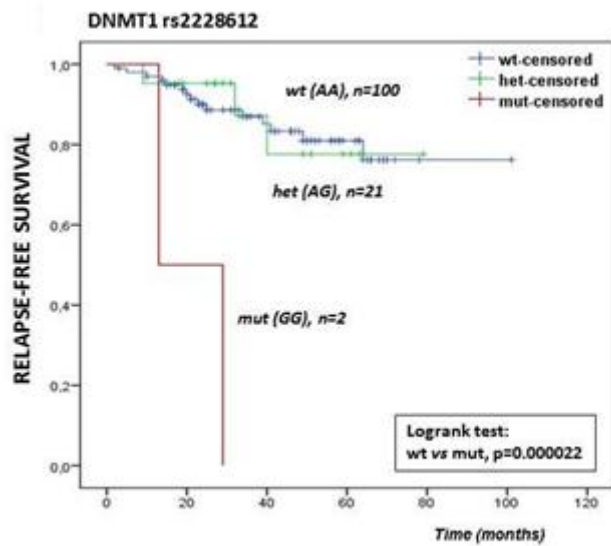
*Wt –wild type

*Het –хетерозигот

*Mut-мутиран

Графикон 12. Повезаност укупног преживљавања пацијената са меланомом са полиморфизмима у гену за ДНМТ1 (*rs2228612*). Укупно преживљавање је израчунато Каплан-Мајеровом методом и тестирано log-rank тестом.

Резултати анализе повезаности преживљавања без напредовања болести (RFS) пацијената са меланомом у односу на генотипове *rs2228612* ДНМТ1 гена су приказани на графикону 13. Анализом кривих преживљавања, утврђено је да су особе са мутираним генотипом ДНМТ1 (*rs2228612*) имале високо статистички значајно ($p=0,000022$) краћи период без напредовања болести у односу на особе са wt генотипом. Такође, није уочена статистички значајна повезаност у RFS пацијената са меланомом који имају хетерозиготни генотип са полиморфизмима у гену за ДНМТ1 (*rs2228612*) упоређујући са wt генотипом (Графикон 13).



*OS-Overall Survival (укупно преживљавање)
 *Wt –wild type
 *Het –хетерозигот
 *Mut-мутиран

Графикон 13. Повезаност периода без појаве болести (без релапса) пацијената са меланомом и полиморфизмима у гену за ДНМТ1 (rs2228612). Укупно преживљавање је израчунато Каплан-Мајеровом методом и тестирано log-rank тестом.

3.6. Униваријантна и мултиваријантна анализа прогностичких фактора у односу на укупно преживљавање пацијената са меланомом

Униваријантна анализа прогностичких фактора у односу на укупно преживљавање пацијената са меланомом, рађена је Кокс регресионом анализом. Утврђено је да су **прогресија болести** (HR=27,485, [CI=3,419-220,924], **p=0,002**), **ДНМТ1 (rs2228612)** (HR=6,620, [CI=2,214-19,791], **p=0,001**), и **ДНМТ3Б (rs2424932)** (HR=2,455, [CI=1,006-5,994], **p= 0,049**) статистички значајно удружени са високим ризиком за погоршање укупног преживљавања код пацијената са меланомом. За разлику од ових фактора, присуство **ТИЛ** представља добар прогностички маркер код пацијената са меланомом (HR=0,323, [CI=0,127-0,855], **p=0,025**) (табела 25).

Табела 25. Униваријантна анализа прогностичких фактора у односу на укупно преживљавање (Overall Survival -OS) пацијената са меланомом, рађена Кокс регресионом анализом (Cox Regression Analysis).

УНИВАРИЈАНТНА АНАЛИЗА	HR [95% CI]	p
Пол	1,557 [0,415-5,842]	0,512
Стадијум III vs I and II	3,558 [0,860-14,714]	0,080
T	1,659 [0,753-3,655]	0,209
N	2,220 [0,511-9,645]	0,287
Прогресија	27,485 [3,419-220,924]	0,002
ТИЛ	0,323 [0,127-0,855]	0,025
ДНМТ1 (rs2228612)	6,620 [2,214-19,791]	0,001
ДНМТ1 (rs2228611)	1,066 [0,405-2,810]	0,896
ДНМТ1 (rs2114724)	1,076 [0,427-2,713]	0,877
ДНМТ3Б (rs406193)	1,690 [0,606-4,708]	0,316
ДНМТ3Б(rs2424932)	2,455 [1,006-5,994]	0,049

*HR -hazard ratio- означава ризик;

*CI- интервал поверења (confidence interval),

*значајне вредности, $p < 0,05$, су болдоване

Параметри који су униваријантном анализом идентификовани као статистички значајни су након тога анализирани мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом. Мултиваријантна анализа је показала да је ДНМТ1 (rs2228612) алел (HR=12,126, [CI=2,345-62,715], $p=0,003$) сво вријеме био независтан прогностички фактор код пацијената са меланомом, док је ДНМТ3Б (rs2424932) (HR=4,640, [CI=0,946-22,763], $p=0,059$) изгубио своју значајност као прогностички фактор. Мултиваријантна анализа је, такође, показала да прогресија болести представља независтан прогностички фактор код пацијената са меланомом (HR=37,888, [CI=3,615-397,062], $p=0,002$) (Табела 26).

Табела 26. Мултиваријантна Кокс пропорционална регресиона анализа (Cox Proportional Hazards Regression analysis) прогностичких фактора пацијената са меланомом укључених у студију .

МУЛТИВАРИЈАНТНА АНАЛИЗА	HR[95% CI]	p
Прогресија	37,888 [3,615-397,062]	0,002
ДНМТ1 (rs2228612)	12,126 [2,345-62,715]	0,003
ДНМТ3Б (rs2424932)	4,640 [0,946-22,763]	0,059

*HR -hazard ratio- означава ризик;

*CI- интервал поверења (confidence interval),

*значајне вредности, $p < 0,05$, су болдоване

ДИСКУСИЈА

Мелагонезе је вишестепени процес који осим познатих фактора ризика укључује и накупљање генетичких и епигенетичких промена у ћелијама. Ове промјене нарушавају равнотежу функције различитих гена, али за развој меланома је најважнија равнотежа између онкогена и тумор супресорских гена.

Вођени овим сазнањем, за циљ овог рада смо поставили да испитамо повезаност између наслеђених варијација (полиморфизми гена) у генима за DNA метилтрансферазе и клиничких параметара болести, факторима ризика, исходом болести, односно са укупним преживљавањем.

Продукти DNA метилтрансферазе кроз метилацију DNA, имају кључну улогу у епигенетичким механизмима који су неопходни за нормалне функције ћелија, али такође, имају значајну улогу у настанку и развоју тумора.

Меланом је малигни тумор коже, порјекла из меланоцита који малигно алтерирају. Клинички се манифестује на различите начине, а карактерише га локална агресивност и склоност ка раном лимфогеном и /или хематогеном метастазирању (186).

Инциденција меланома је у порасту у цијелом свијету, а у последњих десет година забиљежен је значајан пораст броја обољелих. Чини око 5% свих примарних малигнух тумора коже, али је одговоран за око 80% свих смртних случајева тумора коже.

Главни разлог за настанак меланома је излагање UV зрацима који својим мутагеним дејством доводе до хромосомских абнормалности, што се може доказати молекуларном анализом (188-190). Меланин апсорбује UV зрачење у меланоцитима гдје долази до отпуштања слободних радикала који доводе до мутација на DNA. Ове мутације могу активирати протоонкогене или прекинути активност тумор супресорских гена, чијом инактивацијом долази до настанка тумора и његове прогресије (191).

Позитивна породична анамнеза је веома важан фактор ризика за настанак меланома коже. Обољели са једним рођаком у првом кољену који има меланом имају 1,7 пута већи ризик да развију исто обољење, док је у случају постојања два рођака у првом кољену ризик девет пута већи (192, 193).

Иако је познато да је меланом посљедица поремећаја у регулацији раста ћелија и њиховог размножавања, генетички механизми који иницирају и омогућавају његов настанак нису у потпуности познати. Студије секвенцирања цијелог генома (енгл. Whole Genome Sequencing – WGS) и студије секвенцирања егзома (енгл. Whole Exome Sequencing – WES) пацијената са меланомом указују на то да је меланом малигни тумор који има највише стопе мутација у поређењу са другим типовима канцера (194).

Полиморфизми су различите варијанте једног те истог гена. Да би се варијанта могла сматрати за полиморфизам неопходно је да учесталост најмање учестале варијанте у популацији не буде испод 0,001. Познато је да су најчешћи полиморфизми у људском геному полиморфизми појединачних нуклеотида тј. Нуклеотидне секвенце (SNP). Поред SNP, у честе полиморфизме спадају и кратки тендемски поновци (енгл. Short Tandem Repeat Polymorphisms – STRP-s), а дефинишу се као секвенце које садрже 4 базна пара и понављају се по више пута у геному (163).

Епигенетичка регулација подразумијева промјене у генској експресији, при чему се примарна структура DNA молекула не мијења, а епигенетичке промјене се наслеђују митозом (172).

Метилација DNA представља вид епигенетичке регулације која има веома важну улогу у карциногенези. Механизам метилације DNA доводи до инактивисања једног X

хромозома женке сисара, што доводи до утишавања гена, а кључни ензими који учествују у процесу метилације зову се DNA-метилтрансферазе (ДНМТ). Процес метилације цитозина тумор супресорских гена доводи до настанка инактивног хроматина што за последицу има инактивацију гена која доводи до настанка и развоја канцера (177).

Као што је претходно наведено, DNA метилтрансферазе (DNMT) су фамилија ензима који катализују метилацију цитозина у оквиру CpG динуклеотида, при чему је донор метил групе кофактор SAM (S-аденозин метионин) (171,178,179). У фамилију DNA метилтрансфераза спада 4 ензима: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B. У великом броју истраживања показана је повећана експресија DNMT ензима у већем броју типова карцинома, укључујући карцином дојке (DNMT3B) и плућа (DNMT1), гдје је утврђено да прекомјерна експресија DNMT директно корелира са лошом прогнозом (181,182). Међутим, учесталост полиморфизама у DNMT1 гену (rs2228611, rs2228612,rs2114724) и полиморфизама у DNMT3B гену (rs406193 ,rs2424932) код пацијената са примарним меланомом коже у различитим стадијумима болести и њихова корелација са клиничким и патохистолошким карактеристикама, према нашим сазнањима, до сада није испитивана.

Циљ наше студије био је да се утврди да ли постоји значајна разлика у дистрибуцији генотипова и алела полиморфизама у генима : DNMT1 и DNMT3B са стадијумом болести, полом, ризиком за прогресију болести и преживљавањем пацијената обољелих од меланома.

Испитивани полиморфизми у наведеним генима за DNA метил трансферазе су тестиран на HW равнотежу у цјелокупној групи пацијената, као и код пацијената II и III стадијума болести. Уочено је значајно одступање од HW равнотеже у случају DNMT1 rs2228612 полиморфизма код свих пацијената и код групе пацијената са III стадијумом болести. Наши резултати су показали постојање значајне разлике у дистрибуцији генотипова и алела rs2228612 полиморфизма између пацијената II и III стадијума болести. Чињеница да у групи пацијената II стадијума није детектовано присуство мутираног ЦЦ генотипа rs2228612 полиморфизма DNMT1 гена, додатно потврђује постојање претпоставке да присуство Ц алела може бити повезано са повишеним ризиком за прогресију болести, што је потврђено резултатима анализе вјероватноће неповољног догађаја. Повишени ризик за прогресију болести код носиоца ЦЦ генотипа се може објаснити функционалним ефектом испитиваног полиморфизма.

Свеукупна хипометилација и регионална хиперметилација DNA канцерских гена је свеобухватно истраживана код великог број карцинома, укључујући и меланом (195, 196). Мићевић и сар. (195) су показали да метилација канцерских гена код меланома може бити посредована DNMT ензимском повећаном експресијом. Генетичке варијанте DNMT могу узроковати аберантну експресију туморских гена тако што погађају образац метилације.

Неколико студија је до сада испитивало удруженост DNMT полиморфизама и прогресије канцера или подложности за настанак карцинома. Међутим, резултати су опречни и неубједљиви (184, 197-199).

У нашој студији уочена је статистички значајна корелација у полиморфизмима DNMT1 (rs2228612, rs2228611, и rs2114724) и DNMT3B (rs406193 и rs2424932) гена у односу на клиничко-патолошке карактеристике и стадијум меланома. Мултиваријантна анализа је показала да DNMT1 A201G rs2228612 полиморфизам и прогресија болести представљају независне предикторе лошег исхода код пацијената са меланомом.

Такође, ДНМТ1 rs2228612 је био удружен са лошијим свеукупним преживљавањем и преживљавањем без релапса код пацијената са меланомом. Од свих испитаних генских полиморфизама, само ДНМТ1 rs2228612 је био удружен са појавом улцерација, нодалним статусом, прогресијом и стадијумом болести. Анализе преживљавања спроведене у нашем истраживању су показале да управо носиоци -ЦЦ генотипа ДНМТ1 rs2228612 полиморфизма имају најлошије укупно преживљавање. Овакав резултат је донекле очекиван, узимајући у обзир претходно наведене резултате анализе вјероватноће неповољног догађаја и чињенице да је присуство ЦЦ генотипа забиљежено само код пацијената III стадијума, које одликује лошије преживљавање у поређењу са нижим стадијумима болести

Наши резултати се слажу са претходним студијама које су утврдиле повезаност овог полиморфизма са ризиком за настанак карцинома. Претходна студија, код пацијената са оралним карциномом је показала да је ДНМТ1 rs2228612 генски полиморфизам био значајно повезан са смањењем свеукупног преживљавања (184). У истој студији је испитивана повезаност експресије гена за ДНМТ1, ДНМТ3А и ДНМТ3Б са исходом болести. Показано је да повећана експресија гена за ДНМТ1 (мерена је количина и-RNA за испитиване гене) може бити потенцијални предиктор лошег исхода болести ($p=0.029$) и прогностички молекуларни маркер редукованог преживљавања без релапса болести ($p=0.003$) код пацијената са оралним планоцелуларним карциномом. Такође је показано да повећана експресија гена за ДНМТ1 представља независни прогностички маркер краћег преживљавања без знакова болести, као и да пацијенти са повећаном експресијом гена за ДНМТ1 имају 2.385 пута већи ризик за рецидив болести у односу на пацијенте који имају смањену експресију гена. Обзиром да је ријеч о групама пацијената истог етничког поријекла, али са различитим канцерима (меланом и орални карцином), може указати на потенцијалну генералну повезаност мутираног ЦЦ генотипа rs2228612 полиморфизма ДНМТ1 гена са лошијим преживљавањем. Свакако, овакве сумње изискују спровођење обимне проспективне студије у будућности, којом би се наведене претпоставке могле потврдити или оповргнути. Li и сар. (198) су у својој метааналитичкој студији показали да је ДНМТ1 rs2228612 генски полиморфизам био удружен са свеукупним ризиком за настанак карцинома. Chang. и сар (200) су у свом истраживању утврдили да постоји негативна корелација између варијанте Г алела (АГ/ГГ генотипова) ДНМТ1 rs2228612 полиморфизма и ризика за настанак езофагеалног карцинома. Kulmann и сар. (197) су у свом истраживању утврдили да је ДНМТ1 rs2228612 GG хомозиготна варијанта повезана са нижим ризиком за настанак карцинома дојке у средњеевропској популацији бијелаца.

ДНМТ1 rs2228612 полиморфизам (+32204 А/ Г) узрокује настанак несинонимну замјену изолеуцина у валин у аминокиселини 311, локализовану у великом Н-терминалном дијелу ДНМТ1 протеина. Иако изолеуцин и валин имају слична физичко-хемијска својства, а ова промјена се дешава у регији која није важна за катализу, и њена локализација у регулаторном домену може имати кључну улогу у акумулацији протеина (201, 202). Н-терминални домен је састављен из неколико функционалних домена, као што је домен чија је функција у одржавању стабилности и везивању за циљни молекул метилације, домен за посредовање интеракције ДНМТ1 са пролиферишућим ћелијским нуклеарним антигеном (енгл. Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) и циљање ДНМТ1 на репликационо мјесто, домен кључан за везивање са CpGs и изазивање каталитичке активности ензима, и домен укључен у интеракцију са осталим протеинима. Све ово доводи до кључне улоге ДНМТ1 и одржавању

метилационих образаца и посљедичне контроле генске експресије (203). Такође, координациона активност Н-терминалног и Ц терминалног каталитичког домена може утицати и на интерреакцију са осталим протеинима, епигенетичким регулаторима и траскрипционим факторима. Н-терминални домен ДНМТ1 интерреагује и са хистонима деацетилазе HDAG1 и HDAG2 (енгл. Hierarchical Directed Acyclic Graph), транскрипционим фактором E2F1, као и са тумор супресорским геном Rb. Протеолитичка активност Н-терминалног домена доводи до повећања ензимске активности и губитка способности ДНМТ1 да разликује хемиметилисану и неметилисану DNA (204). Ова истраживања показују да Н-терминални дио ДНМТ1 директно имају утицај на каталитичка својства ензима, а такође, везивање метлисане DNA за алостерно мјесто локализовано на Н-терминалним дијеловима ДНМТ1 узрокују алостерну активацију ензима ка *de novo* активацији ДНМТ1 (201). Управо, због претходно наведеног, Н-терминални домен може имати веома важну улогу у интерреакцијама великог броја протеина укључених у хроматинску кондензацију и динамску регулацију генске експресије.

Како је за канцер, укључујући и меланом, карактеристична локална хиперметилација, а глобална хипометилација, могуће је да присуство мутираног генотипа rs2228612 полиморфизма у меланому води глобалној хипометилацији, посљедичној активацији протоонкогена, што све укупно може бити објашњење повезаности испитиваног полиморфизма са повишеним ризиком за прогресију болести у нашој студији.

ДНМТ1 rs2228612 (G/A) је синонимни SNP локализован на 17 егзону, на аминокиселини 463 у ДНМТ1 протеину. Иако је промјена са G на A (CCG на CCA) посредована синонимном мутацијом аминокиселине 463, биоинформатичким анализама је предвиђено да rs2228612 је локализован у региону егзонског спајајућег појачивача, са могућом регулаторном улогом (205). Ова варијација доводи до стварања три егзонска спајајућа мотива, који могу довести до алтернативног спајања и вишеструких транскрипционих варијанти ДНМТ1 гена (206).

У студији која је испитивала утицај изложености кадмијумом код жена у Арегнитини, ДНМТ1 rs2228612 ГГ варијанта генотипа је показала модификујуће ефекте на обрнуту везу између LINE-1 метилације, маркера глобалне метилације и изложености кадмијуму (202, 207). Такође, ГГ генотип ДНМТ1 rs2228612 је значајно повезан и са повећаним ризиком за настанак карцинома јајника (207), а скорија метааналитичка студија је показала да ДНМТ1 rs2228612 полиморфизам може бити удружен и са настанком карцинома дојке (198). Уочене неконзистенције између резултата студија спроведених у групама пацијената са истим канцером могу указати на значај разматрања етничког поријекла у генетичким студијама асоцијације, али и величине укључене студијске групе, селекције пацијената за студију, тачности генотипизације полиморфизама и друго. Међутим, у нашој студији, није уочена значајна повезаност између ДНМТ1 rs2228612 и клиничко-патолошких карактеристика или исхода преживљавања код пацијената са меланомом.

Када је ријеч о rs406193 полиморфизму ДНМТ3Б гена, потврђено је присуство HW равнотеже у студијској групи. Дистрибуција алела rs406193 полиморфизма се није значајно разликовала између групе пацијената II и III стадијума болести, док је уочена гранична статистичка значајност у дистрибуцији генотипова. Број пацијената генотипа TT био је значајно већи код пацијената у трећем стадијуму у односу на други стадијум меланома, што би могло да указује на потенцијалну повезаност овог алела са

прогресијом болести. Ипак, резултати мултиваријантне анализе нису потврдили постојање повезаности генотипова са ризиком за прогресију меланом. Додатно, у нашој студији, није утврђено постојање повезаности испитиваног полиморфизма ДНМТ3Б гена са преживљавањем пацијената, што је у складу са резултатима добијеним у студији спроведеној на групи пацијената са оралним карциномом из Србије (184). Насупрот налазима у групама пацијената са различитим канцерима у Србији, у студији Гиллио-Тос и сар. (207), установљена је повезаност између присуства алела Т полиморфизма rs406193 и смањеног ризика смртности обољелих од канцера простате.

Наши резултати показују да ДНМТ3Б Ц/Т rs406193 може бити повезан са присуством ТИЛ-а. Иако, претходне студије нису биле конзистенте, вјерује се да интензитет и композиција туморског лимфоцитног инфилтрата код имунолошки активних типова карцинома, као што је меланом, корелирају са бољим исходом (208). ТИЛ има кључну улогу у антитуморском имунском одговору и може утицати на терапијску ефикасност и прогнозу болести. Међутим, процјена ТИЛ-а се углавном ради субјективном процјеном од стране патолога. Имајући у виду могућност детекције клоналности Т лимфоцита на молекуларном нивоу (на основу реаранжмана у гама ланцу гена Т ћелијског рецептора), сматрамо да би таква анализа, уз фенотипизацију субпопулација Т лимфоцита, омогућила бољи увид и процену да ли је популација ТИЛ претежно моноклонска, олигоклонска или поликлонска. Скорије студије су показале да DNA метилација може, потенцијално, да се користи како би се процијенили ТИЛ-базирани туморски имунски одговор (209), као и да се користи ТИЛ и DNA метилациони профил као прогностички маркер код великог броја карцинома, укључујући и меланом (210).

Силико анализа је показала да ДНМТ3Б Ц/Т rs406193 интронска SNP смањује транскрипциони фактор-везујући MATWAAT (гдје је М једнако А или Ц, а W је једнако А или Т) (211). Ова секвенца је препозната од стране транскрипционог фактора N-Oct-3 (кодираног од стране brn-2 гена), а она је повезана са туморогенским потенцијалом меланомских ћелија (210, 213). Раније је показано да је Т носач ДНМТ3Б Ц/Т б rs406193 полиморфизам повезан са смањењем морталитета пацијената са карциномом простате (207). Код пацијенткиња са колоректалним карциномом које имају ДНМТ3Б Ц/Т rs406193 полиморфизам уочена је негативна корелација (200). Такође, ДНМТ3Б Ц/Т rs406193 полиморфизам је значајно повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома плућа (214), простате (207) и преживљавањем пацијената са карциномом главе и врата (215). У нашој студији дистрибуција генотипова rs406193 полиморфизма ДНМТ3Б гена у односу на пол била је уједначена. У студији рађеној 2009. године код пацијената обољелих од колоректалног канцера у популацији Холандије, пронађено је да Т алел има утицаја на снижење ризика за појаву овог малигнитета код особа женског пола (211).

У нашој студији, полиморфизам rs2424932 у ДНМТ3Б гену био је повезан са прогресијом болести и ризиком за лоше свеукупно преживљавање код пацијената са меланомом. Полиморфизам rs2424932 А/Г је локализован на 3'UTR на ДНМТ3Б гену, на микро- RNA везујућем мјесту. Силико анализа је предвидјела да А алел обезбјеђује везујуће мјесто за мир-920 (206), утичући на пост-транскрипциону регулацију ДНМТ3Б генске експресије. Такође, А/Г G полиморфизам на овом мјесту може довести до стварања алтернативних посттранскрипционих везујућих мјеста, посљедишно модификујући ДНМТ3Б генску експресију, као и глобалну и регионалну метилацију DNA (216).

Студије секвенцирања цијелог генома различитих врста карцинома су показале да је меланом један тумор са највише мутираних гена, са већином генских промјена повезаних са митоген активираним протеин киназа сигналним путем, укључујући BRAF мутације (217). Ове врсте мутација меланом доводе до настанка карактеристичних клиничких карактеристика и имају агресивнију биолошку активност у односу на меланоме са wt генским мутацијама. BRAF мутација може бити укључена у великом броју поремећаја када је у питању DNA метилација меланом, што показују истраживања која су доказала да блокада BRAF подстиче хипометилацију онкогена и хиперметилацију тумор супресорских гена (218), што доводи до закључка да BRAF мутација може директно утицати на метилационе промјене. Студије су показале да је блокирање BRAF значајно смањило експресију ДНМТ1 и хистон метил трансферазе код меланомских ћелија (218), што доводи до закључка да ДНМТ1 може имати кључну улогу у BRAF вођене метилационе промјене код меланомских ћелија. ДНМТ1 деплеција узрокује деметилацију и активацију канцерских гена код меланомских ћелијских линија (219). ДНМТ3Б има протуморску улогу када је у питању меланом, па је повећана експресија ДНТ3Б гена уочена код пацијената са напреднијим стадијумом болести (220). Такође, ДНМТ3Б утиче и на раст меланом преко miR-196b подстичуће хиперметилације и повећане експресије miR-196b, што директно утиче на mTORC2 сигнални пут (221). Такође, тренутно је у клиничкој фази велики број истраживања која испитују синергистички ефекат имунских блокатора контролних тачака у комбинацији са блокаторима ДНМТ инхибиторима (195).

Потенцијална повезаност између меланомских и ДНМТ ензима није у потпуности разјашњена. Међутим, показано је да је узрок аберантне DNA метилације присутне код наследних меланом могу бити поремећаји у ДНМТ ензимима. Анализа подстичуће метилације код меланомских гена, укључујући и CDKN2A (p16 and p14ARF), је показала да је p16 хиперметилација ријетка, док је смањена метилација TNFRSF10C промотера у крви повезана са значајно већим ризиком од настанка меланом (223). Студија de Araujo и сар. (224) је показала да је значајна DNA метилација различита код меланомских гена (укључујући *KIT*, *MGMT*, *MITF*, *TERT*, и *TNF*), како у узорцима леукоцита, тако и у узорцима из тумора (224). Међутим, неопходне су детаљније анализе да се утврди потенцијална важност и употребљивост измјењене DNA метилације као биомаркера за могући настанак наследног меланом и да ли ДНМТ варијанте могу бити предиспонирајући фактор за настанак наследног меланом.

Резултати овог истраживања су јасно показали удруженост полиморфизама rs2228612 ДНМТ1 гена са смањеним укупним преживљавањем пацијената са меланомом. Такође, сматрамо да је значајан и резултат који је указао да је полиморфизам rs406193 ДНМТ 3Б гена је удружен са повећаним присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (ТИЛ) који су добар прогностички маркер. Ови налази указују на могућност идентификације молекуларних маркера који ће на вријеме указати на потребу агресивније терапије одређених пацијената која би утицала на дужи период преживљавања тих пацијената.

Иако је број пацијената укључених у студију задовољавајући било би неопходно да се сличне студије спроведу на већем броју пацијената и у различитим популацијама.

Значајан допринос овим истраживањима било би и истовремено испитивање експресије гена за ДНМТ са циљем повезивања значаја утврђених генотипова на експресију гена.

Даља истраживања би требало да повежу полиморфизме у ДНМТ генима, њихову експресију са метилационим статусом гена у испитиваним туморима.

На тај начин би се осим указивања на потенцијалне молекуларне маркере болести указало и на специфичну терапију пацијената засновану на епигенетичким промјенама у самом тумору.

ЗАКЉУЧЦИ

- У ову студију је укључено укупно 123 пацијента обољелих од меланома њих 70 било је мушког пола, док је преосталих 53 пацијената било женског пола
- Код највећег броја пацијената (50) меланом је био локализован на трупку, затим на доњим екстремитетима 33, код 21 пацијента болест је била локализована у предјелу главе и врата, код 14 на доњим екстремитетима, и најмање, код 5, на акралном дијелу тијела
- Код мушкараца је скоро двоструко већа заступљеност тумора на трупку и глави врату него код жена. Код жена је била већа учесталост тумора локализованих на екстремитетима, и то доњим екстремитетима скоро троструко више него код мушкараца, и горњим екстремитетима 2.5 пута више код жена него код мушкараца
- Од укупно 123 обољела пацијента највећи број 38 је било у IB стадијуму. Стадијум II (А,Б,Ц) је имало 44 пацијента, док је у трећем стадијуму (А,Б,Ц) било њих 40
- Утврђена је слична дистрибуција пацијената са Бреслов дебљином (< 4 и ≥ 4), као и са или без мутација или митозе у испитиваној групи пацијената. Мјерењем степена инфилтрације тумора са лимфоцитима код највећег броја пацијената (58) нађена је non-brisk инфилтрација.
- У нашој групи пацијената највећи број пацијената се налазио у првом и другом стадијуму болести (83), а мањи број (40) у трећем стадијуму болести.
- Дистрибуција величине тумора у испитиваној групи пацијената је била слична, 57 пацијената има величину T1/2, док 66 има величину тумора T3/4.
- Код већег броја пацијената је утврђен негативан нодални статус (83), док је њих 40 имало позитивни нодални статус. Још већа разлика је утврђена кад је на основу патолошког налаза испитивана прогресија болести. Већина пацијената у испитиваној групи (102) није имала прогресију, док је код свега 21 пацијента меланом био прогресиван.
- Испитивањем учесталости појаве генотипова у ДНМТ1 гену (*rs2228612*, *rs2228611* и *rs2114724*) и ДНМТ3Б гену (*rs406193* и *rs2424932*) утврђена је статистички значајно већа учесталост хетерозигота *rs2228611* ДНМТ1 код мушкараца у односу на женски пол ($p=0,042$). Мушки пол је такође статистички значајно имао већу заступљеност мут генотипа *rs2114724* у ДНМТ1 гену ($p=0,003$) у односу на женски пол.
- У групи испитаника подијељених према полу, бреслов дебљини, постојању митоза и ТИЛ није уочена статистички значајна разлика у односу на дистрибуцију генотипова и алела *rs2228612* ДНМТ1 гена. Међутим, пацијенти са улцерацијама су у значајно већем броју имали wt генотип.
- Утврђена је статистички значајна удруженост полиморфизма *rs2228612* ДНМТ1 гена са стадијумом болести ($p=0,003$), нодалним статусом ($p=0,003$) и прогресијом тумора ($p=0,007$). Ови резултати су такође показали да је wt генотип значајно учесталији код пацијената са I/II стадијумом болести и код пацијената са негативним нодалним статусом у односу на пацијенте који су у III стадијуму

болести и имају позитиван нодални статус. Пацијенти са прогресивним тумором значајно чешће су хетерозиготи, а рјеђе се налази wt генотип.

- Између група пацијената обољелих од меланома подијелих у односу на клиничко-патолошке карактеристике као што су бреслов дебљина, улцерације, митоза, ТИЛ, стадијум болести, величина тумора, нодални статус и прогресија тумора, није уочена статистички значајна разлика у односу на учесталост врсте детектованог генотипа ДНМТ1 (*rs2228611*).
- Статистичком обрадом резултата нису нађене статистички значајне разлике између полиморфизма *rs2114724* ДНМТ1 гена и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус, прогресија тумора, бреслов дебљина, улцерације, митоза и ТИЛ.
- Обрада резултата је показала да између учесталости полиморфизма *rs406193* (*Ц501Т*) ДНМТ 3Б гена и пола, као и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус, прогресија тумора, бреслов дебљина, присуство улцерација, митоза није уочена значајна разлика. Међутим, значајно је већи број пацијената са wt генотипом који имају non-brisk ТИЛ у односу на оне гдје ТИЛ не постоји или је присутан brisk.
- Статистичка анализа је показала да између учесталости полиморфизма *rs2424932* ДНМТ гена и пола, као и клиничко патолошких карактеристика као што су стадијум болести, величина тумора, нодални статус, прогресија тумора бреслов дебљина, присуство улцерација, митоза и ТИЛ није уочена статистички значајна разлика. Међутим, уочен је изразити тренд повезаности wt и одсуства прогресије меланома.
- Анализом кривих преживљавања, уочава се да при поређењу групе пацијената са мутираним генотипом у односу на оне са wt генотипом, особе које имају мутирани генотип (полиморфизмом у гену за *rs2228612* ДНМТ1) имају статистички значајно лошије укупно преживљавање.
- Анализом кривих преживљавања, утврђено је да су особе са мутираним генотипом ДНМТ1 (*rs2228612*) имале високо статистички значајно ($p=0,000022$) краћи период без напредовања болести у односу на особе са wt генотипом.
- Униваријантна анализа прогностичких фактора у односу на укупно преживљавање пацијената са меланомом, утврђено је да су прогресија болести, ДНМТ1 (*rs2228612*), и ДНМТ3Б (*rs2424932*) статистички значајно удружени са високим ризиком за погоршање укупног преживљавања код пацијената са меланомом. За разлику од ових фактора, присуство ТИЛ представља добар прогностички маркер код пацијената са меланомом.
- Мултиваријантна анализа је показала да је ДНМТ1 (*rs2228612*) алел независан прогностички фактор код пацијената са меланомом, док је ДНМТ3Б (*rs2424932*) изгубио своју значајност као прогностички фактор. Мултиваријантна анализа је, такође, показала да прогресија болести представља независан прогностички фактор код пацијената са меланомом.

ОПШТИ ЗАКЉУЧАК

Резултати наших истраживања су показали по први пут да полиморфизам rs2228612 ДНМТ1 гена може бити удружен са смањеним укупним преживљавањем пацијената са меланомом. Такође, полиморфизам rs2424932 ДНМТ3Б гена је показао снажан тренд удружености са прогресијом болести и ризиком за краће укупно преживљавање пацијената са меланомом. Полиморфизам rs406193 ДНМТ 3Б гена је удружен са повећаним присуством тумор инфилтришућих лимфоцита (ТИЛ) које су добар прогностички маркер. Ови налази указују да даља истраживања у овом правцу могу потенцијално довести до открића нових молекуларних маркера и/или нових терапија.

ЛИТЕРАТУРА

1. Melanoma Death Rate Still Climbing ([http:// nlm.nih.gov/medlineplus/news/fullstory-34983.html](http://nml.nih.gov/medlineplus/news/fullstory-34983.html))
2. Canacer Start Fact Sheets (<http:seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>)
3. Balch CM et al. Cutaneous melanoma.Quality Medical Publishing,4th edition. 2003.
4. Bodenham D. A stady of 650 observed malignant melanomas in the South West regin.Ann R Coll Surg Eng.1968; 43(4):218-39.PMC2312310.PMID 5698493.
5. Laennec RTH. Sur les melanoses .Bulletin de la France de Medicine Paris 1806; 1:24-26.
6. Norris W. A case of fungoid disease. Edinb.Med.Surg. J. 1820; 16:562-5.
7. Cooper, Samuel. First lines of theory and practise of surgery. London:Longman,Orme,Brown,Green and Longman, 1840.
8. Ascierto PA, Grimaldi AM et all. Future perspectives in melanoma research. Meeting report from the Melanoma Bridge,Napoli,December 2012.J Trans Med.2013; 11(1):137.
9. Karakousis G, Yang R, Xu X. Circulating melanoma cells as a predictive biomarker. J Invest Dermatol. 2013;133(6):1460-2.
10. Liu W, Peng Y, Tobin DJ. A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis. Peer J. 2013;1:49.
11. Hale CS, Qian M, Ma MW, Scanlon P, Berman RS, Shapiro RL, Pavick AC, Shao Y, Polsky D, Osman I, Darvishian F. Mitotic rate in melanoma: prognostic value of immunostaining and computer assisted image analysis. Am J Sur Pathol. 2013; 37(6):882-9.
12. Brusse A, Rapoion J, Fusi A, Suci S, Nonnenmacher A, Santinami M, Kuuit WH, Testori A, Punt CJ, Dalgleish AG, Spatz A, Eggermont AM, Kelihoiz U. Analysis of surrogate gene expression markers in peripheral blood of melanoma patients to predict tratman outcome of adjuvant pegylated interferon alpha 2b (EORTC 18991 side study). Cancer Immunol Immunother. 2013;62(7):1223-33.
13. Menzies AM, Long GV. Recent advances in melanoma systemic therapy, BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond. Eur J Cancer. 2013 July 16; pii:S0959-8049(13)00502-9.
14. Ravnan MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation pozitiv advanced melanoma. Clin. Ther 2012 July;34(7):1474-86.
15. Mansfield AS, Nevala WK, Lieser EA, Leontovich AA, Markovic SN. The immunomodulatory effects of bevacizumab on systematic immunity in patients with metastatic melanoma. Oncoimmunology.2013 May;1:2(5):e24436.
16. M.Novaković, N.Babović i saradnici. Melanom kože, prevencija, dijagnostika i lečenje. Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva. Mart 2014.

17. Lucas, Robyn, Mc Michael, Tony, Smith, Wayne, Armstrong, Bruce. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. Environmental Burden of Disease Series 13. World Health Organisation, 2006.
18. Jerant AF, Johson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. *Am Fam Physician*, 2000 July; 62(2):357-68,375-6,381-2.
19. Clinical Practice Guidelines for the Management of Melanoma in Australia and New Zealand, 2010.
20. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Prkin DM, Forman D, Bray F. Globocan, Cancer incidence and mortality Worldwide. IARC Cancer base No 11, Lyon, France. 2014 Jan.
21. I. Nola. Kliničko patološki čimbenici i značajke staničnog ciklusa u predviđanju ishoda melanoma kože. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, 2005.
22. Cancer Research UK statistics team 2010.
23. Gershenwald JE, Blch CM, Soong SJ, Thompson JF. Prognostic factors and natural history. Quality Medical Publishing, 2003; 25-54.
24. Leslie MC, Bar Eli M. Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *J Cell Biochem* 2005; 94(1):25-28.
25. Bhoumik A, Singha N, O Connell MJ, Ronai Z. Regulation of TIP60 by ATF2 modulates ATM activation. 2008; 283(25):17605-14.
26. Bhoumik A, Jones N, Ronai Z. Transcriptional switch by activating transcription factor 2-derived peptide sensitizes melanoma cells to apoptosis and inhibits their tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101(12):4222-7.
27. Oliveria S, Saraiya M, Geller A, Heneghan M, Jorgensen C. Sun exposure and risk of melanoma. *Arch Dis Child* 2006; 91(2):131-8.
28. Lee J, Strickland D. Malignant melanoma: social status and outdoor work. *Br. J. Cancer*, 1980 41(5):757-63.
29. Pion IA, Rigel DS, Garfinkel L, Silverman MK, Kopf AW. Occupation and the risk of malignant melanoma. *Cancer*, 1995; 75(2):637-44.
30. Perry PK et al. Cutaneous malignancy in albinism. *Cutis*, 2001; 67:427-30.
31. Lund LP, Timmins GS. Melanoma, long wave length ultraviolet and sun screens: controversial and potential resolutions. *Pharmacology and Therapeutics* 2007; 114:198-207.
32. Autier P, Dore JF, Gefeller O et al. Melanoma risk and residence in sunny areas. *Br J Cancer* 1997; 76(11):1521-1524.

33. Elwood JM, Gallagher RP. Body side distribution of cutaneous malignant melanoma in relationships to patterns of sun exposure. *Int J Cancer* 1998;78(3):276-280.
34. Šitum M, Buljan M, Poduje S, Šebetić K. Prevencija i klinička obilježja malignog melanoma. *Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti* 2008;21-38.
35. Bliss J, Ford D et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: sistematic overview of 10 cases control studies. *Int J Cancer* 1995;62(49):367-76.
36. Gandini S et al. Meta analysis of risk factors for cutaneous melanoma: common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005;41:28-44.
37. Hussein MR. Melanocytic dysplastic naevi occupy the middle ground between benign melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas. *J Clin Pathol* 2005;58:453-6.
38. Naeyaert JM et al. Dysplastic naevi. *N Eng J Med* 2003;349:2233-40.
39. Balch CM et al. Cutaneous melanoma. *Qualiti Medical Publishing* 2003.
40. Begg CB, Orlov I, Hummer AJ. Lifetime risk of Melanoma.
41. Udaykumar D, Mahato B, Gabree M, Tsao H. Genetic determinans of cutaneous melanoma predisposition. *Semin Cutan Med Surg* 2010;29(3):190-195.
42. Kamb A et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440.
43. Suzuki I et al. Blinding of melanotropic hormones to teh melanocortin receptor MCIR on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996;137:1627-1633.
44. Clark WH et al. Origin familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions, the B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978;114:732-738.
45. Bergman W, Gruis NA, Frants RR. The Dutch FAM familiy material. Clonical and genetic data. *Cytogenet Cell Genet* 59;161-164.
46. Bale SJ et al. Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic naevus to chromosome 1p. *N Eng J Med* 1989;320:1367-1372.
47. Gillanders E et al. Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. *Am J Hum Genet* 2003;73:301-313.
48. Astner S et al. Skin phototypes. *J invest Dermatol* 2004.
49. Tsao H, Sober AJ. Atypical Melanocytic Naevi. *Fitzpatrics Dermatology in General Meidcine*. New York, 2006;90-916.
50. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Canacer incidence in five continents. *IARC scientific piblication*, Lion, France 2002;155.

51. Cleavar JE. Cancer in Xeroderma pigmentosum and related disorders og DNA repair. *Nat Rev Cancer* 2005;5:564-73.
52. M.Gačević. Značaj ekspresije VEGF na tok i prognozu bolesti kod bolesnika sa primarnim kutanim melanomom.Doktorski rad. Vojno Medicinska Akademija Beograd, 2004.
53. Hemminki K et al. Skin cancer and non Hodglin lymphoma as second malignancies, markers of impaired function. *Eur J Cancer* 2003;39:223-9.
54. Josse A, De Varies E, Eckell R. Gender differences in melanoma : female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermat* 2011;131:719-726.
55. Melanoma Warning Sings.com
56. Kumar Abbas, Fausto Mitchell. Robins basic pathology, 8th ed. New York. Saunders Elsevier,2007.
57. Crows AN, Magro CM, Barnhill RL, Mihm MC.Pathology-Cutaneous Melanoma . Quality Medical Publishing, 2003;171-202.
58. Breungier H, Schlgenhauff B, Stroebel W et al. Patterns of local horizontal spread of melanomas. Consequences for surgery and histopatological investigation. *Am J surg Path* 1999;23:1493-1498.
59. Balmer A et al. Diagnosis and current menagment of retinoblastoma. *Oncogene* 2006;25:5341-9.
60. Scotto J, Fraumeni JF, Lee JA. Melanomas of the eye and other noncutaneous sites: epidemiologic aspects. *J Natl Cancer Inst* 1976;56(3):489-491.
61. Schreiber MM, Moon TE,Bozzo PD. Chronic solar ultraviolet damage associated with malignant melanoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 1984;10:755-759.
62. Kuchelmeister C,Schaumburg Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in Caucasians: clinical faetures, histopatology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol* 143:275-280.
63. Byers HR,Bawan J. Pathologic parametters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998;12(4):717-725.
64. Balch CM, Gershenwald JE, Soons SJ et al. Final version of 2009 ACJJ melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 2009;27:6199-6206.
65. Clinical Practice Guidelines for the Managment of Melanoma in Australia and New Zeland 2011.
66. Dummer R, Hauscild A, Guggenheim M, Keilholz U, Pentheroudakis G.ESMO Guidlines Working Group. Cutaneous melanoma.ESMO Clinical Practice Guidlines for diagnosis, treatment and follow up. *Ann Oncol*. 2013;23(7):86-91.

67. Garbe C, Peris K et al. Diagnosis and treatment of melanoma. *Eur J cancer* 2013;48(15):2375-90.
68. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill Det et al. S3 guideline, diagnosis, therapy and follow up of melanoma short version. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013;11(6):563-602.
69. Breslow, Alexander. Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of Suregry*, 1970;172(5):902-8.
70. Buttner Petra, Garbe Claus, Bertz Jochen, Burg Gunter, Hoedet Barbara et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of clark level for prognostic classification. *Cancer* 1995;75(10):2499-2506.
71. Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong S et al. Critical analysis of the current American Jint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clinic Oncol* 1997;15(3):1039-51.
72. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-48.
73. Edge Sb, Byrd DR, Compton CC et al. Melanoma of the Skin in: *AJCC Cancer Staging Manual*. New York Springer Verlag, 2010;325-344.
74. Marseden JR, Newton Bishop JA, Burrow L et al. Revised UK Guidelines for the managment of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol* 2010;163:238-56.
75. Frishberg DP, Balch C, Balzer BL et al. Protocol of examination of specimens from patients with melanoma of the skin. College of American Pathologist version 3.2.0.0.
76. Scolyer S, Ellis D, Heenan P et al. Primary cutaneous melanoma structured reporting protocol. Royal College of Pathologist of Auatralia, 2010.
77. Ivan D, Prieto VG, An update on reporting histopathological prognostic factors in melanoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2011;135:825-9.
78. Weedon D. *Skin pathology*. 2nd Edition, Sydney, 2002.
79. Balch CM, Soong SJ et al. Prognostic factor of analysis 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 2001;19:3622-3634.
80. Yamaguchi Y et al. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006;20:1486-8.
81. Harrist Tj, Rigel DS, Day CL et al. Microscopic satellites are more highly associated with regional lymph node metastases than in primary melanoma thickness. *Cancer* 1984;53:2183-2187.

82. Kashani Sabet M, Sgebiel RW, Ferreira CM et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2001;137:1169-1173.
83. Kashani Sabet M, Shaik L, Miler JR et al. NF kappaB in the vascular progression of melanoma. *J Clin Oncol* 2004;22:617-623.
84. Dadrass SS, Paul T, Bertonicini J et al. Tumor lymphangiogenesis a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol*,2003;162:1951-1960.
85. Straume O, Jackon DG, Aleksen LA. Independent impact of lymphatic vessel density and presence of low grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*,2003;9:250-256.
86. Elder DE, Guerry D, Van Horn M et al. The role of lymph node dissection for clonical stage I malignant melanoma of intermediate thickness. *Cancer*,1985;56:413-418.
87. Mihm MC, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathological prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*,1996;74:43-47.
88. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;101:14639-14645.
89. Rosenberger SA, Yannelli RA, Yang JC et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Ins*.1994;86:1159-1166.
90. Sirrot MN, Legha SS, Moon Te et al. Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma: a multivariate analysis. *Cancer*.1993;72:3091-3098.
91. Eton O, Legha SS, Moon TE et al. Prognostic factors for survival of patients treated systematically for disseminated melanoma, *J Clin Oncol*. 1998;16:1103-1111.
92. Agarwala SS, Keliholz U, Gilles E et al. LHD correlation with survival in advanced melanoma from two large randomised trials. *Eur J Cancer*.2009 ;45:1807-1814.
93. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the protein S100 in cancer. *Eur J Surg Oncol*.2008;34:357-364.
94. Devery JM, King NJ, Geczy CL. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J Immunol*.1994;152:1888-1897.
95. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function and expression. *Brain Res Bull*.1995;37:417-429.
96. Heizmann CW. The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol*.2002;172:69-80.
97. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 1980;286:400-401.

98. Nakajima T,Wantanabe S,Sato Y,Shimosato Y,Ishihara K. Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanoma and pigment nevus and its diagnostic application.1982;50:912-918.
99. Abraha HD,Fuller LC,Du Viver AW,Higgins EM et al.Serum S100 protein a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. Br J Dermatol 1997;137:381-385
100. www.dermatologija.info/dermoskopija.thm
101. Dummer R,Haushalid A,Guggenheim M et al.ESMO Guidelines Working Group. Cutaneous melanoma:ESMO Clinical Practise Guidelines for diagnosis,treatment and follow up. Ann Oncol.2012;23(7).
102. Garbe C, Peris K,Hauschild A,Saiag P et al.Diagnosis et tretment of melanoma. European consensus based interdisciplinary guideline Update 2012.Eur J Cancer 2012;48(15):2375-90.
103. NCCN Clinical Practise Guidelines in oncology v2,2014.
104. Leung AM,Hari DM,Morton DL. Surgery for distant melanoma metastasis. Cancer J,2012;18(2):176-84.
105. Schlagenhauff B,Ellwanger U,Breuninger H,Stroebel W et al.Prognostic impact of the type of anaesthesia used during the excision of primary cutaneous melanoma.Melanoma Res 2005;10(2)165-9.
106. Kelemen PR, Essner R, Foshag LJ, Morton DL.Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy after wide local excision of primary melanoma. J Am Coll Surg.1999;189(3):247-52.
107. Ariyan S,Ali Salaam P,Cheng DW,Truini C.Reliability of lymphatic mapping after wide local excision of cutaneous melanoma. J Am Coll Surg 1999;189(3):247-52.
108. N.Parać. Melanom-etiotogeneza, dijagnoza i liječenje. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, 2014.
109. Whiteman DC,Pavan WJ,Bastian BC. The melanomas a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic and biological aspects supporting distinct subtype,causal pathways and cells of origin. Pigment Cell Melanoma Res,2011;24(5):879-97.
110. Goran Šijan, Jefta Kozarski i drugi. Validnost ultrazvučnog nalaza u indentifikaciji metastatskih izmenjenih limfnih čvoriva kod bolesnika sa melanomom kože.Vojnosanitetski pregled.2010, vol.67,br1,st.25-31.
111. Goran Šijan. Validnost ultrazvučno vođene aspiracije tankom iglom u dijagnostici mikrometstaza u limfnim čvorovima stražarima u obolelih od karcinoma. Doktorski rad.Vojnomedicinska Akademija Beograd,2015.
112. Norris W. Eight Cases of Melanoma with Pathological and Terapeutical Remarks on that Disease. London:Longman,Brown, Green,Roberts,1957.

113. Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excisional with margins of 1cm to 3cm. *N Engl J Med*, 1988;318:1159-1162.
114. Balch CM, Uris MM, Karakousis CO et al. Efficacy of 2cm surgical margins for intermediate thickness melanomas (1-4mm). Results of multi institutional randomised surgical trial. *Ann Surg*, 1993;218:218-267.
115. Gillgren P, Drzewiecki KT, Niin M, Gullestad HP, Hellborg H, Mansson Brahme et al. 2cm versus 4cm surgical excision margins for primary cutaneous melanoma thicker than 2mm a randomised multicentre trial. *Lancet*, 2011;378(9803):1635-42.
116. Moerhle M, Dietz K, Garbe G, Breuninger H. Conventional histology vs three dimensional histology in lentigo malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 2006;154(3):453-9.
117. Hilari H, Liorca D, Traves V et al. Conventional surgery compared with slow Mohs micrographic surgery in the treatment of lentigo maligna retrospective study of 62 cases. *Actas Dermo*, 2012;103(7):614-23.
118. Cohem T, Busam KJ, Patel A, Brad MS. Subungual melanoma: management considerations. *Am J Surg* 2008;195(2):244-8.
119. Wong SL, Balch CM et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma. *J Clin Oncol* 2012;30(23):2912-8.
120. Chakera AH, Hesse B, Burak Z et al. EANM EORTC general recommendation for sentinel node diagnostic in melanoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36(10):1713-42.
121. Reintgen D, Pendas S, Jakub J, Swor G et al. National trials involving lymphatic mapping for melanoma: the multicenter selective lymphadenectomy trial, the sunbelt melanoma trial and the Florida melanoma trial. *Semin Oncol* 2004;31(3):363-73.
122. Morton DL, Thomson JF, Conchran J et al. Final trial report of sentinel node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2014;370:599-609.
123. Rajović M, Jauković LJ i drugi. Sentinel lymph node status clinicopathological and prognostic associations initial experience from the single centre. 6th meeting of interdisciplinary melanoma skin cancer center, Barcelona, 2012; p65.
124. Rajović M, Jauković LJ i drugi. Sentinel lymph node tumor burden and its correlation to clinicopathologic characteristic of primary melanoma. *J Deutsch Dermatol Ges* 2013;11(7).
125. Kienstra MA, Padhy TA. Head and neck melanoma. *Cancer Control* 2005;12
126. T. Šoša, Sutlić Z, Stanec I i sur. *Kirurgija, Naklada Ljevak, Zagreb*, 2007.
127. Krikwood J, Ibrahim J, Sondak V et al. High et low dose interferon alfa 2b in high risk melanoma. first analysis of intergroup trial. *J Clin Oncol* 18(12):2444-58.

128. Krikwood J, Ibrahim J, Soudak V et al. Interferon alfa 2a for melanoma metastasis. *Lancet* 2010;359:978-9
129. Neil H, Cox, John SC. British Association of Dermatologists management guidelines. Wiley Blackwell. 2010.
130. Krikwood J, Strawderman M et al. Interferon alfa 2b adjuvant therapy of high risk resected cutaneous melanoma the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*, 1996;14(1):7-17.
131. Wheatley K, Ives N et al. Adjuvant therapy for melanoma an individual patient meta analysis of randomised trials. *J Clin Oncol*, 2007;25:8526
132. Koops HS, Vaglini M, Suci S et al. Prophylactic isolated limb perfusion for localized high risk limb melanoma. *J Clin Oncol* 1998;16(9):2906-12.
133. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR et al. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high risk melanoma: a systematic review and meta analysis. *J National Cancer Ins* 2010;102(7):493-501.
134. Ascierto PA, Gogas HJ, Grob JJ et al. Adjuvant interferon alpha in malignant melanoma: an interdisciplinary and multinational expert review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013;85(2):149-61.
135. Hauschild A, Gogas H, Tahrini A et al. Practical guidelines for the management of interferon alpha side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer* 2008;112(5):982-94.
136. Turza K, Dengel LT, Harris RC et al. Effectiveness of imiquimod limited to dermal melanoma metastases with simultaneous resistance of subcutaneous metastasis. *J Cutan Pathol* 2010;37(1):94-98.
137. Lens MB, Dawes M. Isolated limb perfusion with mephalan in the treatment of malignant melanoma of the extremities a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2003;4(6):359-364.
138. Beasley GM, Petersen RP, Yoo J et al. Isolated limb perfusion on in transit malignant melanoma of the extremity a well tolerated but less effective alternative to hyperthermic isolated limb perfusion. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2195-205.
139. Babović N, Jelić S, Kreačić S. Hemioterapija i hormonska terapija u lečenju melanoma i aktuelne kliničke studije. *Melanom, Udruženje onkoloških hirurga Srbije* 2007;138-44.
140. Babović N, Jelić S, Popov I. Terapija metastatskog melanoma. *Pregledi Serijal Savremena terapija u onkologiji* 2002;128:284-9.
141. Serrone I, Zeuli M, Segal FM et al. Dacarbazine based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19(1):21-34.
142. Mays SR, Nelson BR. Current therapy of cutaneous melanoma. *Cutis* 1999;63(5).

143. Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY et al. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg* 2000;105(5):1774-99.
144. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N et al. A prospective evaluation of a triple drug regimen containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine for metastatic melanoma. *Cancer* 1989;64:2012-9.
145. Jelić S, Babaović N i drugi. Comparison of the efficacy of two different dosage dacarbazine based regimens and two regimens without dacarbazine in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2002;12(1):91-8.
146. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U et al. Result of the phase III, randomised, placebo controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 2009;27(17):823-30.
147. Ives NJ, Stowe RL, Loringan P et al. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma. A meta analysis of 18 trials involving 2621 patients. *J Clin Oncol* 2007;25:5426-34.
148. Dummer R, Guggenheim M, Arnold AW, et al. Updated Swiss guidelines for the treatment and follow up of cutaneous melanoma. *Swiss Med Wkly* 2011;141:13320.
149. Eggermont AM, Schadendorf D. Melanoma and immunotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:547-64.
150. Atkins MB, Lorze MT, Dutcher JP et al. High dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999;17:2105-16.
151. Schwartztruber DJ, Lawson D, Richards J et al. A phase III multi institutional randomised study of immunization with gp100. peptide followed by high dose IL 2 alone in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2009;27
152. Buzaid A. Management of metastatic cutaneous melanoma. *Oncology* 2004;18(11):1443-50.
153. Yervoy. European Medicine Agency report. Available at <http://ema.europa.eu>.
154. Herch EM, Weber JS, Powderly JD et al. Disease control and long term survival in chemotherapy naive patients with advanced melanoma treated with ipilimumab with or without dacarbazine. *J Clin Oncol* 2008;26:9022.
155. Harmon, Amy. A Roller Coaster Chase for a Cure. *The New York Times*, 2010.
156. Andrew Pollack. Drugs show promise slowing advanced melanoma. *The New York Times* 2011.
157. Chapman, Paul B, Hauschild et al. Improved survival with Vemurafenib in melanoma with BRAF mutation. *New England Journal of Medicine* 2011;364(26):2507-2516.

158. Hodi FS, O Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711-23.
159. Hodi FS, O Day SJ, McDermott DF et al. Combination of dabrafenib and trametinib delays development of treatment resistance in MM patients. *New Medical* 2012.
160. Flaherty, Keith T et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF Mutations. *New England Journal of Medicine* 367(18):1694-1703.
161. Bastiaannet E, Beukema J, Hoekstra H. Radiation therapy following lymph node dissection in melanoma patients: treatment, outcome and complications. *Cancer Treat Rev* 2005;31(1):18-26.
162. Boyer. *Primary Care Oncology*. Ford 1999.
163. Strachan T. and Read. A. *Human Molecular Genetics Fourth Edition*. Garland Science. 2011
164. Šupić, Magić, Jović. *Monografija*, editori Jović, Magić 2014.
165. Kujundžić B. Povezanost polimorfizama u genima koji učestvuju u metabolizmu vitamina D sa rizikom za nastanak i kliničkim karakteristikama oralnog lihen planusa. *Doktorska disertacija*, Foča, 2017.
166. Kullman K, Deryal M, Ong MF, Schmidt W, Mahleknecht U. DNMT1 genetic polymorphisms affect breast cancer risk in the central European Caucasian population. *Clin Epigenetics*. 2013;2:5:7
167. Zhu J, Du S, Zhang J, Wang Y, Wu Q, Ni J. Polymorphism of DNA methyltransferase 3B-149 C/T and cancer risk: a meta analysis. *Med Oncol*. 2015;32(1):399.
168. Mc Clay EF, Mc Clay ME et al. The effect of tamoxifen and cisplatin on the disease-free and overall survival of patients with high risk malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2000;83(1):16-21.
169. Khattak M, Fisher R, Turajlic S, Larkin J. Targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma: an evolving paradigm. *Adv Med Oncol*. 2013 March;5(2):105-118.
170. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature* 2002;3:415-428.
171. Šupić G. i Magić Z. Osnovni epigenetski mehanizmi kancera. *Med Data Rev* 2009; 1(4): 31-36.
172. Reis A. H. O. et al. Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics. *Tumour Biol*. 2016 Oct;37(10):13029-13038.
173. Perri F. et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 111 (2017) 166–172.

174. Stojković B. i Tucić N. Od molekula do organizma, molekularna i fenotipska evolucija. Službeni glasnik. 2012
175. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-3229.
176. Šerman A. et al. DNA Methylation as a Regulatory Mechanism for Gene Expression in Mammals. *Coll. Antropol.* 30 (2006) 3: 665–671.
177. Nandakumar V. et al. Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* vol.32 no.4 pp.537–544, 2011.
178. Barter M.J. et al. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (2012) 339-349.
179. Li Y and Tollefsbol T.O. Impact on DNA Methylation in Cancer Prevention and Therapy by Bioactive Dietary Components. *Current Medicinal Chemistry*, 2010; 2141-2151.
180. Roberson KD, Uzvolgyi E, Liang G et al. The human DNA methyltransferases 1.3a,3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and over expression in tumors. *Nucleic Acids Res.*199;27(11):2291-8.
181. Giaurlt I, Tozlu S et al. Expression Analysis of DNA methyltransferases 1,3a et 3b in sporadic breast carcinomas. *Clin Can Res* 2003;9:4415-4422.
182. Xing J, Stewart D, Gu J et al. Expression of methylation related genes is associated with overall survival in patients with non small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2008;98:1716-1722.
183. Goll M.G. et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science* 311, 395, 2006.
184. Supić G et al. Prognostic value of the DNMTs mRNA expression and genetic polymorphisms on the clinical outcome in oral cancer patients. *Clin Oral Invest*, 2016.
185. Valasek MA¹, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005 Sep;29(3):151-9.
186. Perkins AS, Stern DF. Molecular biology of cancer: Oncogenesis. U: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ur. *Cancer – principles and practice of oncology*. Philadelphia – New York : Lippincott – Raven Publishers; 1997, str. 79-102.
187. Herlyn M. Human melanoma: Development and progression. *Cancer Metastasis Rev* 9:101, 1990.
188. Moan J, Dahlback A, Setlow RB. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem Photobiol* 1999;70(2):243-7.

189. Doré JF. Influence of sun exposures durin childhood and durin adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Inter J Can* 1998;77(4):533-7
190. De Gruijl FR. Skin cancer and solar UV radiation. *Europ J Cancer* 1999;35(14):2003-9.
191. Halliday. Immunosuppression and melanoma. *Melanoma Res* 2001;1Suppl 11:34.
192. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol.* 2010;49(4):362-376.
193. Tucker MA. Melanoma Epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(3):383-395.
194. Braeuer R.R. 2013. Why is melanoma so metastatic? *PIGMENT CELL & MELANOMA Research*, Volume 27, Issue 1, Pages 19–36.
195. Micevic G, Theodosakis N, Bosenberg M. Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. *Clin Epigenetics* 2017; 9:34.
196. Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics* 2015;10:103–121.
197. Kullmann K, Deryal M, Ong MF, Schmidt W, Mahlknecht U. DNMT1 genetic polymorphisms affect breast cancer risk in the central European Caucasian population. *Clin Epigenetics* 2013; 5:7.
198. Li H, Liu JW, Sun LP, Yuan Y. A meta-analysis of the association between DNMT1 polymorphisms and cancer risk. *Biomed Res Int* 2017; 2017:3971259.
199. Mostowska A, Sajdak S, Pawlik P, Lianeri M, Jagodzinski PP. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Mol Biol Rep* 2013; 40:4893–4899.
200. Chang SC, Chang PY, Butler B, Goldstein BY, Mu L, Cai L, *et al.* Single nucleotide polymorphisms of one-carbon metabolism and cancers of the esophagus, stomach, and liver in a Chinese population. *PLoS One* 2014; 9:e109235.
201. Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 2001; 309:1189–1199.
202. Hossain MB, Vahter M, Concha G, Broberg K. Low-level environmental cadmium exposure is associated with DNA hypomethylation in Argentinean women. *Environ Health Perspect* 2012; 120:879–884.
203. Kar S, Deb M, Sengupta D, Shilpi A, Parbin S, Torrisani J, *et al.* An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function. *Epigenetics* 2012; 7:994–1007.

204. Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 1992; 11:2611–2617.
205. Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (Web Server issue):W600-W605.
206. Saradalekshmi KR, Neetha NV, Sathyan S, Nair IV, Nair CM, Banerjee M. DNA methyl transferase (DNMT) gene polymorphisms could be a primary event in epigenetic susceptibility to schizophrenia. *PLoS One* 2014; 9:e98182.
207. Gillio-Tos A, Fiano V, Zugna D, Vizzini L, Pearce N, Delsedime L, *et al.* DNA methyltransferase 3b (DNMT3B), tumor tissue DNA methylation, Gleason score, and prostate cancer mortality: investigating causal relationships. *Cancer Causes Control* 2012; 23:1549–1555.
208. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009; 9:3.
209. Dedeurwaerder S, Desmedt C, Calonne E, Singhal SK, Haibe-Kains B, Defrance M, *et al.* DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers. *EMBO Mol Med* 2011; 3:726–741.
210. Jeschke J, Bizet M, Desmedt C, Calonne E, Dedeurwaerder S, Garaud S, *et al.* DNA methylation-based immune response signature improves patient diagnosis in multiple cancers. *J Clin Invest* 2017; 127:3090–3102.
211. de Vogel S. *et al.* Genetic Variants of Methyl Metabolizing Enzymes and Epigenetic Regulators: Associations with Promoter CpG Island Hypermethylation in Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(11). November 2009.
212. Kristensen LS, Dobrovic A. Direct genotyping of single nucleotide polymorphisms in methyl metabolism genes using probe-free highresolution melting analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1240–1247.
213. Cook AL, Donatien PD, Smith AG, Murphy M, Jones MK, Herlyn M, *et al.* Human melanoblasts in culture: expression of BRN2 and synergistic regulation by fibroblast growth factor-2, stem cell factor, and endothelin-3. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1150–1159.
214. Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62:4992–4995.
215. Wang L, Rodriguez M, Kim ES, Xu Y, Bekele N, El-Naggar AK, *et al.* A novel C/T polymorphism in the core promoter of human de novo cytosine DNA methyltransferase 3B6 is associated with prognosis in head and neck cancer. *Int J Oncol* 2004; 25:993–999.
216. Murphy TM, Mullins N, Ryan M, Foster T, Kelly C, McClelland R, *et al.* Genetic variation in DNMT3B and increased global DNA methylation is associated with suicide attempts in psychiatric patients. *Genes Brain. Behav* 2013; 12:125–132.

217. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol* 2018; 31:24–38.
218. Hou P, Liu D, Dong J, Xing M. The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle* 2012; 11:286–295.
219. Cannuyer J, Van Tongelen A, Loriot A, De Smet C. A gene expression signature identifying transient DNMT1 depletion as a causal factor of cancer-germline gene activation in melanoma. *Clin Epigenetics* 2015; 7:114.
220. Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, Sim MS, Turner RR, Morton DL, *et al.* Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics* 2011; 6:388–394.
221. Micevic G, Muthusamy V, Damsky W, Theodosakis N, Liu X, Meeth K, *et al.* DNMT3b modulates melanoma growth by controlling levels of mTORC2 component RICTOR. *Cell Rep* 2016; 14:2180–2192.
222. Hyland PL, Burke LS, Pfeiffer RM, Rotunno M, Sun D, Patil P, *et al.* Constitutional promoter methylation and risk of familial melanoma. *Epigenetics* 2014; 9:685–692.
223. De Araujo ES, Pramio DT, Kashiwabara AY, Pennacchi PC, Maria-Engler SS, Achatz MI, *et al.* DNA methylation levels of melanoma risk genes are associated with clinical characteristics of melanoma patients. *Biomed Res Int* 2015; 2015:376423.

Биографија аутора

Хелена Марић је рођена 1984. год. у Фочи, Основну школу и Гимназију завршила је у Фочи. Дипломирала је на Медицинском факултету, Универзитета Источно Сарајево 2010 године са просјеком оцјена 10.0. Као најбољи је студент Медицинског факултета у Фочи добитница је бројних награда и признања.

Докторске студије на одсјеку за Клиничку и експерименталну хирургију уписала је на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, на истом положила усмени докторски испит и стекла услов за пријаву докторске дисертације.

Специјалистички испит из пластичне и реконструктивне хирургије је положила 2018 године са одличним успјехом. Запослена у Универзитетској болници у Фочи, а ради као виши асистент на Медицинском факултету у Фочи.

Удата, мајка кћерке Хане.