

# Prognostička vrijednost tkivnog proteomskog profila u stadijima I i II malignoga melanoma kože glave i vrata

---

Košec, Andro

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:488396>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Andro Košec**

**Prognostička vrijednost tkivnog  
proteomskoga profila u stadijima I i II  
malignoga melanoma kože glave i vrata**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Andro Košec**

**Prognostička vrijednost tkivnog  
proteomskoga profila u stadijima I i II  
malignoga melanoma kože glave i vrata**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ KBC „Sestre milosrdnice“.

Voditelji rada: Prof. dr. sc. Vladimir Bedeković

Prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

## **ZAHVALE**

Mentoru, koji me naučio kako probleme pretvoriti u prilike, a pitanja pretvoriti u rješenja.

Mentorici, koja mi je razvedrila znanstvene horizonte i pokazala da je samo nebo granica.

Ruđeru Novaku, bez kojega bih još uvijek bio na polovici uvoda.

Obitelji i prijateljima na beskonačnom strpljenju i podršci.

Luciji, koja je moj kompas.

# SADRŽAJ

## Popis oznaka i kratica

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
1.1. Opći i epidemiološki podaci	1
1.2. Čimbenici rizika i prognoze	3
1.2.1. Poznati čimbenici rizika	3
1.2.2. Poznati čimbenici prognoze	4
1.3. Dijagnostika	11
1.4. Liječenje	15
1.4.1. Kirurško liječenje malignih melanoma kože glave i vrata	15
1.4.2. Kemoterapija kao adjuvantno ili primarno liječenje malignih melanoma kože glave i vrata	18
1.4.3. Liječenje malignih melanoma kože glave i vrata zračenjem	21
1.4.4. Praćenje bolesnika nakon završenog liječenja	21
1.5. Značaj translacijskih istraživanja za razumijevanje prognoze bolesti	22
1.5.1. Biljezi tumora	23
1.5.2. Molekularna genetika melanoma	24
1.5.3. Proteomika u humanoj medicini	25
<b>2. Hipoteza</b>	<b>32</b>
<b>3. Ciljevi istraživanja</b>	<b>33</b>
3.1. Opći cilj istraživanja	33
3.2. Specifični ciljevi istraživanja	33
<b>4. Ispitanici i metode</b>	<b>34</b>
4.1. Ispitanici	34

4.2. Opis istraživanja	35
4.3. Protokol izdvajanja proteina iz uzoraka tkiva fiksiranih formalinom i uloženi u parafin	36
4.4. Statistička obrada podataka	43
<b>5. Rezultati</b>	<b>45</b>
5.1. Karakteristike ispitanika	45
5.2. Duljina praćenja	48
5.3. Analiza izraženosti proteina u proteomskom profilu tkiva malignog melanoma glave i vrata	50
5.4. Analiza povezanosti poznatih čimbenika prognoze s preživljenjem bolesnika	56
5.5. Analiza povezanosti proteina identificiranih kao novih čimbenika prognoze s preživljenjem bolesnika	59
<b>6. Rasprava</b>	<b>63</b>
6.1. Mogući biljezi tumora dobiveni istraživanjima seruma bolesnika s malignim melanomom	65
6.2. Mogući biljezi tumora dobivenih istraživanjima linija stanica melanoma	70
6.3. Melanom - mogući biljezi u stvarnom tumoru	72
6.4. Stvaranje proteomskog profila tkiva malignog melanoma kože glave i vrata	73
6.4.1. Značaj proteina aneksin 5 kao čimbenika prognoze	76
6.4.2. Značaj proteina tubulin beta kao čimbenika prognoze	78
6.4.3. Značaj proteina heat shock protein 90 alfa kao čimbenika prognoze	79
6.4.4. Značaj proteina ribosomski protein L7 kao čimbenika prognoze	81
6.4.5. Značaj proteina profilin 1 kao čimbenika prognoze	83
6.4.6. Značaj proteina heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M kao čimbenika prognoze	84

<b>7. Zaključci</b>	88
<b>8. Sažetak</b>	90
<b>9. Summary</b>	91
<b>10. Popis literature</b>	92
<b>11. Životopis</b>	115



## POPIS OZNAKA I KRATICA

$\beta$ FGF –beta podjedinica čimbenika rasta fibroblasta (od engl. Beta Fibroblast Growth Factor)

ABC – amonijev bikarbonat

ACN – acetonitril

AJCC – Američko združeno vijeće za rak (od engl. American Joint Council on Cancer)

BRAF – B-RAF protein kinaza

CDCP1 – površinski biljeg u stanica metastatskog melanoma (od engl. CUB Domain Containing Protein 1)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. Deoxyribonucleic Acid)

DTIC – dakarbazin

DTT – ditiotreitrol

FFPE – fiksacija formalinom i uklapanje u parafin (od engl. Formalin Fixed Paraffin Embedded)

GM-CSF - čimbenik poticanja kolonija granulocita i makrofaga (od engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

GDB - globalno opterećenje bolešću (od engl. Global Disease Burden)

HDGF - čimbenik rasta porijeklom iz hepatoma (od engl. Hepatoma Derived Growth Factor)

HE –hemalun eozin

HLA – kompleks gena koji kodira sustav kompatibilnosti tkiva (od engl. Human Leukocyte Antigen)

HMB45 –proten Human Melanoma Black;

HPLC – tekućinska kromatografija visoke uspješnosti (od engl. High Performance Liquid Chromatography)

iBAQ – apsolutna vrijednost intenziteta izražaja proteina (od engl. Intensity Based Absolute Quantification)

ICAM-1 – molekula međustaničnog prijanjanja 1 (od engl. Intercellular Adhesion Molecule 1)

IL-6, 8, 10 – interleukini 6, 8, 10

LC-MS – tekućinska kromatografija združena sa spektrometrijom masa (od engl. Liquid Chromatography Mass Spectrometry)

LDH – laktat dehidrogenaza (od engl. Lactate Dehydrogenase)

MALDI IMS – matriks-potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija sa spektrometrijom masa (od engl. Matrix Assisted LASER Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry)

MART-1 – melan A gen vezan uz antigensko raspoznavanje citotoksičnim limfocitima (od engl. Melanoma-Associated Antigen Recognized by T cells)

MIA - čimbenik inhibicije aktivnosti melanoma (od engl. Melanoma-Inhibiting Activity)

MITF –čimbenik inhibicije transkripcije vezan uz mikroftalmiju (od engl. Microphthalmia-Associated Inhibiting Transcription Factor)

MMP – matriks metaloproteinaza

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. messenger RNA)

PET/CT – pozitronska emisijska tomografija u kombinaciji s kompjuteriziranom tomografijom (od engl. Pozitron Emission Tomography/Computed Tomography)

PCR -reverzna transkripcija lančanom reakcijom polimeraze (od engl. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

S100 $\beta$  – beta podjedinica proteina izraženog u tumorima porijeklom iz ektoderma

SBCL2 – linija stanica melanoma u radijalnoj fazi rasta

SDS-PAGE –metoda razdvajanja proteina elektroforezom u gelu (od engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Skmel28 - linija stanica metastatskog melanoma

SNLB –biopsija limfnog čvora stražara (od engl. Sentinel Lymph Node Biopsy)

TIL – tumor-infiltrirajući limfociti

TNM – klasifikacija malignih bolesti po prognostičkim kategorijama T (tumor), N (limfni čvorovi) i M (metastaze)

TuM2-PK – piruvat kinaza tumora tipa 2

UVA – ultraljubičasto zračenje valne duljine A

UVB – ultraljubičasto zračenje valne duljine B

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. Vascular Endothelial Growth Factor)

YLL - broj izgubljenih godina života kao statistička mjera za opterećenje bolešću (od engl. Years of Life Lost)

## UVOD

### 1.1. Opći i epidemiološki podaci

Melanom je neuroektodermalni tumor koji nastaje zloćudnom preobrazbom melanocita, a može pokazivati značajke neuroendokrine diferencijacije. Njegove su značajke agresivan rast i rano širenje limfogenim i hematogenim putem. Uvriježeno je mišljenje da ga je prvi opisao Hipokrat. Njegove osobitosti, vezane uz invazivnost, čine ga i danas tumorom čije se biološko ponašanje ne može jednostavno objasniti (1). Melanom se može razviti iz nevusa, ali i mutagenezom iz zdrave kože, *de novo*. Raste u dvije faze: radijalno i okomito. U radijalnoj fazi, stanice tumora se šire u horizontalnoj ravnini, probijaju bazalnu membranu i ulaze u papilarni dermis. Ovaj način širenja potiče upalni odgovor koji je praćen neoangiogenezom i djelomičnom regresijom melanoma koji, u ovoj fazi, još uvijek nema sposobnost kohezivnog rasta i metastaziranja.

Invazivne melanome obilježava okomiti rast u podliježeći retikularni dermis i potkožje, zbog čega se povećava vjerojatnost za nastanak udaljenih metastaza. Melanomi su, s obzirom na morfologiju, podijeljeni u pet skupina: *lentigo maligna* (koji ne pokazuje značajke invazivnog rasta, raste vrlo sporo i smatra se melanomom *in situ*), *lentigo maligna melanoma*, nodularni melanom, akralni lentiginozni melanom, dezmoplastični melanom i površinskošireći melanom (1).

Površinskošireći melanom je najčešći tip tumora. Čini približno 70 % svih novodijagnosticiranih malignih melanoma kože glave i vrata. Njegova osobitost je početni radijalni rast s kasnijim vertikalnim širenjem. Često se razvija iz pigmentiranih nevusa i u mlađih osoba, kao oštro ograničena pipljiva izraslina uzdignuta nekoliko milimetara iznad

površine kože. Sklon je ulceriranju, nagloj promjeni veličine i/ili boje. Povezan je s boljim preživljenjem u odnosu na preostale tipove melanoma.

Nodularni melanom čini 10-20 % svih malignih melanoma kože glave i vrata. Njegov je izgled šarolik: od glatkog čvorića do ulceriranog polipa. Od početka pokazuje izraženu sklonost okomitom rastu, a najčešće se javlja na trupu, i to u muškaraca. Simetričan je, ujednačene tamnosmeđe ili crne boje, iako u 5 % slučajeva može biti amelanotičan (2).

Lentigo maligni melanom čini 5-10 % svih malignih melanoma kože. Obilježava ga produljena faza radijalnog rasta, zbog koje se u početku manifestira kao spororastuća tvorba u razini kože, u osunčanim područjima tijela, posebno na licu i vratu. Pokazuje sklonost širenju u dermo-epidermalnom spoju, te uz folikule dlake. Nastaje iz *lentigo maligna* koja počinje pokazivati značajke vertikalne faze rasta.

Dezmoplastični melanom se povezuje s prethodno prisutnim melanocitnim nevusima. U njima melanociti mogu izgubiti pigmentaciju zbog čega postaju svijetle, bezbojne lezije. Rijetko metastazira, ali je lokalno agresivan i pokazuje visoku učestalost povrata, kao i sklonost perineuralnom širenju. Posebno je čest u području glave i vrata (75%) (3).

Akralni lentiginozni melanom najčešći je tip melanoma u ljudi tamne puti, u kojih se javlja na dlanovima, tabanima, ispod noktiju i na sluznici usne šupljine. Nastaje na dijelovima kože bez dlaka, u ljudi u šestom i sedmom desetljeću života (3). Rijetko se dijagnosticira ljudi svijetlije puti.

Melanom je odgovoran za 80 % smrti povezanih s tumorima kože, iako čini samo svih 4 % tumora kože. Samo 14 % bolesnika s metastatskom bolešću preživi pet godina (4).

Melanom je drugi najčešći tumor u populaciji starosti 20-39 godina. U populacijskoj skupini mlađoj od 50 godina je češći u žena, a do 65. godine se razdioba mijenja u korist muškaraca, kako bi u dobnoj skupini oboljelih koji su stariji od 80 godina bio čak tri puta češći u muškaraca. Ove se razlike povezuju s različitom izloženošću suncu, u pojedinim dobnim

skupinama, u odnosu na spol. Epidemiološki podatci ukazuju na izrazit porast incidencije ranih stadija melanoma debljine <1 mm, u svim populacijama. Prosječna dob pri postavljanju dijagnoze je 57 godina, a 75 % oboljelih je mlađe od 70 godina (5).

U posljednjih je 50 godina zabilježen šesterostruki porast incidencije melanoma, što ga čini zloćudnim tumorom s drugim po redu porastom incidencije (na prvom je mjestu karcinom pluća u žena). Veći broj novodijagnosticiranih bolesnika povezuje se i s ranim prepoznavanjem čimbenika rizika, i ranijem postavljanju dijagnoze, zbog poboljšanih metoda probira.

U Hrvatskoj se, od 1968. do 1995. godine, učestalost melanoma povećala za 309 %, a smrtnost za 310 %. Prema zadnjim podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2010. godini je u Republici Hrvatskoj dijagnosticirano 555 novooboljelih od melanoma kože (stopa: 12,6 na 100 000 stanovnika) (6, 7).

Broj oboljelih u Sjedinjenim Američkim Državama je 2015. godine bio 73 870. Procjenjuje se da će 9 940 ovih bolesnika (13,5 %) u konačnici umrijeti od uznapredovale bolesti. Približno 84 % bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima lokalno ograničenu bolest, a 8-10 % i 4-6 % novooboljelih ima regionalnu metastatsku, odnosno udaljenu metastatsku bolest (8).

Gotovo 20 % svih malignih melanoma kože nalazi se u području glave i vrata, od toga dvije trećine u području lica. Obzirom na to da lice čini samo 3,5 % ukupne površine tijela, smatra se područjem s posebno povećanim rizikom za nastanak melanoma, u odnosu na druga područja glave i vrata (9).

Obzirom na izgubljene godine života (YLL, od engl. Years of Life Lost) i ukupnog opterećenja populacije ovim tumorom (GDB, od engl. Global Disease Burden), jasna je potreba za istraživanjem tumora u ranim stadijima bolesti.

U stadije I i II su razvrstani bolesnici bez metastatske bolesti; u stadij I bolesnici s tumorom debljine jednake ili manje od 2 mm, a u stadij II s tumorom debljine jednake ili veće od 2,01 mm. Čak 27,8 % mortaliteta izraženog kao izgubljene godine života čine bolesnici u stadiju I,

a 32,7 % bolesnici u stadiju II. Epidemiološkim metodama idealne procjene rizika i razvrstavanjem bolesnika u prognostičke skupine, sve izgubljene godine života mogle bi se smanjiti za jednu trećinu. Sukladno tome, korigirano kumulativno preživljenje bolesnika u ranim stadijima bolesti produljilo bi se za trećinu (10).

## **1.2. Čimbenici rizika i prognoze**

### **1.2.1. Poznati čimbenici rizika**

Poznati čimbenici rizika za razvoj melanoma kože glave i vrata su: a) prethodno dijagnosticiran melanom u bolesnika; b) pozitivna obiteljska anamneza; c) nevusi > 5 mm; d) prisutnost > 50 benignih nevusa ili > 5 atipičnih nevusa; e) imunoneдостatnost, f) (prekomjerna) izloženost i osjetljivost na ultraljubičasto zračenje (11).

Poznato je da ultraljubičasto zračenje predstavlja najsnažniji egzogeni čimbenik rizika u nastanku i razvoju melanoma kože. Učestalost izlaganja, zemljopisna širina i dob prvog izlaganja važni su specifični čimbenici rizika. Ultraljubičasto zračenje A (UVA) valne duljine 320-400 nm te ultraljubičasto zračenje B (UVB) valne duljine 290-320 nm mogu sinergističkim djelovanjem potaknuti razvoj melanoma stvaranjem slobodnih radikala koji oštećuju biološke makromolekule i imunosupresijom. Ovi događaji za posljedicu imaju oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i nekontroliranu diobu melanocita. Iako je UV-zračenje nedvojbeno povezano s melanomom, ne postoji proporcionalni odnos incidencije i kumulativne izloženosti suncu, s obzirom na to da se melanom češće dijagnosticira u ljudi koji nisu izloženi svakodnevnoj insolaciji (12). Veza između UV-zračenja i melanoma je posebno izražena u ljudi koji se suncu izlažu povremeno, ali intenzivno. Zbog toga nastaje akutno oštećenje kože, koje je najsnažniji individualni čimbenik rizika za razvoj melanoma potaknutog sunčevim zračenjem.

Za razliku od melanoma, u patogenezi planocelularnog i bazocelularnog karcinoma veliku važnost ima dugotrajna i stalna izloženost UV-zračenju (3, 13).

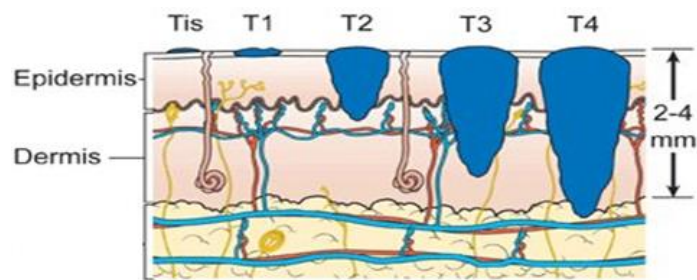
Poznato je da se maligni melanom najčešće razvija iz melanocita podrijetlom iz pigmentiranih displastičnih nevusa, kongenitalnih nevusa i celularnih plavih nevusa, što je i pokazano meta-analizama. Ovim je analizama pokazana i povezanost između postojanja većeg broja nevusa na tijelu s povećanim rizikom za obolijevanje od malignog melanoma. Manja snaga povezanosti je pokazana za blijedu put, svijetle šarenice, svijetlu kosu i sklonost reakcijama kože na izlaganje suncu (14, 15). Najnovija studija na populaciji Norvežana (292,851 ispitanika, kohorta Janus) ukazuje i na povećanu sklonost nastanka melanoma u odnosu na porast tjelesne mase, u muškaraca (16). Obrazac rasta malignih melanoma kože glave i vrata mogu se povezati s morfologijom tumora. Zanimljivo je da se, na temelju istraživanja genoma i proteoma, akralni lentiginozni, površinskošireći, nodularni, dezmoplastični i lentigo melanom počinju razlikovati kao različite bolesti, a ne samo podtipovi iste bolesti (17, 18).

### **1.2.2. Poznati čimbenici prognoze**

American Joint Council on Cancer (AJCC) je 2002. i 2010. godine objavio sustav stupnjevanja melanoma, kako bi se u podjelu rizičnih skupina uključilo što više nezavisnih čimbenika rizika. Otprije poznati prognostički patohistološki čimbenici, debljina tumora po Breslowu te dubina invazije po Clarku, dopunjeni su određivanjem histološkog tipa tumora, prisutnošću ulceracije i/ili regresije, brojem mitozâ po kvadratnom milimetru (mm<sup>2</sup>), prisutnošću i količinom tumor-infiltrirajućih limfocita, limfokapilarnom invazijom te mikroskopskom satelitozom.

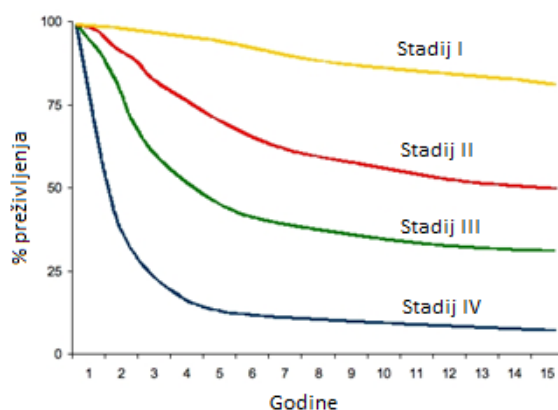
Debljina po Breslowu značajniji je prognostički čimbenik od dubine invazije po Clarku (3) (Slika 1).





**Slika 1.** Stupnjevanje melanoma u odnosu na njegovu debljinu (T-stadij bolesti) koja je najznačajniji prognostički čimbenik (3).

Klasifikacija po AJCC uzima u obzir i zahvaćenost limfnih čvorova, i prisustvo udaljenih metastaza, pri čemu se oboljeli, na temelju kliničke slike i patohistološke analize, razvrstavaju u prognostičke stadije I i II. Za razvrstavanje oboljelih u stadije III i IV potrebno je koristiti podatke dobivene patohistološkom analizom regionalnih limfnih čvorova (3) (Tablice 1, 2, 3) (Slika 2).



**Slika 2.** AJCC: Preživljenje u odnosu na prognostičke skupine (3).

Iako debljina tumora po Breslowu predstavlja najznačajniji nezavisni prognostički čimbenik, debljina tumora nije uvijek točan pokazatelj njegovog biološkog ponašanja (19). Naime, do 15 % bolesnika s debljinom tumora < 1 mm razvija lokalnu metastatsku bolest, a u trećine umrlih

se melanom nalazi u ranom stadiju. Stoga ispravna procjena metastatskog potencijala lezija debljine do 4 mm i dalje predstavlja velik izazov (20, 21).

Trenutno važećim sustavom svrstavanja po AJCC se prognoza u stadijima III i IV određuje u odnosu na veličinu metastatski promijenjenih limfnih čvorova, iako novija istraživanja ukazuju da je broj metastatski promijenjenih limfnih čvorova važniji prognostički čimbenik od veličine čvorova (22). Bolesnici s udaljenom metastatskom bolešću podijeljeni su u tri podskupine. U njihovom praćenju važno mjesto ima mjerenje razine laktat-dehidrogenaze (LDH) u serumu. Njezina povišena razina smatra se nezavisnim negativnim prognostičkim čimbenikom (23). Poznati su i drugi čimbenici koji mogu utjecati na biološko ponašanje melanoma (regresija tumora, limfovaskularna i perineuralna invazija, broj tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL)), no zbog slabe prognostičke vrijednosti trenutno nisu uključeni u stupnjevanje bolesti.

Starija životna dob, smještaj primarnog tumora na lateralnim stranama glave i vrata i muški spol su također povezani sa slabijim preživljenjem, posebno u oboljelih koji su stariji od 70 godina (24). Razlog povezanosti ženskog spola i boljeg preživljenja nije objašnjen, iako je pokazan u nekoliko velikih multicentričnih istraživanja provedenih na bolesnicama u pre- i postmenopauzi (25, 26) (Tablica 4).

Bolesnici s melanomom glave i vrata pokazuju značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s melanomom na drugim dijelovima tijela (27). Glava i vrat su suncu najizloženija područja tijela, naročito lice, oglavak, vrat i uške. Pokazano je kako najlošiju prognozu imaju bolesnici s primarnim smještajem tumora na oglavku.

U istraživanju koje je provedeno na 2079 bolesnika s primarnim melanomom kože glave i vrata, ova se anatomska lokacija tumora mogla, u odnosu na druga sjela, povezati s manjim postotkom pozitivnih biopsija limfnog čvora stražara, uz istovremeno prisutnu mikroskopsku metastatsku regionalnu bolest (28, 29).

**Tablica 1.** Klasifikacija TNM melanoma kože glave i vrata (3)

<b>PRIMARNI TUMOR (T)</b>	
<b>TX</b>	Primarni tumor ne može se procijeniti (na primjer, djelomično reseciran ili regredirao)
<b>T0</b>	Nema prisutnosti primarnog tumora
<b>TIS</b>	Melanom <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Melanom debljine $\leq 1,0$ mm T1a: bez ulceracije i broj mitozā $< 1/\text{mm}^2$ T1b: s ulceracijom ili brojem mitozā $> 1/\text{mm}^2$
<b>T2</b>	Melanom debljine 1,01-2,0 mm T2a: bez ulceracije T2b: s ulceracijom
<b>T3</b>	Melanom debljine 2,01-4,0 mm T3a: bez ulceracije T3b: s ulceracijom
<b>T4</b>	Melanom debljine $> 4,0$ mm T4a: bez ulceracije T4b: s ulceracijom
<b>REGIONALNI LIMFNI ČVOROVİ (N)</b>	
<b>NX</b>	Status regionalnih limfnih čvorova ne može se procijeniti (na primjer, uklonjeni ranije)
<b>N0</b>	Bez znakova regionalne metastatske bolesti
<b>N1</b>	Jedan metastatski limfni čvor N1a: mikroskopski vidljiva metastaza N1b: makroskopski vidljiva metastaza
<b>N2</b>	dva ili tri metastatska limfna čvora N2a: mikroskopski vidljive metastaze N2b: makroskopski vidljive metastaze
<b>N3</b>	N2c: <i>in transit</i> * metastaze/satelitoza bez metastatskih limfnih čvorova $\geq 4$ metastatska limfna čvora, metastaze <i>in transit</i> s metastatskim limfnim čvorovima
<b>UDALJENE METASTAZE (M)</b>	
<b>M0</b>	Bez znakova udaljene metastatske bolesti
<b>M1A</b>	Udaljene metastaze kože, potkožja ili limfnih čvorova
<b>M1B</b>	Metastaze na plućima
<b>M1C</b>	Ostale metastaze u unutarnjim organima, s povišenom razinom LDH u serumu

\* Izraz „*in transit*“ odnosi se na metastaze koje se nalaze u regionalnim dermalnim i subdermalnim limfnim vodovima, udaljene najmanje 2,01 cm od primarnog tumora, a još nisu stigle do regionalnih limfnih čvorova (3).

**Tablica 2.** Kliničko stupnjevanje – stadiji bolesti u oboljelih od melanoma kože glave i vrata

(2)

<b>STADIJ</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1a	N0	M0
<b>IB</b>	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
<b>IIB</b>	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>III</b>	Bilo koji T	N1, N2, N3	M0
<b>IV</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

**Tablica 3.** Stadiji melanoma u odnosu na patohistološke osobitosti (3)

<b>STADIJ</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1a	N0	M0
<b>IB</b>	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
<b>IIB</b>	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T(1-4)a	N1a	M0
	T(1-4)a	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T(1-4)b	N1a	M0
	T(1-4)b	N2a	M0
	T(1-4)a	N1b	M0
	T(1-4)a	N2b	M0
	T(1-4)a	N2c	M0
<b>IIIC</b>	T(1-4)b	N1b	M0
	T(1-4)b	N2b	M0
	T(1-4)b	N2c	M0
	Bilo koji T	N3	M0
<b>IV</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

**Tablica 4.** Negativni prognostički čimbenici u bolesnika s melanomom kože u stadijima I i II (3)

<b>Pouzdana dokazani nezavisni negativni čimbenici*</b>
Rastuća debljina primarnog tumora
Prisutnost ulceracije primarnog tumora
Broj mitozu >1 mm <sup>2</sup>
<b>Manje pouzdani negativni čimbenici**</b>
Starija životna dob
Muški spol
Glava i vrat kao primarna lokalizacija
Rastući stupanj invazije po Clarku
Izostajanje histološke komponente radijalnog rasta
Limfovaskularna invazija
Perineuralna invazija
Regresija primarnog tumora
Smanjen broj tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL)

\* sustavno identificirani u svim istraživanjima

\*\*identificirani kao pretkazatelji, ali ne sustavno, nezavisno od drugih čimbenika ili u manjim istraživanjima

Limfovaskularna invazija je snažan čimbenik prognoze za pojavu regionalne metastatske bolesti. U bolesnika s tumorima u stadijima I i II je prisutnost limfovaskularne invazije prepoznata kao neovisni čimbenik koji doprinosi povećanoj incidenciji regionalne metastatske bolesti, posebno u ranim stadijima bolesti (30, 31). U istraživanju na bolesnicima s T2-melanomima, vjerojatnost invazije limfnog čvora stražara je bila dvostruko veća ako je u primarnom melanomu postojala limfovaskularna invazija. Perineuralna invazija ili neurotropizam je značajka koje nije često prisutna u tkivu melanoma. Njezino prisustvo nije jasno povezano s kraćim preživljenjem, ali se povezuje s povećanom vjerojatnošću pojave lokalnog recidiva, posebno u bolesnika s dezmoplastičnim melanomom kože glave i vrata (32). Regresija primarnog tumora, obilježena mjestimičnim nestankom stanica tumora iz epidermisa i dermisa te pojačanom upalom i fibrozom okolnog tkiva, nije sustavno identificiran nezavisan

prognostički čimbenik. Pokazana je moguća povezanost s kraćim preživljenjem u bolesnika u stadijima I i II. U multicentričnom istraživanju na 2243 bolesnika s malignim melanomom kože u stadijima I i II, regresija primarnog melanoma  $\geq 50\%$  je otkrivena u 26,3 % tumora i povezana je s kraćim preživljenjem, uz omjer rizika (engl. odds ratio) 3,32 (31). Regresija može biti informativna u razvrstavanju bolesnika s T4-tumorima, pri čemu bolesnici s povećanim brojem tumor-infiltrirajućih limfocita i izostankom regresije preživljavaju dulje (desetgodišnje preživljenje od 78 %), u usporedbi s bolesnicima s niskim brojem tumor-infiltrirajućih limfocita i izraženom regresijom primarnog tumora (desetgodišnje preživljenje od 35 %) (33). Povećan broj tumor-infiltrirajućih limfocita je nedvojbeno povezan s boljim ukupnim preživljenjem, iako se prognostička vrijednost različito interpretira. U najnovijem istraživanju, na 3330 invazivnih melanoma, umjeren broj tumor-infiltrirajućih limfocita je povezan s 30 % manjom, a velik broj tumor-infiltrirajućih limfocita s 50 % manjom smrtnošću od melanoma, nakon statističke korekcije za ostale čimbenike (34). Čini se kako je broj tumor-infiltrirajućih limfocita posebno vezan uz debljinu tumora na način da mu se pouzdanost povećava s porastom debljine melanoma (34).

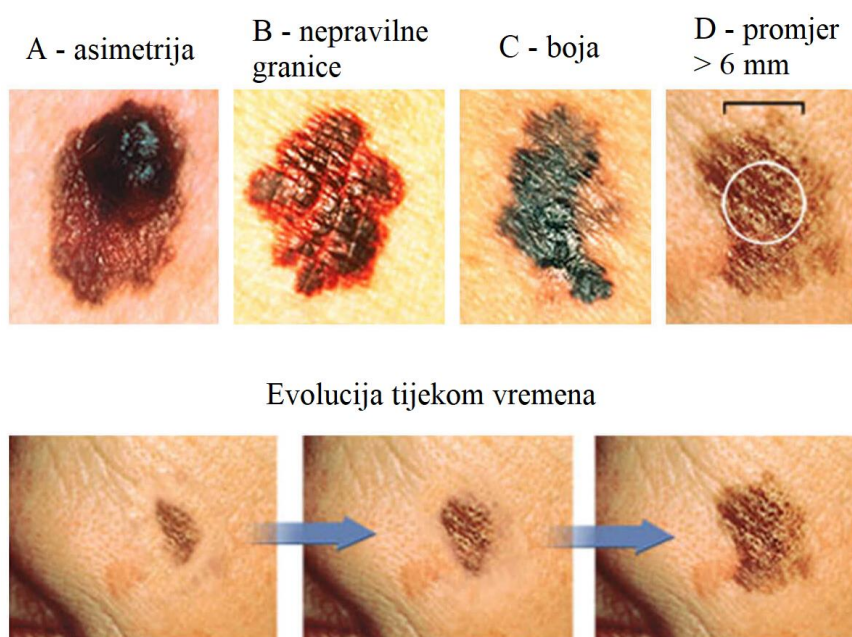
U proteklom je desetljeću nekoliko značajnih otkrića omogućilo razvrstavanje melanoma u prognostičke podskupine, ovisno o prisutnosti kromoskih aberacija, mutacija gena i mehanizama zloćudne preobrazbe koje su od značaja za kliniku.

Od uvođenja proteomskih metoda se očekuje poboljšavanje stupnjevanja i bolja procjena prognoze.

Na temelju poznavanja svih ovih parametara, očekuje se i poboljšanje liječenja koje bi se trebalo temeljiti na specifičnim osobitostima svakog melanoma zasebno, u kontekstu personaliziranog liječenja (35, 36, 37, 38, 39).

### 1.3. Dijagnostika

Promjene na koži koje bi mogle upućivati na melanom opisuju se kriterijima ABCDE, a odnose se na asimetriju (A od engl. Assimetry), nepravilne granice (B od engl. Border Irregularity), raznolikost boje (C od engl. Color Variation), promjer (D, od engl. Diameter) i napredovanje (E od engl. Evolution). (Slika 3). U diferencijalno dijagnostičkom postupku se melanom mora razlučiti u odnosu na benigni melanocitni nevus, displastični nevus, planocelularni karcinom, metastatski tumor kože, nevus coeruleus, Spitzov nevus, halo nevus, pigmentiranu aktiničku ili seboroičku keratozu, *lentigo maligna* i bazocelularni karcinom.



**Slika 3.** Osobitosti melanoma u odnosu na kriterije ABCDE (40)

Kako bi se postavila dijagnoza i procijenili čimbenici rizika, potrebno je napraviti biopsiju pune debljine lezije kojom se omogućuje određivanje najvažnijeg nezavisnog prognostičkog čimbenika, debljine melanoma po Breslowu. U epidemiološkoj studiji Referentnog centra za

melanom Ministarstva zdravlja RH kojom je bilo obuhvaćeno više od 700 bolesnika, srednja vrijednost debljine tumora bila je 2,24 mm (7).

Biopsije melanoma trebaju se izvoditi na način da se odstrani i minimalno 1 - 3 mm zdravog tkiva oko pigmentirane lezije. Tangencijalne biopsije (engl. Shave Biopsy) treba izbjegavati, a ako se planira djelomična biopsija, potrebno ju je učiniti na mjestu na kojem je debljina lezije najveća.

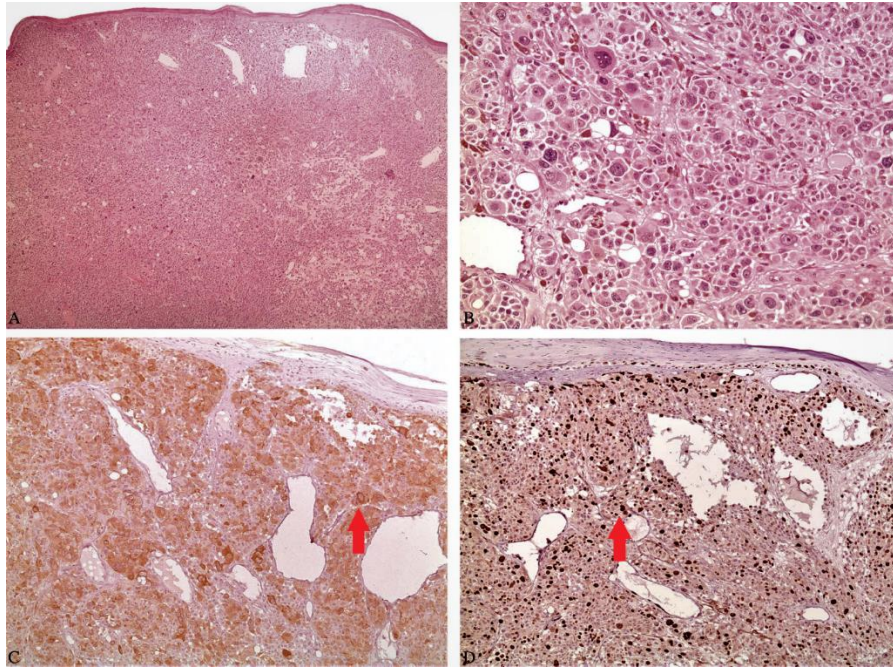
Patohistološku analizu bi trebalo povjeriti patologu koji je upoznat sa specifičnostima dijagnostike melanoma, a *ex tempore* analize i rezovi svježeg smrznutog tkiva treba izbjegavati zbog distorzije veličine preparata i osobitosti stanica u epidermisu (41).

Zbog specifičnosti anatomije glave i vrata, biopsije se nerijetko uzimaju na nepravilan način. Iako je jednim je istraživanjem na 159 bolesnika ukazano na značajno lošije preživljenje u bolesnika kojima je melanom kože glave i vrata dijagnosticiran incizijskom biopsijom u odnosu na ekscizijsku biopsiju (petogodišnja smrtnost 31 %, odnosno 8,9 %) ovi podatci nisu potvrđeni kasnijim istraživanjima (41, 42).

Iako specifična patohistološka značajka kojom bi se melanom mogao sa sigurnošću dijagnosticirati još uvijek ne postoji, patohistološka analiza omogućuje uvid u, za melanom karakteristične, promjene tkiva. Takozvani „pagetoidni obrazac“ okomitog rasta melanocita, zbog kojeg se gubi njihova pravilna raspodjela u bazalnom sloju epidermisa, omogućuje razlikovanje tkiva tumora i netumora i smatra se najpouzdanijom značajkom melanoma. Atipija stanica je uvijek prisutna. Prevladavaju povećane stanice koje sadrže velike, pleomorfne i hiperkromatske jezgre i brojne mitoze.

Analiza tkiva metodom imunohistokemije nužna je samo u slučaju slabo diferenciranih tumora. Ovom se metodom najčešće dokazuju proteini čiji je izražaj značajan za nastanak i razvoj melanoma: S-100, HMB45 i Ki-67 (41) (Slika 4).





**Slika 4.** Nodularni melanom obojen hemalaun eozinom. Povećanja: A) 4x; B) 40x; C) imunoreaktivnost na protein MART-1 i D) Ki-67. Strjelice upućuju na specifično bojanje antigena (23).

U bolesnika s novootkrivenim melanomom potrebno je učiniti kompletnu krvnu sliku, kompletnu paletu biokemijskih pretraga koje uključuju i određivanje alkalne fosfataze, transaminaze jetre i koncentraciju albumina u serumu te laktat-dehidrogenazu. Od navedenih, samo je laktat-dehidrogenaza informativna u dijagnostici melanoma, i to u kasnijim stadijima. Najinformativnija je i u odnosu na praćenje uspjeha liječenja, odnosno povrata bolesti. Za sada se vrijednosti LDH u serumu smatraju, iako je specifičnost niska, jedinim nezavisnim negativnim prognostičkim čimbenikom, u stupnjevanju uznapredovalosti melanoma (43). Dodatne pretrage mogu uključivati snimanje srca i pluća rendgenom, nuklearnu magnetsku rezonancu mozga, ultrazvučni pregled regionalnih limfnih čvorova i trbušne šupljine, kompjuteriziranu tomografiju prsnog koša, trbušne šupljine i zdjelice te pozitronsku emisijsku tomografiju, često u kombinaciji s kompjuteriziranom tomografijom (PET/CT). U stadijima bolesti I i II je informativnost rezultata ovih pretraga iznimno niska.

Ovim se pretragama nastoji isključiti klinički neispoljena metastatska bolest. Dodatno, rezultati pretraga se koriste u razvrstavanju bolesnika u prognostičke skupine, kako bi se procijenili opseg i vrsta liječenja.

Rezultati meta-analiza upućuju na ultrazvuk kao najpouzdaniju metodu za procjenu statusa regionalnih limfnih čvorova, a PET/CT kao najpouzdaniju metodu za procjenu statusa cijelog tijela, u odnosu na proširenost bolesti (44). Najnoviji podatci pokazuju da primjena kompjutrizirane tomografije u oboljelih od melanoma u području glave i vrata, u kojih metastatska bolest nije klinički manifestna, može biti korisna u otkrivanju lokalnih metastaza u limfne čvorove (45).

Osnovni podatci vezani uz prognozu, dobiveni stupnjevanjem po AJCC, mogu se nadopuniti uvidom u tijek bolesti, na koji naročito utječu histološki tip melanoma, dob, spol i ukupan broj tumorom infiltriranih regionalnih limfnih čvorova (46).

Bogata regionalna limfna mreža ima izuzetno značajnu ulogu u određivanju prognoze za svakog bolesnika u kojeg postoji visokorizična primarna lezija. Oboljeli od melanoma kože glave i vrata imaju lošiju prognozu u odnosu na bolesnike s melanomima koji se razvijaju na drugim dijelovima. S obzirom na značajan metastatski potencijal, ključno je što ranije otkriti primarni tumor i njegovu proširenost. Približno 10 % melanoma kože glave i vrata se klinički ispoljava kao metastatska bolest nepoznatog primarnog sjela, što zahtijeva dodatnu prijeoperativnu obradu i eksciziju primarnog sjela - ako se uspije pronaći (18).

Podskupina primarnih melanoma sluznice glave i vrata se u kliničkoj praksi odvaja od malignih melanoma kože. Ova podskupina melanoma povezana je s kraćim preživljenjem i drugačijim obrasem odgovora na liječenje kemoterapijom i postoperativnim zračenjem. Uzroci ovakvog ponašanja tumora povezani su s nemogućnošću njegovog dijagnosticiranja s obzirom na anatomske lokacije, izostanak lokalnih simptoma, ali i agresivnu prirodu bolesti (47).

## 1.4. Liječenje

### 1.4.1. Kirurško liječenje malignih melanoma kože glave i vrata

Liječenje malignih melanoma kože glave i vrata je primarno kirurško. Opseg zahvata se prilagođava stupnju bolesti; maligni melanomi *in situ* liječe se ekscizijom koja obuhvaća i pripadajući zdravi rub tkiva širine najmanje pet milimetara. Nakon patohistološke analize, ovisno o širini ruba ekscidirane kože slobodne od tumora, potrebno je učiniti eksciziju ožiljka sa širim zdravim rubom kako bi se spriječio nastanak lokalnog recidiva koji je, u ovakvim slučajevima, veći od 40 % (48).

Većina melanoma u stadiju I može se izliječiti ekscizijom koja uključuje i pripadajući zdravi rub tkiva od jedan centimetar. U bolesnika s melanomom u stadiju IB, s ulceracijom ili brojem mitozama  $> 1/\text{mm}^2$ , debljine između 1 i 4 mm, odnosno stadija II, preporučeno je izvođenje ekscizije ožiljka s rubom zdravog tkiva širine dva centimetra i pridruženim postupkom biopsije limfnog čvora stražara (SNLB) (49, 50). U bolesnika s melanomom debljim od 4 milimetra, SNLB se može izvesti kako bi se dobio uvid u obrazac drenaže limfe i kako bi se omogućila bolja kontrola potencijalno prisutne regionalne metastatske bolesti. Meta-analizama nije pokazana uvjerljiva korist ovih postupka za sve oboljele, već samo za oboljele visokog rizika, u čijim je tumorima bilo identificirano nekoliko negativnih prognostičkih čimbenika (51, 52). Ako biopsija limfnog čvora stražara ukazuje na prisutnost bolesti u regionalnom limfnom sustavu, pristupa se disekciji regionalnih limfnih čvorova vrata. Ako se melanom prepozna i kirurški odstrani u ranoj fazi, predstavlja u cijelosti izlječivu bolest. Za bolesnike u uznapredovalim stadijima bolesti su, neovisno o primjeni postoperativnog zračenja, sustavne kemoterapije i primjene novih oblika liječenja poput imunoterapije i biokemoterapije, rezultati liječenja još uvijek skromni (24). Osobito složena anatomija glave i vrata često zahtjeva individualan pristup, uz poštivanje smjernica liječenja. Ovo se naročito odnosi na ekscizije

lezija na ušci, mjestu na kojem često nije moguće odstranjenje lezije s dva centimetra zdravog tkiva.

Biopsija limfnog čvora stražara također može imati neke specifičnosti. Na primjer, ponekad se otkrije i više od jednog limfnog čvora stražara po jednom primarnome sijelu, a i postupci biopsije nisu uvijek jednostavni. Prilikom disekcije intraparotidnih limfnih čvorova može se oštetiti lični živac, što za posljedicu ima značajne probleme vezane uz funkciju i izgled, zbog čega se drastično smanjuje kvaliteta života. Ova se komplikacija može izbjeći rutinskim izvođenjem površinske parotidektomije s očuvanjem ličnog živca.

Unatoč tehničkim poteškoćama, izvođenje biopsije limfnog čvora stražara je dokazano sigurna i učinkovita metoda, osim u slučajevima u kojima je postoperativni defekt primarnog sijela rekonstruiran lokalnim režnjem kože, što zbog čega se remeti drenaža limfe (53). Pokazano je da su putevi drenaže limfe vrlo sličini u 92 % bolesnika, dok u preostalih 8 % postoji nepredvidiv tok drenaže (54). Zbog ove činjenice lokoregionalna kontrola bolesti može biti neuspješna. U istraživanju uzoraka drenaže limfe na glavi i vratu, na 374 bolesnika s malignim melanomom kože, u 8 bolesnika (2,1 %) je pronađen atopičan, metastazama zahvaćen limfni čvor stražar. Biopsija limfnog čvora stražara omogućuje najpouzdaniju procjenu proširenosti bolesti, lako se i brzo izvodi te pouzdano identificira bolesnike-kandidate za širi opseg kirurškog liječenja (55).

Rezultati meta-analiza o ulozi kurativne disekcije regionalnih čvorova vrata u liječenju metastatskog malignog melanoma su proturječni. S jedne strane, rezultati ukazuju na smanjenu učestalost regionalnog povrata bolesti, ali s druge strane, i izostanak utjecaja na ukupno preživljenje uz povećanje morbiditeta bolesnika (56). Kurativna disekcija regionalnih čvorova na vratu dovodi do izlječenja u 30 % bolesnika s klinički prisutnim regionalnim metastazama. Problem je da čak 70-80 % ovih bolesnika već ima udaljene metastaze. To ne znači da u ovih

bolesnika nije potrebno izvoditi kurativne disekcije vrata, ali znači da ispravna procjena preživljenja ne mora ovisiti o provedbi ovog postupka (57).

Uloga elektivnih disekcija vrata u bolesnika s visokim rizikom za razvoj regionalne metastatske bolesti je kontroverzna. Teoretski, uklanjanje nezamjetnih metastaza trebalo bi spriječiti širenje bolesti i produljiti preživljenje. Ovo je i potvrđeno u nekoliko velikih, nerandomiziranih istraživanja (55, 56). Unatoč tome, kriteriji za odabir bolesnika koji bi mogli imati koristi od ovog zahvata nisu jednoznačni (58, 59). Meta-analize ukazuju na to da elektivne disekcije ne koriste jednako svim bolesnicima, nego većinom onima u kojih su primarni melanom tanji od dva milimetra. Produljenje preživljenja u odnosu na bolesnike koji nisu bili kirurški liječeni je potvrđeno u bolesnika kojima je, nakon elektivnog zahvata, patohistoški potvrđeno prisustvo klinički nezamijećenih metastaza u vratu (58). Postotak povrata bolesti nakon disekcije vrata u visokorizičnih bolesnika, u stadiju bolesti T3 i T4, veći je u odnosu na bolesnike koji su imali melanome izvan područja glave i vrata, i u kojih je učinjena disekcija aksile ili ingvinuma. I zbog ove je činjenice neophodno izdvajanje malignog melanoma glave i vrata kao bolesti s jedinstvenim biološkim ponašanjem, pa time i prognozom (58, 59).

#### **1.4.2. Liječenje melanoma kože glave i vrata kemoterapijom i imunoterapijom**

Interferon  $\alpha$  se koristi u adjuvantnom liječenju bolesnika s visokim rizikom za razvoj metastatske bolesti. Na žalost, ne postoje standardne preporuke prema kojima bi se liječenje provodilo na način da se bolesniku značajno produlji život, bez proporcionalnog povećanja neželjenih učinaka liječenja. Iznimka su bolesnici s dokazanim specifičnim mutacijama serin/treonin protein kinaze B-RAF (BRAF V600), u kojih postoji dobar odgovor na liječenje, koji se manifestira duljim preživljanjem bez povrata bolesti za prosječno jednu godinu, ali ne utječe na ukupno preživljenje (60, 61).

Dakarbazin je najstariji lijek koji se koristi u liječenju metastatskog melanoma. Iako približno četvrtina bolesnika reagira na liječenje, nema utjecaja na ukupno preživljenje. Zbog toga je dekarbazin, u većini protokola liječenja, zamijenjen temozolomidom (62).

Bez obzira na ovu činjenicu, niti jedan konvencionalni lijek korišten zasebno, ili u kombinaciji s drugim lijekovima, nije se pokazao boljim od dakarbazina, u odnosu na ukupno preživljenje. Samo se u 10-15% bolesnika s uznapredovalom bolešću preživljenje produljuje, ali bez velikoga kliničkog značaja (62).

Interleukin-2 je imunoregulatorni protein koji je izvorno opisan kao čimbenik rasta limfocita T koji se koristio u limfokinima-aktiviranom liječenju tumora stanicama-ubojicama (63). Približno šestina oboljelih od metastatskog melanoma reagira na liječenje. Liječenje interleukinom 2 popraćeno je snažnim neželjenim pojavama, pa stoga ovaj način liječenja podnose samo pacijenti dobrog općega stanja (63).

Karboplatina i paklitaksel se koriste u kombinaciji sa sorafenibom, malim inhibitorom nekoliko različitih tirozin kinaza. Na ovaj oblik liječenja pozitivno odgovara 11-17 % bolesnika (64). Iako primjena ovog protokola liječenja rezultira s puno manje neželjenih pojava u odnosu na dakarbazin, učinkovitost kombiniranog liječenja karboplatinom paklitakselom i sorafenibom, u odnosu na dakarbazin i temozolomid, nije potvrđena dosadašnjim meta-analizama (64, 65).

Čimbenik poticanja kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF, od engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) koristi se u adjuvantnom liječenju bolesnika u stadijima III i IV, ali bez značajnog utjecaja na ukupno preživljenje. Kratko produljenje preživljenja je pokazano samo u bolesnika kojima su prethodno odstranjene metastaze u unutarnjim organima (66).

Najčešće korištena kombinacija lijekova u bolesnika s uznapredovalom bolešću je cisplatina, vinblastin i dakarbazin. Često se koristi i kombinacija cisplatine, dakarbazina, karmustina i

tamoksifena. Meta-analizama nije pokazano produljenje preživljenja u bolesnika koji su liječeni kombinacijama lijekova kojima je dodan tamoksifen (67).

Mutacije u genu *BRAF* koji kodira serin-treonin kinazu, a zbog kojih se aminokiselina valin na položaju 600 zamjenjuje nekom drugom aminokiselinom, prisutne su u 40-60% melanoma (68). U čak 90% tumora s mutacijom ovog gena postoji zamjena V600E (zamjena valina glutaminskom kiselinom). Određivanje statusa gena *BRAF* u odnosu na ovu mutaciju ključno je u početku liječenja bolesnika s uznapredovalom bolešću.

Inhibitori serin-treonin kinaza: nivolumab i ipilimumab te vemurafenib su inhibitori serin-treonin kinaze koji su se pokazali učinkovitim u usporavanju napredovanja bolesti u bolesnika s metastatskim melanomima u kojima su bile prisutne mutacije BRAF V600.

Vemurafenib je pozitivno utjecao na ukupno preživljenje (69).

Nivolumab (djeluje i na divlji tip, i na mutiranu inačicu proteina BRAF) (70), kao monoterapija, ili u kombinaciji s ipilimumabom (monoklonsko protutijelo i imunomodulator koji utječe na CTLA-4) je lijek izbora u bolesnika s uznapredovalom metastatskom bolešću i prisutnim mutiranim oblikom BRAF V600 (71, 69).

Vemurafenib i dabrafenib se koriste u bolesnika s dokazanom mutacijom BRAF V600E/K. Iako oba lijeka značajno produljuju vrijeme u kojem bolest ne napreduje, njihova primjena ne utječe značajno na ukupno preživljenje. Do tri četvrtine bolesnika pozitivno reagira na liječenje, a učinak je osobito snažan u bolesnika koji ne pokazuju klinički značajan odgovor na liječenje dakarbazinom (72).

Trametinib (inhibitor kinaza MEK1/2) i cobimetinib su inhibitori serin kinaze potaknute mitogenim signalima koji djeluju na BRAF V600E i BRAF V600K (zamjena valina lizinom). Pokazuju jednaku učinkovitost kao i dabrafenib u odnosu na produljenje preživljenja bez povrata bolesti. Mogu se kombinirati s protokolima liječenja vemurafenibom, bez pojačanja toksičnosti (73). Nažalost, melanomi posjeduju alternativne metaboličke puteve kojima

zaobilaze učinak inhibitora BRAF zbog čega razvijaju neosjetljivost na ove lijekove, u vremenskom periodu od nekoliko mjeseci (73).

Cjepiva i gensko liječenje nisu se pokazali učinkovitima u liječenju uznapredovale bolesti, kada su bili primijenjeni zajedno s citostaticima (74).

Jedini trenutno odobreni pripravak cjepiva je *Talimogene laherparepvec*, živo atenuirano cjepivo virusa herpes simpleks tipa 1 koji se umnaža u stanicama tumora i proizvodi čimbenik poticanja kolonija granulocita i makrofaga, a koristi se kao lokalni pripravak u bolesnika s recidivima nakon primarnog kirurškog liječenja. (75). Radi se o rekombinantnom cjepivu koje je nastalo na način da se iz virusa izbacuje gen za ICP34.5 i ubaci gen za GM-CSF (76).

#### **1.4.3. Liječenje malignih melanoma kože glave i vrata zračenjem**

Rezultati dobiveni u nekoliko istraživanja pokazuju da dodavanje zračenja u protokol liječenja može biti korisno uz superselektivne disekcije vrata u nekih bolesnika s recidivima regionalne metastatske bolesti. Nisu potvrđeni u randomiziranim istraživanjima (77).

#### **1.4.4. Praćenje bolesnika nakon završenog liječenja**

Način praćenja bolesnika s melanomom kože glave i vrata ovisi o stupnju bolesti. Najvažnije je imati na umu mogućnost razvoja drugog primarnog tumora, te razvoja udaljenih metastaza koje se najčešće nalaze u plućima. Rizik od povrata bolesti je najveći u prve tri godine. Bolesnicima s melanomom u stadiju 0 preporučuje se godišnji dermatoskopski pregled cijelog tijela, doživotno. Bolesnicima s melanomom u stadiju IA preporučuje se dermatoskopski pregled cijelog tijela svakih tri do šest mjeseci prvih pet godina, a nakon toga prema kliničkoj procjeni. Bolesnicima s melanomom u stadiju IB-IV preporučuje se dermatoskopski pregled



svaka tri mjeseca prve dvije godine, zatim svakih šest mjeseci naredne dvije godine, a nakon toga jednom godišnje, doživotno. Uz to je potrebno učiniti rendgensko snimanje i kompjuteriziranu tomografiju pluća najmanje jednom godišnje svim bolesnicima kojima je melanom dijagnosticiran najmanje u stadiju IIB te mjeriti razinu LDH u serumu, uz kompletnu krvnu sliku, jednom godišnje (58).

U pravilu se uspjeh liječenja procjenjuje primjenom pozitronske emisijske tomografije udružene s kompjuteriziranom tomografijom. Ovi postupci, uz pozitivne učinke koji su neosporni, povećavaju cijenu liječenja, vrijeme potrebno za dijagnostiku te izlaganje bolesnika dodatnom zračenju. Zbog toga su istraživanja proteoma melanoma velikim dijelom usmjerena otkrivanju biljega tumora koji bi prikladno zamijenio veliki dio trenutno dostupnih dijagnostičkih metoda (48).

Istraživanjima dugoročnog preživljenja bolesnika s melanomom stadija I i II je pokazano da se bolest može vratiti i u bolesnika koji se smatraju izliječenima.

U skupini od 1372 bolesnika s melanomima u stadijima I i II, zabilježeno je 77 recidiva (5,6 %) koji su se javili više od deset godina nakon početnog liječenja. U ovoj su skupini najснаžniji negativni prognostički čimbenici bili dob (< 40 godina) u trenutku postavljanja dijagnoze, stupanj invazije po Clarku (IV i V) te debljina tumora (više od 2 mm).

Većina recidiva se pojavila u regionalnim limfnim čvorovima, a ne na mjestu ekscizije. U skupini bolesnika s udaljenom metastatskom bolešću, u 75 % bolesnika su metastaze bile prisutne u mozgu, organu za koji melanom ima posebno izražen metastatski tropizam (78).

Pretpostavlja se da je „buđenje“ zloćudne bolesti nakon višegodišnjeg mirovanja, poznato kao i uspavanost tumora (engl. cancer dormancy), posredovano oslabljenim imunološkim statusom (imunosupresijom) domaćina (78).

## 1.5. Značaj translacijskih istraživanja za razumijevanje prognoze bolesti

Osobita poteškoća u liječenju bolesnika s malignim melanomom kože glave i vrata u stadijima I i II je pravovremeno otkrivanje bolesnika koji imaju visok rizik od razvoja regionalne metastatske bolesti i u kojih će petogodišnje preživljenje biti kraće. Iako se, naizgled, radi o bolesnicima u ranom stadiju bolesti, bez regionalne metastatske bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, manje od polovine bolesnika s lezijama debljine  $> 4$  mm će biti izliječeno (79).

Stoga prognoza bolesti za oboljele od melanoma u stadijima I i II predstavlja veliki problem, koji za posljedicu ima nemogućnost davanja preciznih preporuka za daljnje liječenje. Ovo se osobito odnosi na terapijski potencijal adjuvantne terapije koja se, na temelju trenutno poznatih čimbenika rizika, ne preporučuje bolesnicima u ranim stadijima bolesti. Nemogućnost pravovremenog otkrivanja oboljelih koji imaju visoki rizik za povrat bolesti otežava i praćenje te utječe na pravodobnost otkrivanja regionalne i udaljene metastatske bolesti, što doprinosi slabijem preživljenju (80). Metodama kojima se analiziraju promjene u genomu i epigenomu identificiran je velik broj gena koji su uključeni u nastanak i razvoj melanoma: *ERBB3*, *AKT*, *MITF*, *BCL2*, *NCOA3*, *CDKNA2A (p16)*, *CDK4*, *RBI*, *CDKN2A (p19)*, *PTEN/MMAC1*, *BRAF*, *KIT* i *RAS* (81, 82, 83, 84).

Kako bi se poboljšalo razumijevanje značaja čimbenika rizika u ranim stadijima malignog melanoma, prije razvoja lokalnih i udaljenih metastaza, potrebno je otkriti nove biljege tumora kojima bi se preciznije predvidjelo njegovo biološko ponašanje.

### 1.5.1. Biljezi tumora

Biljezi tumora mogu se definirati kao čimbenici čija prisutnost ili promjena koncentracije upućuje na pojavu ili napredovanje tumorske bolesti. Biljezi tumora su najčešće proteini. Mogu

se podijeliti na stanične ili tkivne te na humoralne ili serumske, koje stanice tumora otpuštaju u izvanstaničnu tekućinu.

Opravdanje korištenja nekog biljega tumora u kliničkom radu ovisi o njegovoj specifičnosti, osjetljivosti te pozitivnoj i negativnoj prediktivnoj vrijednosti.

Specifičnost je omjer broja stvarno negativnih osoba (označenih kao negativnih po učinjenom testu) i ukupnog broja testiranih osoba koje nemaju bolest.

Osjetljivost je omjer broja stvarno pozitivnih osoba (označenih kao pozitivnih po učinjenom testu) i ukupnog broja osoba koje imaju bolest.

Pozitivna prediktivna vrijednost predviđa vjerojatnost postojanje bolesti ako je rezultat testiranja pozitivan, dok negativna prediktivna vrijednost predviđa vjerojatnost da bolesti nema, ako je rezultat testiranja negativan.

Biljezi tumora se mogu koristiti u probiru (engl. screening) zdrave populacije, ali i populacije s visokim rizikom za razvoj bolesti, za postavljanje dijagnoze, određivanje prognoze i praćenje tijeka ili povrata bolesti. Idealno, pouzdani bi biljezi trebali olakšati razvoj i pridonijeti racionalnoj primjeni novih i već postojećih oblika liječenja.

U dijagnostici malignog melanoma koristi se mali broj biljega melanocita (S100, HMB45, MART-1 i MITF) koji u analizi metodom imunohistokemije pokazuju visoku specifičnost. Međutim, njihova se primjena u svrhu prognoze bolesti nije pokazala opravdanom.

Preobrazba benignih melanocita u melanom posredovana je velikim brojem genetskih promjena koje, udružene s promjenama transkriptoma i proteoma, dovode do nastanka stanica koje nekontrolirano proliferiraju, imaju neograničen djelidbeni potencijal, sposobnost invazivnog rasta i otporne su na apoptozu (85).

Opisan je i velik broj onkogenih mutacija gena *BRAF* u stanicama benignih pigmentiranih nevusa koje mogu dovesti do razvoja melanoma (86).

### 1.5.2. Molekularna genetika melanoma

Melanom je heterogena bolest, povezana s brojnim o molekularnim abnormalnostima koje se manifestiraju kroz poremećaje diobe, diferencijacije i apoptoze. Dosadašnjim istraživanjem genoma čovjeka otkriven je velik broj gena koji su povezani s prognozom bolesti.

Predložena je i nova klasifikacija melanoma, kojom se objedinjuju genetske i histomorfološke karakteristike tumora (87).

Podatci dobiveni ovom klasifikacijom trebali bi poslužiti kao prognostičko oruđe koje se temelji na nekoliko biljega specifičnih za rane stadije melanoma, otkivene metodom imunohistohemije. Problemi vezani uz ovaj pristup uključuju složenost postupka, dugotrajno testiranje, nisku pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost testa (ispod 80 %) i nisku reproducibilnost metode (87).

Epigenomske promjene su prepoznate kao snažan pokretači mehanizam nastanka i napredovanja melanoma. Istraživanjima je pokazano da se kao kandidati - biljezi tumora mogu smatrati epigenetske modifikacije molekule DNA, histona i mi-RNA.

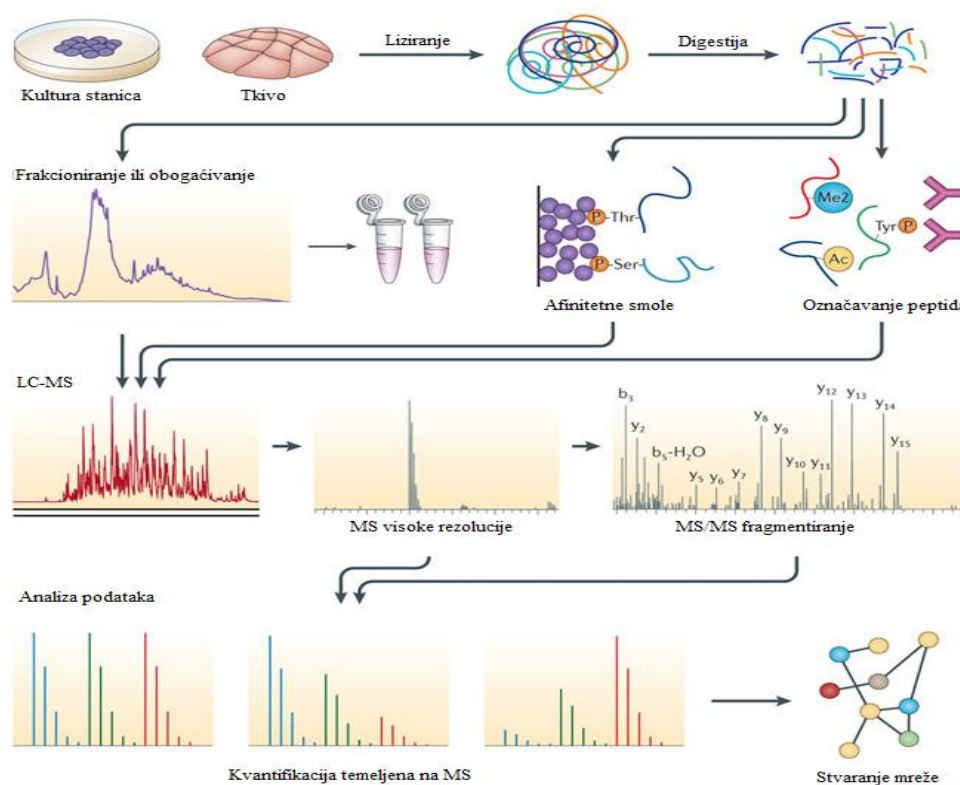
Iznimno visoka razina šarolikosti ovih promjena u svakom melanomu ne omogućuje otkrivanje „vrućih mjesta“ (engl. hot spots) na koja bi se moglo djelovati liječenjem, primarno i zbog postojanja raznolikih posttranslacijskih promjena u proteinima, koji mogu stupati u interakcije u različitim kombinacijama.

Zbog postojanja ovih fenomena koji nisu značajka samo melanoma, nego i svih zloćudnih tumora, nemoguće je primijeniti „univerzalno“ protutijelo i/ili veći broj protutijela koja „ciljaju“ rastući broj potencijalnih biljega.

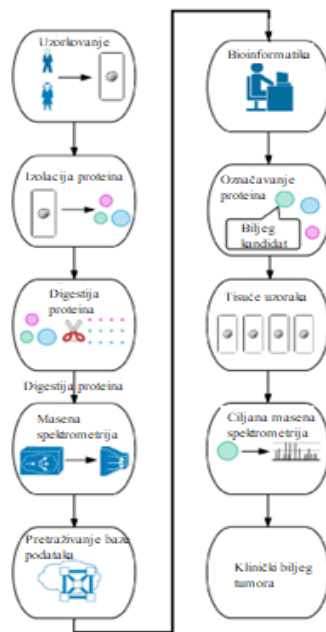
Dodatan problem predstavlja i nedostatna količina materijala za mnogostruke analize koje bi trebale osigurati reproducibilnost dobivenih podataka (88).

### 1.5.3. Proteomika u humanoj medicini

Proteomika, sistemska analiza profila proteina tkiva u određenom trenutku (Slika 5), je relativno nova disciplina (89). Analizom proteoma dobiva se velik broj podataka koji se obrađuju složenim algoritmima. Primjena proteomike je u fazi uspona, koji rezultira probojem u otkrivanju proteina i potvrđivanju njihove funkcije. Sukladno tome, proteomikom se može identificirati i kvantificirati velik broja proteina i njihovih posttranslacijskih modifikacija, u biološkom uzorku. Na ovaj se način dobivaju podatci o proteinima - kandidatima za daljnja istraživanja. Na fazu otkrivanja nastavlja se ciljana potvrda značaja funkcije proteina - kandidata. Za konačno određivanje značaja funkcije potreban je manji broj proteina - kandidata, u većem broju uzoraka (Slika 6).



Slika 5. Pojednostavljeni prikaz određivanja proteoma u biološkom uzorku (88)

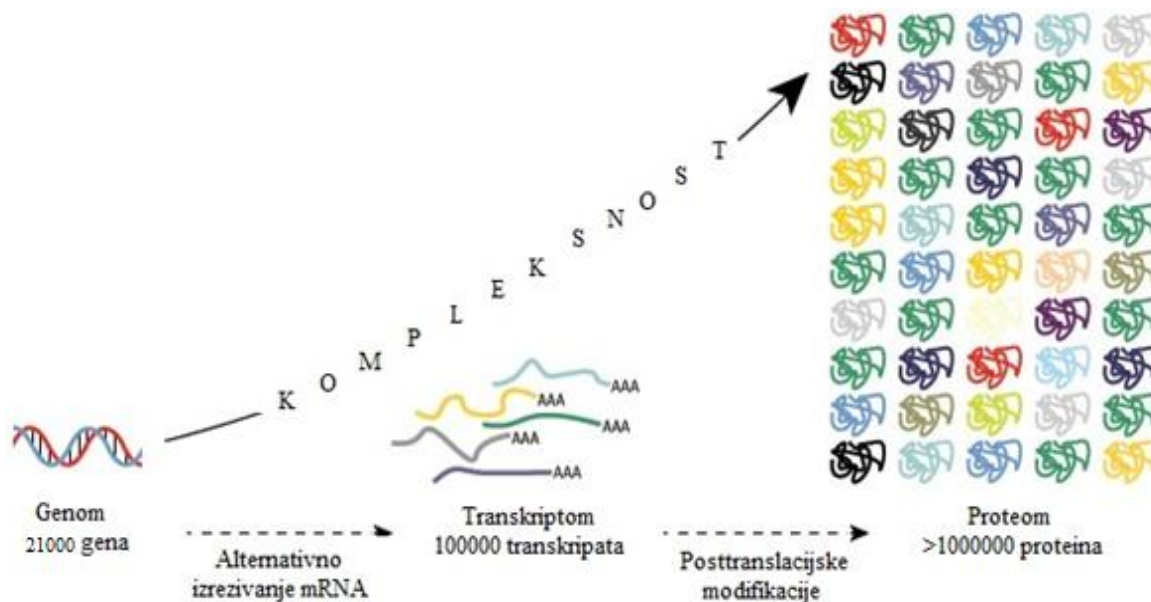


**Slika 6.** Proteomika u otkrivanju i potvrđivanju značaja proteina, u biološkom uzorku (90)

Iako genom čovjeka čini približno 21 000 gena, broj proteina je znatno veći; između 250 000 i 1 000 000. Samo je manji dio ovih proteina identificiran i sekvenciran.

Prilikom aktivacije gena, nastaje glasnička ribonukleinska kiselina (mRNA, od engl. messengerRNA) koja se iz jezgre prenosi u citoplazmu stanice, u kojoj se translacija proteina na ribosomima. Stoga istraživanja vezana uz načine aktivacije gena imaju veliku ulogu u razumijevanju etiopatogeneze bolesti. Međutim, aktivnost gena ne znači ujedno i aktivnost proteina za koji gen od interesa kodira. Nemogućnost procjene aktivnosti proteina na temelju aktivnosti transkripcije gena je posljedica mnogih događanja u stanici. Na primjer, jedna mRNA može kodirati nekoliko različitih proteina zbog alternativnog izrezivanja (engl. splicing), a novonastali proteini mogu stvarati kompleksne tvorbe s drugim proteinima i/ili RNA-molekulama. Stoga njihova funkcija ovisi o nazočnosti proteina - partnera (Slika 7).

Dodatno, velik broj proteina se posttranslacijski modificira, što za posljedicu može imati višestruke funkcije jednog proteina.



**Slika 7.** Raznolikost biomolekula koje nastaju aktiviranjem gena (91)

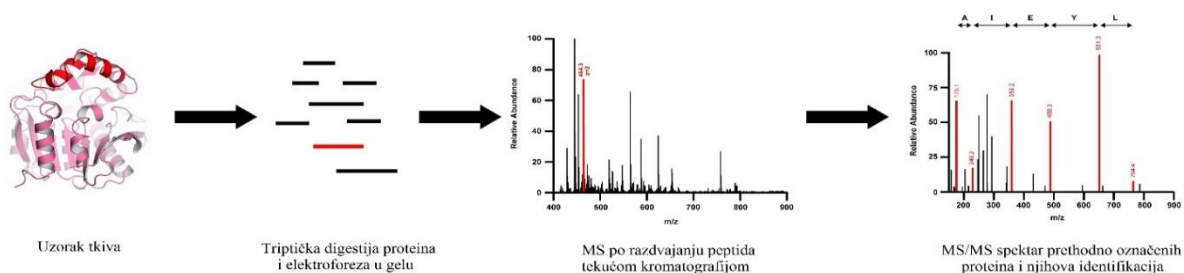
Zbog svega navedenog, od profiliranja proteoma se očekuju značajni rezultati. Određivanje prisustva određenih proteina u određenom tkivu i u određenom vremenu, omogućuje njegovo povezivanje s raznolikim biološkim fenomenima.

Postoji nekoliko postupaka kojima se može analizirati proteom. Svim postupcima prethodi izdvajanje proteina (lizat stanica, serum), denaturiranje i digestija proteina u peptide enzimima. Peptidi se odvajaju tekućinskom kromatografijom i analiziraju spektrometrom masa. Za razliku od analiza koje se temelje na metodi imunohistokemije, analizom proteoma, koja je utemeljena na spektru masa, može se istovremeno analizirati velik broj proteina (do nekoliko tisuća), bez potrebe za *a priori* znanjem o specifičnom sadržaju proteina u uzorku, i bez specifičnih protutijela.

Spektrometar masa se sastoji od izvora iona, analizatora mase kojim se mjeri omjer mase i naboja, i detektora kojim se mjeri broj iona u svakom omjeru mase i naboja. Za svaki protein se spektrometrom masa mjeri karakteristični spektar peptida, a njihova masa ukazuje na ishodišni protein.

Upravo je korištenje tekućinske kromatografije združene sa spektrom masa te eksponencijalno povećanje procesorske moći računala omogućilo, posebno unazad nekoliko godina, moderne analize proteoma, koje su praćene poboljšanim metodama pripreme uzoraka (Slika 8) (92). Rezultati spektra masa proteina u tkivu fiksiranom formalinom i uklopljenom u parafin (od engl. Formalin Fixed Paraffin Embedded; FFPE) i svježe smrznutom tkivu pokazuju 95% „preklapanja“ u broju i vrsti identificiranih proteina, bez obzira na njihov smještaj unutar stanice. Iako se smatra dozvoljivim zaključiti da starost fiksiranog preparata ne utječe znatno na sadržaj i koncentraciju proteina (93), najnoviji podatci ipak upućuju na mjeru opreza s obzirom na to da izlaganje tkiva djelovanju fiksativa (formalin) za posljedicu ima dodavanje metilne skupine na lizin. Zbog toga može doći do pogreške u analizi spektra masa, primarno kod određivanja peptida čija je masa vrlo slična (94).

Istraživanje melanoma analizom proteoma ima za cilj otkrivanje čimbenika napredovanja bolesti kako bi se na vrijeme otkrili i adekvatno liječili bolesnici koji imaju visok rizik od progresije bolesti i razvoja metastaza (95, 96).



**Slika 8.** Načela otkrivanja proteina u uzorku metodom LC/MS (od engl. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) (92).



Dosadašnja istraživanja su se uglavnom temeljila na određivanju biljega tumora u serumu. Ovaj način određivanja biljega ima nekoliko značajnih prednosti u odnosu na analizu proteoma tkiva:

a) jednostavno uzorkovanje;

b) dostupnost nekoliko različitih metoda za analizu malih koncentracija proteina povezanih s masom tumora.

Najpoznatiji proteini – kandidati za biljege tumora su antigen melanocita S100-beta i protein MIA (od engl. Melanoma Inhibiting Activity), istraživani u ranom otkrivanju povrata bolesti tijekom postoperativnog praćenja (97). Iako su oba proteina vrijedni prognostički čimbenici u bolesnika s udaljenim metastazama i u kasnim stadijima bolesti, nepouzdati su u ranim stadijima bolesti, u kojima se uglavnom koriste u praćenju odgovora na liječenje (96).

Najpouzdaniji prognostički biljeg u serumu je enzim laktat-dehidrogenaza (LDH), koja je nespecifična i upućuje na povećanu masu tumora, relativnu hipoksiju i pojačan metabolizam tkiva tumora. Njezine povišene vrijednosti prisutne su i u oboljelih od različitih metastatskih tumora, a ne samo melanoma. Zbog jednostavnosti mjerenja i pouzdanosti, jedini je biokemijski biljeg koji je uključen u klasifikaciju po AJCC (3).

Do danas je otkriveno nekoliko potencijalnih biljega koji koreliraju s masom melanoma i progresijom bolesti, a vezani su za diferencijaciju melanocita, angiogenezu (vaskularni endotelni čimbenik rasta, čimbenik rasta fibroblasta beta, interleukin 8), adheziju i pokretljivost stanica (matriks metaloproteinaze), citokine i njihove receptore (interlukini 6 i 10), prezentaciju antigena (molekule sustava HLA – od engl. Human Leukocyte Antigen), metabolizam tumora (TuM2-PK) i apoptozu (Fas/CD95) (97).

Istraživanje proteoma se nameće kao inovativan pristup u identifikaciji biljega u tkivu i serumu oboljelih od melanoma. Dostupni podatci ukazuju na to da su već postignuti rezultati koji

pokazuju da se bolesnici mogu razvrstati u prognostičke skupine na temelju proteomskog profila u serumu (98).

Analiza proteoma seruma je problematična, prvenstveno zbog tehničke izvedbe. Naime, u serumu postoji minimalna količina proteina koje je tumor izlučio, a vrlo visoka koncentracija drugih, „netumorskih“ proteina koji „stvaraju buku“ i otežavaju analizu (99, 100).

Nedavno su objavljeni rezultati određivanja proteoma kojima je identificiran amiloidni protein A seruma (od engl. SAA) kao novi prognostički čimbenik u ranim stadijima melanoma (101).

Donedavna su tehnološka ograničenja onemogućavala analizu proteoma arhivskih preparata. Godine 2007 opisana je prva analiza proteoma korištenjem tkiva fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafin. Ovaj pristup čini temelj jednostavnije analize proteoma tumora iz arhivskog materijala od onog ovisnog o vremenu uzorkovanja (102, 103, 104, 105).

Matriks-potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija sa spektrometrijom masa (MALDI IMS, od engl.; Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization and Imaging Mass Spectrometry) je metoda kojom se, prije određivanja proteoma, obilježavaju dijelovi tkiva na prerezu, što omogućuje razumijevanje topografske raspodjele proteina, u uzorku. Dodatno, ovom je metodom moguće analizirati i posttranslacijske modifikacije proteina i proteina male molekularne mase (106).

U istraživanju, kojim je u bolesnika s metastatskim melanomom uspoređen proteom 69 limfnih čvorova patohistološki pozitivnih na metastaze i 17 negativnih limfnih čvorova, pokazano je da se analizom proteoma može razlikovati bolesno i zdravo tkivo, te s velikom sigurnošću povezati značajke proteoma metastazama zahvaćenih limfnih čvorova sa stadijem bolesti (107).

Istraživanja profila proteoma tkiva ranog stadija melanoma kože glave i vrata do sada nisu izvedena, pa stoga nije poznato postoji li povezanost specifičnog proteoma i prognostičkih čimbenika bolesti.

## **2. HIPOTEZA**

Profil proteoma tkiva oboljelih od melanoma kože glave i vrata u stadijima I i II povezan je s prognozom bolesti.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Opći cilj istraživanja**

Cilj predloženog istraživanja je određivanje profila proteoma melanoma kože glave i vrata stadija u stadijima I i II.

#### **3.2. Specifični ciljevi istraživanja**

- 1) Odrediti profil proteoma u uzorcima tkiva primarnog melanoma kože glave i vrata u stadijima I i II;
- 2) Usporediti izraženost proteina primarnog melanoma kože glave i vrata s patohistološkim prognostičkim čimbenicima (debljina tumora, stupanj invazije po Clarku, prisutnost ulceracije, limfokapilarna invazija, prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita, broj mitozama/mm<sup>2</sup>, proširenost bolesti prema klasifikaciji AJCC).
- 3) Ispitati prognostički značaj izraženosti proteina u analiziranim uzorcima u odnosu na smrtni ishod kao posljedicu primarne bolesti (DSS, od engl. disease specific survival).

Ostvarivanjem navedenih ciljeva istražiti će se: 1) da li su, i u kojoj mjeri, u uzorcima tkiva ranog stadija melanoma glave i vrata izraženi poznati biljezi tumora; 2) da li su, i u kojoj mjeri, u uzorcima tkiva ranije navedenih melanoma prisutni novi (potencijalni) biljezi; 3) ima li izraženost pojedinih poznatih i/ili novih biljega proteoma prognostičku vrijednost, za oboljele od malignog melanoma kože glave i vrata, u stadijima I i II.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ispitanici

Ispitanici, oboljeli od melanoma i kontrolna skupina bolesnika sa složenim melanocitnim nevusima, a bez znakova malignog melanoma u vrijeme operacije, operirani su u KBC „Sestre milosrdnice“, u vremenu od 1. siječnja 2000 do 31. prosinca 2012. Bolesnici s melanomom su postoperativno praćeni i evidentiran im je onkološki status na svakom pregledu.

U istraživanje je bio uključen 31 bolesnik s patohistološkom dijagnozom malignog melanoma kože glave i vrata, koji je u vrijeme postavljanja dijagnoze bio bez klinički prisutne regionalne i/ili udaljene metastatske bolesti (klinički stadij I i II bolesti određen prema uputama AJCC) (7). U istraživanje je bilo uključeno i šest bolesnika u kojih su dijagnosticirani pigmentirani benigni nevusi, bez malignog melanoma u osobnoj anamnezi ili u vrijeme uzorkovanja. Uzorci nevusa su homogenizirani i skupljeni u jedan kontrolni uzorak (engl. sample pooling).

Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak, u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovakvom znanstvenom istraživanju. Ovo uključuje Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN121/03) i Zakon o pravima bolesnika Republike Hrvatske (NN 169/04). Istraživači su se obavezali se na potpuno osiguravanje tajnosti identiteta bolesnika.

Istraživanja vezana uz Laboratorij za mineralizirana tkiva, Odjela za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta bila su izvedena uz poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost – u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Shodno tome, uzorci tkiva su prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima, na način da je privatnost podataka ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita

tajnosti podataka u potpunosti osigurana, prvenstveno šifriranjem uzorka na kirurškoj sali. Ovo je istraživanje odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **4.2. Opis istraživanja**

Istraživanje je opažajno, retrospektivno i kohortno, na formalinom fiksiranim uzorcima malignog melanoma kože glave i vrata u stadiju I i II, uklopljenim u parafin. Uzorci su uzeti iz arhive Zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ KBC „Sestre milosrdnice“. Istraživanje je interdisciplinarno, a sastoji se od kliničkog dijela i analize proteoma. Stoga je realizirano u tri ustanove: Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, Zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ (KBC „Sestre milosrdnice“) i Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Broj uzoraka je usporediv s brojem uzoraka koji su se koristili u dosadašnjim istraživanjima. Materijal je obrađen standardnom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu od 5-40  $\mu\text{m}$ , deparafiniranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE).

Patohistološka analiza melanoma i složenih melanocitnih nevusa je provedena u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC „Sestre milosrdnice“. Ovom su analizom određeni dobro poznati prognostički čimbenici: a) debljina tumora po Breslowu, b) stupanj invazije po Clarku, c) histološki tip tumora, d) prisutnost ulceracije i/ili regresije, e) broj mitozna na  $\text{mm}^2$ , f) intenzitet prisutnosti tumor-infiltrirajućih limfocita, g) prisutnost limfokapilarne invazije te h) mikroskopski vidljiva satelitoza. Ovaj je prognostički čimbenik ujedno bio i čimbenik isključenja iz studije, s obzirom na to da prisutnost satelitoze razvrstava bolesnike u prognostičke stadije III ili IV. Stadij bolesti po patologu je određen po prihvaćenoj klasifikaciji

po AJCC, koja u obzir uzima debljinu tumora, broj zahvaćenih limfnih čvorova i prisustvo udaljenih metastaza (3)

U izradi profila proteoma melanoma korišten je nano-tekućinski kromatogram Easy-nLC (Proxeona) i spektrometar masa LTQ Orbitrap Discovery (Thermo). Protokol je dodatno modificiran nakon izvođenja probnih analiza kako bi se maksimalno povećala količina proteina.

#### **4.3. Protokol izdvajanja proteina iz uzoraka tkiva fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin**

##### **a) Priprema uzoraka:**

Uzorci tkiva fiksirani su formalinom i uklopljeni u parafinske blokove. Eksperimentalni uzorci potom su izrezani iz parafinskih blokova mikrotomom, a raspon mase ovih uzoraka bio je 18 – 194 mg. Tkivo je umetnuto u LoBind Eppendorf tube od 1,5 mL, odmah po rezanju iz parafinskih blokova i preneseno u laboratorij.

##### **b) Deparafinizacija i izolacija proteina:**

Uzorci su potom usitnjeni u dva koraka kako bi se povećala površina uzorka dostupna otopini za ekstrakciju proteina. S obzirom na to da je parafinom fiksirano tkivo kože mehanički izrazito čvrsto, tkivo je prvo skalpelom usitnjeno na tanke komadiće, a potom je homogenizirano u tarioniku.

Prilikom fiksacije proteina formalinom dolazi do kemijskog povezivanja između molekula formalina i amino skupina proteina. Ovo je povezivanje ključno za očuvanje uzoraka, no ometa razgradnju proteina (identifikaciju proteina).

Kuhanjem uzoraka u puferu za ekstrakciju proteina pokidane su spomenute kemijske veze pa je učinkovitost ekstrakcije proteina mnogostruko povećana. Netopivi dio uzorka razdvojen je centrifugiranjem od otopine izdvojenih proteina.

Protokol izdvajanja proteina proveden je kako slijedi:

- 1) Uzorku tkiva izrezanom iz parafinskog bloka dodano je 400  $\mu$ L ksilena, uzorak je vorteksiran 10 sekundi i inkubiran na sobnoj temperaturi 5 min.
- 2) Ksilen je uklonjen, zatim je dodano novih 400  $\mu$ L ksilena i postupak je ponovljen dva puta.
- 3) Nakon trećeg uklanjanja ksilena, na uzorak je dodano 400 mL etanola, kako bi se uklonio ksilen. Uzorak je etanolu izložen tri puta, uz postupke miješanja i inkubiranja na jednak način kao i kada je korišten ksilen;
- 4) Nakon uklanjanja etanola (Sigma, 99 %) uzorak je osušen uporabom vakuum centrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) kroz 10 min pri temperaturi 30 °C i 200 g.
- 5) Tkivo je prebačeno na čistu staklenu ploču na kojoj je izrezano skalpelom na komadiće približnog volumena 1 mm<sup>3</sup>, prebačeno u tarionik i usitnjeno kroz 3 minute uz dodavanje 500  $\mu$ L univerzalnog pufera za ekstrakciju proteina iz tkiva, koji je sastavni dio komercijalno dostupnog kompleta kemikalija FFPE-FASP (Expedeon).
- 6) Usitnjeni (tekući) dio uzorka prebačen je u Eppendorf mikroeprevetu od 1,5 mL, dok je preostalo krupnije tkivo usitnjeno u tarioniku dodavanjem novih 500  $\mu$ L pufera za ekstrakciju.

Postupak je ponovljen dva puta, što znači da je na uzorak ukupno dodan 1,5 mL pufera za ekstrakciju proteina.



- 7) Uzorak usitnjenog tkiva inkubiran je uz trešnju u Eppendorf mikroepripruvtama od 1,5 mL 45 min na 99 °C, a potom polako ohlađen na sobnoj temperaturi.
- 8) Centrifugiranjem uzorka na 15000 g 10 min na sobnoj temperaturi uklonjen je veći dio netopivog taloga koji je sadržavao nedovoljno usitnjene komadiće tkiva. Postupak je ponovljen dva puta kako bi se proteini izdvojeni u supernatantu bolje pročistili.
- 9) Supernatant s pročišćenim proteinima je premješten u nove mikroepripruvete Eppendorf od 1,5 mL kako bi se odredila koncentracija proteina, korištenjem komercijalno dostupnog kompleta kemikalija BioRad RC DC Protein Assay Kit II (Biorad), prema uputama proizvođača.

#### **c) Određivanje koncentracije proteina:**

Prije digestije proteina peptidazama potrebno je utvrditi koncentraciju proteina kako bi se ujednačile njihove koncentracije u uzorcima. Koncentracija proteina određena je korištenjem ranije navedenog komercijalno dostupnog kompleta kemikalija, BioRad RC DC Protein Assay Kit II, na slijedeći način:

- 1) Alikvot uzorka razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:5.
- 2) Određena je koncentracija proteina prema uputama u BioRad RC DC Protein Assay Kit II. Apsorbancija proteina izmjerena je pri valnoj duljini 690 nm, korištenjem instrumenta Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer).

#### **d) Digestija proteina:**

Priprema uzoraka za analizu spektrometrijom masa uključuje digestiju proteina peptidazom - tripsinom.

Kako bi se povećala učinkovitost digestije, proteini su denaturirani uporabom ureje, potom izloženi djelovanju alkilirajućeg reagensa, jodoacetamida, koji sprečava renaturaciju proteina

na način da se kovalentno veže na bočne lance cisteina čime onemogućava stvaranje disulfidnih mostova.

Protokol digestije proveden je kako slijedi:

- 1) U skladu s preporukama proizvođača komercijalno dostupnog kompleta kemikalija FFPE-FASP, odvojen je uzorak od 40 µg proteina te pomiješan s 200 µL 8 M otopine ureje u filteru za centrifugiranje koji „propušta“ proteine manje od 30 kDa. Filter je umetnut u novu tubicu Eppendorf od 1,5 mL te centrifugiran na 14000 g 30 min pri sobnoj temperaturi.
- 2) Na filter za centrifugiranje je dodano novih 200 µL 8 M otopine ureje i uzorak je centrifugiran na 14000 g 20 min pri pri sobnoj temperaturi.
- 3) Iz tubice Eppendorf od 1,5 mL je odstranjena 8 M ureja prikupljena tijekom prethodna dva koraka (engl. flow through).
- 4) Na filter za centrifugiranje je dodano 100 µL jodoacetamida otopljenog u 8 M ureji. Uzorak je kratko vorteksiran te inkubiran 20 min na sobnoj temperaturi, u mraku.
- 5) Uzorak je centrifugiran na 14000 g 10 min pri sobnoj temperaturi.
- 6) Na filter za centrifugiranje je dodano 100 µL 8 M ureje te je uzorak centrifugiran na 14000 g 15 min pri sobnoj temperaturi. Ovaj je korak ponovljen dva puta.
- 7) Uzorku je dodano 100 µL 50 mM otopine amonijevog bikarbonata te je uzorak centrifugiran na 14000 g 10 min pri sobnoj temperaturi. Ovaj je korak ponovljen dva puta.
- 8) Uzorku je dodano 75 µL 50 mM otopine amonijevog bikarbonata i tripsina u omjeru 50:1 te je kratko vorteksiran.
- 9) Kako bi se spriječilo isparavanje uzorka, vrh epruvete zaštićen je parafilmom te je uzorak inkubiran preko noći na 37 °C.
- 10) Filter za centrifugiranje premješten je u novu tubicu Eppendorf od 1,5 mL i centrifugiran na 14000 g 15 min na sobnoj temperaturi.

- 11) Uzorku je dodano 50  $\mu\text{L}$  50 mM otopine amonijevog bikarbonata te je centrifugiran na 14000 g 10 min na sobnoj temperaturi.
- 12) Uzorku je dodano 50  $\mu\text{L}$  0.5 M otopine natrijevog klorida te je centrifugiran na 14000 g 10 min na sobnoj temperaturi.
- 13) Filtrat u Eppendorf tubici sadrži pročišćene triptičke peptide. Uzorak je zakiseljen do pH 2,5-3 dodavanjem 30  $\mu\text{L}$  20% octene kiseline.

#### **e) Pročišćavanje i ugušćivanje peptida Stage Tipsevima**

Dobiveni triptički peptidi pročišćeni su od zaostalih soli (amonijevog bikarbonata i natrijevog klorida) koje ometaju ionizaciju peptida u spektrometru masa. Uz pročišćavanje, peptidi su istovremeno ukoncentrirani, kako bi se učinkovitije nanijeli na tekućinski kromatograf.

Protokol pročišćavanja i ugušćivanja peptida proveden je na slijedeći način:

- 1) U nastavak pipete od 100  $\mu\text{L}$  uglavljen je materijal C18 (tzv. Stage Tips (STop And Go Extraction), koji je bio navlažen dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  metanola. Nakon toga je Stage Tips centrifugiran na 1300 g 2 min na sobnoj temperaturi, ispran s 200  $\mu\text{L}$  0,5 % octene kiseline (otopina A), ponovo centrifugiran na 1300 g 3 min na sobnoj temperaturi.
- 2) U Stage tips je dodan je uzorak pročišćenih peptida i nakon tog je postupka uzorak centrifugiran u Stage Tips na 1300 g 5 min na sobnoj temperaturi.
- 4) Stage Tips je ispran s 200  $\mu\text{L}$  0.5 % octene kiseline (otopina A).
- 5) Stage Tips je centrifugiran na 1300 g 3 min na sobnoj temperaturi.
- 6) U Stage tips je dodan uzorak pročišćenih peptida. (ne kužim kako je dodan i u #2 i u #6?)
- 7) Uzorak je centrifugiran u Stage Tips na 1300 g 5 min na sobnoj temperaturi.
- 8) Stage Tips je ispran s 200  $\mu\text{L}$  0.5 % otopine A.

- 9) Stage Tips je centrifugiran na 1300 g 3 min na sobnoj temperaturi.
- 10) Peptidi su eluirani s materijala C18 (Stage tips) u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, na način da je Stage Tips uglavljen na plastičnu špricaljku, a peptidi su isprani pomoću 40  $\mu$ L otopine koja sadrži 80% acetonitrila (ACN) i 20% otopine A (otopina B).
- 11) Centrifugiranjem na vakuum-centrifugi tijekom 10 min pri 30 °C i 200 g je uparen zaostali ACN.
- 12) Utvrđena je konačna koncentracija pročišćenih peptida u uzorku pomoću NanoDrop 2000 uređaja (Thermo Scientific™), mjerenjem apsorbancije pri 280 nm.

#### **f) Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa**

Pročišćeni peptidi su razdvojeni temeljem polarnosti i analizirani pomoću nano-scale HPLC sustava Easy-nLC (Thermo) spojenog s LTQ-Orbitrap Discovery spektrometrom masa (Thermo) kroz nano-elektrosprej LC-MS sučelje (Thermo). Nanokolona C18 napravljena je pakiranjem „picofrit“ kapilare (New Objective,  $\varnothing$  75  $\mu$ m, promjera vrha 10  $\mu$ m) s kašom od Luna 3  $\mu$ m C18 faze (Phenomenex). Peptidi su u otapalu „A“ (0,5% AcOH u vodi) nanoseni na nanokolonu i razrijeđeni kroz 240-minutni linearni gradijent od 2-40% otapala „B“ (80% ACN, 0,5% AcOH u vodi) s protokom od 250 nL/min.

Automatizirani ciklusi mjerenja spektrometra masa sastojali su se od punog skeniranja MS i skeniranja MS/MS do dvadeset najintenzivnijih iona, koristeći se dinamičkim isključenjem kako bi se izbjeglo prekomjerno fragmentiranje (analiza) peptida najveće koncentracije.

Puni skenovi MS (m/z od 300 do 2000) su dobiveni u Orbitrap analizatoru (ThermoFisher Scientific) na rezoluciji od 100,000 s unutrašnjom kalibracijom pomoću tzv. „lock“ mase.

### **g) Bioinformatička obrada dobivenih podataka**

Eksperimentalne podatke, odnosno - spektre pojedinih fragmentiranih peptida, potrebno je bioinformatički analizirati kako bi se dobile informacije važne za biološki sustav. Peptidi su identificirani i kvantificirani uporabom računalnog programa MaxQuant (Max Planck Institute of Biochemistry), inačica 1.5.1.2, uz standardne postavke. Za *in silico* digestiju humanih proteina odabrana je peptidaza tripsin. S obzirom na to da je učinkovitost karbamidometilacije cisteina (dodavanje karbamidne skupine korištenjem jodoacetamida), acetilacije N-kraja proteina i degradacijske oksidacije metionina rijetko potpuna, ove su značajke odabrane kao varijabilne modifikacije. Stoga su prilikom uparivanja mase pojedinog eksperimentalno detektiranog peptida s *in silico* podacima, provjerene obje mogućnosti, za svaki pojedini parametar. Drugim riječima, detektirani su peptidi s karbamidnom skupinom, kao i oni bez nje, peptidi s acetiliranim i neacetiliranim N-krajevima te peptidi kojima su metioninski bočni lanci degradirani oksidacijom, kao i oni s očuvanim metioniskim bočnim lancima. Maksimalna dopuštena greška postavljena je na uobičajenih 0,01, a minimalna duljina peptida za identifikaciju proteina podešena je na sedam aminokiselina.

Proteini u pojedinom uzorku kvantificirani su uporabom kontinuirane vrijednosti intenziteta izražaja proteina (iBAQ, od engl. engl. Intensity Based Absolute Quantification;) koja predstavlja omjer zbroja eksperimentalno utvrđenih intenziteta svih peptida i intenziteta pojedinog detektiranog peptida.

Detektirani su proteini molekulskih masa manjih od 30 kDa, iako je uzorak propušten kroz filter koji u otpad propušta čestice manje od 30 kDa. Naime, proteini su filtrirani u denaturirajućim uvjetima, odnosno otapalu 8 M ureji koja je narušila njihovu sekundarnu i tercijarnu strukturu. Zbog denaturacije i narušene kompaktne strukture, izgledno je da su proteini manji od 30 kDa zaostali na porama filtera.

Ključni korak u bioinformatičkoj analizi jest identifikacija peptida *in silico*, u dostupnim bazama podataka proteoma. Eksperimentalni podaci su uspoređeni s najnovijim kompletnim setom proteoma čovjeka, koji je dostupan u bazi podataka UniProt (Uniprot, <http://www.uniprot.org>). Korišten je modul Andromeda MaxQuant paketa (Max Planck Institute of Biochemistry), pretraživača koji je zasnovan na probabilističkom bodovanju pojedinih peptida. Na ovaj su način otkriveni peptidi koje je bilo moguće usporediti s, u datoteku pohranjenim, proteinima čovjeka.

#### **4.4. Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu podataka trenutak uzimanja uzorka tijekom operativnog zahvata bio je početna točka istraživanja. Završna točka je ukupno preživljenje bolesnika. Cilj analize podataka je definiran prije izrade profila proteoma tkiva malignog melanoma kože glave i vrata ranih stadija. Identifikacija povezanosti izraženosti proteina dobivenih profiliranjem proteoma tkiva melanoma s poznatim prognostičkim čimbenicima i vremenom preživljanja bolesnika je bila primarni cilj.

Podatci dobiveni mjerenjem su prikazani kao minimum, prva kvartila (Q1), medijan, treća kvartila (Q3), maksimum, i aritmetička sredina. Censusom je označen ishod (živ ili preminuo), a kontinuirane vrijednosti intenziteta izražaja proteina (engl. intensity Based Absolute Quantification; iBAQ) za svakog su bolesnika testirane u dva načina prikaza – po kontinuiranim vrijednostima u uzorcima, a potom i u omjeru izraženosti u uzorku bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu. Očekivan je veliki broj proteina (varijabli) i zbog toga je predviđeno korištenje testova koji mogu kompenzirati nepovoljne omjere broja ispitanika i varijabli.

Multivarijatna analiza povezanosti promatranih varijabli s pojavom smrtnog ishoda bolesti zasnivala se na uporabi različitih oblika rekurzivnog particioniranja (RP) implementiranih kao rpart moduli unutar programskog jezika R. Programi zasnovani na RP izvrsno razjašnjavaju kompleksne i nelinearne interakcije, te omogućuju dobivanje pouzdanih zaključaka i na relativno malom broju ispitanika i/ili varijabli. Osim toga, s algoritmima RP mogu se izvesti pouzdani zaključci čak i ako nedostaje dio podataka. Zbog toga se sve više koriste u onkologiji za izdvajanje čimbenika rizika, izradu prognostičkih indeksa, te optimiziranje dijagnostičkih postupaka i liječenja. Rezultat rekurzivnog particioniranja izražava se kao omjer hazarda (engl. hazard ratio). Koristeći tako posložene varijable, rezultati su prikazani Kaplan Meierovom krivuljom preživljenja za zasebne proteine koristeći Mantel-Cox log-rank test kako bi se identificirali oni proteini koji su povezani s preživljenjem.

Svi statistički testovi bili su dvosmjerni. Vrijednosti  $p$  manje od i jednake 0.05 određene su statistički značajnima. Obrada podataka je učinjena uz pomoć programa programa R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> i SPSS (Verzija 22.0. Izdana 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.) (108, 109, 110).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike ispitanika

U istraživanje je bio uključeno 31 bolesnika koji su bili kirurški liječeni od histopatološki potvrđenog malignog melanoma kože glave i vrata u kliničkim stadijima I ili II, u KBC „Sestre milosrdnice“ u vremenu od 1. siječnja 2000 - 31. prosinca 2010. Bolesnici su postoperativno praćeni i evidentiran im je onkološki status. Analizirano je i šest uzoraka pigmentiranih benignih nevusa koji su se razvili u osoba bez malignog melanoma u osobnoj anamnezi ili u vrijeme uzorkovanja. Ovih je šest uzoraka tkiva bilo homogenizirano i predstavljalo je jedan, kontrolni uzorak koji je korišten kao provjera izraženosti proteina u uzorcima melanoma, s obzirom da predstavlja melanomu najbližnje benigno tkivo.

Istraživanje je uključivalo 18 osoba muškog i 13 osoba ženskog spola (omjer M:Ž 1,38). Medijan dobi bio je 73, s rasponom od 23 do 90 godina starosti i sa standardnom devijacijom od 14,97 godina.

U istraživanju su bila četiri bolesnika s *lentigo maligna* melanomom, 12 bolesnika s površinskoširećim melanomom te 15 bolesnika s nodularnim melanomom. Prosječni promjer tumora bio je  $15,5 \pm 7,54$  mm. Šest bolesnika bilo je s T1-kategorijom tumora, četiri bolesnika s T2-kategorijom tumora, 13 bolesnika s T3-kategorijom tumora te osam bolesnika s T4-kategorijom tumora.

Deset bolesnika bilo je u stadiju bolesti I, a 21 bolesnik u stadiju bolesti II.

Osnovni podatci o ispitanicima i odstranjenim tumorima prikazani su u tablicama 6-7.



**Tablica 5.** Raspodjela ispitanika po dobi, spolu i histološkom tipu melanoma kože glave i vrata

	Svi ispitanici	Muškarci	Žene
Svi ispitanici	n=31	18	13
Dob u godinama			
Prosjek ± SD	68,9 ± 14,9	70,3 ± 12,71	66,9 ± 18,03
Medijan (raspon)	73 (23-90)	73 (44-90)	73 (23-84)
<i>Površinskošireći melanom</i>	n=12	n=8	n=4
Dob u godinama			
Prosjek ± SD	68,9 ± 17	72 ± 10,47	62,75 ± 26,9
Medijan (raspon)	73,5 (51-83)	75 (51-82)	72,5 (23-83)
<i>Lentigo maligna melanom</i>	n=4	n=1	n=3
Dob u godinama			
Prosjek ± SD	63,7 ± 13,9	61 ± 9,4	63,7 ± 17,1
Medijan (raspon)	67 (44-74)	61 (48-77)	73 (44-74)
<i>Nodularni melanom</i>	n=15	n=9	n=6
Dob u godinama			
Prosjek ± SD	70,4 ± 14,1	69,7 ± 15,3	71,3 ± 13,5
Medijan (raspon)	72 (44-90)	72 (44-90)	76 (49-84)
<i>Debljina po Breslowu u mm</i>			
Prosjek	7,4	8	6,67
Medijan (raspon)	7 (0,29-14,0)	7 (0,37-14,0)	7 (0,29-12,0)

**Tablica 6.** Mjesto nastanka melanoma u odnosu na spol:

Lokalizacija	Muškarci	Žene	Ukupno
Skalp	2	1	3
Čelo	1	1	2
Srednja trećina lica	1	1	2
Srednja trećina vrata	0	0	0
Lijevo temporalno	1	0	1
Desno temporalno	3	2	5
Lijeva strana vrata	3	3	6
Desna strana vrata	2	1	3
Lijeva polovica lica	2	1	3
Desna polovica lica	3	3	6

**Tablica 7.** Raspodjela ispitanika u odnosu na poznate prognostičke čimbenike i masu uzorka, u miligramima. Prikazano je vrijeme praćenja u mjesecima a ishod praćenja je zabilježen kao census (1 – živ, u praćenju, 0 – preminuo).

Redni broj	Promjer	Debljina	Mitoze	T	Stadij	Breslow	Clark	TI L	Praćenje	Census	Masa uzorka
1	25	0,6	2	1a	I	1	2	2	69	1	33
2	10	0,7	0	1a	I	1	2	2	54	1	45
3	15	1	4	1a	I	2	3	2	138	1	54
4	7	0,49	1	1a	I	1	2	1	37	0	18
5	7	0,29	2	1a	I	1	4	3	88	1	23
6	24	0,37	2	1b	I	1	2	3	52	1	29
7	14	1,86	4	2a	I	3	4	1	24	0	49
8	20	1,93	6	2a	I	3	4	2	49	1	39
9	20	1,4	3	2a	I	2	3	2	38	0	46
10	25	1,7	6	2a	I	3	3	3	15	0	77
11	13	3,0	6	3a	II	3	4	2	23	0	28
12	15	2,25	4	3a	II	3	3	2	40	0	36
13	17	2,5	4	3a	II	3	3	2	78	0	39
14	11	4	3	3a	II	4	3	2	32	0	68
15	13	2,38	4	3a	II	3	4	2	42	1	67
16	10	2,12	1	3a	II	3	3	1	57	1	52
17	8	2,34	3	3a	II	3	4	2	60	1	106
18	5	4,0	15	3b	II	5	3	2	21	0	60
19	14	3,97	16	3b	II	3	4	3	37	0	87
20	12	3,06	10	3b	II	3	3	3	32	0	49
21	12	2,39	2	3b	II	4	4	3	45	0	74
22	20	2,8	6	3b	II	3	4	2	32	0	106
23	11	3,19	8	3b	II	5	4	1	60	0	67
24	15	7	13	4a	II	4	4	2	21	0	47
25	10	4,1	6	4a	II	4	4	1	49	0	55
26	12	8	5	4a	II	4	5	1	10	0	87
27	14	6	3	4a	II	4	4	3	37	1	48
28	7	4,5	10	4a	II	4	5	1	14	0	60
29	35	12	4	4b	II	5	4	1	11	0	194
30	35	5,44	12	4b	II	4	4	3	78	0	149
31	23	14	7	4b	II	4	4	2	37	1	188
Kontrolna skupina											316

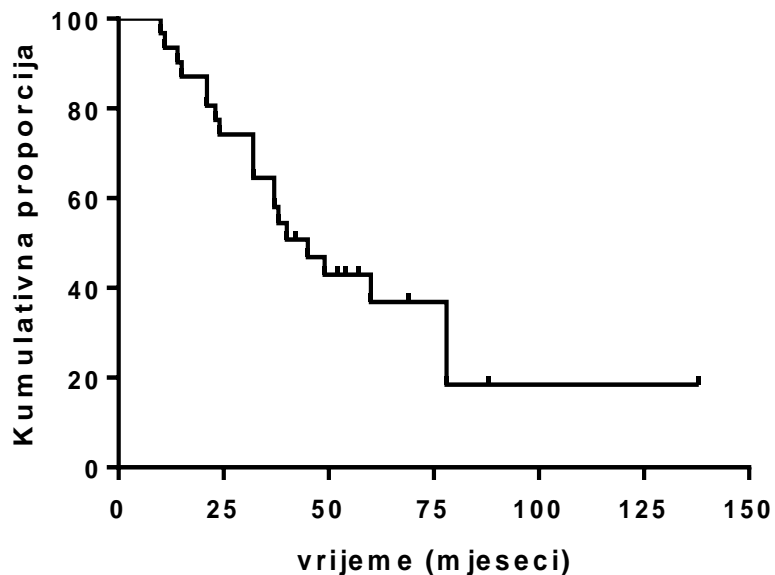
## 5.2. Duljina praćenja (engl. *Time to Event*)

Prosječna duljina praćenja bolesnika, izražena kao aritmetička sredina i standardna devijacija, bila je  $44,51 \pm 26,57$  mjeseci.

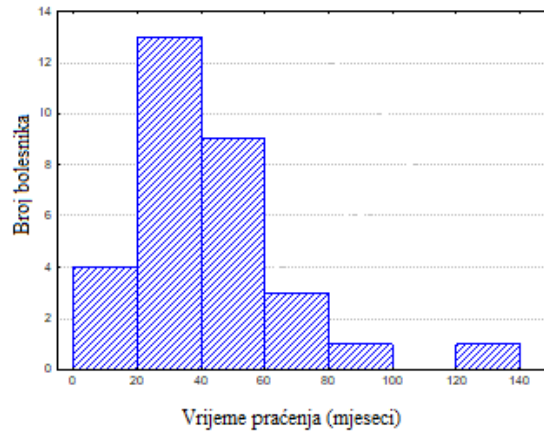
Zbog velike standardne devijacije, medijan je preciznija mjera duljine praćenja i iznosi 38 mjeseci, uz interkvartilni raspon od 24–78 mjeseci (50% svih bolesnika).

Praćenje ovih bolesnika prikazano je korištenjem krivulje preživljenja Kaplan Meier (slike 9 i 10), prikazom desnostrano pomaknutog vremena praćenja u mjesecima.

Zbog ovog pomaka su analize preživljenja izračunate tradicionalnim statističkim metodama – neprecizne. Zbog toga se koriste specijalizirane statističke metode (multivarijatna regresija Cox ili zamjena za ovaj tip analize).

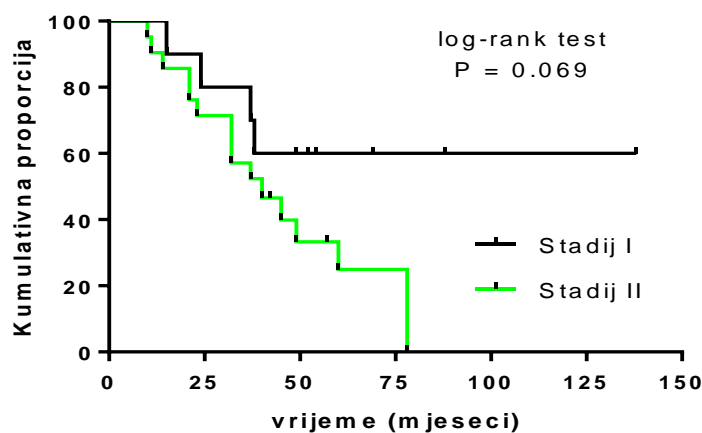


**Slika 9.** Preživljenje bolesnika prikazano krivuljom Kaplan Meier



**Slika 10.** Udesno pomaknuto vrijeme praćenja u mjesecima

Kompletnost praćenja izražava se kao cenzorirana ili kompletna. Kompletno praćenje je ono kod kojeg je kritični događaj, u ovom slučaju smrt ispitanika, zabilježen u zadanom vremenu praćenja. Cenzorirano praćenje označava ono kod kojeg, u tom vremenu, kritični događaj nije nastupio – odnosno, bolesnici su živi. U skupini ispitanika bilo je 20 kritičnih i 11 cenzoriranih događaja. Vidljivo je slabije preživljenje bolesnika u stadiju bolesti II u odnosu na stadij I, u skladu s ranije objavljenim podacima AJCC, a na granici statističke značajnosti obzirom na mali broj bolesnika (Slika 11) (22).



**Slika 11.** Krivulja preživljenja Kaplan Meier u odnosu na stadij bolesti ( $p = 0,069$ , Mantel-Cox log-rank test)

### **5.3. Analiza izraženosti proteina u profilu proteoma malignog melanoma kože glave i vrata**

Izraženost proteina u proteomu tkiva malignog melanoma kože glave i vrata te kontrolne skupine uzoraka, benignih pigmentiranih nevusa kože glave i vrata, analizirana je i prikazana kontinuiranom varijablom izvedenom iz intenziteta kvantifikacije proteina (iBAQ), uz pomoć spektrometra masa.

Ova varijabla predstavlja zbroj intenziteta svih identificiranih peptida, podijeljenu s izražajem pojedinog identificiranog peptida. Može se pretvoriti u apsolutan broj kopija proteina po stanici, uz prethodno određenu količinu proteina u lizatu stanica.

Ta je varijabla pridružena svakom od identificiranih proteina, uz zapis o mogućem onečišćenju i broju identificiranih peptida, pri čemu je granična vrijednost točne identifikacije postavljena na razinu nazočnosti dva više peptida određenog proteina u uzorku (95).

Uz vrijednosti iBAQ je svakom proteinu pridružen i omjer vrijednosti iBAQ ispitanik/kontrola, kao dodatna mjera izraženosti proteina u uzorku, pogodna za statističku analizu.

Svi su uzorci analizirani u triplikatima, kako bi se sa što većom osjetljivošću i specifičnošću potvrdio izražaj svakog novootkrivenog proteina.

U profilu proteoma melanoma je identificirano ukupno 1169 proteina.

Od toga je 29 odbačeno kao potencijalna kontaminacija, a 369 proteina je bilo zastupljeno samo s jednim peptidom. Stoga su i ovi proteini odbačeni kao „nepouzdana identificirani“.

Uvriježeno je da se odbace svi proteini koji nisu izraženi u svim uzorcima. Ovakav pristup olakšava i provedbu analize zajedničkih varijabli.

Na kraju je preostalo 47 proteina koji su izraženi u svim uzorcima, i u kontrolnoj skupini; vrijednosti parametara povezanih s ovim proteinima, u proteomu analiziranih melanoma, prikazane su u tablici 8.

**Tablica 8.** Proteini zastupljeni s najmanje dva peptida, izraženi u svim melanomima i u kontrolnom uzorku, s vrijednostima dobivenim analizom proteoma

Ime proteina	Naziv gena	Oznaka Uniprot baze podataka	Broj peptida	Prosjek	Medijan	Minimum	Maksimum	Donja kvartila	Gornja kvartila	Standardna devijacija
14-3-3 protein zeta/delta	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	>sp P63104 1433Z_HUMAN 14-3-3 protein zeta/delta	10	1.43E+13	1.03E+07	2.85E+04	4.92E+13	4.05E+06	2.71E+07	1.36E+13
40S ribosomski protein S16	ribosomal protein S16	>tr M0R210 M0R210_HUMAN 40S ribosomal protein S16	6	7.13E+12	4.65E+06	1.72E+05	2.26E+13	2.07E+06	1.09E+07	6.31E+12
<b>60S ribosomski protein L7</b>	<b>ribosomal protein L7</b>	<b>sp P18124 RL7_HUMAN 60S ribosomal protein L7</b>	7	2.87E+12	1.03E+06	1.01E+04	1.27E+13	3.01E+05	5.26E+06	3.47E+12
Aktin, alfa srčani mišić 1	actin, alpha, cardiac muscle 1	>sp P68032 ACTC_HUMAN Actin, alpha cardiac muscle 1	19	7.89E+12	2.87E+06	4.20E+05	1.21E+14	1.23E+06	5.50E+06	2.14E+13
Aktin, citoplazmatski 2	actin gamma 1	>sp P63261 ACTG_HUMAN Actin, cytoplasmic 2	20	1.71E+14	1.36E+08	1.75E+07	6.76E+14	8.21E+07	1.99E+08	1.35E+14
Alfa-enolaza	enolase 1	>sp P06733 ENOA_HUMAN Alpha-enolase	16	7.86E+12	4.54E+06	8.32E+03	3.13E+13	2.26E+06	1.05E+07	8.25E+12
Aneksin A1	annexin A1	>sp P04083 ANXA1_HUMAN Annexin A1	16	3.46E+12	9.43E+05	4.56E+04	1.63E+13	4.32E+05	3.86E+06	4.84E+12

<i>Aneksin A5</i>	<i>annexin A5</i>	>sp P08758 ANXA5_HUMAN <i>Annexin A5</i>	15	2.80E+1 3	1.21E+07	1.48E+06	1.18E+14	6.08E+06	4.05E+07	3.17E+13
ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	TP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	>sp P25705 ATPA_HUMAN ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	24	6.90E+1 2	4.06E+06	4.67E+05	7.14E+13	1.92E+06	7.09E+06	1.26E+13
ATP sintaza podjedinica beta, mitohondrijalna	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	>sp P06576 ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial	20	6.11E+1 2	3.69E+06	1.81E+03	5.76E+13	1.78E+06	6.33E+06	1.02E+13
Kalmodulin	calmodulin 1	>sp P62158 CALM_HUMAN Calmodulin	4	8.72E+1 2	6.59E+06	0.00E+00	6.09E+13	2.63E+06	1.06E+07	1.10E+13
Katepsin D	cathepsin D	>tr A0A1B0GW44 A0A1B0GW44_HUMAN Cathepsin D	11	4.56E+1 2	1.25E+06	0.00E+00	2.37E+13	2.11E+05	4.89E+06	7.24E+12
Katepsin G	cathepsin G	>sp P08311 CATG_HUMAN Cathepsin G	6	1.16E+1 3	6.48E+06	3.79E+05	5.13E+13	3.45E+06	1.75E+07	1.33E+13
Kofilin-1	cofilin 1	>sp P23528 COF1_HUMAN Cofilin-1	5	6.57E+1 2	3.34E+06	6.87E+04	3.88E+13	6.61E+05	7.46E+06	8.79E+12
Kolagen alfa-1(VI) lanac	collagen type VI alpha 1 chain	>tr A0A087X0S5 A0A087X0S5_HUMAN Collagen alpha-1(VI) chain	18	2.62E+1 2	1.29E+06	3.19E+03	1.45E+13	3.25E+05	3.95E+06	3.43E+12
Kolagen alfa-3(VI) lanac	collagen type VI alpha 3 chain	>sp P12111-2 CO6A3_HUMAN Isoform 2 of Collagen alpha-3(VI) chain	98	5.05E+1 2	2.86E+06	1.70E+05	2.97E+13	9.16E+05	6.77E+06	6.50E+12
Galektin-3	galectin 3	>sp P17931 LEG3_HUMAN Galectin-3	7	1.56E+1 3	1.08E+07	3.22E+05	7.15E+13	1.62E+06	2.17E+07	1.88E+13
Galektin-3-vežući protein	galectin 3 binding protein	>sp Q08380 LG3BP_HUMAN Galectin-3-binding protein	4	5.67E+1 1	2.44E+05	0.00E+00	6.17E+12	4.99E+04	4.74E+05	1.16E+12

Galektin-7	Galectin 7	>sp P47929 LEG7_HUMAN Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2	7	2.25E+1 3	1.26E+07	1.99E+05	1.08E+14	2.11E+06	3.70E+07	2.55E+13
Gliceralehid-3- fosfate dehidrogenaza	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	>sp P04406 G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12	1.89E+1 3	1.34E+07	4.77E+05	7.16E+13	5.18E+06	2.37E+07	1.80E+13
Heat shock 71 kDa protein	heat shock protein family A (Hsp70) member 8	>sp P11142 HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein	16	3.42E+1 2	2.74E+06	2.56E+04	1.37E+13	9.87E+05	4.58E+06	3.26E+12
Heat shock protein beta-1	heat shock protein family B (small) member 1	>sp P04792 HSPB1_HUMAN Heat shock protein beta-1	13	4.54E+1 3	3.57E+07	3.09E+06	2.27E+14	1.41E+07	5.59E+07	4.73E+13
<b>Heat shock protein HSP 90- alfa</b>	<b>heat shock protein 90 alpha family class A member 1</b>	>sp P07900 HS90A_HUMAN <b>Heat shock protein HSP 90- alpha</b>	12	3.32E+1 2	1.70E+06	5.79E+04	1.86E+13	5.09E+05	4.79E+06	4.17E+12
Hemoglobin podjedinica alfa	hemoglobin subunit alpha 1	>sp P69905 HBA_HUMAN Hemoglobin subunit alpha	8	5.40E+1 4	2.10E+08	1.03E+07	2.30E+15	1.04E+08	7.93E+08	6.41E+14
Hemoglobin podjedinica beta	hemoglobin subunit beta	>sp P68871 HBB_HUMAN Hemoglobin subunit beta	11	8.38E+1 4	3.15E+08	2.15E+07	4.60E+15	1.67E+08	1.06E+09	1.10E+15
<b>Heterogeni nuklearni ribonukleoprote in M</b>	<b>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</b>	>sp P52272-2 HNRPM_HUMAN <b>Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</b>	9	4.27E+1 1	1.75E+05	0.00E+00	2.01E+12	1.71E+04	7.38E+05	5.47E+11
Histon H2A tip 1-J	histone cluster 1 H2A family member j	>sp Q99878 H2A1J_HUMAN Histone H2A type 1-J	7	1.05E+1 5	9.58E+08	9.08E+07	2.76E+15	7.71E+08	1.47E+09	5.56E+14



Histon H2B tip 1-M	histone cluster 1 H2B family member m	>sp Q99879 H2B1M_HUMAN Histone H2B type 1-M	9	4.13E+14	3.75E+08	5.23E+07	1.16E+15	1.76E+08	5.65E+08	2.75E+14
Histon H3	H3 histone family member 3B	>tr K7EK07 K7EK07_HUMAN Histone H3 (Fragment)	5	1.98E+14	1.13E+08	2.89E+06	6.34E+14	4.12E+07	2.81E+08	2.10E+14
Histon H4	histone cluster 1 H4 family member a	>sp P62805 H4_HUMAN Histone H4	13	6.92E+14	6.56E+08	7.58E+07	1.59E+15	5.11E+08	9.46E+08	3.43E+14
Ig kapa lanac C regija	immunoglobulin kappa constant	>sp P01834 IGKC_HUMAN Ig kappa chain C region	3	1.05E+13	7.64E+06	6.40E+04	4.19E+13	3.33E+06	1.60E+07	1.06E+13
Keratin, tip II citoskeletalni 1	keratin 1	>sp P04264 K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1	34	1.17E+13	5.74E+06	3.22E+04	4.78E+13	9.83E+05	1.83E+07	1.43E+13
Keratin, tip II citoskeletalni 5	keratin 5	>sp P13647 K2C5_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 5	39	2.14E+13	2.04E+07	4.88E+05	7.78E+13	6.39E+06	2.83E+07	1.83E+13
Peptidil-prolil cis-trans izomeraza A	peptidylprolyl isomerase A	>sp P62937 PPIA_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	12	2.28E+13	1.27E+07	5.66E+04	1.23E+14	7.47E+06	2.75E+07	2.53E+13
Peroksiredoksin-2	peroxiredoxin 2	>sp P32119 PRDX2_HUMAN Peroxiredoxin-2	13	6.53E+12	5.35E+06	3.95E+05	2.52E+13	2.33E+06	8.09E+06	5.78E+12
Fosfoglicerat kinaza 1	phosphoglycerate kinase 1	>sp P00558 PGK1_HUMAN Phosphoglycerate kinase 1	13	4.38E+12	2.67E+06	2.96E+04	1.77E+13	8.99E+05	7.01E+06	4.67E+12
<b>Profilin-1</b>	<b>profilin 1</b>	>sp P07737 PROF1_HUMAN Profilin-1	7	1.27E+13	8.13E+06	5.06E+05	7.16E+13	3.51E+06	1.57E+07	1.44E+13
Protein S100-A7	S100 calcium binding protein A7	>sp P31151 S10A7_HUMAN Protein S100-A7	7	4.82E+12	2.99E+06	1.67E+03	1.77E+13	1.20E+06	8.89E+06	4.79E+12

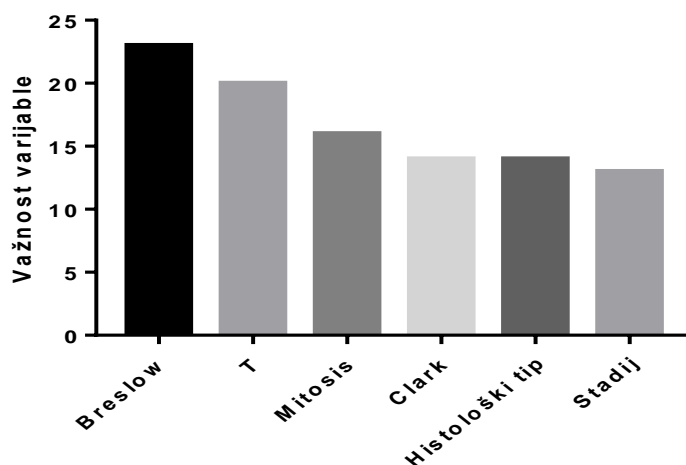
Protein S100-A8	S100 calcium binding protein A8	>sp P05109 S10A8_HUMAN Protein S100-A8	9	1.09E+1 3	8.50E+06	4.51E+05	4.45E+13	2.01E+06	1.91E+07	1.04E+13
Protein S100-A9	S100 calcium binding protein A9	>sp P06702 S10A9_HUMAN Protein S100-A9	9	1.99E+1 3	9.22E+06	1.51E+05	1.50E+14	1.57E+06	2.45E+07	3.03E+13
Putativni factor elongacije 1-alfa-like 3	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 pseudogene 5	>sp Q5VTE0 EF1A3_HUMAN Putative elongation factor 1-alpha-like 3	8	2.48E+1 3	1.60E+07	6.52E+04	1.23E+14	2.04E+06	3.14E+07	3.27E+13
Piruvat kinaza izoforma 2	pyruvate kinase M1/2	>sp P14618 KPYM_HUMAN Pyruvate kinase PKM Isoform 2	19	4.52E+1 3	2.28E+07	1.17E+06	2.55E+14	5.21E+06	6.53E+07	5.96E+13
Serumski albumin	albumin	>sp P02768 ALBU_HUMAN Serum albumin	30	6.62E+1 3	4.60E+07	3.78E+06	2.96E+14	2.44E+07	9.07E+07	6.04E+13
Tubulin alfa-1B lanac	tubulin alpha 1b	>sp P68363 TBA1B_HUMAN Tubulin alpha-1B chain	15	2.04E+1 3	1.04E+07	1.31E+06	7.20E+13	4.29E+06	3.45E+07	1.93E+13
<b><i>Tubulin beta lanac</i></b>	<b><i>tubulin beta class I</i></b>	<b><i>&gt;tr Q5JP53 Q5JP53_HUMAN Tubulin beta chain</i></b>	18	1.85E+1 3	1.14E+07	6.66E+05	8.43E+13	3.33E+06	3.11E+07	2.03E+13
Ubikvitin-60S ribosomski protein	ubiquitin B	>tr J3QS39 J3QS39_HUMAN Polyubiquitin-B (Fragment)	3	3.30E+1 3	2.22E+07	2.11E+06	9.47E+13	1.19E+07	4.45E+07	2.70E+13
Vimentin	vimentin	>sp P08670 VIME_HUMAN Vimentin	51	9.32E+1 3	6.71E+07	1.85E+07	3.11E+14	4.39E+07	1.17E+08	7.35E+13

#### 5.4. Analiza povezanosti poznatih čimbenika prognoze s preživljenjem bolesnika

Nakon završene bioinformatičke obrade proteoma malignog melanoma, učinjena je analiza značaja poznatih čimbenika prognoze u odnosu na preživljenje bolesnika, rekurzivnim particioniranjem (rpart). Rezultati se sastoje od numeričkog i grafičkog dijela. Najvažniji dio numeričkog dijela je opis važnosti varijabli (Slika 12). Varijable debljina po Breslowu, T-kategorija, broj mitozama/mm<sup>2</sup>, stupanj invazije po Clarku, histološki tip tumora i stadij imaju naglašenu važnost u odnosu na ostale čimbenike prognoze (Tablica 9) (Slika 12).

**Tablica 9.** Informacijska vrijednost poznatih čimbenika prognoze

Vrijednost varijable					
Debljina tumora po Breslowu	T-kategorija	Broj mitozama po mm <sup>2</sup>	Stupanj invazije po Clarku	Histološki tip tumora	Stadij bolesti
23	20	16	14	14	13



**Slika 12.** Redosljed poznatih čimbenika prognoze po važnosti

Grafički rezultat analize rpart prikazano je kao stablo odluke koje prikazuje podskupine s maksimalnom razlikom u omjeru rizika. Kriterij po kojem se određuje veličina stabla utemeljeno je na izbjegavanju „usitnjavanju“ odluke.

Pretjerano detaljna stabla odluke mogu savršeno opisivati pojedinačni skup podataka, ali ne moraju predstavljati opći zaključak.

Stabla odluke omogućavaju usporedbu učinkovitosti modela s malim brojem varijabli s modelom koji ima veći broj varijabli, te na taj način omogućuju donošenje odluke o broju varijabli u modelu (Slika 13, Slika 14).

Stablo odluke se interpretira uz pretpostavku da je omjer hazarda (HR) za sve ispitanike 1. Na ovoj razini postoje dva čvora odluke:

1. Prvi čvor odluke koristi varijablu „Breslow“. Ukoliko je vrijednost varijable Breslow manja od 2,5 tada je vrijednost HR 0.37 ( $n = 7$ ). Ukoliko je vrijednost varijable Breslow  $\geq 2,5$  tada je HR = 1,37 ( $n = 24$ ).

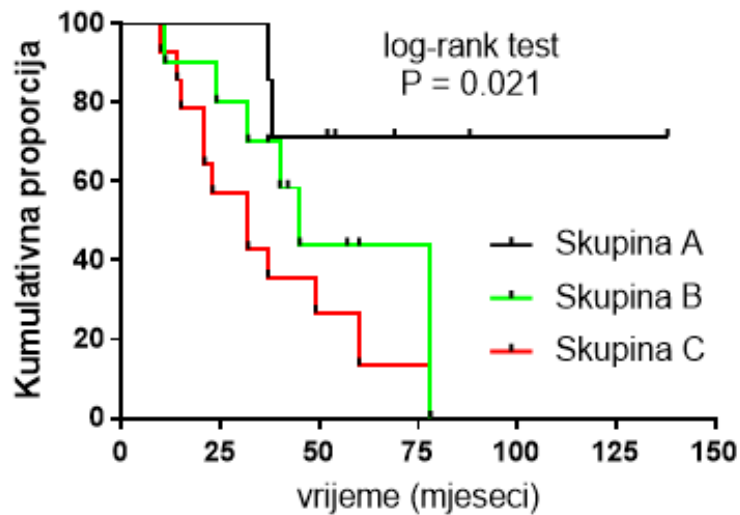
2. Drugi čvor odluke koristi varijablu „broj mitozu po  $\text{mm}^2$ “ i obuhvaća bolesnike u čijim je melanomima vrijednost varijable Breslow  $\geq 2,5$  ( $n = 24$ ). Ako ti ispitanici imaju  $< 4,5$  mitoze po  $\text{mm}^2$ , tada za te bolesnike HR iznosi 0.95 ( $n = 10$ ). Ukoliko je vrijednost varijable „broj mitozu po  $\text{mm}^2$ “  $\geq 4.5$  tada je HR za te ispitanike 1,72 ( $n = 14$ ).

Stablo odluke ekstrahira ukupno tri rizične skupine:

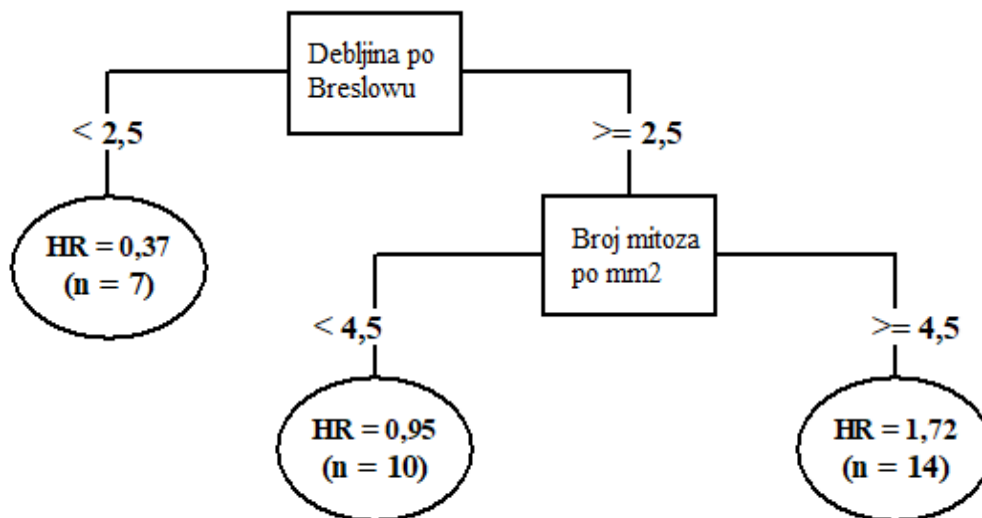
1. Skupina A - Nisko rizična skupina (Breslow  $< 2,5$ ). Ova skupina obuhvaća 7 ispitanika čiji je HR 0.37.

2. Skupina B - Srednje rizični ispitanici (Breslow  $\geq 2,5$  i broj mitozu po  $\text{mm}^2 < 4,5$ ). Ova skupina obuhvaća 10 ispitanika čiji je HR 0.95.

3. Skupina C - Visoko rizična skupina (Breslow  $\geq 2,5$  i broj mitozu po  $\text{mm}^2 \geq 4,5$ ) Ova skupina obuhvaća 14 ispitanika čiji je HR 1,72.



**Slika 13.** Povezanost poznatih čimbenika prognoze s preživljenjem analizirana je Mantel-Cox log rank testom ( $p = 0,021$ ) i prikazana Kaplan Meierovom krivuljom preživljenja.



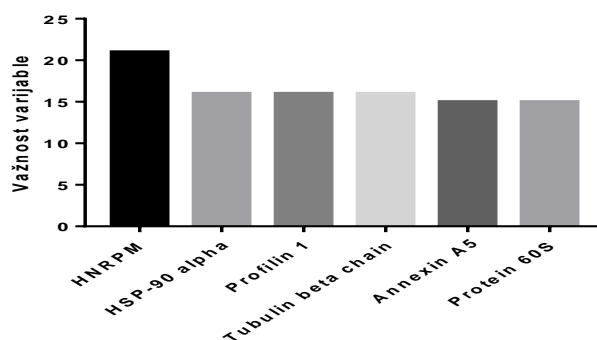
**Slika 14.** Rezultat multivarijatne analize prognostičkih čimbenika strukturiran kao stablo odluke. Čvorovi odluke s varijablama u analizi prikazani su kao ovali, dok pravokutnici predstavljaju završni rezultat – listove. Brojevi u listovima predstavljaju omjer hazarda, koji je izražen u odnosu na sve ispitanike. Multivarijatna analiza poznatih čimbenika prognoze je izdvojila debljinu tumora po Breslowu i broj mitozu po  $\text{mm}^2$  kao najznačajnije čimbenike prognoze.

## 5.5. Analiza povezanosti proteina identificiranih kao novih čimbenika prognoze s preživljenjem bolesnika

Potom je učinjena statistička analiza značaja proteina idenficiranih kao mogućih čimbenika prognoze, u odnosu na preživljenje bolesnika, rekurzivnim particioniranjem (rpart). Rezultati se sastoje od numeričkog i grafičkog dijela. Najvažniji dio numeričkog dijela je opis važnosti varijabli (Slika 15). Varijable (izraženost opisana iBAQ vrijednošću), prikazane stilom „italic, bold“ (Tablica 9): heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M, heat shock protein 90 alpha, profilin-1, tubulin, beta lanac, aneksin-5 i ribosomski protein L7 imaju naglašenu važnost u odnosu na sve ostale čimbenike prognoze, uključujući i poznate čimbenike kao što su debljina melanoma po Breslowu, broj mitozama/mm<sup>2</sup>, T-kategorija, histološki tip tumora i stadij bolesti (Tablice 10 i 11) (Slika 15).

**Tablica 10.** Informacijska vrijednost proteina identificiranih kao mogućih čimbenika prognoze

Vrijednost varijable					
Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M	Heat shock protein 90 alpha	Profilin-1	Tubulin, beta lanac	Aneksin-5	Ribosomski protein L7
21	20	16	14	14	13



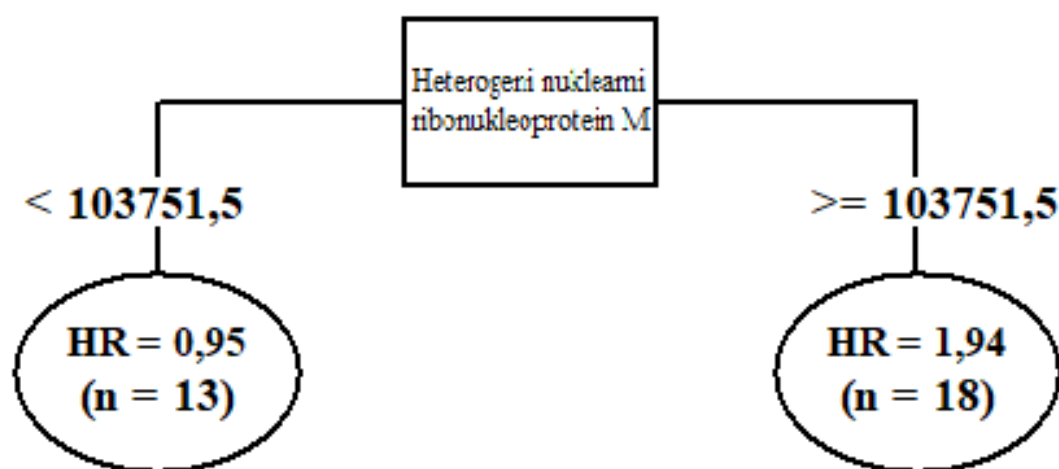
**Slika 15.** Redosljed važnosti proteina identificiranih kao mogućih čimbenika prognoze po važnosti

Stablo odluke se interpretira uz pretpostavku da je hazard ratio za sve ispitanike 1. Postoji samo jedan čvor odluke koji koristi varijablu iBAQ - vrijednost izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M (hnRNP M). Ako je vrijednost varijable iBAQ za hnRNP M manja od 103751,5, tada je vrijednost HR 0.38 (n = 13), a ako je veća ili jednaka toj vrijednosti (103751,5), tada je HR = 1,94 (n = 18).

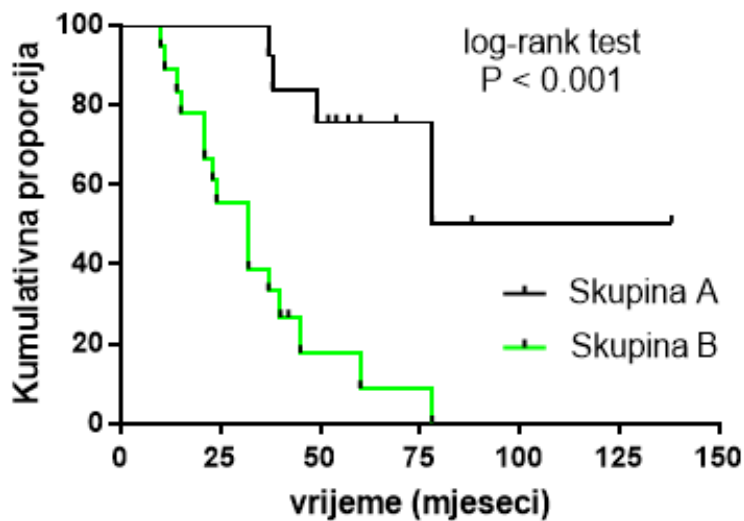
Dakle, postoje samo dvije rizične skupine, ovisne o vrijednosti iBAQ za hn RNP M, neovisno o vrijednosti drugih čimbenika prognoze (Slike 16 i 17) (Tablica 14);

Skupina A – Nisko rizični ispitanici (iBAQ vrijednost izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M < 103751,5); HR = 0.38.

Skupina B – Visoko rizični ispitanici (iBAQ vrijednost izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M ≥ 103751,5); HR = 1.94.



**Slika 16.** Rezultat multivarijatne analize proteina identificiranih kao mogućih novih prognostičkih čimbenika u melanomina ranog stadija, u području glave i vrata, strukturiran kao stablo odluke. Čvorovi odluke s varijablama u analizi su prikazani kao ovali, dok pravokutnici predstavljaju završni rezultat – listove. Brojevi u listovima predstavljaju omjer hazarda, koji je izražen u odnosu na sve ispitanike. Multivarijatna analiza poznatih čimbenika prognoze je izdvojila izraženost heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M kao najznačajniji čimbenik, neovisan o svim ostalim, kliničkim i proteomskim, ispitivanim čimbenicima prognoze.



**Slika 17.** Povezanost vrijednosti izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M s preživljenjem analizirana je Mantel-Cox log rank testom ( $p < 0,001$ ) i prikazana Kaplan Meierovom krivuljom preživljenja.

**Tablica 11.** Prikaz omjera hazarda između skupina bolesnika A i B u odnosu na izraženost proteina heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M, pri čemu je granična vrijednost iBAQ manja ili jednaka i veća od 103751,5.

<b>Medijan preživljenja u mjesecima</b>		
Skupina A		78
Skupina B		32
<b>Omjer hazarda (Test Mantel-Haenszel)</b>		
	A/B	B/A
Omjer i njegova recipročna vrijednost	0,1553	6,44
95% interval pouzdanosti omjera hazarda	0,06015 - 0,4008	2,495 - 16,62
<b>Omjer hazarda (Test log-rank)</b>		
	A/B	B/A
Omjer i njegova recipročna vrijednost	0,1682	5,946
95% interval pouzdanosti omjera hazarda	0,0688 - 0,4111	2,432 - 14,53



Učinjena statistička obrada daje opći zaključak: vrijednost izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M je glavni prognostički čimbenik u ispitivanom skupu podataka. Neovisan je o svim ostalim ispitivanim prognostičkim čimbenicima, statistički je značajan, te ima i klinički značaj zbog velike razlike u omjeru hazarda.

## 6. RASPRAVA

Incidencija malignog melanoma kože glave i vrata u svijetu se povećava. Čak 90% ukupne smrtnosti od zloćudnih novotvorina kože otpada upravo na melanom. Za uznapredovali melanom ima vrlo malo učinkovitih mogućnosti liječenja.

Trenutno dostupne mogućnosti otkrivanja, predviđanja tijeka bolesti i postterapijskog praćenja ovise o kliničkim, morfološkim i histopatološkim karakteristikama tumora. Svi ovi čimbenici pružaju ograničen uvid u biološko ponašanje melanoma i ishod bolesti. Stoga je melanom nepredvidiva bolest, posebno u ranim stadijima bolesti.

Iako se podatci o dobi, lokalizaciji primarnog melanoma, broju infiltriranih limfnih čvorova i prisutnosti udaljenih metastaza, zajedno s debljinom tumora i prisutnošću ulceracije, koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi, samo se debljina melanoma po Breslowu (u milimetrima) pokazala učinkovitim prognostičkim čimbenikom u melanomima kože glave i vrata u stadijima I i II (3).

Ovaj je čimbenik svakako nedovoljan u predviđanju agresivnosti melanoma, zato što i bolesnici u stadiju T1a mogu razviti metastatsku bolest, usprkos pravovremenom liječenju. U odnosu na biljege koji se mogu odrediti u serumu, samo je LDH pouzdan prognostički biljeg, ali u uznapredovalom stadiju IV. Istraživanja vezana uz otkrivanje pouzdanog biljega koji bi bio koristan za predviđanje nastanka metastatske bolesti u oboljelih čiji je melanom u ranom stadiju (I i/ili II) predstavljaju velik izazov (106).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na nove, klinički provjerljive biljege za maligni melanom kože glave i vrata u ranom stadiju te kao takvi predstavljaju vrijedan dodatak dosadašnjim istraživanjima (107) (Tablica 12).

**Tablica 12.** Objavljena istraživanja potencijalnih biljega tumora u bolesnika s malignim melanomom kože (107).

Izvor biljega	Proteomska metoda	Identificirani proteini	Veličina uzorka
Serum	SELDI	Proteomski profil bez identificiranih proteina	205 uzoraka seruma bolesnika svih stadija
Serum		Proteomski profil bez identificiranih proteina	49 uzoraka seruma bolesnika stadija I i II
Serum		Amiloid A (SAA) i C-reaktivni protein (CRP)	596 uzoraka seruma bolesnika svih stadija
Serum	SEREX	Galektin-3	94 uzorka seruma bolesnika svih stadija
Serum	SERPA	Eukariotski faktor elongacije 2 (EEF2), enolaza 1 (ENO1), aldolaza A (ALDOA), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), heterogeni nuklearni ribonukleoproteini (HNRNP) A2/B1	10 uzoraka seruma bolesnika svih stadija i 3 zdrave kontrole
Serum	Glikopreinski microarray	94 kDa protein pridružen glukozi (GRP94), kisela ceramidaza (ASAHI), katepsin D (CTSD), laktatna dehidrogenaza B (LDHB)	27 uzoraka bolesnika stadija I i II i 16 bolesnika stadija III i IV
Serum	Nanočestična hidrogel klopka	Proapoptotični protein Bak	29 uzoraka seruma bolesnika stadija I i II, 26 uzoraka seruma bolesnika s atipičnim nevusima i 79 zdravih kontrola
Linija stanica melanoma	SILAC	26 različito izraženih proteina	SBC12 maligni melanom zaustavljen u radijalnoj fazi rasta i SKmel28 iz metastaza u koži
Linija stanica melanoma		CUB-domena-sadržavajući protein 1 (CDCP1)	A375 maligni melanom niskog metastatskog potencijala i MA2 visoki metastatski potencijal
Linija stanica melanoma	2DE MS	ciklofilin A	WM-115 (stadiji I i II) i WM-266-4 (metastatski melanom)
Linija stanica melanoma		Aneksin-1	B16F10 i B16B16 maligni melanom miševa
Linija stanica melanoma		Nukleofozmin B23, čimbenik rasta dobiven iz hepatoma (HDGF)	Dvije stanične linije melanocita i 12 linija melanoma

Linija stanica melanoma		Galaktin-1 (Gal-1), inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza 2 (IMPDH2), serin/treonin proteinska fosfataza 2A65 kDa regulatorna podjedinica A $\alpha$ izoforma, protein DJ-1 (PP2A), ciklofilin A (CypA), kofilin-1 (CFL1)	FOM78 melanocitna stanična linija i A375 i 526 stanične linije melanoma
Linija stanica melanoma		GPX5, periostin (POSTN), staniokalcin-1 (STC-1)	Primarni melanomi svih stadija
Tkivo	Microarray tkiva	Sintaksin-7 (STX7)	Normalni melanociti, benigni pigmentirani nevusi, atipični nevusi i uzorci primarnih malignih melanoma
			69 uzoraka tkiva limfnih čvorova infiltriranih metastatskim melanomom i 17 kontrolnih uzoraka limfnih čvorova slobodnih od infiltracije
Tkivo	MALDI IMS	Više od 40 proteina identificirano	

### 6.1. Mogući biljezi tumora dobiveni istraživanjima seruma bolesnika s malignim melanomom

U posljednjih nekoliko godina proteomika postaje sve značajnija metoda u istraživanju biljega tumora. Rezultati istraživanja dobiveni ovom učinkovitom metodom omogućuju jednostavnije razvrstavanje bolesnika u prognostičke skupine te personaliziran pristup liječenju, kako bi se na vrijeme pokušalo spriječiti napredovanje bolesti. Razvoj metoda koje omogućuju otvaranje posve novog područja u humanoj medicini, a naročito molekularnoj onkologiji, je prvenstveno usmjeren na otkrivanje i određivanje količine određenog proteina u serumu bolesnika s razvijenom bolešću.

Činjenica je da su metode koje se primjenjuju u analizi uzoraka tkiva bile nerijetko zanemarene u dosadašnjim istraživanjima, prvenstveno zbog visokih kriterija koji se odnose na kvalitetu

uzorka, ali i složenosti metode, u konkretnom slučaju – metoda vezanih uz analizu proteoma. Krv, u koju proteini koje sintetiziraju stanice tumora, mogu dospjeti ili izravnim izlučivanjem, ili raspadom tkiva tumora, lako se uzorkuje. Iako se korištenjem krvi može odrediti nazočnost/količina velikog broja biljega/proteina, za većinu zloćudnih tumora još uvijek ne postoji biljeg kojime bi se, na temelju njegove prisutnosti u krvi, mogao točno predvidjeti, stadij bolesti, odnosno – uspješnost liječenja (111).

Po svojoj definiciji, biljezi tumora su jedno od najpouzdanijih oruđa i u otkrivanju bolesti, i u praćenju njenog napretka, i u praćenju odgovora na liječenje. Na žalost, otkriveno ih je tek nekoliko. Idealnim bi se biljekom tumora bolesnici mogli precizno razvrstati, u odnosu na rizik od progresije bolesti.

Protein S100 $\beta$  (od engl. S100 calcium binding protein B) i LDH su opisani kao mogući kandidati. Protein S100 $\beta$ , acidofilna molekula male molekulske mase od 46 kDa uključen je u prijenos signala koji reguliraju enzimske aktivnosti i rast citoskeleta melanoma. Pokazao je zadovoljavajuću razinu osjetljivosti u bolesnika s izostankom odgovora na liječenje i identifikaciji bolesnika s visokim rizikom za napredovanje bolesti koja je u stadiju I i II (111). Njegove izvanstanične funkcije uključuju privlačenje leukocita, aktivaciju makrofaga i modulacija proliferacije stanica. Može djelovati i kao pro-apoptični čimbenik, ali i kao promotor tumorskog rasta, preko inhibicije proteina TP53 (111). Rutinski se koristi kao biljeg u dijagnosticiranju malignog melanoma imunohistokemijom. Na žalost, određivanje njegove razine u serumu ne rezultira dovoljnom specifičnošću, što onemogućuje njegovu upotrebu kao biljega melanoma u ranom stadiju (I/II). Naime, povišena razina proteina S100 $\beta$  u serumu nalaz se tek u 1,3 % bolesnika u stadiju I i 8,7 % bolesnika u stadiju II. Sukladno tome, vrijednost S100 $\beta$  u serumu ne može se koristiti za probir ili određivanje rizika u u oboljelih od melanoma u ranom stadiju.

U kasnijim stadijima bolesti je dobar biljeg kraćeg preživljenja. Ovo je potvrđeno u nekoliko istraživanja, na ukupno 3393 bolesnika (omjer rizika 2,23, 95 %, CI 1,92-2,58), na čijim je melanomima pouzdano pokazano da pozitivno korelira s debljinom tumora (111, 112). U povrđivanju metastatske bolesti, vezano uz melanome debljine > 4 mm te koncentracije S100β u serumu > 0,22 μg/L, razina osjetljivosti je 91%, a specifičnosti 95 % (112). Također je utvrđena i dobra povezanost (bolja u odnosu na pad LDH) između pada koncentracije S100β u serumu nakon primjene kemoterapije u bolesnika u stadiju IV (98). Multivarijatnom analizom nije pokazano da uključivanje koncentracije S100β u serumu (uobičajene vrijednosti se kreću od 0,02 do 1,54 μg/L), kao prognostičkog čimbenika u sustav stupnjevanja po AJCC, poboljšava točnost pri razvrstavanju bolesnika u pojedine prognostičke stadije (113).

Nezanemariv problem u kliničkoj primjeni ovog biljega je njegova nespecifičnost, odnosno povišena koncentracija u serumu i u bolesnika s ozljedama bubrega, jetre, jetrenim metastazama raznih primarnih tumora te raznim sustavnim upalnim i infektivnim bolestima (113).

Drugi po važnosti biljeg u serumu oboljelih od melanoma je LDH (uobičajene vrijednosti u serumu kreću se od 140 jedinica po litri (U/L) do 280 U/L), enzim koji katalizira pretvorbu piruvata u laktat u uvjetima nedostatka kisika, do čega dolazi zbog naglog porasta mase i specifičnih metaboličkih puteva koji se razvijaju u zloćudnom tumoru. Razina LDH u serumu je povišena u mnogim tumorskim bolestima, ne samo u melanomu kože glave i vrata. Brojnim je multivarijatnim analizama pokazana njegova nezavisna negativna prognostička vrijednost, ali tek u bolesnika s razvijenom metastatskom bolešću (114).

Čimbenik inhibicije aktivnosti melanoma (MIA, od engl. melanoma-inhibiting activity;) je toplivi protein veličine 11 kDa, snažno izražen u stanicama melanoma. Djeluje kao autokrini čimbenik rasta. Paradoksalno, pojačano je izražen u melanomima višeg stupnja invazivnosti, sklonim metastatskom širenju. Porast koncentracije MIA korelira s kraćim preživljenjem. U

ranim stadijima bolesti je njegova koncentracija povišena u 13% bolesnika u stadiju I te 23% bolesnika u stadiju II. Koncentracija MIA pouzdano opada tijekom adjuvantnog liječenja (115). Istraživanjem na 350 bolesnika u stadijima I i II koji su proglašeni izliječenima po završenom kirurškom liječenju, pokazan je porast koncentracije MIA u serumu 15 od 32 bolesnika koji su razvili metastatsku bolest. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da porast razine MIA u serumu, u nekih bolesnika, prethodi pojavi klinički manifestne metastatske bolesti (115).

Postoji i istraživanje kojim je pokazano (serum; 373 bolesnika s metastatskim melanomom; mjerenje S100 $\beta$ , MIA, LDH) da najveću osjetljivost psojeduje S100 $\beta$  (86 %), potom MIA (80 %) i LDH (48 %). S druge strane, LDH ima najvišu specifičnost (98 %), a slijede S100 $\beta$  (91 %), i MIA (62 %) (116).

Imunosupresivno djelovanje malignog melanoma u neposrednom okružju je već opisano. Središnji mehanizam ovog djelovanja je skretanje imunskog odgovora prema kroničnoj upali pomoću medijatora upale koje oslobađaju stanice tumora i okolne upalne stanice. (117). Povišena koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) je povezana s metastatskom bolešću i aktivacijom Th2 grane (od engl. T-helper cell; T-stanica pomagač) imunog odgovora koja vodi u imunosnu hiporeaktivnost i smanjuju sposobnost obrane ciljnih tkiva od metastatskih procesa. Upotrebljivost VEGF kao prognostičkog biljega je dvojben, zbog toga što su rezultati istraživanja proturječni. Jedno je istraživanje pokazalo da je povišena koncentracija VEGF u serumu nezavisan negativan prognostički čimbenik za ukupno preživljenje, ali ti rezultati nisu potvrđeni (118).

Brojni su cirkulirajući proteini, analizirani kao mogući biljezi tumora. Najčešće su se analizirale koncentracije 5-S-cisteinildope, L-DOPA/L-tirozinaze i čimbenike diferencijacije melanocita, topivih intracelularnih adhezijskih molekula 1 i 2, matriks-metaloproteinaza 1 i 9, inhibitora metaloproteinaza 1 i 2 u tkivima, interleukina 6 i 10, topivih HLA-molekula, albumina, piruvat kinaze M2 i visokomolekularnog antigena pridruženog melanomu. Niti

jedno istraživanje nije pokazalo osjetljivost ili specifičnost veću od prethodno dobivenih rezultata analize proteina S100 $\beta$  i LDH (118).

Kako bi se poboljšalo otkrivanje mogućih biljega tumora niske koncentracije u serumu, poboljšavane su pre-analitičke metode otkrivanja proteina u serumu. One su i dalje prvenstveno ometene činjenicom da preko 97 % proteinskog sadržaja seruma čine albumin, imunoglobulini, fibrinogen, alfa-1 antitripsin, alfa-2 makroglobulin, transferin i lipoproteini, što znači da je omjer količina albumina i svih ostalih, sh mogućih biljega tumora između  $10^6$  i  $10^9$ . Zbog toga je precizna identifikacija ne-albuminskih proteina u serumu otežana. Iako se upotreba seruma kao temeljenog medija za istraživanje biljega tumora čini samorazumljivom, prije navedene poteškoće predstavljaju i dalje teško rješiv problem. Već postoje tehnike kojima se s velikom sigurnošću i primjerenom brzinom u kliničkom okružju mogu kvantificirati biljezi tumora. Jedan od primjera je metoda ELISA (od engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) koja se koristi za otkrivanje cirkulirajućih proteina u krvi.

Pouzdanost otkrivanja biljega tumora se nastojala povećati uvođenjem stabilnih izotopa u kombinaciji s kvantitativnom analizom proteoma spektrom masa. Isprobane su i metode identifikacije cirkulirajućih stanica melanoma u serumu pomoću metode reverzna transkripcija - lančana reakcija polimerazom (RT-PCR, od engl. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), ali bez reproducibilnih rezultata izvan matičnog laboratorija i s velikim brojem lažno pozitivnih rezultata (119)).

Pojačana aktivnost kinaze ERK koja čini dio mehanizma regulacije staničnog rasta posredovanog aktivacijom kinaza RAS-RAF je čest nalaz u zloćudnim tumorima. Mutacije protein kinaze B-Raf (BRAF) na poziciji 600 (BRAF V600E) nalaze se u 31 % linija stanica primarnih melanoma i 60 % linija stanica metastatskih melanoma. Određivanje razine cirkulirajuće DNA BRAF u serumu 103 pacijenta s malignim melanomom kože svih stadija je pokazalo da povišena koncentracija DNA BRAF nakon adjuvantnog ili primarnog



kemoterapijskog liječenja ukazuje na bolesnike s lošijim preživljenjem. Međutim, zadovoljavajuća pouzdanost se pokazuje tek u serumu bolesnika s vrlo uznapredovalom metastatskom bolešću. Novije metode, poput matriks-potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (engl. Matrix Assisted LASER Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry; MALDI TOF), smanjuju prag otkrivanja cirkulirajuće DNA na jednu kopiju po uzorku.

Nažalost, identificiran je i alternativni mehanizam aktivacije NRAS i MEK1/2 puta i pojačanja izražaja gena BRAF kao odgovora na liječenje, što objašnjava neuspjeh u održavanju učinaka liječenja (96, 120, 121, 122).

Dodatne su analize seruma metodom MALDI TOF u 39 oboljelih od melanoma u stadijima III i IV, tijekom liječenja vemurafenibom, otkrile četiri snažnije, i pet slabije izraženih proteina u bolesnika koji su odgovorili na liječenje i živjeli dulje, a u tijeku su i prospektivna kohortna istraživanja, na većem broju bolesnika (122).

## **6.2. Mogući biljezi tumora dobivenih istraživanjima linija stanica melanoma**

Tek je nekoliko istraživanja proteoma izvedeno na staničnim linijama melanoma visokog i niskog rizika za metastaziranje (SBCL2 – linija melanoma u radijalnoj fazi rasta i Skmel28 – metastatski melanom) u kojima su otkrivena ukupno 582 proteina specifična za melanom, a njih 26 bilo je različito izraženo u ovim linijama. Kao mogući klinički upotrebljiv biljeg tumora naveden je CDCP1, površinski biljeg u stanica metastatskog melanoma koji je povezan s izražajem obitelji Src-kinaza, a koje inhibiraju lijekovi trenutno korišteni u liječenju uznapredovale bolesti. Mjerenjem količine izraženog CDCP1 mogao bi se pratiti učinak već postojećih lijekova, ali još nisu izvedena istraživanja koja bi tu mogućnost potvrdila (123).

Usporedbe proteoma staničnih linija melanocita, primarnih melanoma i metastatskih melanoma pokazale su razlike u izražaju proteina koje bi mogle upućivati na čimbenike onkogeneze, povezivanjem progresije bolesti s pojačanim izražajem „heat shock“ obitelji proteina (124).

Metode temeljene na afinitetnom pročišćavanju ili zadržavanju proteina nanočesticama u klopama su uspješno identificirale 24 moguća nova serumska biljega tumora, prije svega Bak skupinu proteina povezanih s apoptozom koja je značajno slabije izražena u serumu bolesnika s malignim melanomom debljine  $> 1$  mm, ali njihov značaj nije potvrđen u većim istraživanjima (125).

Nadalje, istraživanjima na linijama stanicama melanoma pokazan je povišen izražaj aneksina-1 i ciklofilina A, proteina uključenih u razgradnju izvanstaničnog matriksa u metastatskih melanoma. Njima su pridruženi nukleofosmin B23 i čimbenik rasta dobiven iz hepatoma (engl. hepatoma derived growth factor; HDGF), kao biljezi neoangiogeneze i migracije stanica melanoma, ali bez potvrde *in vivo* (126).

Komparativna analiza proteoma je pokazala nekoliko proteina koji su različito izraženi u kulturama stanica melanoma u odnosu na kulture pigmentiranih nevusa: galektin-1, inozin-5'-monofosfat dehidrogenazu, serin/treonin-protein fosfatazu 2A, protein DJ-1, ciklofilin A i kofilin-1 (127).

Izvedena su i praktična istraživanja transkriptoma i proteoma linija stanica melanoma, kojima se nastojala objasniti metabolička raznolikost melanoma zbog koje se razvija neosjetljivost na inhibitore BRAF već nakon 2 do 18 mjeseci. Otkrivene su mutacije odgovorne za neosjetljivost na lijekove, no višestruke mutacije u molekuli DNA u pojedinim linijama stanica melanoma otežale jednoznačnu interpretaciju nalaza (128).

Istraživanja na linijama stanica melanoma su relativno jednostavna zbog dostupnosti materijala, ako se radi na komercijalno dostupnim linijama. Ako se radi s primarnim kulturama, javljaju se mnogobrojne metodološke poteškoće, primarno vezane uz prisustvo raznolikih mutacija. Navedena se istraživanja mogu shvatiti kao početna točka daljih istraživanja koja tek trebaju objasniti ulogu različito izraženih proteina i njihove moguću povezanost s odgovorima na liječenje ili povezanošću s prognozom bolesti u ranim stadijima bolesti. Važno je reći da linije stanica ni na koji način ne mogu u potpunosti „imitirati“ procese u tkivu melanoma, u bolesniku.

### **6.3. Melanom - mogući biljezi u stvarnom tumoru**

Ključ razumijevanju ponašanja melanoma nalazi se u pronalaženju i razumijevanju razlika u proteomu benignog i malignog oblika tumora. Istraživanja biljega tumora izravno na tkivu melanoma su do sada bila nepoznanica, iako je upravo to uzorak koji je izravno vezan s klinički važnim informacijama. Jedno objavljeno istraživanje metodom analize proteoma, temeljeno na izolaciji proteina protutijelima, je kao mogući biljeg tumora izdvojilo sintaksin-7, protein izražaja obrnuto proporcionalnog rastu melanoma i smanjenog izražaja u agresivnih melanoma (129).

Jedino do sada objavljeno istraživanje na tkivu bolesnika oboljelih od melanoma kože u stadijima III i IV je učinjeno slikovnom spektrometrijom masa (MALDI IMS), kojom se analiziralo 69 metastatskih limfnih čvorova i 17 usporednih limfnih čvorova bez metastaza. Rezultati upućuju na mogućnost razlikovanja tkiva na osnovu proteomskog profila tkiva koji je identificirao 12 proteina povezanih s prognozom, a različito izraženih u analiziranim čvorovima. Na osnovu razine izraženosti citokroma C, S100 A6, histona H4, timozina  $\beta$ -4m,

timozina  $\beta$ -10 i ubikvitina, bolesnike je bilo moguće ispravno svrstati u prognostičke skupine s boljim, odnosno lošijim preživljenjem (130).

#### **6.4. Stvaranje i analiza proteomskog profila tkiva malignog melanoma kože glave i vrata**

Rezultatima dosadašnjih istraživanja predložen je velik broj mogućih kandidata - biljega tumora (Tablica 12). Za sve njih nedostaju potvrde dobivene analizom tkiva melanoma u većim skupinama bolesnika. Glavne tehničke teškoće nisu nužno povezane s mjerenjem količine proteina, već pripremanjem tkiva za uspješnu i ponovljivu proteomsku proteoma. Dok krv ima jednu vrst nedostataka povezanu s teškoćom izolacije biljega tumora, u parafin uklopljena fiksirana tkiva bolesnika pružaju sasvim drugi niz izazova, povezanih s deparafinizacijom i pročišćavanjem uzorka. Istraživanja biljega tumora na smrznutom tkivu primarnih tumora je problematično zbog nestabilnosti i unutarnje heterogenosti uzorka, dok je tkivo fiksirano formalinom i uloženo u parafin (engl. formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) vrlo stabilno i može se koristiti u širokom spektru proteomskih metoda. U praksi je korištenje ovog tkiva sve donedavno bilo otežano nedovoljno uspješnim izvlačenjem proteina unakrsno kovalentno povezanih s formalinom.

Na temelju pionirskih pokušaja izdvajanja iskoristive količine proteina za proteomsku analizu spektrometrijom masa, otvorila se mogućnost istraživanja na arhivskom materijalu bolesnika (131). Prvom je opisanom analizom laserskim mikrodisektorom odvojeno približno  $10^5$  stanica malignog melanoma i pigmentiranog nevusa, proteini su izdvojeni pomoću komercijalnog kompleta kemikalija, a uzorak je analiziran elektroforezom SDS-PAGE (od engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), izložen djelovanju tripsina i analiziran tekućinskom kromatografijom - spektrometrijom masa (LC MS). Ovim je postupkom

identificirano 888 proteina, od kojih 390 različito eksprimiranih u dvije vrste tkiva (104). Pokazalo se kako prije analize spektrometrijom masa treba napraviti multidimenzijsku kromatografiju triptičkih ili intaktnih proteina i osigurati minimalnu masu peptida od 1-3  $\mu$ g, koliko je potrebno za uspješnu analizu (132).

Osnovna je metoda slična protokolu korištenom u ovom istraživanju, uz modifikaciju protokola prema vlastitom iskustvu i drugoj objavljenoj literaturi.

Misao vodilja ove radnje temelji se na interpretaciji podataka koji se vežu uz nekoliko važnih pitanja; a) je li uzorak reprezentativan?, b) jesu li korištene statističke metode valjane?, c) što se, na temelju dobivenih rezultata, smije zaključiti?, d) jesu li dobiveni podatci usporedivi s već objavljenim istraživanjima? i e) imaju li dobiveni rezultati klinički značaj?

Ovo je istraživanje osmišljeno kako bi se identificirao proteomski profil tkiva malignog melanoma kože glave i vrata u ranim stadijima, pri čemu je bilo potrebno razriješiti nekoliko objektivnih teškoća. Prije svega, radi se o analizi velikog broja varijabli na malom broju ispitanika. S obzirom na do sada objavljena istraživanja, ovo je prvo koje je povežalo kliničke podatke s proteinima - potencijalno upotrebljivim biljezima tumora. Pravila o odnosu broja varijabli i broju ispitanika nisu istovjetna za sve korištene testove, te su u uvjetima prekoračenja odnosa broja ispitanika i broja varijabli (idealni omjer je 5:1) korišteni statistički testovi koji su manje osjetljivi u odnosu na promjenu omjera. Povezanost izražaja pojedinih proteina s preživljenjem bolesnika je analizirana multivarijatnom analizom te ne predstavlja otegotnu okolnost interpretaciji rezultata. Programski jezik R, korišten u analizi podataka izvršno razjašnjava kompleksne i nelinearne interakcije, te omogućuje dobivanje pouzdanih zaključaka i na relativno malom broju ispitanika i/ili varijabli. Osim toga, s algoritmima RP mogu se

izvesti pouzdani zaključci čak i ako nedostaje dio podataka. Zbog toga se rezultati dobiveni u ovom istraživanju mogu smatrati relevantnima unatoč malom broju ispitanika.

Usprkos velikim tehničkim poteškoćama vezanim uz izdvajanje proteina iz tkiva malignog melanoma, u analizi profila proteoma je identificirano više od tisuću proteina, što potvrđuje velik tehnički potencijal metode. Uzorci tkiva malignog melanoma u ranim stadijima su izuzetno maleni, a priprema uzoraka zahtijeva veliko tehničko iskustvo. Ipak, uz modifikacije originalno opisanih protokola izdvajanja proteina je i u ovako malim uzorcima tkiva bilo moguće identificirati do sada najopsežniji objavljen proteomski profil malignog melanoma (Tablica 8).

Uzorci su analizirani u triplikatima. Prvi je korak u smanjivanju varijabilnosti uzorka bio odbacivanje svih proteina koji nisu identificirani s dva ili više peptida u pojedinom uzorku, a potom i provjera izraženosti proteina u kontrolnom i u ispitivanom uzorku. Svi su proteini identificirani u uzorcima melanoma identificirani i u kontrolnom uzorku. Na ovaj je način reduciran najveći broj podataka; u obzir je uzeto tek 47/1169 identificiranih proteina – 3,95%. Ovaj način „filtriranja“ je uobičajen u istraživanjima proteoma i ne predstavlja neuobičajenu veliku redukciju podataka.

Svi proteini identificirani u prethodnim istraživanjima (Tablica 12) nalaze se profilu proteoma melanoma u ovoj radnji. Pri ocjeni vjerodostojnosti rezultata važno je napomenuti kako su statističke analize *fold change* broja pokazala rezultate istovjetne onima koji su dobivni analizom iBAQ vrijednosti uzoraka. Ova činjenica dodatno potvrđuje početnu hipotezu.

U analizi svih prikazanih rezultata naročito je važna dosljednost u povezivanju kliničke slike i proteoma rekurzivnim particioniranjem. Kao najsnažniji klinički prognostički čimbenici izdvojeni su debljina tumora po Breslowu i broj mitozâ po mm<sup>2</sup>, što je u skladu s podacima koji su dobiveni meta-analizama na mnogo većim setovima podataka. Podatci izraženi kao

stablo odluke sažimaju svakodnevne kliničke odluke u liječenju pacijenata s ranim melanomom. Ujedno potvrđuju vrijednost metode i reprezentativnost uzorka.

Analiza podataka je pokazala da su s preživljenjem povezani; heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M (hnRNP M), heat shock protein 90 alpha, profilin-1, beta lanac tubulina, aneksin-5 i ribosomski protein L7.

Ovi proteini nisu povezani s preživljenjem ili s poznatim prognostičkim čimbenicima niti u jednom do sada objavljenom istraživanju. Stoga predstavljaju najznačajniji znanstveni doprinos ovog istraživanja. Važno je istaknuti da je ovo prvo istraživanje koje je povezalo izražaj proteina u profilu proteoma tkiva malignog melanoma s prognozom bolesti. Posebno je zanimljivo kako analiza rpart identificira sve navedene proteine kao nezavisne čimbenike prognoze, s mnogo većom informacijskom vrijednošću - odnosno, snagom u odnosu na sve poznate čimbenike prognoze (pa čak i debljinom tumora po Breslowu). Dodatno, rezultati ovog istraživanja nisu vezani uz populaciju i omjer rizika skupine, nego su identificirani omjeri hazarda pokazani za individualne bolesnike.

#### **6.4.1. Značaj proteina aneksin 5 kao čimbenika prognoze**

Aneksin 5 je protein, u ovom istraživanju identificiran kao biljeg snažno povezan s prognozom melanoma, koji inhibira protein kinazu C i o kalciju ovisan fosfolipid-vežući protein. Poznat je pod nazivima: placentalni antikoagulantni protein I, inhibitor tromboplastina V, endoneksin II, kalfobindin I i lipokortin V. Pripisuju mu se značajne uloge u regulaciji onkogeneze putem poticanja proliferacije stanica, prijenosa signala, egzo- i endocitoze i apoptoze. Nalazi se na dugačkom kraku kromosoma 4 (4q27). Gen kodira protine molekularne mase od 35,9 kDa, građen od 320 aminokiselina. Gen *ANXA5* posjeduje ima 14 eksona, a njegove su mutacije povezane s habitualnim pobačajem u žena.

Još nije opisan kao biljeg tumora u bolesnika s malignim melanomom, iako je sličan protein iz obitelji aneksina (aneksin 1, *ANXA1*) identificiran kao pojačano izražen u linijama stanica melanoma visokog invazivnog potencijala (A2058 i A375), ali ne i u linijama stanica smanjene invazivnosti, SK-MEL-5. Mehanizam povećanja invazivnog potencijala je eksperimentalno pokazan potaknutim izražajem proteina *ANXA1* butiratom, što je dovelo do smanjenja ispoljavanja epitelijskog biljega, E-kadherina. Na sličan način je pokazano i smanjenje invazivnog potencijala utišavanjem ispoljavanja proteina *ANXA1* malim interferirajućim odsječcima RNA, što je rezultiralo pojačanim ispoljavanjem E-kadherina (133).

Objavljeni su i rezultati istraživanja koji povezuju njegov pojačan izražaj u profilu proteoma tkiva karcinoma pluća s kraćim preživljenjem (134). Putevi glikoliza i glukoneogeneza se smatraju najvažnijim putevima djelovanja aneksina 5, u linijama ne-malih stanica (NSCLC, od engl. Non-Small Cell Lung Carcinoma) karcinoma pluća (135).

Učinci pojačanja ispoljavanja aneksina 5 su pleiotropni, često i antagonistični.

Čini se da u nekim, sličnim vrstama tumora i smanjenje ispoljenosti aneksina 5 može biti negativan čimbenik prognoze, kao što je to slučaj u linijama stanica planocelularnog karcinoma pluća LUSC u odnosu na NSCLC (135). Pojačan izražaj aneksina 5 pokazan je u karcinomima jetre i debelog crijeva, a glioblastomu je njegov pojačani izražaj povezan sa sklonošću invaziji i smanjenom odgovorom na liječenje (136, 137). U području glave i vrata je pojačana ispoljenost aneksina 5 povezana s pojačanom invazivnošću u planocelularnih karcinoma larinksa (138).

Jedino istraživanje koje povezuje aneksin 5 s melanomom temelji se na statistički značajno prisutnijem polimorfizmu nukleotida, rs6854854, što je pokazano analizom 464 melanoma u odnosu na 400 zdravih kontrolnih uzoraka tkiva. Međutim, ovi rezultati nisu bili potvrđeni u narednoj fazi istraživanja (139).



#### 6.4.2. Značaj proteina tubulin beta kao čimbenika prognoze

U ovom istraživanju je kao nezavisni prognostički čimbenik identificiran i tubulin beta. Gen koji kodira tubulin beta, klasa I, *TUBB*, nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21.33). Čine ga 5226 baze. Transkripcijom gena i prekrajanjem primarnog transkripta u sastav kojeg ulaze četiri kodirajuća eksona, nastaje protein mase 30,7 kDa. S obzirom na to da ovaj gen posjeduje nekoliko promotorskih područja, opisano je nekoliko inačica zrelog transkripta. Broj inačica se dodatno povećava zbog alternativnog izrezivanja. Nekoliko pseudogena ovog gena se nalazi na kromosomima 1, 6, 7, 8, 9 i 13. Protein stvara dimere s alfa tubulinom i član je obitelji proteina koji formiraju kompleksne polimere sastavljene od dimera tubulina. Dinamika izgradnje i razgradnje mikrotubula igra važnu ulogu u mitozu, putem organizacije kinetohora kromosoma.

U patologiji čovjeka, tubulin beta je povezan s kompleksnom kortikalnom displazijom i sindromom Michelin-tire baby. Lijekovi koji ostvaruju interakcije s kompleksima tubulina često se koriste u liječenju zloćudne bolesti (kolhicin, vinblastin, vinkristin, paklitaksel, docetaksel te combrestatin A-4), a tubulin beta se intenzivno istražuje kao ciljna molekula u kemoterapiji nekoliko vrsta tumora (140).

Povećan izražaj tubulina beta je već povezivan s otpornošću na liječenje taksanima *in vitro* (linija stanica karcinoma glave i vrata HLaC79) (141). Opisana je i njegova pojačana izraženost u linijama stanica karcinoma jajnika 1A9 (izvedena iz linije stanica A2780), u kojima su identificirane dvije točkaste mutacije na položaju 306, koje su izmijenile divlji tip alela R306 u mutirani H306 ili C306 (zamjena arginina histidinom/cisteinom) (142). Pojačana izraženost, na razini proteina, pokazana je i u stromi karcinoma debelog crijeva (143).

Prije petnaest godina je opisana i smanjena izraženost beta tubulina koja dovodi do pojačanja metastatskog potencija linija stanica malignog melanoma kože, ali sa slabom statističkom značajnošću (144). Nedavno je, analizom 132 karcinoma ne-malih stanica pluća, pokazano da

se, u ovim tumorima, njegov izražaj na razini mRNA ne mijenja, u odnosu na zdravo tkivo pluća (145). Iako su u *TUBB* opisani polimorfizmi koji se povezuju s povećanom sklonošću nastank karcinoma dojke (146), beta tubulin se za sada ne smatra biljegom melanoma (iako se o ovoj mogućnosti nagađalo u nekoliko publikacija koje su nastale na temelju istraživanja klase III beta tubulina) (147).

Na temelju svih ovih činjenica ne može se zaključiti a) zbog čega je izraženost tubulina beta povišena u melanomima koji će metastazirati; b) koja je njegova uloga u procesu napredovanja melanoma.

#### **6.4.3. Značaj proteina heat shock protein 90 alfa kao čimbenika prognoze**

Heat shock protein (HSP) 90, otkriven kao važan biljeg u ovom istraživanju, pripada skupini visoko konzerviranih i funkcionalno povezanih proteina čije se ispoljavanje povećava kada je stanica izložena stresu (ovo uključuje i izloženost povišenoj temperaturi) (148). Najvažnija uloga HSP je sudjelovanje u pravilnom smatanju ("chaperon") proteina. Zbog ove funkcije HSP sudjeluju u preveniranju nastanka nepravilnih konformacija, odnosno – agregata proteina (149).

Nazivi heat shock proteina izvode se u odnosu na njihovu masu; HSP 90 $\alpha$  je građen od 732 aminokiseline i ima molekulsku masu od 84,6 kDa. Gen koji kodira njegov nastanak, *HSP90AA1*, nalazi se na dugačkom kraku kromosoma 14 (14q32.31). Zauzima 59 012 parova baza genomske DNA. Glasnička RNA HSP90AA1 postoji u dva oblika, koja nastaju zbog alternativnog izrezivanja. U zreli transkript dulje inačice ulazi svih 12 eksona ovoga gena. Poznato je da se HSP 90 $\alpha$  i HSP 90 $\beta$ , koji su homologni u 86 % svog peptidnog slijeda, nalaze u citoplazmi; prvi predstavlja inducibilni, a drugi konstitutivni oblik proteina (150). Iako se obitelj HSP istražuju relativno dugo, pa je stoga i poznato da HSP 90 $\alpha$  može stabilizirati i

aktivirati više od 300 proteina, tek je odnedavno prisutan povećan interes za njihovu funkciju u kontekstu zloćudne preobrazbe. Na temelju trenutno dostupnih podataka, čini se da je izražaj HSP 90 $\alpha$  povećan u većini, do danas istraženih, zloćudnih tumora. Ovo je vrlo važno zbog toga što je stanica raka doslovno ovisna (“addicted”) o HSP 90 zbog toga što oni, čini se – ciljano, stabiliziraju mutirane proteine koji potiču prijenos signala koji je neophodan za zloćudnu preobrazbu (SRC, HER2, BCR-ABL, B-RAF, ELM4-ALK) (149,151).

Godine 2014. je pokazano, na modelu nekoliko različitih linija stanica raka, da se HSP 90 $\alpha$  veže za protein kinazu D (PRKD2), ključnu molekulu regulacije komuniciranja između stanica tumora i stanica endotela, u gastrointestinalnim zloćudnim tumorima i glioblastomima. Vežanje HSP 90 $\alpha$  s PRKD2 dovodi do stabiliziranja kinaze i, posljedično, ima protumorigeničan učinak (152). S druge strane, ako se djelovanje HSP 90 $\alpha$  inhibira, dolazi do razgradnje PRKD2 u proteasomu, što rezultira smrću stanica, apoptozom. Na karcinomu kolona je nedvojbeno pokazano poticajno djelovanje HSP 90 $\alpha$  na epitelno-mezenhimalni prijelaz, fenomen koji ukazuje na pojačanu invazivnost tumora (153), a u karcinomima prostate je poznat njegov pozitivan utjecaj na pro-proliferativni signalni put upale, NF- $\kappa$ B (154). U ovom tipu karcinoma se HSP 90 $\alpha$  izlučuje izvan stanice, te potiče reaktivnost strome. Poznato je se HSP 90 $\alpha$  pojačano izražava u tkivu orofarinksa u kojem nema izražaja P16, te da utišavanje HSP 90 $\alpha$  u tumorima s ovakvom molekularnom pozadinom doprinosi povećanoj osjetljivosti na zračenje (155).

Iako ove spoznaje predstavljaju tek vrh ledenog brijega, vezano uz funkciju HSP90, razvijaju se spojevi kojima bi se pokušalo inhibirati njihovu funkciju na ciljan način, u stanici tumora. Onalespib (AT13387) je trenutno u nekoliko kliničkih istraživanja, koja se provode na oboljelima od različitih tumora (156). Ovo uključuje i oboljele od melanoma s mutacijom u genu BRAF, u kojih se Onalespib primjenjuje u kombinaciji s dabrafenibom i trametinibom.

Zadnji objavljeni rezultati pokazuju da onalespib prelazi krvno-moždanu barijeru i ima značajan učinak na stanice tumora (studija je učinjena *in vitro*, na stanicama dobivenih iz glioblastoma ljudi), koji se manifestira sniženim izražajem proteina AKT i EGFR (157). Čini se da još jedan spoj, ganetespib, ima vrlo obećavajuću ulogu za oboljele od melanoma: inhibiranje HSP90 ganetespibom pojačava T-stanicama posredovano uništavanje stanica melanoma *in vitro*, i pojačava odgovor na liječenje s anti-CTLA4 i anti-PD1, *in vivo* (158).

U oboljelih od melanoma je pokazano da se povećana koncentracija HSP90 (u odnosu na zdrave ispitanike) nalazi u serumu. Nije, međutim, pokazano da ima prognostički značaj u odnosu na preživljenje (159). U našoj je studiji HSP90 pokazan kao izuzetno važan čimbenik za preživljenje bolesnika, ali izmjeren u tkivu tumora. Očito je da će se, naročito u kontekstu razvoja novih lijekova, istraživanje na heat shock proteinima, u području onkologije, dodatno intenzivirati.

#### **6.4.4. Značaj ribosomskog proteina L7 kao čimbenika prognoze**

Gen koji kodira ribosomski protein L7, *RPL7*, nalazi se na dugačkom kraku kromosoma 8 (8q21.11). Zauzima 3 856 baza genomske DNA i čini ga sedam malenih eksona. Protein, koji je sastavni dio ribosomske podjedinice 60S, je dugačak 248 aminokiselina i ima molekulsku masu 29,23 kDa. Iako se o točnoj funkciji ovog proteina zna vrlo malo, poznato je da ima važnu ulogu u ranoj fazi procesiranja pre-rRNA tijekom stvaranja podjedinica 60S.

Posljedica ciljane inaktivacije *RPL7* u kvascu je prestanak rasta organizma, zbog nedostatnog stvaranja podjedinice 60S (160).

Godine 1994. je pokazano da oboljeli od nekih autoimunih bolesti (ma primjer, sistemski lupus), razvijaju protutijela na ovaj protein (161). Dodatno je pokazano da ovaj protein

posreduje u vezanju podjedinice 60S na endoplazmatski retikulum (ER), zbog toga što je vezanje na ER jedno od njegovih važnih svojstava (162).

Za sada je, u području zloćudnih tumora čovjeka, RPL7 analiziran, uz još 11 ribosomalnih proteina (Sa, S8, S11, S12, S18, S24, L7, L13a, L18, L28, L32, and L35a) u nepromijenjenoj sluznici i pridruženom karcinomu debelog crijeva.

Zanimljivo je da su RPL7 i S8, za razliku od preostalih proteina, bili vrlo rijetko združeni s ribosomima u stanicama epitela (njihova je ispoljenost bila na donjoj granici detekcije), u zdravoj sluznici. Međutim, ispoljavanje je bilo vrlo snažno u stanicama karcinoma, pri čemu je RPL7 bio prisutan u sekretornim granulama enterokromafinih stanica u sluznici mukoze, a ispoljavanje se višestruko pojačalo u stanicama karcinoma kolona koje su ispoljavale kromogranin A (163). Stoga su autori ovog istraživanja zaključili da bi RPL7 mogao biti uključen u reguliranje neuroendokrine funkcije stanica karcinoma rektuma, neovisno o podjedinici S60. Ovo je jako zanimljiv podatak, s obzirom na to da je, u melanomima koje smo istraživali, ispoljenost RPL7 bila vrlo snažna. Funkcionalna poveznica s kromograninom A zvuči izuzetno atraktivno, ako se zna da kromogranin A može biti ispoljen u melanomima s neuroendokrinom diferencijacijom (164). Za sada, na žalost, nema dovoljno podataka koji bi mogli logično povezati snažan izražaj RFLP7 s kraćim preživljenjem bolesnika, u našem istraživanju.

Svakako bi bilo zanimljivo istražiti status gena *BRAF*, s obzirom na to da je pokazano da se u melanomima, u kojima su prisutne mutacije gena *BRAF*, amplificira upravo područje 8q21.11, u kojem se nalazi *RPL7* (165).

Na temelju istraživanja koje smo proveli, ne možemo zaključiti da li je pojačan izražaj ribosomskog proteina RPL7 posljedica višestrukih kopija transkripcijski aktivnog dijela kromosoma 8q21.11, iako ta mogućnost zvuči logično.

#### 6.4.5. Značaj proteina profilin 1 kao čimbenika prognoze

U ovom je istraživanju visoku snagu u odnosu na preživljenje bolesnika imao i profilin 1. Gen koji kodira profilin, *PFLN1*, nalazi se na kratkom kraku kromosoma 17 (17p13.2). Ovaj je gen relativno malen; čine ga samo 3437 baze, što i rezultira nastankom relativno malenog proteina mase 15 kDa. Sto četrdeset aminokiselina od kojih je izgrađen ovaj protein kodirano je s tri eksona. Iako je u banci protein UniProt pohranjena samo jedna inačica ovog proteina, hnRNA *PFLN1* se može prekrojiti na dva načina.

Najbolje istražena uloga profilina vezana je uz aktin, odnosno citoskelet stanice. Poznato je da profilin 1 djeluje na polimerizaciju aktina, ovisno o koncentraciji u stanici: u niskim koncentracijama je potiče, a u visokim inhibira (166). Vezanje profilina i aktina ključan je događaj u stvaranju filamenata. Nedavno je pokazano da se profilin veže na formin, koji će biti raspravljen u kontekstu funkcije hnRPM (167).

U patologiji čovjeka je profilin najbolje istražen u području neuroloških bolesti, poglavito u nasljednom obliku amiotrofične lateralne skleroze (ALS, od engl. Amyotrophic Lateral Sclerosis). U dijela oboljelih od nasljednog oblika ove bolesti dokazane su točkaste mutacije gena *PFLN1*, zbog kojih se smanjuje afinitet profilina za aktinske niti (168). U području molekularne onkologije, promjene/promijenjena funkcija profilina dokazana je u nekoliko skupina zloćudnih tumora.

U mokraćnom mjehuru, pojačan izražaja profilina 1 bio je povezan s agresivnijim ponašanjem tumora (169). U glioblastomu, fosforilacija profilina 1 na tirozinu 129 za posljedicu ima vezanje profilina 1 na tumor-supresorski protein von Hippel–Lindau (VHL). Posljedica ovog događaja je inaktiviranje proteina VHL, zbog čega ne može razgraditi hipoksijom potaknut čimbenik 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , od engl. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ ). Posljedično nakupljanje HIF-1 $\alpha$  doprinosi napredovanju glioblastoma (170).

U zloćudnim tumorima gušterače, poticanjem SIRT3, profilin 1 destabilizira HIF-1 $\alpha$  i usporava napredovanje tumora (171), dakle - ponaša se kao supresor.

U karcinomima usne šupljine gubi se u kasnijim stadijima bolesti, pa je zbog toga postavljena (ne i dokazana) hipoteza da bi se i u ovoj skupini tumora mogao ponašati kao tumor supresorski gen (172).

U karcinomu želuca je, na temelju multivarijatne analize, pokazano da smanjeno ispoljavanje profilina 1 (dakle, suprotno od naših rezultata dobivenih na melanoma) predstavlja neovisan čimbenik rizika za nastanak metastaza u limfne čvorove (173). Zanimljivo je da, u uvjetima *in vitro*, inhibitor DNA metiltransferaze, 5-aza-2'-deoksicitidin, suprotno očekivanju, utišava ispoljavanje profilina, u liniji stanica podrijetlom od karcinoma gušterače (174). Regulatorni mehanizmi aktivnosti *PFLNI* nisu poznati na razini epigenoma.

Na temelju svih ovih činjenica ne može se zaključiti a) zbog čega je profilin povišen u melanomima koji će metastazirati; b) koja je njegova uloga u procesu napredovanja melanoma. Vrlo je vjerojatno da njegova uloga, kao i uloga mnogih drugih proteina, ovisi o specifičnom okruženju, koje je nerijetko specifično za pojedine vrste stanica/tumora (175).

#### **6.4.6. Značaj heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M kao čimbenika prognoze**

U ovom je istraživanju najjaču snagu u odnosu na preživljenje bolesnika imao heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M (hnRP M). Gen koji ga kodira, *HNRPM*, nalazi se na kratkom kraku kromosoma 19 (19p13.2). Velik je 44 200 nukleotida unutar kojih se nalazi 16 eksona. Transkripcijom gena nastaje glasnička RNA koja se može prekrojiti na 15 različitih načina. Na razini proteina su trenutno poznate tri inačice: najdulja inačica (inačica 1) je građena od 740 aminokiselina, inačicu 2 čini 691 aminokiselina (u odnosu na inačicu 1, ovoj inačici nedostaju

aminokiseline 160-198). Slijed aminokiselina za inačicu 3 nije poznat; njezino postojanje se povezuje sa specifičnom inačicom mRNA.

Protein hnRP M je član obitelji heterogenih nuklearnih proteina čija je funkcija najbolje istražena kroz procese izrezivanja primarnog transkripta mRNA (hnRNA). Zbog toga što hnRNA nastaje u jezgri, a procesira se tijekom transporta u citoplazmu, proteini hnRP, kao njezini “pratitelji” također putuju između jezgre i citoplazme.

Protein hnRP M član je obitelji koja se naziva “veliki proteini hnRNP”. Poznato je da sudjeluje u alternativnom izrezivanju primarnog transkripta, koje je omogućeno njegovim visokim afinitetom vezanja za područja bogata nukleotidima “C”, odnosno “U” (176). To, međutim, nije njegova jedina uloga. Pokazano je da može imati funkciju receptora na površini Kupferovih stanica, za koji se vežu protein s penta-peptidnim slijedom Pro-Glu-Leu-Pro-Lys (177), koji se nalazi i u karcinoembrionalnom antigenu (178). Iako bi potencijalna interakcija ova dva proteina mogla biti izuzetno važna u melanomu, nije poznato da do interakcije dolazi. Poznato je, međutim, da je jedan od članova obitelji karcinoembrionskih antigena, CEACAM1 (od engl. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule-1), snažno ispoljen u melanomima (179), te da jedna od njegovih inačica - CEACAM1-4L, potiče o sidrenju neovisan rast stanica melanoma (180).

Godine 2011. je pokazano da hnRP M, zajedno s hnRNP L i hnRNP A1, sudjeluje u alternativnom izrezivanju mRNA CEACAM1, u liniji stanica karcinoma dojke - ZR75. U ovom je modelu pokazano antagonističko djelovanje hnRNP M, u odnosu na hnRNP L i hnRNP A1, vezano uz uključivanje/izrezivanje eksona 7, koji se, u prisustvu hnRNP M, uključuje u primarni transkript (CEACAM1-L) (181). Ovaj oblik transkripta prevodi se u protein koji, u stanicama melanoma, u uvjetima *in vitro*, stupa u interakciju s ranije spomenutim filaminom A. Zanimljivo je da upravo postojanje ili odsustvo interakcije CEACAM1-L/filamin A ima snažan utjecaj na potencijal migracije melanocita; ako interakcija postoji – onda je



migratorni potencijal značajno smanjen. Ako do interakcije ne dođe, onda svaki od ova dva proteina snažno pojačava migracijski potencijal zloćudno promijenjenih melanocita, što je iznimno važno za shvaćanje metastatskog potencijala ovog tumora (182).

Na temelju ovih podataka moglo bi se pretpostaviti da: a) u melanoma hnRNP M posreduje uključivanju eksona 7 u CEACAM1-L, zbog čega nastaje dugačka inačica proteina koja b) može stupati u interakciju s filaminom A (ako je u stanici prisutan), te na taj način c) inhibirati nastanak metastaza. Ako, međutim d) filamina A nema, onda bi CEACAM1-L, za čiji je e) nastanak odgovoran hnRNP M, mogao f) djelovati izuzetno pro-metastatski. Da li su ovi mehanizmi bili uključeni u melanome koje smo istraživali tek se treba dokazati. Iako postoje podatci koji ukazuju na filamin A kao negativan prognostički biljeg u melanomima (183, 184), ovakvih podataka za hnRNP M u literaturi, vezano uz melanoma, nema.

S druge strane, poznato je da hnRNP M, sudjelovanjem u alternativnom izrezivanju primarnih transkripata, doprinosi povećanom metastatskom potencijalu karcinoma dojke (185). U korelativnoj studiji, kojom se pokušao otkriti značaj hnRNP M u karcinomima jajnika metodom imunohistokemije, nije pokazano da utječe na kliničke parametre ovih tumora (186). Svakako treba napomenuti da je u melanomima opisan pojačan izražaj hnRNP K, koji također pripada obitelji “veliki proteini hnRNP”. Njegov pojačan izražaj povezuje se s agresivnijim ponašanjem melanoma (187) i mnogih drugih zloćudnih tumora (188).

Većina kritika koje su upućene na račun studija kojima se analizirao proteom melanoma odnosi se na nedostatnu reproducibilnosti između istraživanja i korištenje malog broja uzoraka tkiva uznapređovalog tumora. Logično je da upravo analiza tumora u uznapređovalom stadiju, koji u pravilu ima loš ishod, ne može doprinijeti otkrivanju korisnih biljega progresije bolesti. No, u proteklih nekoliko godina, značajan napredak liječenja i u bolesnika s uznapređovalom bolešću osnažuje argumente onih koji istražuju biljege; ne samo u odnosu na rane, nego i u

odnosu na kasne stadije bolesti (189). Reproducibilnost rezultata ovog istraživanja tek treba biti potvrđena u neovisnom istraživanju, na većem broju bolesnika i, poželjno, analizom melanoma u svim stadijima.

## 7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju, provedenom na 31 malignom melanomu kože glave i vrata stadija u stadijima I i II, analiziran je profil proteoma tkiva i njegova prognostička vrijednost u odnosu na kumulativno preživljenje ispitanika. Dobiveni rezultati analizirani su i u odnosu na klasične prognostičke pokazatelje; promjer tumora, kategorije Breslow i Clark, T-kategorije, histološki tip tumora, broj mitozna na  $\text{mm}^2$  te količinu tumor infiltrirajućih limfocita.

Izrađen je profil proteoma tkiva melanoma kože glave i vrata stadija u stadijima I i II i identificirani su proteini izraženi u svim melanomima. Njihov je izražaj uspoređen s izražajem u benignim pigmentiranim nevusima kože glave i vrata.

1. Profil proteoma melanoma melanoma kože glave i vrata u stadijima I i II povezan je s prognozom bolesti.
2. Povezanost poznatih prognostičkih čimbenika s preživljenjem, određena partitivnim rekurzivnim particioniranjem u programskom jeziku R pokazala je da debljina po Breslowu, T-kategorija, broj mitozna/ $\text{mm}^2$ , stupanj invazije po Clarku, histološki tip tumora i stadij tumora imaju naglašenu važnost u odnosu na ostale čimbenike prognoze.
3. Za razvrstavanje bolesnika u prognostičke skupine postoje samo dva čvora odluke; debljina po Breslowu i broj mitozna po  $\text{mm}^2$ .
4. Identificirani su novipotencijalni biljezi tumora povezani s prognozom bolesti; heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M, heat shock protein 90 alpha, profilin-1, beta lanac tubulina, aneksin-5 i ribosomski protein L7.
5. Izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M ima naglašenu važnost u odnosu na ostale čimbenike prognoze, i predstavlja jedini relevantan čvor odluke na stablu odluke.

6. Vrijednost izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M je glavni prognostički čimbenik u analiziranim melanomima. Neovisan je o svim ostalim ispitivanim prognostičkim čimbenicima, statistički je značajan, te ima i klinički značaj zbog velike razlike u omjeru hazarda.

## 8. SAŽETAK

Morfološka i histopatološka obilježja su osnova klasifikacije i prognoze melanoma. Rastući broj molekularnih biljega predstavlja potencijal za unapređenje dijagnostičkih metoda i prognostičkih kategorija bolesti. Prognoza melanoma u ranoj fazi je tek djelomično objašnjena morfohistopatološkim parametrima kao što su lokalizacija primarnog tumora, dob i spol oboljelog, broj mitoz po mm<sup>2</sup>, debljina tumora i prisustvo ulceracije. Analizirani su profili proteoma 31 melanoma kože glave i vrata u ranom stadiju i šest objedinjenih benignih pigmentiranih nevusa kože kao jednim uzorkom kontrolne skupine.

Na temelju profila proteoma melanoma, rekurzivnim particioniranjem je analizirana izraženost proteina s vremenskim razdobljem proteklom od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti uzrokovane melanomom, (engl. disease specific survival). Ovim su istraživanjem identificirani novi potencijalni biljezi melanoma koji su povezani s prognozom bolesti; heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M, heat shock protein 90 alpha, profilin-1, tubulin, beta lanac, aneksin-5 i ribosomski protein L7.

Vrijednost izraženosti heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M je glavni prognostički čimbenik u ispitivanom skupu podataka. Neovisan je o svim ostalim ispitivanim prognostičkim čimbenicima, statistički je značajan, i ima klinički značaj zbog velike razlike u omjeru hazarda. Rezultati ove disertacije proširili su spoznaje o postojećim i novootkrivenim proteina u melanomima koji su u ranim stadijima, a pružili su i su i solidan temelj za daljnja a istraživanja prognostičke vrijednosti ovih proteina.

**Ključne riječi:** proteomika, maligni melanom, biljeg tumora, prognoza, glava i vrat

## 9. SUMMARY

### **Prognostic significance of proteomic profiling applied to stages I and II cutaneous malignant melanoma of the head and neck in stages I and II**

Andro Košec, Zagreb, 2017.

Morphohistopathological parameters are the basis for malignant melanoma classification and prognosis. An increasing number of molecular biomarkers offers new potential for refining diagnostic and prognostic disease categories. However, early stage disease prognosis is only partially defined by morphological and histopathological parameters (primary tumor localization, patient age and gender, mitotic rate, lesion thickness and presence of ulceration). This study is based on proteomic profiling of 31 early stage head and neck cutaneous malignant melanoma tissue samples and six pooled benign pigmented nevi tissue, as a control sample. After identifying the global melanoma proteomic profile, expression of individual proteins was correlated with established prognostic factors and patient survival by recursive partitioning. Relations between individual protein expression levels and disease specific survival were analyzed. Analysis revealed, previously unreported proteins, identified as possible prognostic biomarkers. These are: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, heat shock protein 90 alpha, profilin-1, tubulin - beta chain, annexin-5 and ribosomal protein L7. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M was identified as the principal prognostic factor in our data set. It was shown as independent in relation to other prognostic factors, statistically significant and clinically relevant due to an exceedingly high hazard ratio. These findings add a new dimension in relation to novel melanoma biomarkers, especially in for early disease stages.

**Keywords:** proteomics, malignant melanoma, biomarker, prognosis, head and neck

## 10. POPIS LITERATURE

1. Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966;19:607-10.
2. Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Krickler A, Eberle C i sur. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:195-9.
3. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, i sur. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27:6199–206.
4. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor, i sur. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:10-30.
5. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002. Bethesda, Md: National Cancer Institute; 2004. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2002](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002). Pristupljeno: rujan, 2017.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. Bilten br. 38. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2013.
7. Buljan M, Rajacic N, Vurnek Zivkovic M, Blajic I, Kusic Z, Situm M. Epidemiological data on melanoma from the referral centre in Croatia (2002-2007). *Coll Anthropol*. 2008;2:47-51.
8. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. American Cancer Society. [Pristupljeno: 20.9.2017.] Dostupno na: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
9. Larson DL, Larson JD. Head and neck melanoma. *Clin Plastic Surg*. 2010;37:73–7.

10. Tromme I, Legrand C, Devleeschauwer B, Leiter U, Suciú S, Eggermont A, i sur. Melanoma burden by melanoma stage: Assessment through a disease transition model. *Eur J Cancer*. 2016;53:33-41.
11. Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355:51-65.
12. Murali R, Desilva C, Thompson JF, Scolyer RA. Factors predicting recurrence and survival in sentinel lymph node-positive melanoma patients. *Ann Surg*. 2011;253:1155-64.
13. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, i sur. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma, II: sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005;41:45-60.
14. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, i sur. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma, I: common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41:28-44.
15. Rigel DS. Epidemiology and prognostic factors in malignant melanoma. *Ann Plast Surg*. 1992;28:7-8.
16. Stenehjem JS, Veierød MB, Nilsen LT, Ghiasvand R, Johnsen B, Grimsrud TK, i sur. Anthropometric factors and cutaneous melanoma: Prospective data from the population-based Janus Cohort. *Int J Cancer*. 2017, u tisku. doi: 10.1002/ijc.310
17. Jennings L, Murphy GM. Predicting outcome in melanoma: where are we now. *Br J Dermatol*. 2009;161:496-503.
18. Kienstra, MA, Padhya TA. Head and neck melanoma. *Cancer control*. 2005;12:242-7.
19. Bilinski C, LaChance A, Murphy MJ. Clinical and histopathological parameters in melanoma. *U: Current Clinical Pathology (Ur.: Murphy MJ)*. Springer, New York, NY, 2012., str. 49-67.
20. Larson DL, Larson JD. Head and neck melanoma. *Clin Plastic Surg*. 2010;37:73–77.



21. Andersson AP, Gottlieb J, Drzewiecki KT, Hou-Jensen K, Sondergaard K. Skin melanoma of the head and neck: prognostic factors and recurrence-free survival in 512 patients. *Cancer*. 1992;69:1153-6.
22. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual; for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform. *CA Cancer J Clin*. 2017, u tisku. doi: 10.3322/caac.21409
23. Abbas O, Miller DD, Bhawan J. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol*. 2014;36:363-79.
24. de Giorgi V, Rossari S, Gori A, Grazzini M, Savarese I, Crocetti E, et al. The prognostic impact of the anatomical sites in the 'head and neck melanoma': scalp versus face and neck. *Melanoma Res*. 2012;2:402-5.
25. Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM. TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1475-7.
26. Joosse A, Collette S, Suci S, Nijsten T, Patel PM, Keilholz U, et al. Sex is an independent prognostic indicator for survival and relapse/progression-free survival in metastasized stage III to IV melanoma: a pooled analysis of five European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized controlled trials. *J Clin Oncol*. 2013;31:2337-46.
27. Bartlett EK, Karakousis GC. Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24:215-27.
28. Fadaki N, Li R, Parrett B, Sanders G, Thummala S, Martineau L, et al. Is head and neck melanoma different from trunk and extremity melanomas with respect to sentinel lymph node status and clinical outcome? *Ann Surg Oncol*. 2013;20:3089-97.

29. Andersson AP, Gottlieb J, Drzewiecki KT, Hou-Jensen K, Sondergaard K. Skin melanoma of the head and neck: prognostic factors and recurrence-free survival in 512 patients. *Cancer*. 1992;69:1153-6.
30. Xu X, Chen L, Guerry D, Dawson PR, Hwang WT, VanBelle P, i sur. Lymphatic invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18:229–37.
31. Maurichi A, Miceli R, Camerini T, Mariani L, Patuzzo R, Ruggeri R, i sur. Prediction of survival in patients with thin melanoma: results from a multi-institution study. *J Clin Oncol*. 2014;32:2479–85.
32. Quinn MJ, Crotty KA, Thompson JF, Coates AS, O'Brien CJ, McCarthy WH. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma: experience with 280 patients. *Cancer*. 1998;83:1128–35.
33. Cintolo JA, Gimotty P, Blair A, Guerry D, Elder DE, Hammond R, i sur. Local immune response predicts survival in patients with thick (t4) melanomas. *Ann Surg Oncol*. 2013;20:3610–7.
34. Thomas NE, Busam KJ, From L, Krickler A, Armstrong BK, Anton-Culver H, i sur. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol*. 2013;31:4252–9.
35. Becker D, Mihm MC, Hewitt SM, Sondak VK, Fountain JW, Thurin M. Markers and tissue resources for melanoma: meeting report. *Cancer Res*. 2006;66:10652-57.
36. Murphy MJ, Rezaul K, Han DK. Tissue based protein biomarkers in melanoma: mass spectrometry-based strategies. U: Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets in melanoma. (Ur.: Murphy MJ). Springer, New York, NY, 2012., str. 189-194-67., 2012.

37. Rezende TM, de Souza Freire M, Franco OL. Head and neck cancer: proteomic advances and biomarker achievements. *Cancer*. 2010;116:4914-25.
38. Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, i sur. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:472-82.
39. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, i sur. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008;5:e120.
40. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – Melanoma [ažurirano 28.08.2017; pristupljeno 18.9.2017.]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Melanoma/> Source: NCI Visuals Online. Skin Cancer Foundation. <http://visualsonline.cancer.gov/about.cfm>
41. Austin JR, Byers RM, Brown WD, Wolf P. Influence of biopsy on the prognosis of cutaneous melanoma of the head and neck. *Head Neck*. 1996;18:107–17.
42. Yamashita Y, Hashimoto I, Abe Y, Seike T, Okawa K, Senzaki Y, i sur. Effect of biopsy technique on the survival rate of malignant melanoma patients. *Arch Plast Surg*. 2014;41:122-5.
43. Ugurel S, Utikal J, Becker JC. Tumor biomarkers in melanoma. *Cancer Control*. 2009;16:219-24.
44. Xing Y, Bronstein Y, Ross MI, Askew RL, Lee JE, Gershenwald JE, i sur. Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:129-42.
45. Hafström A, Silfverschiöld M, Persson SS, Kanne M, Ingvar C, Wahlberg P, i sur. Benefits of initial CT staging before sentinel lymph node biopsy in patients with head and neck cutaneous melanoma. *Head Neck*. 2017, u tisku. doi: 10.1002/hed.24901

46. Mocellin S, Pasquali S, Riccardo Rossi C, Nitti D. Validation of the prognostic value of lymph node ratio in patients with cutaneous melanoma: A population-based study of 8,177 cases. *Surgery*. 2011;150:83-90.
47. Martin JM, Porceddu S, Weih L, Corry J, Peters LJ. Outcomes in sinonasal mucosal melanoma. *ANZ J Surg*. 2004;74:838-42.
48. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Melanoma Version 3.2015. NCCN. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/melanoma.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/melanoma.pdf). Pristupljeno: rujan, 2017.
49. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, i sur. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol*. 2004; 164:193-203.
50. Han D, Zager JS, Shyr Y, Chen H, Berry LD, Iyengar S, i sur. Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31:4387–93.
51. Krown SE, Chapman PB. Defining adequate surgery for primary melanoma. *N Engl J Med*. 2004;350:823-25.
52. Gillgren P, Drzewiecki KT, Niin M, Gullestad HP, Hellborg H, Månsson-Brahme E, i sur. 2-cm versus 4-cm surgical excision margins for primary cutaneous melanoma thicker than 2 mm: a randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378:1635-42.
53. Wong SL, Balch CM, Hurley P, Agarwala SS, Akhurst TJ, Cochran A, i sur. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Joint Clinical Practice Guideline. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:3313-24.
54. Carling T, Pan D, Ariyan S, Narayan D, Truini C. Diagnosis and treatment of interval sentinel lymph nodes in patients with cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119:907–13.

55. Pathak I, O'Brien CJ, Petersen-Schaefer K, McNeil EB, McMahon J, Quinn MJ. Do nodal metastases from cutaneous melanoma of the head and neck follow a clinically predictable pattern? *Head Neck*. 2001;23:785-90.
56. O'Brien CJ, McNeil EB, McMahon JD, Pathak I, Lauer CS. Incidence of cervical node involvement in metastatic cutaneous malignancy involving the parotid gland. *Head Neck*. 2001;23:744-48.
57. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, et al. Survival of SLNB-positive melanoma patients with and without complete lymph node dissection: A multicenter, randomized DECOG trial. *J Clin Oncol*. 2015;20:33:Suppl, LBA9002-LBA9002.
58. Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman JJ 3rd. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105:1774-99.
59. Lee RJ, Gibbs JF, Proulx GM, Kollmorgen DR, Jia C, Kraybill WG. Nodal basin recurrence following lymph node dissection for melanoma: implications for adjuvant radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;46:467-74.
60. Hauschild A, Weichenthal M, Rass K, Linse R, Berking C, Bottjer J, et al. Efficacy of low-dose interferon alpha 2a 18 versus 60 months of treatment in patients with primary melanoma of  $\geq 1.5$  mm tumor thickness: results of a randomized phase III DeCOG trial. *J Clin Oncol*. 2010;28:841-6.
61. Kirkwood JM, Manola J, Ibrahim J, Sondak V, Ernstoff MS, Rao U. Eastern Cooperative Oncology Group. A pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group and intergroup trials of adjuvant high dose alpha interferon for melanoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1670-77.

62. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S i sur. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 2000;18:158-66.
63. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, i sur. 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.
64. Perez DG, Suman VJ, Fitch TR, Amatruda T III, Morton RF, Jilani SZ, i sur. Phase II trial of carboplatin, weekly paclitaxel, and weekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N047A. *Cancer.* 2009;115:119-27.
65. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, i sur. Results of a phase III, randomized, 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;27:2823-30.
66. Lawson DH, Lee S, Zhao F, Tarhini AA, Margolin KA, Ernstoff MS, i sur. Randomized, placebo-controlled, Phase III trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) versus Peptide Vaccination versus GM-CSF plus Peptide Vaccination versus placebo in patients with no evidence of disease after complete surgical resection of locally advanced and/or stage IV melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). *J Clin Oncol.* 2015;1:33:4066-76.
67. Fecher LA, Flaherty KT. Where are we with adjuvant therapy of stage III and IV melanoma in 2009? *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7:295-304.

68. Guadarrama-Orozco JA, Ortega-Gómez A, Ruiz-García EB, Astudillo-de la Vega H, Meneses-García A, Lopez-Camarillo C. BRAF V600E mutation in melanoma: translational current scenario. *Clin Transl Oncol*. 2016;18:863-71.
69. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-16.
70. Larkin J, Lao CD, Urban WJ, McDermott DF, Horak C, Jiang J, et al. Efficacy and safety of Nivolumab in patients with BRAF V600 mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: A pooled analysis of 4 clinical trials. *JAMA Oncol*. 2015;1:433-40.
71. Maggiore U, Pascual J. The bad and the good news on cancer immunotherapy: implications for organ transplant recipients. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016;23:312-316.
72. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380:358-65.
73. Paulitschke V, Berger W, Paulitschke P, Hofstätter E, Knapp B, Dingelmaier-Hovorka R, et al. Vemurafenib resistance signature by proteome analysis offers new strategies and rational therapeutic concepts. *Mol Cancer Ther*. 2015;14:757-68.
74. Sasse AD, Sasse EC, Clark LG, Ulloa L, Clark OA. Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;CD005413.
75. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. *Talimogene Laherparepvec* improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2015;33:2780-8.

76. Toda M, Martuza RL, Rabkin SD. Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Ther* 2000;2:324–9.
77. Ballo MT, Garden AS, Myers JN, Lee JE, Diaz EM Jr, Sturgis EM, i sur. Melanoma metastatic to cervical lymph node: can radiotherapy replace formal dissection after local excision of nodal disease? *Head Neck*. 2005;27:718–21.
78. Osella-Abate S, Ribero S, Sanlorenzo M, Maule MM, Richiardi L, Merletti F, i sur. Risk factors related to late metastases in 1,372 melanoma patients disease free more than 10 years. *Int J Cancer*. 2015;136:2453-7.
79. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated AKT expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol*. 2005;23:1473–82.
80. Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, i sur. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1366–71.
81. Mikhail M, Velazquez E, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Sorhaindo L, i sur. PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5153–7.
82. Rangel J, Torabian S, Shaikh L, Nosrati M, Baehner FL, Haqq C, i sur. Prognostic significance of nuclear receptor coactivator-3 overexpression in primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:4565–9.
83. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, i sur. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 2011;305:2327-34.
84. Gerami P, Cook RW, Wilkinson J, Russell MC, Dhillon N, Amaria RN, i sur. Development of a prognostic genetic signature to predict the metastatic risk associated with cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21:175-83.



85. Charles EM, Rehm M. Key regulators of apoptosis execution as biomarker candidates in melanoma. *Mol Cell Oncol*. 2014;1:e964037.
86. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28: 661–72.
87. Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, i sur. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer*. 2003;97:1737-45.
88. Altelaar M, Muñoz, J, Heck, A. Next-generation proteomics: Towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet*. 2013;14:35-48. doi: 10.1038/nrg3356. [slika s mrežne stranice] [pristupljeno 14.09.2017.].  
Dostupno na: [https://www.researchgate.net/figure/233839108\\_fig5\\_Figure-2-Generalized-mass-spectrometry-based-proteomics-workflow/](https://www.researchgate.net/figure/233839108_fig5_Figure-2-Generalized-mass-spectrometry-based-proteomics-workflow/)
89. Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, Stanley A, Pappin D, Naven T, i sur. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis--preliminary findings. *Electrophoresis*. 1999;20:689-700.
90. Domon B., Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat Biotechnol*. 2010;7:710-21. doi: 10.1038/nbt.1661. [slika s mrežne stranice] [pristupljeno 14.09.2017.].  
Dostupno na: <https://www.nature.com/nbt/journal/v28/n7/full/nbt.1661.html>
91. Erasmus Proteomics Center, Erasmus University Medical Center Rotterdam [slika s mrežne stranice]. 2017 [pristupljeno 14.09.2017.].  
Dostupno na: <http://www.proteomicscenter.nl/background-information>)
92. BioZone Proteomics, University of Toronto Faculty of Applied Science and Engineering [slika s mrežne stranice]. 2017 [pristupljeno 14.09.2017.].

Dostupno na: <https://www.biozone.utoronto.ca/proteomics-3/>

93. Takikawa M, Akiyama Y. Identification of melanoma-specific serological markers using proteomic analyses. *Proteomics Clin Appl*. 2009;3:552-62.
94. Canetti D, Rendell NB, Di Vagno L, Gilbertson JA, Rowczenio D, Rezk T, i sur. Misidentification of transthyretin and immunoglobulin variants by proteomics due to methyl lysine formation in formalin-fixed paraffin-embedded amyloid tissue. *Amyloid*. 2017, u tisku. doi: 10.1080/13506129.2017.1385452.
95. Koomen JM, Smalley KS. Using quantitative proteomic analysis to understand genotype specific intrinsic drug resistance in melanoma. *Oncotarget*. 2011; 2:329-35.
96. Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze E, i sur. Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy. *Br J Dermatol*. 1999;140:1065-71.
97. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K, Waldmann V i sur. S100-Beta, melanoma inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 1999;17:1891-6.
98. Ortega-Martínez I, Gardeazabal J, Erramuzpe A, Sanchez-Diez A, Cortés J, García-Vázquez MD, i sur. Vitronectin and dermcidin serum levels predict the metastatic progression of AJCC I-II early-stage melanoma. *Int J Cancer*. 2016;139:1598-607.
99. Solassol J, Mangé A. Identification of serum melanoma progression biomarkers through proteomic-based approaches. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6:341-3.
100. Mian S, Ugurel S, Parkinson E, Schlenzka I, Dryden I, Lancashire L i sur. Serum proteomic fingerprinting discriminates between clinical stages and predicts disease progression in melanoma patients. *J Clin Oncol*. 2005; 23:5088-93.

101. Findeisen P, Zapatka M, Peccerella T, Matzk H, Neumaier M, Schadendorf D, i sur. Serum amyloid A as a prognostic marker in melanoma identified by proteomic profiling. *J Clin Oncol.* 2009;27:2199-208.
102. Byrum S, Avaritt NL, Mackintosh SG, Munkberg JM, Badgwell BD, Cheung WL, i sur. A quantitative proteomic analysis of FFPE melanoma. *J Cutan Pathol.* 2011; 38:933-6.
103. Lemaire R, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I. Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Proteome Res.* 2007;6:1295-305.
104. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, i sur. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011;473:337-42.
105. Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.* 2011;86:981-90.
106. Sabel MS, Liu Y, Lubman DM. Proteomics in melanoma biomarker discovery: great potential, many obstacles. *Int J Proteomics.* 2011;2011:181890.
107. Hardesty WM, Kelley MC, Mi D, Low RL, Caprioli RM. Protein signatures for survival and recurrence in metastatic melanoma. *J Proteomics.* 2011;74:1002-14.
108. R Core Team (2017). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
109. Therneau TM, Grambsch PM. *\_Modeling Survival Data: Extending the Cox Model.* Springer, New York. ISBN 0-387-98784-3, 2000.
110. Therneau T, Atkinson B, Ripley B. *rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees.* R package version 4.1-11. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>, 2017.
111. Smit LH, Korse CM, Hart AA, Bonfrer JM, Haanen JB, Kerst JM, i sur. Normal values of serum S-100B predict prolonged survival for stage IV melanoma patients. *Eur J Cancer* 2005;41:386–92.

112. Bottoni U, Izzo P, Richetta A, Mannooranparampil TJ, Devirgiliis V, Del Giudice M i sur. S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2003;13:427- 9.
113. Egberts F, Hitschler WN, Weichenthal M, Hauschild A. Prospective monitoring of adjuvant treatment in high-risk melanoma patients: lactate dehydrogenase and protein S-100B as indicators of relapse. *Melanoma Res.* 2009;19:31–5.
114. Krähn G, Kaskel P, Sander S, Waizenhöfer PJ, Wortmann S, Leiter U, i sur. S100 beta is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase. *Anticancer Res.* 2001;21:1311-6.
115. Meral R, Duranyildiz D, Tas F, Camlica H, Yasasever V, Kurul S, i sur. Prognostic significance of melanoma inhibiting activity levels in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2011;11:627-32.
116. Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.* 2011;86:981-90.
117. Mansfield AS, Holtan SG, Grotz TE, Allred JB, Jakub JW, Erickson LA, i sur. Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis. *Mod Pathol.* 2011;24:487-94.
118. Osella-Abate S, Quaglino P, Savoia P, Leporati C, Comessatti A, Bernengo MG. VEGF-165 serum levels and tyrosinase expression in melanoma patients: correlation with the clinical course. *Melanoma Res.* 2002;12:325-34.
119. Nezos A, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Gogas H, Koutsilieris M. Molecular markers detecting circulating melanoma cells by reverse transcription polymerase chain reaction: methodological pitfalls and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47:1-11.

120. Rebecca VW, Wood E, Fedorenko IV, Paraiso KH, Haarberg HE, Chen Y, i sur. Evaluating melanoma drug response and therapeutic escape with quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13:1844-54.
121. Caron J, Mangé A, Guillot B, Solassol J. Highly sensitive detection of melanoma based on serum proteomic profiling. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135:1257-64.
122. Garrisi VM, Strippoli S, De Summa S, Pinto R, Perrone A, Guida G, i sur. Proteomic profile and *in silico* analysis in metastatic melanoma with and without BRAF mutation. *PLoS One*. 2014;9:e112025.
123. Liu H, Ong SE, Badu-Nkansah K, Schindler J, White FM, Hynes RO. CUB-domain containing protein 1 (CDCP1) activates Src to promote melanoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:1379–84.
124. Carta F, Demuro PP, Zanini C, Santona A, Castiglia D, D'Atri S i sur. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. *Melanoma Res*. 2005;15:235-44.
125. Longo C, Gambarà G, Espina V, Luchini A, Bishop B, Patanarut AS i sur. A novel biomarker harvesting nanotechnology identifies Bak as a candidate melanoma biomarker in serum. *Exp Dermatol*. 2011;20:29–34.
126. Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, Shellman YG, Argast G, Polvinen K i sur. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res*. 2003;63:6716–25.
127. Caputo E, Maiorana L, Vasta V, Pezzino FM, Sunkara S, Wynne K i sur. Characterization of human melanoma cell lines and melanocytes by proteome analysis. *Cell Cycle*. 2011;10:2924–36.
128. Capaldo BJ, Roller D, Axelrod MJ, Koepfel AF, Petricoin EF, Slingluff CL Jr i sur. Systems Analysis of Adaptive Responses to MAP Kinase Pathway Blockade in BRAF Mutant Melanoma. *PLoS One*. 2015;10:e0138210.

129. Stromberg S, Agnarsdottir M, Magnusson K, Rexhepaj E, Bolander A, Lundberg E i sur. Selective expression of Syntaxin-7 protein in benign melanocytes and malignant melanoma. *J Proteome Res.* 2009;8:1639–46.
130. Bougnoux AC, Solassol J. The contribution of proteomics to the identification of biomarkers for cutaneous malignant melanoma. *Clin Biochem.* 2013;46:518-23.
131. Murphy MJ, Rezaul K, Phelps A, Han DK. Proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma. *J Cutan Pathol.* 2012;39:464-6.
132. Wiśniewski JR, Duś K, Mann M. Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. *Proteomics Clin Appl.* 2013;7:225-33.
133. Shin J, Song IS, Pak J, Jang S. Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human melanoma cells induces invasion by inhibiting E-cadherin expression. *Tumour Biol.* 2016;37:14577-84.
134. Lihong H, Linlin G, Yiping G, Yang S, Xiaoyu Q, Zhuzhu G, i sur. Proteomics approaches for identification of tumor relevant protein targets in pulmonary squamous cell carcinoma by 2D-DIGE-MS. *PLoS ONE.* 2014;9:e95121.
135. Sun B, Bai Y, Zhang L, Gong L, Qi X, Li H, i sur. Quantitative proteomic profiling the molecular signatures of Annexin A5 in lung squamous carcinoma cells. *PLoS One.* 2016;11: e0163622.
136. Wu L, Yang L, Xiong Y, Guo H, Shen X, Cheng Z, i sur. Annexin A5 promotes invasion and chemoresistance to temozolomide in glioblastoma multiforme cells. *Tumour Biol.* 2014; 35:12327-37.
137. Xue G, Hao LQ, Ding FX, Mei Q, Huang JJ, Fu CG, i sur. Expression of annexin a5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas. *J. Clin.Gastroenterol.* 2009;43:831-7.

138. Deng S, Wang J, Hou L, Li J, Chen G, Jing B, i sur. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncol Lett.* 2013;5:107-12.
- 139 Arroyo-Berdugo Y, Alonso S, Ribas G, Ibarrola-Villava M, Peña-Chilet M, Martínez-Cadenas C, i sur. Involvement of ANXA5 and ILKAP in susceptibility to malignant melanoma. *PLoS One.* 2014;9:e95522.
140. Mikstacka R, Stefański T, Rózański J. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *Cell Mol Biol Lett.* 2013;18:368-97.
141. Schmidt M, Schler G, Gruensfelder P, Hoppe F. Differential gene expression in a paclitaxel-resistant clone of a head and neck cancer cell line. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006;263:127–34.
142. Kanakkanthara A, Wilmes A, O'Brate A, Escuin D, Chan A, Gjyrezi A, i sur. Peloruside- and laulimalide-resistant human ovarian carcinoma cells have  $\beta$ I-tubulin mutations and altered expression of  $\beta$ II- and  $\beta$ III-tubulin isotypes. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:1419-29.
143. Mu Y, Chen Y, Zhang G, Zhan X, Li Y, Liu T, i sur. Identification of stromal differentially expressed proteins in the colon carcinoma by quantitative proteomics. *Electrophoresis.* 2013;34:1679-92.
144. Meije CB, Hakvoort TB, Swart GW, Westerhof W, Lamers WH, Das PK. Gene expression patterns in melanocytic cells: candidate markers for early stage and malignant transformation. *J Pathol.* 2002;196:51-8.
145. Al-Khafaji ASK, Marcus MV, Davies MPA, Risk JM, Shaw RJ, Field JK. AURKA mRNA expression is an independent predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2017;13:4463-8.

146. Kang X, Liu H, Onaitis MW, Liu Z, Owzar K, Han Y, i sur. Polymorphisms of the centrosomal gene (FGFR1OP) and lung cancer risk: a meta-analysis of 14,463 cases and 44,188 controls. *Carcinogenesis*. 2016;37:280-289
147. Shimizu A, Kaira K, Yasuda M, Asao T, Ishikawa O. Decreased expression of class III  $\beta$ -tubulin is associated with unfavourable prognosis in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2016;26:29-34.
148. Lindquist SL, Kelly JW. Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12). pii: a004507
- 149 Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2005;5:761–72.
150. Langer T, Fasold H. Isolation and quantification of the heat shock protein 90 alpha and beta isoforms from rat liver. *Protoplasma*. 2001;218:54–6.
151. Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res*.2012;18:64–76.
152. Azoitei N, Diepold K, Brunner C, Rouhi A, Genze F, Becher A, i sur. HSP90 supports tumor growth and angiogenesis through PRKD2 protein stabilization. *Cancer Res*. 2014;74:7125-36.
153. Nagaraju GP, Long TE, Park W, Landry JC, Taliaferro-Smith L, Farris AB, i sur. Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal transition, invasion, and migration in colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2015;54:1147-58.
154. Bohonowych JE, Hance MW, Nolan KD, Defee M, Parsons CH, Isaacs JS. Extracellular Hsp90 mediates an NF- $\kappa$ B dependent inflammatory stromal program: implications for the prostate tumor microenvironment. *Prostate*. 2014;74:395-407.



155. Patel K, Wen J, Magliocca K, Muller S, Liu Y, Chen ZG, i sur. Heat shock protein 90 (HSP90) is overexpressed in p16-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma, and its inhibition *in vitro* potentiates the effects of chemoradiation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74:1015-22.
156. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier AT13387, Hsp90 Inhibitor AT13387 in Treating Patients With Locoregionally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Receiving Radiation Therapy and Cisplatin; 2006 Feb 3 [Pristupljeno 21.10.2017]; Dostupno na <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AT13387>
157. Canella A, Welker AM, Yoo JY, Xu J, Abas FS, Kesanakurti D, i sur. Efficacy of Onalespib, a long-acting second-generation HSP90 inhibitor, as a single agent and in combination with Temozolomide against malignant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2017;23:6215-26.
158. Mbofung RM, McKenzie JA, Malu S, Zhang M, Peng W, Liu C, i sur. HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. *Nat Commun.* 2017;8:451.
159. Tas F, Bilgin E, Erturk K, Duranyildiz D. Clinical significance of circulating serum cellular heat shock protein 90 (HSP90) level in patients with cutaneous malignant melanoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18:599-601.
160. Jakovljevic J, Ohmayer U, Gamalinda M, Talkish J, Alexander L, Linnemann J, i sur. Ribosomal proteins L7 and L8 function in concert with six A<sub>3</sub> assembly factors to propagate assembly of domains I and II of 25S rRNA in yeast 60S ribosomal subunits. *RNA.* 2012;18:1805-22.

161. von Mikecz A, Hemmerich P, Peter HH, Krawinkel U. Characterization of eukaryotic protein L7 as a novel autoantigen which frequently elicits an immune response in patients suffering from systemic autoimmune disease. *Immunobiology*. 1994;192:137-54.
162. Wu WC, Liu HW, Lin A. Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association. *FEBS Lett*. 2007;581:651-7.
163. Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA, i sur. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:567-74.
164. Eyden B, Pandit D, Banerjee SS. Malignant melanoma with neuroendocrine differentiation: clinical, histological, immunohistochemical and ultrastructural features of three cases. *Histopathology*. 2005;47:402-9.
165. Greshock J, Nathanson K, Medina A, Ward MR, Herlyn M, Weber BL, i sur. Distinct patterns of DNA copy number alterations associate with BRAF mutations in melanomas and melanoma-derived cell lines. *Genes Chrom Cancer*. 2009;48:419-28.
166. Yarmola EG, Bubb MR. How depolymerization can promote polymerization: the case of actin and profilin. *BioEssays* 2009;31:1150–60.
167. Nejedla M, Sadi S, Sulimenko V, de Almeida FN, Blom H, Draber P, i sur. Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics. *Mol Biol Cell* 2016;27:2381-93.
168. Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, i sur. Mutations in the Profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2012;488:499–503.
169. Zoidakis J, Makridakis M, Zerefos PG, Bitsika V, Esteban S, Frantzi M, i sur. Profilin 1 is a potential biomarker for bladder cancer aggressiveness. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11:M111.009449.

170. Fan Y, Potdar AA, Gong Y, Eswarappa SM, Donnola S, Lathia JD, i sur. Profilin-1 phosphorylation directs angiocrine expression and glioblastoma progression through HIF-1alpha accumulation. *Nat Cell Biol.* 2014;16:445–56.
171. Yao W, Ji S, Qin Y, Yang J, Xu J, Zhang B, i sur. Profilin-1 suppresses tumorigenicity in pancreatic cancer through regulation of the SIRT3-HIF1alpha axis. *Mol Cancer.* 2014;13:187.
172. Adami GR, O'Callaghan TN, Kolokythas A, Cabay RJ, Zhou Y, Schwartz JL. A loss of profilin-1 in late-stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2017;46:489-95.
173. Ma Y, Li YF, Wang T, Pang R, Xue YW, Zhao SP. Identification of proteins associated with lymph node metastasis of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140:1739-49.
174. Cecconi D, Astner H, Donadelli M, Palmieri M, Missiaglia E, Hamdan M, i sur. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Electrophoresis.* 2003;24:4291-303.
175. Gall Trošelj K, Novak Kujundzic R, Ugarkovic D. Polycomb repressive complex's evolutionary conserved function: the role of EZH2 status and cellular background. *Clin Epigenetics.* 2016;8:55.
176. Chaudhury A, Chander P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA.* 2010;16:1449-62.
177. Gangopadhyay A, Thomas P. Processing of carcinoembryonic antigen by Kupffer cells: Recognition of a penta-peptide sequence. *Arch Biochem Biophys.* 1996;334:151–7.
178. Bates PA, Luo J, Sternberg JE. A predicted three-dimensional structure for the carcinoembryonic antigen (CEA) *FEBS Letters.* 1992;301:207–14.

179. Thies A1, Berlin A, Brunner G, Schulze HJ, Moll I, Pfüller U, i sur. Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett.* 2007;248:68-80.
180. Löffek S, Ullrich N, Görgens A, Murke F, Eilebrecht M, Menne C, i sur. CEACAM1-4L promotes anchorage-independent growth in melanoma. *Front Oncol.* 2015;5:234.
181. Dery KJ, Gaur S, Gencheva M, Yen Y, Shively JE, Gaur RK. Mechanistic control of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) splice isoforms by the heterogeneous nuclear ribonuclear proteins hnRNP L, hnRNP A1, and hnRNP M. *J Biol Chem.* 2011;286:16039-51.
182. Klaile E, Müller MM, Kannicht C, Singer BB, Lucka L. CEACAM1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 23):5513-24.
183. Zhang K, Zhu T, Gao D, Zhang Y, Zhao Q, Liu S, i sur. Filamin A expression correlates with proliferation and invasive properties of human metastatic melanoma tumors: implications for survival in patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140:1913-26.
184. Gawecka JE, Griffiths GS, Ek-Rylander B, Ramos JW, Matter ML. R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One.* 2010;5:e11269.
185. Xu Y, Gao XD, Lee JH, Huang H, Tan H, Ahn J, i sur. Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing. *Genes Dev.* 2014;28:1191-203.
186. Bjersand K, Seidal T, Sundström-Poromaa I, Åkerud H, Skirnisdottir I. The clinical and prognostic correlation of HRNPM and SLC1A5 in pathogenesis and prognosis in epithelial ovarian cancer *PLoS One.* 2017;12:e0179363.

187. Wen F, Shen A, Shanas R, Bhattacharyya A, Lian F, Hostetter G, i sur. Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:2619-27.
188. Lu J, Gao FH. Role and molecular mechanism of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development and progression. *Biomed Rep.* 2016;4:657-63.
189. Admon A. Is proteomics starting to deliver on biomarkers discovery. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24:1084-5.

## 11. ŽIVOTOPIS

Andro Košec je rođen 3.9.1985. godine u Zagrebu. Upisao je Privatnu klasičnu gimnaziju 2000. godine, a treći je razred proveo kao stipendist Američke nezavisne udruge srednjih škola u Albuquerque Academy, SAD.

Upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2004. godine te diplomirao 2010. godine s prosječnom ocjena 4,93. Tijekom studija je demonstrirao na kolegijima Fiziologija i imunologija, Patofiziologija i Klinička propedeutika. Nagrađen je Priznanicom za izvrsnost iz patofiziologije, Dekanovom nagradom za najboljeg studenta četvrte godine studija te Rektorovom nagradom za najbolji znanstveni rad „Značenje kliničkog statusa glave i vrata u indikaciji, opsegu i ishodu kirurškog liječenja planocelularnog karcinoma kože glave i vrata“. Izabran je za jednog od najboljih studenata u Republici Hrvatskoj i dodijeljene su mu stipendija Sveučilišta u Zagrebu, stipendija Grada Zagreba za poslijediplomski studij i Top stipendija pod pokroviteljstvom Predsjednika Republike.

Po završetku studija je 2011. upisao poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i završio pripravnički staž u KBC „Sestre milosrdnice“, gdje je 2012. godine otpočeo specijalizaciju iz otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata. Odslušao je stručni poslijediplomski studij Otorinolaringologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i objavio 11 radova indeksiranih u Current Contents i 3 u SCI Expanded. Recenzent je u International Journal of Dermatology i International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. Usavršavao se u Landeskrankenhaus St. Poelten i Weill-Cornell seminarima u Salzburgu, Austriji, Prosper-Hospital Klinik für HNO-Heilkunde u Recklinghausenu, Njemačkoj, Institute for Head and Neck Surgery, Cleveland Clinic i Cranial Base Surgery Center, University of Pennsylvania, SAD.

Sretno je oženjen Lucijom.