

Dijagnostika malignog melanoma imunohistokemijskim bojanjem.

Matešković, Antonela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:555661>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Antonela Matešković

DIJAGNOSTIKA MALIGNOG

MELANOMA

IMUNOHISTOKEMIJSKIM BOJENJEM

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Antonela Matešković

DIJAGNOSTIKA MALIGNOG

MELANOMA

IMUNOHISTOKEMIJSKIM BOJENJEM

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u KBC-u Osijek

Mentor rada: Ksenija Marjanović, doc. dr. sc.

Rad ima 26 listova i 14 tablica.

Veliku zahvalnost izražavam mentorici doc. dr. sc. Kseniji Marjanović na predloženoj temi, pruženoj prilici za suradnju, potpori na mom stručnom i znanstvenom usavršavanju i pomoći pri realizaciji rada.

Hvala kolegama i prijateljima koji su moje studiranje učinili ljepšim i ugodnijim.

Posebno hvala mojoj obitelji na svim odricanjima i razumijevanju.

Hvala svima od srca što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene!

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Dijelovi kože	1
1.1.1. Epidermis	1
1.1.2. Dermis	1
1.2. Melanin i melanociti.....	2
1.3. Što je melanom?	2
1.3.1. Čimbenici nastanka melanoma.....	3
1.4. Vrste melanoma.....	3
1.4.1. Klinički stadiji melanoma	4
1.5. Klasifikacija melanoma.....	4
1.6. Prevencija melanoma	5
1.6.1. Primarna prevencija.....	5
1.6.2. Sekundarna prevencija	5
2. CILJ.....	6
3. ISPITANICI I METODE.....	7
3.1. Ustroj studije	7
3.2. Ispitanici	7
3.3. Metode.....	7
3.3.1. Obrada tkiva	7
3.3.2. Imunohistokemija.....	9
3.4. Statističke metode	10
4. REZULTATI.....	11
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČAK	21
7. SAŽETAK	22
8. SUMMARY	23
9. LITERATURA	24
10. ŽIVOTOPIS	26

1. UVOD

1.1. Dijelovi kože

Koža je jedan od najvećih i najtežih organa u tijelu. Težina joj je oko 16 % ukupne tjelesne težine (1). Koža se sastoji od epidermisa i korijuma (dermisa). Između sloja epidermisa i papilarnog sloja dermisa nalazi se bazalna lamina. Ispod bazalne lamine je mreža retikulinskih vlakana koja se zove lamina reticularis. Bazalna lamina zajedno s laminom reticularis tvori bazalnu membranu vidljivu svjetlosnim mikroskopom. Bazalna membrana čini dermoepidermalnu granicu koja veže epidermis s dermisom. Dermoepidermalna granica je vrlo neravna te se tako povećava površina kroz koju difuzijom prolaze hranjive tvari i kisik potrebni za metabolizam epidermisa (2).

1.1.1. Epidermis

Epidermis je epitelni sloj ektodermalnog podrijetla koji se sastoji od oroženog mnogoslojnog pločastog epitela, no sadrži i tri posebne vrste stanica: melanocite, Langerhansove stanice i Merkelove stanice (1). Epidermis se sastoji od nekoliko slojeva, a to su: temeljni sloj (stratum basale), nazubljeni sloj (stratum spinosum), zrnati sloj (stratum granulosum), svijetli sloj (stratum lucidum) i površinski, rožnati sloj (stratum corneum) (2).

1.1.2. Dermis

Dermis je vezivno tkivo mezodermalnog podrijetla koje podupire epidermis i povezuje ga s potkožnim tkivom. Dermis se dijeli na papilarni i na retikularni dermis. Papilarni dermis je tanki sloj građen od rahlog vezivnog tkiva. Retikularni sloj je deblji sloj koji se sastoji od gustog vezivnog tkiva (uglavnom kolagen tip I). U dermisu se nalazi gusta mreža krvnih i limfnih žila, kao i derivati epidermisa poput folikula dlake ili žlijezde lojnice i znojnice (1). Derivati epidermisa u dermisu važan su izvor epitelnih stanica koje mogu biti centar epitelizacije u slučajevima kada je epidermis uklonjen (opekline, uzimanje slobodnog kožnog transplantata) (2).

1.2. Melanin i melanociti

Melanin je pigment koji nastaje iz aminokiseline tirozina. Nakon toga se pohranjuje u stanicama epidermisa. Ima zaštitnu ulogu, pa tako štiti tijelo od djelovanja štetnih UV zraka. Melanin je također odgovoran i za boju kose, zjenice oka, pronađen je i na mozgu. Prisutan je u koži na različitim dubinama (2). U sintezi melanina važnu ulogu ima enzim tirozinaza. Djelovanjem tirozinaze tirozin se pretvara u 3,4-dihidroksifenilalanin, a nakon toga u dopakvinon koji se nizom reakcija pretvara u melanin.

Postoji nekoliko vrsta melanina - eumelanin, feomelanin i neuromelanin. Eumelanin je pronađen u koži, kosi i tamnim područjima oko bradavica. Feomelanin je također pronađen u kosi i koži. Ta vrsta melanina daje crvenu i ružičastu boju pa je feomelanin glavni pigment koji je pronađen kod crvenokosih ljudi. Neuromelanin je tip melanina koji je pronađen u različitim dijelovima mozga (3).

Melanociti su stanice koje proizvode pigment melanin koji je potreban da bi se koža zaštitila od štetnog ultraljubičastog zračenja (2). Melanociti potječu od stanica neuralnog grebena. Sadržavaju mitohondrije, Golgijev aparat i hrapavi endoplazmatski retikulum (1). Melanociti se nalaze u bazalnim slojevima epidermisa kao i u folikulima dlaka, mrežnici i ovojnica mozga. Gustoća melanocita ovisi o izloženosti UV zračenju, a može biti u odnosu na keratinocite 1 : 4 do 1 : 30 (2).

1.3. Što je melanom?

Melanom je jedan od najagresivnijih tumora. Nastaje iz aktiviranih ili genski izmijenjenih epidermalnih melanocita. Rezultat je kompleksnih interakcija između genskih, konstitucijskih te okolišnih čimbenika. Melanom nastaje malignom preobrazbom melanocita (4).

Najčešće se pojavljuje u bijelaca, dva puta više kod žena nego kod muškaraca, posebno u srednjoj životnoj dobi. Različite su lokalizacije melanoma, najčešće lokalizirani melanomi su oni na području glave i vrata. Melanomi nisu samo zloćudni tumori kože, melanom oka je druga najčešća lokalizacija te bolesti (5, 6).

1.3.1. Čimbenici nastanka melanoma

Za razvoj melanoma važne su dvije skupine čimbenika: čimbenici domaćina i okolišni čimbenici.

Obiteljska anamneza za melanom je pozitivna u oko 10 do 15 % bolesnika s melanomom. Također, bolesnici kojima je dijagnosticiran melanom kože pripadaju u skupinu s povećanim rizikom za razvoj sljedećeg primarnog melanoma. Smatra se da atipični nevusi ili velik broj urednih nevusa predstavljaju genski biljeg povećanog rizika, a ne premaligne promjene iz koje bi se mogao razviti melanom. Samo 25 - 40 % melanoma nastaje iz nevusa, većina melanoma nastaje *de novo* (4). Tip kože je također jedan od čimbenika domaćina koji utječu na pojavu melanoma. Osobe svijetle puti, crvene ili svijetle kose, plavih očiju, s pjegama, a koje brzo zadobiju opekline pri izlaganju suncu i teško potamne spadaju u najrizičniju skupinu za nastanak melanoma. Smatra se da jedna trećina bolesnika s obiteljskim melanomom ima mutaciju CDKN2A gena. Od okolišnih čimbenika koji su važni za razvoj melanoma najznačajnije je UV zračenje (4).

1.4. Vrste melanoma

Razlikujemo četiri osnovna histološka tipa melanoma:

- Lentigo maligna melanoma – Melanom koji je povezan s UV zračenjem odnosno sunčevim svjetlom. Javlja se u 4 do 10 % slučajeva melanoma. Morfološki se očituje kao nepravilna smeđa mrlja na licu koja pokazuje bifazičan rast.
- Superficialno šireći melanom – Melanom koji najčešće nastaje u melanocitnih prekursora, a pojavljuje se u 70 % slučajeva melanoma. Najčešće se nalazi na leđima kod muškaraca, a kod žena na donjim udovima. Taj melanom također pokazuje bifazičan rast.
- Nodularni melanom – Melanom koji nastaje *de novo*. Pojavljuje se u 15 do 30 % slučajeva melanoma, najčešće kod muškaraca, a lokaliziran je na području glave, vrata i trupa. Taj melanom pokazuje monofazičan rast.
- Akrolentiginozni melanom – Melanom koji je karakterističan za obojene rase. Kod bijele rase pojavljuje se samo u 2 do 8 % slučajeva. Najčešće je lokaliziran na području dlanova, tabana i pod noktima. Taj melanom pokazuje bifazičan rast (7).

1.4.1. Klinički stadiji melanoma

Razlikujemo tri klinička stadija melanoma:

- Prvi stadij – Primarni tumor bez klinički vidljivih regionalnih metastaza
- Drugi stadij – Primarni tumor s klinički vidljivim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima
- Treći stadij – Primarni tumor s udaljenim hematogenim ili limfogenim metastazama (7).

Petogodišnje preživljavanje prvog stadija je od 70 do 80 %, drugog stadija 25 %, a trećeg 0 % (7).

1.5. Klasifikacija melanoma

Wallace H. Clark predložio je Clarkove stupnjeve invazije melanoma prema zahvaćenosti epidermisa i dermisa, što je bila jedna od prvih klasifikacija melanoma. Model je obuhvatio spol, lokalizaciju melanoma, dubinu invazije melanoma, mitotski indeks, prisutnost ili odsutnost regresije tumora i stupanj imunološkog odgovora (Tablica 1.1.) (2,7).

Tablica 1.1. Clarkova klasifikacija dubine invazije.

Stupanj	Histološke karakteristike
I	Zahvaćen je epidermis (in situ).
II	Zahvaća papilarni dermis, ali ne doseže papilarno-retikularnu granicu.
III	Ispunjava papilarni dermis i dopire do retikularnog dermisa.
IV	Zahvaća retikularni dermis, ali ne zahvaća subkutis.
V	Zahvaća retikularni dermis i subkutis.

Alexander Breslow uveo je određivanje debljine melanoma kao osnovni prognostički pokazatelj lokaliziranog melanoma. To je prvi kvantitativni pokazatelj dijagnostike melanoma, koji je i jednostavan za mjerenje (Tablica 1.2.) (2,7).

Tablica 1.2. Breslowova klasifikacija debljine melanoma.

Stupanj	Maksimalna debljina melanoma
I	$\leq 0,75$ mm
II	0,76 - 1,50 mm
III	1,51 - 2,25 mm
IV	2,26 - 3 mm
V	≥ 3 mm

1.6. Prevencija melanoma

1.6.1. Primarna prevencija

Prema dostupnim podacima 80 % svih zloćudnih tumora kože uzrokovano je UV zračenjem. U postupke primarne prevencije ubrajamo kreme za sunčanje koje smanjuju akutne učinke UV zračenja, faktore zaštite od sunčevog zračenja koji imaju SPF (sun protection factor), a podrazumijevaju stupanj zaštite samo od UVB zračenja (4).

1.6.2. Sekundarna prevencija

Cilj sekundarne prevencije je što ranije otkrivanje i dijagnosticiranje melanoma.

U postupke sekundarne prevencije ubrajamo samopreglede koji označavaju detaljan pregled madeža, primjećivanje promjena pigmentacije i strukture kože kao i primjećivanje novih promjena. Osim samopregleda, u postupke sekundarne prevencije pripadaju i odlasci na pregled kod dermatologa. Dermatolog procjenjuje radi li se o osobi koja spada u rizičnu skupinu i ima li na koži promjene koje su sumnjive ili su za kontinuirano praćenje. Genetičko savjetovanje je također dio sekundarne prevencije jer su brojna istraživanja pokazala da neki ljudi mogu naslijediti mutirane gene od roditelja, što povećava rizik za nastanak melanoma (4).

2. CILJ

U ovom istraživanju postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Utvrditi broj dijagnosticiranih melanoma tijekom pet godina
2. Utvrditi učestalost melanoma ovisno o klasifikaciji prema Breslowu i Clarku
3. Usporediti proliferacijski indeks prema patohistološkim stadijima po Breslowu i Clarku.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječno, a pri izradi završnog rada koristio se retrospektivni tip studije (8).

3.2. Ispitanici

U radu će se koristiti postojeća medicinska dokumentacija (arhiv) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu dijagnosticiranih melanoma operiranih u KBC-u Osijek, od 2012. do 2016. g.

Svi pronađeni bolesnici će se voditi pod šifrom broja biopsije. Obrada materijala neće utjecati na dijagnozu i liječenje bolesnika čiji će se materijal koristiti u studiji.

3.3. Metode

Analiza postojeće medicinske dokumentacije (arhiv) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu dijagnosticiranih melanoma operiranih u KBC-u Osijek, od 2012. do 2016. g. Uzorci tkiva analizirat će se morfološki, mikroskopom marke Olympus®, model CX40, na postojećim arhivskim histološkim staklima, bojenim standardnim hemalaun-eozin i imunohistokemijskim bojenjem na melan A, HMB45 te Ki67.

3.3.1. Obrada tkiva

Fiksacija je prvi i najvažniji postupak u pripremi tkiva za mikroskopiranje. Fiksacija se provodi kako bi se izbjegla razgradnja tkiva enzimima ili bakterijama. Fiksacija se provodi tako da se tkivo uroni u otopinu tvari koje stabiliziraju ili križno povezuju bjelančevine u tkivu kako bi se bolje očuvale morfološke i molekularne značajke tkiva. Fiksativi su tvari kojima se obavlja fiksacija. Idealni fiksativ trebao bi očuvati stanice bez ikakvog oštećenja (autoliza, razgradnja bakterijama), spriječiti raspadanje stanica, zaštititi tkiva od štetnih utjecaja tijekom obrade tkiva za analizu. Najčešće korišteni fiksativi su neutralni puferirani formalin ili otopina 10 %-tnog formalina u vodi. Uz pravilan izbor fiksativa jako je važno vrijeme fiksacije, pH i temperatura. Primjerice, formalin brzo prodire u tkivo, ali ga sporo fiksira. Fiksacija se odvija na način da se stvaraju metilenski mostovi između karbonilne

skupine formaldehida i amino skupina bočnih lanaca proteina. Važno je napomenuti da je formalin mogući kancerogen (9).

Dehidracija se provodi radi uklanjanja vode iz tkiva. Postupak dehidracije podrazumijeva uzastopno prenošenje tkiva u mješavine etanola i vode, krenuvši od manjih koncentracija (70 %-tni etanol) do većih koncentracija (apsolutni etanol). Dehidracija ne smije biti nagla kako se ne bi oštetilo tkivo. Nakon tog koraka, etanol se zamjenjuje otapalom za sredstvo za uklanjanje. Nakon dehidracije slijedi uklapanje u parafin, a sredstvo koje se koristi za to je najčešće ksilol. Tijekom prožimanja otapala, tkivo u većini slučajeva postane prozirno, pa se u skladu s tim postupak i naziva prosvjetljivanje. Ksilol je otapalo koje omogućuje prodor parafina u tkivo i istiskivanje alkohola iz tkiva. Ukoliko je došlo do nepotpune dehidracije tkiva, ksilol će se zbog sadržaja vode mliječno zamutiti. To predstavlja velik problem jer će preparati biti nejednoliko obojeni (9).

Za uklapanje tkiva koristi se parafin. Parafin je mješavina lančastih ugljikohidrata s 22 - 28 ugljikovih atoma u lancu. Kada je tkivo prožeto otapalom, stavlja se u otopljeni parafin u termostatu na temperaturu 58 °C - 60 °C. Pod utjecajem visoke temperature otapalo ispari, a tekući parafin prožima tkivo bez toplinskog i kemijskog oštećenja sve dok se svi prostori ne ispune parafinom. Metalna kadica napuni se mješavinom voska i parafina, tkivo se utisne na dno kadice i poklopi plastičnom kasetom koja se koristila i za dehidriranje tkiva. Tim postupkom dobiveni su parafinski blokovi koje treba brzo ohladiti kako bi se spriječilo stvaranje velikih kristala vidljivih u preparatu. Mikrotom je uređaj koji služi za rezanje parafinskih blokova. Postoje rotacijski i klizni mikrotomi. Nakon postupka na mikrotomu, rezovi se postave na predmetna stakalca i suše na termostatu pri temperaturi od 56 °C tijekom 12 sati ili više (9).

Hematoksilin zapravo ne boji. Hematoksilin se oksidira u hematein koji s ionima aluminijske stvara bazičnu boju hemalaun. Hemalaun je boja koja dobro boji jezgru i prikazuje jezgrine detalje. Eozin je kisela boja koja boji acidofilne strukture (citoplazmu, mišićno tkivo...) različitim intenzitetima crvene boje. Eozin je negativno nabijen pa na sebe veže pozitivno nabijene protone citoplazme. Potrebne kemikalije za to bojenje su Mayerov hematoksilin, 1 %-tna otopina eozina, apsolutni alkohol, ksilol (9).

Protokol bojenja preparata hematoksilin - eozin tehnikom:

1. Deparafinizacija u ksilolu..... 30 - 45 minuta
2. Ispiranje u apsolutnom alkoholu..... 3x 10 minuta
3. Ispiranje pod tekućom vodom..... 5 minuta
4. Nanošenje Mayerov hematoksilin..... 5 minuta
5. Ispiranje pod tekućom vodom..... 10 minuta
6. Nanošenje 1 %-tne otopine eozina..... 1 minutu
7. Ispiranje viška boje pod tekućom vodom
8. Ispiranje u apsolutnom alkoholu..... 3x 10 minuta
9. Izbistravanje u ksilolu..... 2x 10 minuta
10. Pokrivanje medijem za montiranje trajnih preparata

3.3.2. Imunohistokemija

Imunohistokemija je metoda kojom pronalazimo antigene u tkivima ili stanicama na temelju reakcije antigen-antitijelo. Osnovni princip imunohistokemije je da se određeno antitijelo veže i prepoznaje ciljni antigen, a nakon tog specifičnog vezanja protutijela slijedi očitavanje signala koji je rezultat obilježavanja protutijela kromogenima. Razlikujemo direktnu i indirektnu metodu. Direktna metoda podrazumijeva lokaliziranje antigena uz uporabu specifičnog primarnog protutijela koje je obilježeno za taj antigen. Direktna metoda je jednostavnija od indirektna. Indirektna metoda uključuje primarna i sekundarna antitijela. Primarna antitijela su neoznačena, a zadaća im je otkriti antigen, dok su sekundarna protutijela označena i njihova je zadaća otkriti primarna protutijela. Reakcija kromogena zasniva se na pretvorbi kromogena DAB koja je potaknuta preoksidazom hrena u vidljivi reakcijski produkt na veznim mjestima antigena i antitijela. Imunohistokemijske metode rabe se samo u dvojbjenim slučajevima i pomoćno su sredstvo koje će patologu olakšati postavljanje točne dijagnoze (10).

Za potrebe ovog rada pregledana su arhivska histološka stakla bojena imunohistokemijskim bojenjem na melan A, HMB45 i Ki-67.

Melan A je manje specifičan melanosomalni protein koji se koristi u imunohistokemijskoj analizi melanocitnih lezija. Membranski je protein kojemu funkcija nije do kraja razjašnjena. Melan A reagira s melanomskim stanicama i sa stanicama nevusa u kombinaciji s HMB45 (4).

HMB45 (*human melanoma black 45*) je monoklonsko antitijelo na antigen prisutan u melanocitnim tumorima, a koristi se za analizu primarnih i metastatskih melanoma. HMB45 veže se na glikoprotein koji se nalazi u premelanosomima te reagira s melanomskim stanicama, funkcionalno smještenim nevusnim stanicama i fetalnim melanocitima, ali ne reagira s dermalno smještenim nevusnim stanicama (zrelim melanocitima). HMB45 osim kod primarnih i metastatskih melanoma može biti pozitivan i kod rijetkih nemelanomskih tumora (pigmentirani švanom, sarkom svijetlih stanica...) (4).

Ki-67 je nuklearni protein, biljeg proliferacije koji se koristi u dijagnostici mnogih tumora, pa tako nije specifičan za melanomske lezije. Reagira sa stanicama koje se nalaze u mitozu ili bilo kojoj od aktivnih faza staničnog ciklusa, dok je negativan u stanicama koje se nalaze u fazi mirovanja (4).

Potpuni postupak imunohistokemijskog bojenja proveden je na aparatu Ventana BenchMark Ultra.

Antitijela koja su korištena za imunohistokemijsko bojenje su:

1. Anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
2. Anti-Melanosome (HMB45) Mouse Monoclonal Primary Antibody
3. Anti-MART-1/melan A (A103) Mouse Monoclonal Primary Antibody.

3.4. Statističke metode

Za prikaz podataka u ovom radu korištene su metode deskriptivne statistike. Za statističku obradu podataka rabljen je program Microsoft Excel (inačica 14.0, Microsoft, Redmond, WA, SAD).

4. REZULTATI

Od 1. siječnja 2012. godine do 31. prosinca 2016. godine u Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek dijagnosticirano je 189 primarnih melanoma. Melanom je dijagnosticiran kod 113 muškaraca (59,8 %) i 76 žena (40,2 %). Najmlađi ispitanik imao je 14 godina, a najstariji 92 godine. Prosječna životna dob ispitanika bila je 61,3 godine. Melanomi su se podjednako javljali svake godine (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Raspodjela primarno dijagnosticiranih melanoma 2012. - 2016. godine.

Godina	Broj melanoma	%
2012.	37	19,6
2013.	37	19,6
2014.	40	21,2
2015.	35	18,5
2016.	40	21,2

Melanomi su se najčešće javljali u srednjoj i starijoj životnoj dobi s najvećom učestalošću u dobnoj skupini 70 - 79 godina (33,3 %) (Tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Raspodjela dijagnosticiranih melanoma po dobnim skupinama.

	M	Ž	Ukupno
10-19	3		3
20-29	2		2
30-39	7	3	10
40-49	11	16	27
50-59	21	14	35
60-69	27	12	39
70-79	37	26	63
80-89	4	5	9
90-99	1		1
Ukupno	113	76	189

Najčešće su lokalizacije na koži, njih 178 (93,2 %), dok je ostalih lokalizacija bilo 13 (6,8 %) (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Raspodjela melanoma po lokalizaciji.

			%	
Koža	glava	32	16,9	
	vrat	7	3,7	
	trup	80	42,3	
	gornji udovi	21	11,1	
	donji udovi	36	19,1	
	Ukupno		176	
Ostale lokalizacije	oko	5	2,7	
	nosna šupljina	4	2,1	
	usna šupljina	1	0,5	
	larinks	1	0,5	
	anus/rektum	2	1,1	
	Ukupno		13	

S obzirom na klasifikaciju po Clarku, najzastupljeniji stupnjevi su Clark III (32,4 %) i Clark IV (32,4 %) (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Raspodjela melanoma prema klasifikaciji po Clarku.

Clark	Broj ispitanika	%
Clark I	12	6,8
Clark II	31	17,6
Clark III	57	32,4
Clark IV	57	32,4
Clark V	19	10,8
Ukupno	176	

U odnosu na stupnjeve po Clarku i lokalizaciju na koži najčešće je zahvaćen trup (45,4 %) (Tablica 4.5.).

Tablica 4.5. Odnos klasifikacije po Clarku i lokalizacije na koži.

	Clark I	Clark II	Clark III	Clark IV	Clark V	Ukupno
Glava	2 (1,1 %)	8 (4,5 %)	8 (4,5 %)	8 (4,5 %)	6 (3,4 %)	32 (18 %)
Vrat		2 (1,1 %)	2 (1,1 %)	2 (1,1 %)	1 (0,6 %)	7 (3,9 %)
Trup	9 (5,1 %)	12 (6,8 %)	27 (15,3 %)	25 (14,2 %)	7 (4 %)	80 (45,4 %)
Gornji udovi	1 (0,6 %)	3 (1,7 %)	8 (4,5 %)	7 (4 %)	2 (1,1 %)	21 (11,9 %)
Donji udovi		6 (3,4 %)	12 (6,8 %)	15 (8,5 %)	3 (1,7 %)	36 (20,4 %)
Ukupno	12 (6,8 %)	31 (17,5 %)	57 (32,2 %)	57 (32,3 %)	19 (10,8 %)	176

Najzastupljeniji stupanj prema klasifikaciji po Breslowu je Breslow I (28,4 %). U 16 (9,1 %) slučajeva tumori su bili polipoidni ili ulcerirani te Breslow nije napravljen (Tablica 4.6.).

Tablica 4.6. Raspodjela melanoma prema klasifikaciji po Breslowu.

Breslow	Broj ispitanika	%
Breslow I	50	28,4
Breslow II	30	17
Breslow III	25	14,2
Breslow IV	22	12,5
Breslow V	33	18,8
Nije napravljen	16	9,1
Ukupno	176	

S obzirom na lokalizaciju melanoma na koži i stupnjeve prema klasifikaciji po Breslowu najčešće je zahvaćen trup (45,1 %). U 16 (9,1 %) slučajeva tumori su bili polipoidni ili ulcerirani te Breslow nije napravljen (Tablica 4.7.).

Tablica 4.7. Odnos klasifikacije po Breslowu i lokalizacije na koži.

	Breslow I	Breslow II	Breslow III	Breslow IV	Breslow V	Ukupno
Glava	11 (6,9 %)	4 (2,5 %)	2 (1,3 %)	5 (3,1 %)	7 (4,4 %)	29 (18,2 %)
Vrat	3 (1,9 %)	1 (0,6 %)		2 (1,3 %)		6 (3,8 %)
Trup	24 (15 %)	15 (9,4 %)	11 (6,9 %)	8 (5 %)	14 (8,8 %)	72 (45,1 %)
Gornji udovi	4 (2,5 %)	3 (1,9 %)	5 (3,1 %)	3 (1,9 %)	5 (3,1 %)	20 (12,5 %)
Donji udovi	8 (5 %)	7 (4,4 %)	7 (4,4 %)	4 (2,5 %)	7 (4,4 %)	33 (20,7 %)
Ukupno	50 (31,3 %)	30 (18,8 %)	25 (15,7 %)	22 (13,8 %)	33 (20,7 %)	160

Nizak proliferacijski indeks (Ki-67) bio je evidentiran kod 33 % ispitanika, srednji kod 19,9 %, dok je 47,1 % ispitanika imalo visok Ki-67. Uspoređujući klasifikaciju po Clarku i stupanj proliferacijskog indeksa najveći broj ispitanika evidentiran je s Clarkom IV visokog Ki-67 (23,9 %) (Tablica 4.8.).

Tablica 4.8. Odnos Ki-67 i klasifikacije po Clarku.

	Nizak Ki-67	Srednji Ki-67	Visok Ki-67
Clark I	10 (5,7 %)	1 (0,6 %)	1 (0,6 %)
Clark II	24 (13,6 %)	4 (2,3 %)	3 (1,7 %)
Clark III	20 (11,4 %)	17 (9,6 %)	20 (11,3 %)
Clark IV	3 (1,7 %)	12 (6,8 %)	42 (23,9 %)
Clark V	1 (0,6 %)	1 (0,6 %)	17 (9,6 %)
Ukupno	58 (33 %)	35 (19,9 %)	83 (47,1 %)

Najviše ispitanika (58) je imalo nizak Ki-67, 35 ispitanika srednji Ki-67, a njih 83 visok Ki-67. Uspoređujući debljinu tumorske infiltracije (Breslow) i proliferacijski indeks, najveći broj ispitanika (22,7 %) imao je Breslow I s niskim Ki-67. U 9,1 % ispitanika tumori su bili polipoidni ili ulcerirani te Breslow nije napravljen (Tablica 4.9.).

Tablica 4.9. Odnos Ki-67 i klasifikacije po Breslowu.

	Nizak Ki-67	Srednji Ki-67	Visok Ki-67
Breslow I	40 (22,7 %)	6 (3,4 %)	4 (2,3 %)
Breslow II	11 (6,3 %)	8 (4,6 %)	11 (6,2 %)
Breslow III	4 (2,3 %)	11 (6,3 %)	10 (5,7 %)
Breslow IV	1 (0,6 %)	3 (1,7 %)	16 (9,1 %)
Breslow V	2 (1,1 %)	5 (2,8 %)	28 (15,9 %)
Bez procjene		2 (1,1 %)	14 (7,9 %)
Ukupno	58 (33 %)	35 (19,9 %)	83 (47,1 %)

Najviše ispitanika imalo je nizak mitotski indeks (70,4 %). Srednji mitotski indeks imalo je 17,6 % ispitanika, a visok mitotski indeks imalo je 11,9 % ispitanika. Uspoređujući klasifikaciju po Clarku i mitotski indeks, najveći broj ispitanika imao je Clark III (26,7 %) s niskim mitotskim indeksom (Tablica 4.10.).

Tablica 4.10. Odnos mitotskog indeksa i klasifikacije po Clarku.

	Nizak broj mitoza	Srednji broj mitoza	Visok broj mitoza
Clark I	11 (6,2 %)		1 (0,6 %)
Clark II	29 (16,5 %)	1 (0,6 %)	1 (0,6 %)
Clark III	47 (26,7 %)	5 (2,8 %)	5 (2,8 %)
Clark IV	30 (17 %)	18 (10,2 %)	9 (5,1 %)
Clark V	7 (4 %)	7 (4 %)	5 (2,8 %)
Ukupno	124 (70,4 %)	31 (17,6 %)	21 (11,9 %)

Najviše ispitanika imalo je nizak mitotski indeks (70,4 %), srednji mitotski indeks imalo je 17,6 % ispitanika, a visok mitotski indeks imalo je 11,9 % ispitanika. Uspoređujući klasifikaciju po Breslowu i mitotski indeks, najveći broj ispitanika (26,7 %) imao je Breslow I niskog mitotskog indeksa (Tablica 4.11.).

Tablica 4.11. Odnos mitotskog indeksa i klasifikacije po Breslowu.

	Nizak broj mitoza	Srednji broj mitoza	Visok broj mitoza
Breslow I	47 (26,7 %)	1 (0,6 %)	2 (1,1 %)
Breslow II	29 (16,5 %)		1 (0,6 %)
Breslow III	21 (11,9 %)	2 (1,1 %)	2 (1,1 %)
Breslow IV	7 (4 %)	10 (5,7 %)	3 (1,7 %)
Breslow V	14 (7,9 %)	14 (7,9 %)	7 (4 %)
Bez procjene	6 (3,4 %)	4 (2,3 %)	6 (3,4 %)
Ukupno	124 (70,4 %)	31 (17,6 %)	21 (11,9 %)

Od ukupno 189 dijagnosticiranih melanoma, u 33 ispitanika, u vrijeme dijagnosticiranja primarnog tumora, evidentiran je metastatski proces. Najčešće se radilo o metastazama u regionalne limfne čvorove (81,8 %), sa najčešćim primarnim sijelom u području kože trupa i donjih udova (27,2 %) (Tablica 4.12.). Kod 12,1 % ispitanika, od ukupno evidentiranih

metastaza, dijagnosticirane su multiple udaljene metastaze (jetra, pluća, nadbubrežna žlijezda, dojka, štitnjača). Metastaze u mozak evidentirane su u 6,1 % ispitanika.

Tablica 4.12. Lokalizacija metastaza u odnosu na primarna sijela melanoma.

Koža	glava	4
	vrat	1
	trup	9
	gornji udovi	5
	donji udovi	9
Ostale lokalizacije	oko	
	nosna šupljina	2
	usna šupljina	
	larinks	1
	anus/rektum	2
Ukupno		33

5. RASPRAVA

Incidencija malignih melanoma u konstantnom je porastu. Prema podacima je 132 000 malignih melanoma dijagnosticirano svake godine u svijetu, dok je svaki treći dijagnosticirani rak kod ljudi rak kože (11).

Smatra se da će u SAD-u tijekom 2017. godine biti dijagnosticirano 87 110 novih slučajeva melanoma, a da će 9 730 ljudi umrijeti od posljedica istog tijekom 2017. godine. Prema istraživanju provedenom u Velikoj Britaniji, uzrok 86 % melanoma je izlaganje sunčevom UV zračenju (12).

U Hrvatskoj se također bilježi porast incidencije melanoma. To je jedan od tumora s najvećom ekspanzijom u posljednjih nekoliko godina. Godišnje povećanje broja oboljelih u Hrvatskoj iznosi 7 %. Godišnje se otkrije oko 580 novootkrivenih melanoma (13). Melanom je iznimno rijedak tumor u svim populacijama prije 40. godine života, iako je posljednjih godina uočen rast u mlađim dobnim skupinama (4).

U ovom istraživanju provedenom u KBC-u Osijek od 2012. do 2016. godine dijagnosticirano je 189 primarnih melanoma. Melanomi su se češće javljali kod muškaraca (59,8 %).

Najviše dijagnosticiranih melanoma bilo je u dobnoj skupini od 70 do 79 godina (33,3 %). U ovom istraživanju melanomi su najčešće bili lokalizirani na koži i to u području trupa (42,3 %).

Razne kliničke studije pokazale su da, s obzirom na lokalizaciju, melanom najčešće zahvaća trup kod ispitanika u dobnoj skupini između 50 i 60 godina, a kod populacije starije od 80 godina najčešće lokalizacije su vrat i glava (4).

Dvije deskriptivne studije provedene u Kanadi i na Novom Zelandu utvrdile su postupni porast incidencije melanoma na trupu usporedno sa životnom dobi. Svoj vrhunac melanomi trupa dosežu u kasnijoj srednjoj životnoj dobi, a potom incidencija polagano opada (14, 15).

Istraživanje iz 1978. godine u SAD-u obuhvatilo je 339 ispitanika s dijagnosticiranim melanomom tijekom 17 godina te je utvrdilo da je 70 % ispitanika imalo dijagnosticiran melanom kojemu je dodijeljen stupanj Clark III (34 %) i Clark IV (36 %) (16).

Istraživanje koje je provedeno u Općoj bolnici Varaždin na Odjelu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu od kraja 2014. do početka 2016. godine utvrdilo je da je najviše melanoma u stupnju Clark II i kod žena i kod muškaraca. Najčešća lokalizacija melanoma kojemu je

dodijeljen Clark II kod žena bio je trup, dok su leđa kod muškaraca najčešća lokalizacija kojemu je dodijeljen Clark II (17).

U ovom istraživanju raspodjela melanoma prema klasifikaciji po Clarku pokazala je da su najzastupljeniji stupnjevi bili Clark III i Clark IV s ukupno 64,8 %, nakon ta dva stupnja slijedi Clark II s ukupno 17,6 % pojavnosti.

Također, obrađeni su podatci koji pokazuju odnos klasifikacije po Clarku i lokalizacije na koži. Oni pokazuju da je najčešće zahvaćen trup (45,4 %) gdje je najzastupljeniji stupanj Clark III (15,3 %). Nakon njega najčešće dijagnosticirani melanom bio je melanom donjih udova (20,4 %) gdje je najzastupljeniji stupanj bio Clark IV (8,5 %).

U istraživanju provedenom 1978. godine u SAD-u utvrdilo se da je najzastupljeniji stupanj zahvaćenosti po Breslowu bio Breslow III (36 %), nakon kojeg slijedi Breslow II (23 %) (16). Istraživanje provedeno u Općoj bolnici Varaždin utvrdilo je da je najviše dijagnosticiranih melanoma prema klasifikaciji po Breslowu imalo stupanj Breslow I i kod žena i kod muškaraca. Najčešća lokalizacija melanoma kojemu je dodijeljen Breslow I kod žena bio je trup, dok je kod muškaraca najveća zastupljenost melanoma bila lokalizirana na leđima (17).

U ovom istraživanju najzastupljeniji stupanj po klasifikaciji po Breslowu bio je Breslow I (28,4 %), nakon kojeg slijedi Breslow V (18,8 %). Najviše dijagnosticiranih melanoma bilo je lokalizirano na trupu, a oni su najčešće pokazivali stupanj Breslow I (15 %).

Prema istraživanju koje je objavljeno 2010. godine u kojemu se proučavala povezanost proliferacijskog indeksa (Ki-67) i broja mitozu kod dijagnosticiranih melanoma, znanstvenici su utvrdili da su povećan broj mitozu i ekspresija Ki-67 povezani s raznim značajkama melanoma poput povećanog nivoa Clarkove invazije, prisutnosti tumorske ulceracije, tumorske nekroze i vaskularne invazije. Kao zaključak donijeli su da je Ki-67 bolji prognostički pokazatelj od broja mitozu (18).

U ovom je istraživanju najviše ispitanika imalo visok Ki-67 (47,1 %), najviše sa stupnjem Clark IV (23,9 %) i Breslow V (15,9 %). Najmanje ispitanika imalo je srednje vrijednosti Ki-67 (19,9 %) gdje se isticao Clark III (9,6 %) i Breslow III (6,3 %).

Analiziranjem odnosa mitotskog indeksa i klasifikacije po Clarku i Breslowu najveći broj ispitanika imao je nizak broj mitozu (70,4 %), najviše sa stupnjem Clark III (26,7 %) i Breslow I (26,7 %). Najmanji broj ispitanika imao je visok mitotski indeks (11,9 %), najčešće sa stupnjem Clark V (2,8 %) i Breslow V (4 %).

Prema podacima iz literature, melanom najčešće metastazira u limfne čvorove. Osim limfnih čvorova, metastaze mogu biti lokalizirane i u organima kao što su pluća, jetra, kosti i mozak (19). U Hrvatskoj se najčešća lokalizacija metastaza melanoma nalazi na leđima kod muškaraca, dok su to najčešće donji udovi kod žena (20).

U ovom su istraživanju metastaze evidentirane kod 17,5 % ispitanika i to najčešće u regionalne limfne čvorove (81,8 %).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Od 2012. do 2016. godine dijagnosticirano je 189 melanoma
2. Melanomi su bili nešto češći kod muškaraca (59,8 %). Najčešće su se javljali u dobnoj skupini od 70 do 79 godina (33,3 %)
3. Dijagnosticirani melanomi najčešće su se javljali na koži (94,7 %)
4. Melanomi na koži najčešće su pokazivali stupanj Clark III i Clark IV (32,4 %)
5. Ocijenjeni prema stadiju po Breslowu, melanomi su najčešće imali stadij Breslow I (28,4 %)
6. Većina melanoma pokazivala je visok proliferacijski indeks-Ki-67 (47,1 %)
7. Ispitanici s visokim Ki-67 najčešće su bili stadija Clark IV (23,9 %).

7. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Utvrditi broj dijagnosticiranih melanoma tijekom pet godina, utvrditi učestalost melanoma ovisno o klasifikaciji prema Breslowu i Clarku, usporediti proliferacijski indeks prema patohistološkim stadijima po Breslowu i Clarku.

USTROJ STUDIJE: Retrospektivna studija.

ISPITANICI I METODE: Obuhvaćeno je 189 melanoma dijagnosticiranih na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek tijekom pet godina (2012. - 2016.). Uzorci tkiva bojeni su standardnim hemalaun-eozin bojenjem. Napravljena je i imunohistokemijska obrada na melan A, HMB45 i Ki-67. Za imunohistokemijsku obradu koristio se automatizirani bojač Ventana BenchMark Ultra marke Roche i monoklonska primarna antitijela marke Roche.

REZULTATI: Većina ispitanika bili su muškarci (59,8 %). Melanomi su najčešće dijagnosticirani na koži (93,2 %), prvenstveno na koži trupa (42,3 %). Prema klasifikacijama po Clarku i Breslowu, najzastupljeniji stupnjevi bili su Clark III (32,4 %) i Clark IV (32,4 %) te Breslow I (28,4 %). Najčešća lokalizacija melanoma u odnosu na klasifikaciju po Clarku bio je trup (45,4 %), kao i kod klasifikacije po Breslowu (45,1 %). Najviše ispitanika imalo je visoke vrijednosti Ki-67 (47,1 %), najčešće u stupnju Clark IV (23,9 %) i Breslow V (15,9 %). Najviše ispitanika imalo je nizak broj mitozâ (70,4 %), najčešće u stupnju Clark III (26,7 %) i Breslow I (26,7 %).

ZAKLJUČAK: Obrazloženje za veliku pojavnost raka kože jest to što je koža najveći čovjekov organ. U dijagnostici melanoma neophodna je imunohistokemijska obrada tumorskog tkiva na melan A i HMB45, određivanje Ki-67 kao i stupnjevanje po Clarku i Breslowu.

KLJUČNE RIJEČI: melanom, Clark, Breslow, Ki-67.

8. SUMMARY

Diagnostics of malignant melanoma by immunohistochemistry

OBJECTIVES: The aim of this study was to determine the number of diagnosed melanoma in a five year period, to determine the frequency of melanoma depending on the classification of Clark and Breslow staging.

STUDY DESIGN: Retrospective study.

PARTICIPANTS AND METHODS: There were 189 melanomas diagnosed at Clinical Department of Pathology and Forensic Medicine at Clinical Hospital Centre Osijek in a five year period (2012 – 2016). Tissue samples were stained by standard hemalaun eosin staining. All samples were immunohistochemically treated for Melan A, HMB45 and Ki-67. Immunohistochemistry treatment included automatic machine Ventana BenchMark Ultra brand Roche and monoclonal primary antibodies brand Roche.

RESULTS: Most of the respondents were males (59.8 %). The most common localization of melanomas was skin (93.2 %) with the highest percentage on torso (42.3 %). According to Clark and Breslow classifications, the most common stages were Clark III (32.4 %), Clark IV (32.4 %) and Breslow I (28,4 %). The most common localization of melanomas in Clark classification was torso (45.4 %), same as in Breslow classification (45.1 %). The most patients had very high value of Ki-67 (47.1 %), most frequently in Clark IV stage (23.9 %) and Breslow V stage (15.9 %). The most patients had a very low number of mitosis (70.4 %), most frequently in Clark III stage (26.7 %) and Breslow I stage (26.7 %).

CONCLUSION: Explanation for high skin cancer frequency is the fact that the skin is the biggest human organ. In diagnostics of melanoma immunohistochemistry treatment of tumor tissue is necessary for Melan A and HMB45, defining Ki-67 as well as staging by Clark and Breslow.

KEY WORDS: melanoma, Clark, Breslow, Ki-67.

9. LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije udžbenik i atlas. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 1-21; 369-382.
2. Rudman F. Odnos debljine melanoma i debljine kože kao prognostički pokazatelj metastaza u sentinel limfnom čvoru [disertacija]. Zagreb (HRV): Medicinski fakultet u Zagrebu; 2010.
3. News Medical Life Sciences. What is Melanin? Dostupno na adresi: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Melanin.aspx>. Datum pristupa: 18.8.2017.
4. Šitum M i sur. Melanom. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
5. Lipozenčić J. i sur. Dermatovenerologija. Medicinska zaklada, Zagreb: 2004.
6. Stanec S, Stanec Z i sur. Melanom. Medicinska naklada, Zagreb: 2006.
7. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija 4. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 870-872.
8. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
9. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory methods in histotechnology. 3. Izd. Washington D.C.:American registry of pathology;1994.
10. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 4th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014. str. 1-41.
11. World Health Organization. Skin Cancers. Dostupno na adresi: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Datum pristupa: 3.9.2017.
12. Skin Cancer Foundation. Skin Cancer Facts & Statistics. Dostupno na stranici: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts#melanoma>. Datum pristupa: 3.9.2017.

13. Onkologija.hr. Melanom-statistika. Dostupno na stranici: <http://www.onkologija.hr/melanom/melanom-statistika/>. Datum pristupa: 3.9.2017.
14. Elwood JM, Gallagher RP. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer*. 1998;78:276-80.
15. Bulliard JL, Cox B: Cutaneous malignant melanoma in New Zealand: trends by anatomical site. 1969-1993. *Int J Epidemiol*. 2000;29:416:23.
16. National Center for Biotechnology Information. A Multifactorial Analysis of Melanoma: Prognostic Histopathological Features Comparing Clark's and Breslow's Staging Methods. Dostupno na stranici: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1397001/?page=4>. Datum pristupa: 3.9.2017.
17. Kandera S. Melanom – epidemiološka analiza [završni rad]. Varaždin (HRV). Sveučilište Sjever u Varaždinu; 2016.
18. BioMed Central. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitosin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. Dostupno na stranici: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-140>. Datum pristupa: 3.9.2017.
19. DermNet New Zealand. Metastatic melanoma. Dostupno na stranici: <https://www.dermnetnz.org/topics/metastatic-melanoma/>. Datum pristupa: 3.9.2017.
20. Pliva Zdravlje. Rak kože. Dostupno na stranici: <https://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/48/Rak-koze.html>. Datum pristupa: 3.9.2017.

10. ŽIVOTOPIS

Antonela Matešković, studentica 3. godine preddiplomskog Studija medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Osobni podatci:

Datum i mjesto rođenja: 26. 11. 1995., Nova Gradiška

Adresa: Roždanik 22, 44323 Rajić

E-mail: am261195@gmail.com

Telefon: 099 596 67 91

Obrazovanje:

2002. - 2010. Osnovna škola Rajić

2010. - 2014. Gimnazija Novska

2014. - 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Osijek

Osobne vještine:

Materinski jezik: hrvatski.

Strani jezici: engleski.