

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija M. Dunjić

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA *GLI-1*,
PTCH1 I *SMO* GENA *HEDGEHOG*
SIGNALNOG PUTA SA RIZIKOM
OBOLJEVANJA, KLINIČKO PATOLOŠKIM
FAKTORIMA I PROGNOZOM MELANOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Marija M. Dunjić

**ASSOCIATIONS BETWEEN
POLYMORPHISMS IN THE *GLI-1*, *PTCH1*
AND *SMO* GENES OF THE *HEDGEHOG*
SIGNALING PATHWAY WITH MELANOMA
RISK, CLINICOPATHOLOGICAL FACTORS,
AND PROGNOSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

MENTOR 1:

doc. dr Dijana Perović, docent

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

MENTOR 2:

prof. dr Gordana Šupić, redovni profesor,

Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Sanja Mazić, redovni profesor,

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu (predsednik komisije)

Prof. dr Dušan Škiljević, vanredni profesor,

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Biljana Ljujić, redovni profesor

Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Želim da iskažem duboku zahvalnost svojim mentorima, prof. dr Gordani Šupić i doc. dr Dijani Perović, pre svega na ukazanom poverenju. Njihova pomoć, podrška, strpljenje i podeljeno znanje tokom celog ovog puta, od kreiranja koncepta teze i prikupljanja podataka, preko istraživanja i analize, do pisanja i supervizije, bilo je veliko i nesebično. Njihova otvorenost za komunikaciju, iskustvo i stručnost omogućili su mi da rastem kao lekar i istraživač.

Takođe, zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta za medicinska istraživanja VMA i sa Instituta za humanu genetiku koji su dali doprinos u realizaciji ovog istraživanja, kao i koautorima radova koji su proizašli kao rezultat rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Predsedniku komisije, prof. dr Sanji Mazić, neizmerno sam zahvalna na svesrdnoj podršci, pomoći i konstruktivnim savetima, kako tokom izrade doktorske teze, tako i u toku doktorskih studija. Duboko se zahvaljujem prof. dr Dušanu Škiljeviću na nesebičnoj pomoći, izdvojenom vremenu i značajnim kometarima. Takođe, hvala prof. dr Biljani Ljujić kao članu komisije na podršci, oceni teze i izdvojenom vremenu.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim najbližima koji su svih ovih godina imali razumevanja za moj rad, pružali mi podršku, bodrili i verovali u mene. Ovu tezu posvećujem svojoj porodici, čija mi je bezgranična ljubav ulila snagu i entuzijazam da na ovom dugom akademskom putovanju istrajem.

Zahvaljujem se koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:

1. Kreiranju koncepta teze, metodologiji i superviziji: prof. dr Gordana Šupić, doc. dr Dijana Perović;
2. Prikupljanju podataka: prof. dr Boban Đorđević, dr Nikola Ostojić;
3. Formalnoj analizi: dr Bojana Uzelac;
4. Istraživanju: dr Nikola Lukić; dr Bojana Uzelac;
5. Pisanju – originalni nacrt, recenzija i uređivanje: prof. dr Gordana Šupić, doc. dr Dijana Perović.

POVEZANOST POLIMORFIZAMA *GLI-1*, *PTCH1* I *SMO* GENA *HEDGEHOG* SIGNALNOG PUTA SA RIZIKOM OBOLJEVANJA, KLINIČKO PATOLOŠKIM FAKTORIMA I PROGNOZOM MELANOMA

Sažetak

Melanom je agresivni maligni tumor sa progresivnim rastom incidence u svetu. Uznapredovale forme ispoljavaju rezistenciju na terapiju, što naglašava potrebu identifikacije novih prognostičkih i terapijskih markera. *Hedgehog* (HH) signalni put ima ključnu ulogu intrauterino u morfogenezi, a njegova aberantna aktivacija u adultnom dobu povezana je sa brojnim malignitetima, uključujući karcinome kože. U složenom HH putu učestvuje transmembranski receptor *PTCH1*, dok važne medijatore citoplazmatske i nuklearne signalne kaskade čine *SMO* protein i transkripcijski faktor *GLI1*. Ciljevi ovog istraživanja bili su ispitivanje povezanosti polimorfizama pojedinačnih nukleotida ključnih gena HH puta: *GLI1* (rs2228224, rs2228226), *PTCH1* (rs357564) i *SMO* (rs2228617) sa rizikom od oboljevanja, kliničko-patološkim faktorima i prognozom melanoma. U istraživanju su učestvovala 93 pacijenta sa melanomom i 97 ispitanika u kontrolnoj grupi. Genotipovi polimorfizama su određeni pomoću *TaqMan* eseja PCR metodom u realnom vremenu (*Real-time PCR*). Pokazano je da ispitanici koji su nosioci mutiranog G alela (GA+GG genotipa) za polimorfizam *GLI1* rs2228224, kao i mutiranog C alela (CG+CC genotipa) za polimorfizam *GLI1* rs2228226, imaju značajno veći rizik za oboljevanje od melanoma (OR=2,261, p=0,007, OR= 2,176, p=0,010). Pacijenti CC genotipa za *GLI1* rs2228226 su imali lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti (p=0,0001 i p=0,037, redom). Multivarijatna Cox regresiona analiza je otkrila da su pojava recidiva bolesti i prisustvo varijantnog alela *GLI1* rs2228226 nezavisni prognostički faktori kod obolelih od melanoma (HR=14,434, p=0,0001; HR=4,161, p=0,006; redom). Za varijante u genima *PTCH1* i *SMO* nije pokazana asocijacija ni sa jednim parametrom. Na osnovu rezultata ovog istraživanja možemo zaključiti da varijante *GLI1* gena mogu biti faktori predispozicije za pojavu melanoma i predstavljati nove prognostičke biomarkere ove bolesti.

Ključne reči: Melanom, *Hedgehog* signalni put, genetički polimorfizmi, *GLI1*, *PTCH1*, *SMO*.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: fiziološke nauke

UDK BR: _____

ASSOCIATION OF *GLI-1*, *PTCH1*, AND *SMO* GENE POLYMORPHISMS IN THE *HEDGEHOG* SIGNALING PATHWAY WITH THE RISK OF DISEASE, CLINICAL-PATHOLOGICAL FACTORS, AND PROGNOSIS OF MELANOMA

Abstract

Melanoma is an aggressive malignant tumor with a progressive increase in incidence worldwide. Resistance to treatment is a common trait of advanced forms, that highlights the necessity for novel prognostic and therapeutic markers. The *Hedgehog* (HH) signaling pathway plays a crucial role in intrauterine morphogenesis, and its aberrant activation in adulthood is associated with numerous malignancies, including skin carcinomas. The complex HH pathway involves the transmembrane receptor PTCH1, while the important mediators of the cytoplasmic and nuclear signaling cascade include the SMO protein and the transcription factor GLI-1. The objectives of this research were to examine the association of single nucleotide polymorphisms of the key genes of the HH pathway: *GLI1* (rs2228224, rs2228226), *PTCH1* (rs357564) and *SMO* (rs2228617) with the risk of disease, clinical-pathological factors and the prognosis of melanoma. 93 patients with melanoma and 97 subjects in the control group participated in the research. Genotypes of polymorphisms were determined by the TaqMan assay using the Real-time PCR method. Research indicates that individuals who carry the mutated G allele (GA+GG genotype) for the *GLI1* rs2228224 polymorphism and the mutated C allele (CG+CC genotype) for the *GLI1* rs2228226 polymorphism are at a significantly higher risk of melanoma development. (OR=2.261, p=0.007, OR= 2.176, p=0.010). Patients with the CC genotype for *GLI1* rs2228226 had worse overall survival and relapse-free survival (p=0.0001 and p=0.037, respectively). Multivariate Cox regression analysis revealed that disease recurrence and the presence of the variant allele *GLI1* rs2228226 are independent prognostic factors in melanoma patients (HR=14.434, p=0.0001; HR=4.161, p=0.006, respectively). Variants in the *SMO* and *PTCH1* genes did not demonstrate association with any of the parameters. Based on the results of this research, we can conclude that *GLI1* gene variants could be predisposing factors for melanoma development and may serve as new prognostic biomarkers of this disease.

Keywords: Melanoma, *Hedgehog* signaling pathway, genetic polymorphisms, *GLI1*, *PTCH1*, *SMO*.

Scientific area: Medicine

Narrow scientific field: physiological sciences

UDK NO: _____

SADRŽAJ

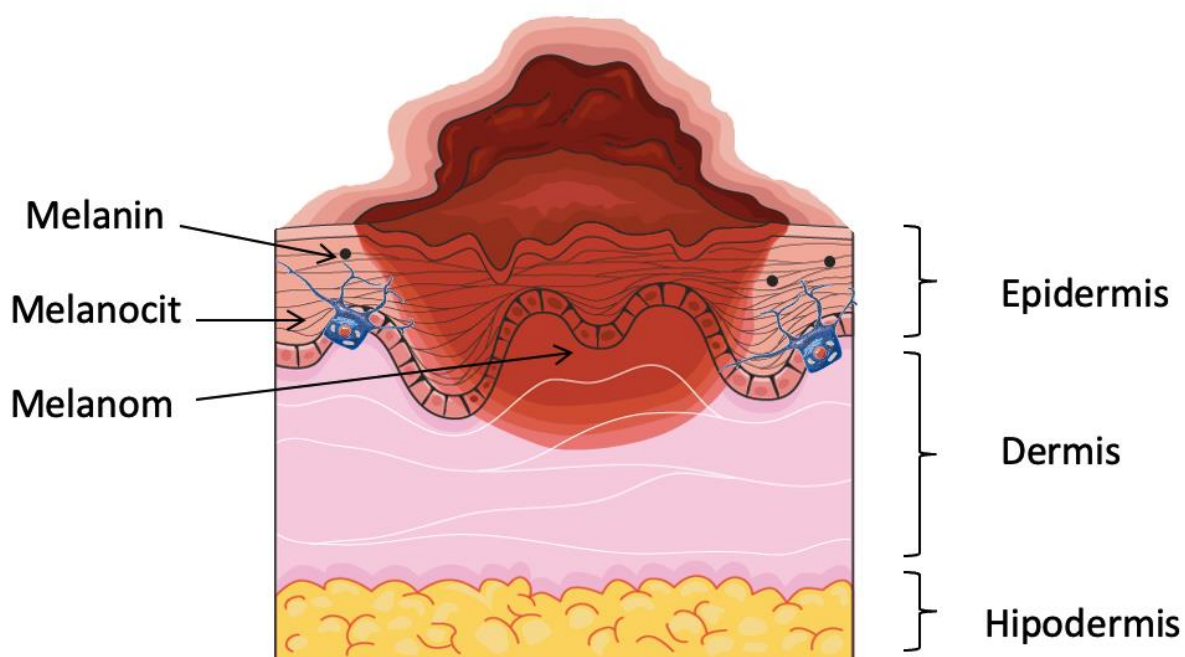
1. UVOD.....	1
1.1. Melanom.....	1
1.1.1. Istorijat melanoma.....	2
1.1.1.1. Melanom u antičko doba.....	2
1.1.1.2. Prvi koraci u definisanju i lečenju melanoma.....	2
1.1.1.3. Napreci u hirurškom lečenju melanoma.....	3
1.1.1.4. Otkirvanje genetičke osnove melanoma.....	3
1.1.1.5. Razvoj medikamentne terapije za melanom.....	4
1.1.2. Epidemiologija melanoma.....	4
1.1.2.1. Incidenca, mortalitet i preživljavanje.....	4
1.1.2.2. Geografska rasprostranjenost.....	5
1.1.2.3. Demografija.....	5
1.1.3. Etiologija melanoma i faktori rizika.....	5
1.1.3.1. UV zračenje.....	6
1.1.3.2. Pesticidi.....	8
1.1.3.3. Socio-ekonomski status i stil života.....	8
1.1.3.4. Genetički faktori.....	8
1.1.3.5. Imunosupresivna stanja.....	9
1.1.3.6. Drugi karcinomi kože.....	10
1.1.4. Genetička osnova patogeneze melanoma.....	10
1.1.4.1. Somatske mutacije u genima koji kodiraju važne ćelijske signalne puteve.....	11
1.1.4.2. Nasledna predispozicija.....	13
1.1.4.3. UV potpis.....	13
1.1.4.4. Fototip kože.....	14
1.1.4.5. Mladeži i intermedijerne lezije.....	14
1.1.4.6. Genetička heterogenost.....	15
1.1.5. Dijagnostika, klasifikacija, stadijumi i prognoza melanoma.....	17
1.1.5.1. Dijagnostika melanoma.....	17
1.1.5.2. Stadijumi i prognoza melanoma.....	18
1.1.5.3. Kliničko-patološka klasifikacija melanoma.....	21
1.1.6. Terapija melanoma.....	23
1.1.6.1. Hirurška terapija melanoma.....	24
1.1.6.2. Ciljana terapija i imunoterapija u lečenju melanoma.....	26
1.1.6.3. Buduća perspektiva.....	28
1.2. <i>Hedgehog</i> signalni put.....	30
1.2.1. Istorijat <i>Hedgehog</i> signalnog puta.....	30
1.2.2. Ključni geni i molekuli u <i>Hedgehog</i> signalnom putu.....	30
1.2.3. <i>Hedgehog</i> signalni put i maligniteti.....	33
1.3. Polimorfizmi gena <i>Hedgehog</i> puta	35
1.3.1. Polimorfizmi nukleotidne sekvence.....	35
1.3.2. Polimorfizmi nukleotidne sekvence u genima <i>Hedgehog</i> signalnog puta.....	35

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3. MATERIJAL I METODE.....	37
3.1. Dizajn studije.....	37
3.2. Ispitanici.....	37
3.3. Metode.....	37
3.4. Genetičke analize.....	38
3.5. Statistička analiza.....	40
4. REZULTATI.....	41
4.1. Demografske i kliničko-patološke karakteristike u grupi obolelih od melanoma.....	41
4.2. Učestalost genotipova polimorfizama <i>PTCH1</i> (rs357564), <i>SMO</i> (rs2228617) i <i>GLII</i> (rs2228224, rs2228226) u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi zdravih osoba.....	43
4.3. Povezanost polimorfizama <i>PTCH1</i> , <i>GLII</i> i <i>SMO</i> gena sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma.....	47
4.4. Povezanost polimorfizama <i>GLII</i> , <i>SMO</i> i <i>PTCH1</i> gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od melanoma.....	50
4.5. Procena ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez recidiva bolesti kod pacijenata sa polimorfizmima <i>GLII</i> , <i>SMO</i> i <i>PTCH1</i> gena.....	52
5. DISKUSIJA.....	56
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA.....	68

1. UVOD

1.1. MELANOM

Melanom je maligni tumor koji nastaje iz melanocita, ćelija koje proizvode tamni pigment melanin, odgovoran za boju kože, kose i očiju. Najčešći oblik je kutani melanom, koji nastaje malignom transformacijom melanocita u bazalnom sloju epidermisa (Slika 1). Osim u koži, melanomi nastaju malignom transformacijom melanocita u uveji, meningeama i sluznici (gastrointestinalnog, urogenitalnog, respiratornog trakta itd.) (1-3).



Slika 1. Kožni melanom

Slika je delimično kreirana korišćenjem Servier Medical Art, od Servier, licencirana pod Creative Commons Attribution 3.0 neprenosnom licencom.

Zbog svog metastatskog potencijala i genetičke heterogenosti, melanom je jedan od najagresivnijih i najsmrtonosnijih karcinoma kože. Iako čini tek 1% svih kožnih maligniteta, odgovoran je za više od 75% smrtnih ishoda (4). Stalni porast svetske incidence i visoka stopa letaliteta svrstavaju ovu bolest u ozbiljan globalni zdravstveni problem (5, 6). Uprkos zalaganjima javno-zdravstvenog nadzora za prevenciju, kao i činjenici da je tumor najčešće dostupan vizuelnom pregledu, i dalje smo često u situaciji da dijagnostikujemo i lečimo uznapredovalo oboljenje.

Melanom se smatra multifaktorskom bolešću u kojoj su egzogeni i endogeni faktori isprepleteni i igraju važnu ulogu kako u nastanku, tako i u progresiji, težini i ishodu bolesti. Ključnim faktorom životne sredine smatra se prekomerno izlaganje sunčevim UV zracima, dok endogeni faktori uključuju individualne karakteristike kao što su svetla koža, plava/riđa kosa i drugi nasledni genetički faktori (7).

Kod pacijenata sa inicijalno dijagnostikovanim udaljenim metastazama, samo 15-20% preživi pet godina (8). Savremena terapija, uključujući ciljanu terapiju i imunoterapiju, značajno je unapredila prognozu bolesti. Međutim, iako se često koristi kombinacija ovih tretmana radi veće efikasnosti, kod većine pacijenata se brzo razvija sekundarna rezistencija, čime uznapredovali melanom i dalje ostaje fatalna, neizlečiva bolest. (9, 10).

Zbog loše prognoze uznapredovalog, metastatskog melanoma, poslednjih decenija se intenzivno radi na razumevanju njegove genetičke osnove, koja je ključna u patogenezi i smatra se najvažnijim prediktorom sklonosti, progresije i ishoda ove bolesti. Dalja genetička istraživanja melanoma će svakako doneti nove perspektive u dijagnostici i terapiji, a postoji potencijal i za razvoj personalizovanog pristupa u lečenju koje bi se temeljilo na specifičnim genetičkim profilima pacijenta i samog tumora. (8, 10).

1.1.1. Istorijat melanoma

1.1.1.1. Melanom u antičko doba

Reč „melanom“ potiče iz grčkog jezika i doslovno znači „crni tumor“, budući da je sastavljena od reči „melas“, što znači tamno, i sufiksa „-oma“, koji označava izraslinu. Hipokratovi drevni medicinski zapisi iz 5. veka pre nove ere svedoče o prisustvu ove bolesti još od najranijih dana. Skeleti mumija iz Perua iz 3. veka predstavljaju najraniji materijalni istorijski izvor u kojima su pronađene metastaze melanoma (11, 12).

1.1.1.2. Prvi koraci u definisanju i lečenju melanoma

Interesovanje za melanom prisutno je vekovima unazad. U evropskoj medicinskoj literaturi, od 17. veka pa nadalje, nastali su brojni tekstovi kao pokušaj da se opiše i objasni ova zloćudna neoplazma, a sredinom 18. veka napravljeni su prvi koraci u njenoj dijagnostici i lečenju.

Početak hirurškog lečenja zabeležen je 1787. godine kada je Džon Hanter, poznat kao „otac naučne hirurgije“, izveo prvu dokumentovanu resekciju melanoma sa vilice tridesetpetogodišnjaka, a tumor se i danas čuva u njegovom muzeju u Londonu (12, 13). Rene Lanek je 1804. godine upotrebio naziv „melanoza“ da opiše razliku između obdukcionog nalaza pulmonalnog metastatskog melanoma, tuberkuloznog granuloma i depozita ugljenika u plućima (14).

Britanski lekar Vilijam Noris bio je prvi koji je dao detaljan opis melanoma. U svom izveštaju „Slučaj fungoidne bolesti“, Noris je opisao heterogenost ovog tumora, sklonost ka metastaziranju, naslednu prirodu oboljenja i povezanost sa svetlim tenom i kosom. Pored toga, primetio je da mladeži i izlaganje određenim faktorima spoljne sredine povećavaju rizik od nastanka melanoma, što je kasnije potvrđeno otkrićem sindroma FAMM (familijarnog atipičnog multiplog mladeža) i SDN (sporadičnog displastičnog nevusa) (15, 16). U lečenju je naglasio važnost široke ekscizije radi bolje prevencije recidiva, a ukazao je i na neefikasnost lečenja kod uznapredovalog oboljenja (17).

Termin „melanom“ prvi je upotrebio Ser Robert Karšvel 1838. godine u svom delu „Ilustracije osnovnih oblika bolesti“ kako bi opisao ovo smrtonosno oboljenje (12, 13).

1.1.1.3. Napreci u hirurškom lečenju melanoma

Do kraja 19. veka hirurško lečenje melanoma svodilo se na uklanjanje tumora ligaturom, ekscizijom, amputacijom ili kaustičnim sredstavom. Kako u to vreme počinje upotreba anestezije, 1851.godine u Lancetu je objavljen slučaj žene kojoj je uklonjen recidivantni melanom pod hloroformom.

Herbert Snou, hirurg iz Londona, 1892. godine bio je zagovornik ekscizije melanoma uz istovremeno uklanjanje limfnih čvorova. Daljem razvoju hirurškog lečenja doprineo je škotski lekar Vilijam Hendli, koji je na osnovu svog iskustva 1907. godine u radu objavljenom u Lancetu predložio široku eksciziju primarnog melanoma sa marginama od 5cm i potkožnim tkivom do mišićne fascije, zajedno sa radikalnom resekcijom limfnih čvorova. Ovaj pristup je postao zlatni standard za hirurško lečenje melanoma narednih pola veka, a prvi ga je primenio Pringe 1908. godine (12, 13).

Valas Klark i Aleksandar Breslou razvili su skale za prognostičku procenu melanoma na osnovu patohistološkog pregleda koje su relevantne i danas (18). Klark je 1966. godine predložio sistem od pet nivoa koji se odnosi na procenu invazije tkiva, kasnije nazvan "Klarkovi nivoi", dok je Breslou 1970. godine primetio da na prognozu utiče i debljina tumora. Ova prognostička procena na osnovu patohistološke invazije i debljine tumora dovela je do napretka u hirurškom lečenju. Kako je utvrđeno da tanki melanomi (Klark II i Breslou <0,76mm) imaju bolju prognozu, došlo je do niza studija koje su pokazale sigurnost užih margina resekcije (1 cm za melanome ≤ 1 mm i 2cm za deblje melanome), pa su margine od 5cm potpuno napuštene (19). Takođe, s obzirom na povezanost debljine tumora i verovatnoće nodalnih metastaza, napuštena je i profilaktička resekcija limfnih čvorova. Radikalno uklanjanje nodusa iz limfnog basena postaje rezervisano samo za pacijente sa dokazanim metastazama, a ustupa mesto biopsiji limfnog čvora stražara, minimalno invazivnoj tehnici koju je osmislio Donald Morton (20-23). Sve ovo je vodilo smanjenju morbiditeta i traumatizacije pacijenata. Danas se, uz patohistološki pregled, rade i genetičke analize, kako bismo dobili precizniju kliničku i prognostičku procenu.

1.1.1.4. Otkrivanje genetičke osnove melanoma

Henri Lankaster, australijski istraživač, prvi je dokazao vezu između izloženosti UV zračenju i povećanog rizika za razvoj melanoma kod australijsko-kavkaske populacije. Njegova istraživanja, objavljena 1956. godine, dala su važne informacije o faktorima rizika za ovu bolest, uključujući karakteristike kože i izloženost suncu (24, 25).

Otkriće gena *CDKN2A*, čije su mutacije povezane sa sa porodičnim melanomom i sindromom FAMM, predstavljalo je prekretnicu u istraživanju nasledne predispozicije za melanom.. Dalja istraživanja su identifikovala i druge gene povezane sa naslednom sklonošću za nastanak melanoma, uključujući *CDK4* gen koji je povezan sa povišenim rizikom u određenim populacijama (26).

Krajem 20. veka dolazi do „onkogene revolucije“, kada je otkriveno da tumori nastaju sticanjem određenih genskih mutacija. Ovo otkriće je bilo ključno za razumevanje patogeneze malignih tumora, uključujući melanom (27). Tako su otkrivene dve najčešće pokretačke mutacije u melanomu: u *NRAS* genu 1984. godine i u *BRAF* genu 2002. godine (28, 29). Obe mutacije zajedno su prisutne kod približno 80% kutanih melanoma, a u drugim histološkim podtipovima pronađeno je još pokretačkih onkogeni, poput *c-KIT* u mukoznim i akralnim melanomima i *GNAQ/GNA11* u melanomu oka (30, 31). Kako su ovi geni u sklopu važnih ćelijskih signalnih puteva, a njihove mutacije podstiču rast i preživljavanje tumorskih ćelija, njihova identifikacija je otvorila vrata razvoju novih ciljanih terapija za melanom. Do sada su razvijeni lekovi usmereni na inhibiciju BRAF i MEK proteina iz mitogenima

aktiviranog puta protein kinaze (engl. *Mitogen-activated protein kinases*, MAPK), dok ciljana terapija na osnovu *NRAS* mutacija do sada nije razvijena (29, 32).

1.1.1.5. Razvoj medikamentne terapije za melanom

Do kraja 19. veka nehirurško lečenje maligniteta se uglavnom svodilo na palijativnu terapiju. Nemački lekar Pol Erlih bio je prvi koji je predstavio ideju „magičnog metka“, leka koji bi selektivno ubijao samo ćelije ili mikroorganizme koji uzrokuju bolest, međutim nije imao uspeha u razvoju takvog leka za karcinome (12).

Medikamentne terapije za melanom su decenijama bile ograničene visokom toksičnošću i kratkim trajanjem dejstva, poput Melfalena, dekarbazina, Interleukina-2 i drugih (33, 34). 2011. godine Američka agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je upotrebu anti-CTLA-4 antitela ipilimumaba, koje se pokazalo efikasnim kod izvesne podgrupe melanoma (35). Iste godine, odobrena je upotreba prve ciljane terapije melanoma- BRAF inhibitora vemurafeniba (36). Međutim, uprkos odličnom početnom odgovoru, gotovo svi pacijenti ubrzo postaju rezistentni na terapiju (37). Nastavljeno je sa genetičkim istraživanjima koja i danas imaju za cilj razvoj strategija za prevazilaženje otpornosti na lekove, a izgleda da heterogenost melanoma o kojoj je Norris govorio još 1820. godine ovo otežava. Identifikacija drugih mutacija i varijanti u genima povezanim sa važnim ćelijskim signalnim putevima i imunološkim odgovorom, kao i epigenetskih promena koje utiču na ekspresiju gena, predstavljaju potencijalne nove terapijske mete.

Dosadašnja istraživanja genetičke osnove melanoma nisu pomogla samo u razumevanju nasledne prirode i mehanizama nastanka bolesti, već su omogućila otkrivanje prognostičkih markera i razvoj terapije. Nova istraživanja u ovoj oblasti sprovode se s idejom razvoja personalizovanog koncepta u lečenju melanoma, gde bi terapija bila prilagođena pojedincu na osnovu specifičnog genetičkog profila tumora, ali i genetičke konstitucije samog pacijenta.

1.1.2. Epidemiologija melanoma

1.1.2.1. Incidenca, mortalitet i preživljavanje

Tokom poslednje četiri decenije incidenca melanoma u svetu neprestano raste dobijajući epidemijske razmere, posebno u zemljama sa populacijom svetle puti koja je evropskog porekla. Globalno opterećenje melanomom je od 2012. do 2020. godine poraslo za 41% (5, 6). U SAD melanom se rangira kao peti malignitet po učestalosti, a tokom 2023. godine registrovano je oko 97.610 novih slučajeva, što čini 5% svih registrovanih maligniteta (4).

Kontinuiran porast incidence, uz stabilnu stopu mortaliteta, može donekle da se objasni promocijom skrininga (38-41). Rasprostranjenost dermoskopije i podizanje svesti o prevenciji poslednjih 20 godina dovela je do veoma značajnog porasta dijagnostikovanih melanoma *in situ* (42). Međutim, to nije smanjilo broj kasnih stadijuma bolesti. Postavlja se pitanje prekomerne dijagnoze, pojma koji označava one forme karcinoma koje nedijagnostikovane ne bi dovele do smrtnog ishoda, te predstavljaju indolentne forme (43). Efektivni skrining maligniteta trebalo bi da ranim otkrivanjem i uklanjanjem prekursora smanji kasnije stadijume bolesti i stopu smrtnosti, kao što se desilo kod skrininga cervikalnog

i kolorektalnog karcinoma (44, 45). Međutim, iako se displastični nevus razmatra kao mogući prekursor melanoma (46), njegova dijagnostika i uklanjanje nisu smanjili broj uznapredovalih stadijuma bolesti i mortalitet.

Kako se značajan broj melanoma dijagnostikuje u ranim stadijumima, stopa petogodišnjeg preživljavanja je relativno visoka i iznosi 93,5%. Sa progresijom bolesti stopa preživljavanja opada, pa tako pacijenti u stadijumu III i IV imaju značajno nižu stopu preživljavanja, od 73,9%, odnosno 35,1%. Ipak, zahvaljujući napretku terapije, postignuti su značajni pomaci u preživljavanju kod ovih pacijenata u odnosu na ranije godine. Kada se bolest dijagnostikuje rano, dok je još lokalna, što se dešava u 78% slučajeva, preživljavanje raste na 99.6% (4).

1.1.2.2. Geografska rasprostranjenost

Među zemljama u svetu postoje velike varijacije u incidenci melanoma. Pretpostavlja se da su uzrokovane genotipom i fenotipom populacije, UV indeksom i navikama vezanim za sunčanje, ali i merama prevencije, dostupnošću rane detekcije i vođenja registra. Najveću incidencu melanoma imaju Australija, Novi Zeland, razvijene zemlje Severne Amerike i Evrope, posebno Skandinavske zemlje (6, 7). U Evropi su najniže stope oboljevanja prijavljene u istočnim zemljama, ali ne i manja smrtnost, za šta se smatra odgovornim kasna dijagnostika i lošije preživljavanje, kao i lošije vođenje registra i izveštavanje. Takođe, sprovođenje javnozdravstvenih kampanja radi povećanja nivoa svesti populacije, kao i programi skrininga, igraju značajnu ulogu. Mere javnog zdravlja koje su sprovedene u Australiji od 1988. godine, poput edukacija o zaštiti od sunca, rezultirale su smanjenjem učestalosti melanoma od 2005. godine (7).

1.1.2.3. Demografija

Rizik od razvoja melanoma varira među različitim etničkim grupama. Kod belaca iznosi 3% (1 od 33), hispanoamerikanaca 0,2% (1 od 200), dok je kod afroamerikanaca znatno niži i iznosi svega 0,1% (1 od 1000), mada se oni obično dijagnostikuju u uznapredovalim stadijumima i imaju lošiju prognozu (47).

Iako se rizik od pojave melanoma povećava sa godinama starosti, ovo je jedna od najčešćih neoplazmi kod mladih odraslih osoba (47). Prosečna starost pacijenata u trenutku dijagnoze je 66 godina. Bolest se javlja 1,6 puta češće kod muškaraca nego žena. (4). Iako može da se pojavi na bilo kom delu kože, najčešće se javlja na rukama ili nogama kod žena, odnosno glavi, vratu, leđima i trupu kod muškaraca (48). Kod afroamerikanaca melanom se najčešće pojavljuje na delovima tela koji nisu izloženi suncu, poput tabana (4).

1.1.3. Etiologija melanoma i faktori rizika

Melanom, kao kompleksna bolest, nastaje i razvija se usled interakcije brojnih faktora koji se mogu podeliti na:

1. egzogene faktore - odnose se na čovekovu sredinu i na njih se može uticati. Tu spadaju izloženost UV zračenju, pesticidima, socio-ekonomski status i stil života.

2. endogene faktore - odnose se na datost čovekovog organizma i nepromenjivi su. Oni uključuju brojne genetičke, imunološke faktore i prisustvo drugih karcinoma kože (7).

Tabela 1. Endogeni i egzogeni etiološki faktori koji utiču na nastanak i razvoj melanoma

	Egzogeni faktori	Endogeni faktori
1.	UZ zračenje	Genetički faktori
2.	Pesticidi	Imunosupresija
3.	Socio-ekonomski status i stil života	Drugi karcinomi kože

Unutar ove isprepletene interakcije tačan redosled događaja u nastanku i razvoju melanoma nije lako utvrditi, ali nakupljanje genetičkih mutacija usled sunčevih UV zraka predstavlja najznačajniji faktor rizika na koji se može uticati, a genetički faktori se smatraju najvažnijim prediktorima za nastanak, progresiju i ishod ove bolesti (1, 49).

Razumevanjem etiološke pozadine melanoma i identifikacijom faktora rizika omogućava se pravovremeno preduzimanje preventivnih mera. One podrazumevaju edukaciju, smanjenje rizičnog ponašanja, kao i redovne dermatološke preglede radi otkrivanja potencijalnih melanoma u ranom stadijumu kada ih je najlakše lečiti i izlečiti. U Tabeli 2. (50-52) dat je prikaz faktora rizika koji se mogu utvrditi kliničkim pregledom i anamnezom. Kako bi se unapredila prevencija i rana detekcija, poslednjih godina razvijeni su kalkulatori za predviđanje individualnog rizika od melanoma, a dostupni su putem interneta lekarima i pacijetima. U kalkulator se unose karakteristike pojedinca, poput broja nevusa, istorije opekotina i drugih, i u odnosu na njih izračunava pojedinačni rizik (53).

Tabela 2. Faktori rizika za razvoj melanoma

	Glavni faktori rizika za razvoj melanoma:
1	Melanom kod jednog ili više prvostepenih srodnika
2	Prethodna istorija melanoma ili drugog karcinoma kože
3	Više melanocitnih nevusa (>100)
4	Tri ili više klinički atipičnih (displastičnih) nevusa
5	Gigantski kongenitalni mladež
6	Prekomerno izlaganje suncu u detinjstvu
7	Prethodna istorija jedne ili više teških opekotina od sunca (IIa stepena, sa plikovima)
8	Prethodna upotreba solarijuma, posebno pre 30. godine
9	Svetla put
10	Riđa ili plava kosa, plave ili zelene oči, pege
11	Imunodeficijencija (transplantirani pacijenti ili pacijenti sa HIV infekcijom)
12	Viša socioekonomska grupa
13	Zanimanje (npr. posada aviona, poljoprivredni radnici)
14	Muškarci stariji od 50 godina

1.1.3.1. UV zračenje

Izloženost UV zračenju, konkretno UVA (315–400 nm) i UVB (280–315 nm) delu spektra, pokazala se kao glavni faktor rizika za razvoj melanoma tokom višedecenijskih istraživanja (7).

UVB zračenje je u spoljnoj sredini mnogo manje zastupljeno od UVA, mada je 1000x više genotoksično. U sunčevoj svetlosti su UVA zraci u odnosu na UVB prisutni 20-40x više, što zavisi od vremena, godišnjeg doba, geografske širine i nadmorske visine. UVA deo spektra ima veću probojnost kroz staklene prozore, dok UVB najvećim delom ne prolazi kroz

staklo. Takođe, UVA zraci predstavljaju primarni izvor svetlosti u solarijumima, a većina krema za sunčanje ih ne filtrira jednako dobro kao UVB (1, 49).

Izvori UV zračenja mogu biti prirodni, tj. sunce, i veštački poput lampi (solarijumi, medicinske lampe, kozmetičke lampe) i alata za varenje. Međunarodna agencija za istraživanje raka je 1992. godine sunčevo UV zračenje svrstala u humane karcinogene (grupa 1), 2009. godine je tome dodato i zračenje u solarijumima, 2012. godine zračenje koje nastaje u toku varenja, a 2017. godine su uključeni i dimovi od varenja (54, 55).

- *Sunčanje i istorija opekotina*

Prekomerno izlaganje suncu i česte opekotine, posebno u mlađem uzrastu, značajno povećavaju rizik od razvoja karcinoma kože. Pri tome je intermitentno prekomerno sunčanje sa istorijom opekotina povezano je sa većim rizikom od nastanka melanoma, dok je hronična dugotrajna izloženost više povezana sa planocelularnim i bazocelularnim karcinomima. Zaštita od UV zračenja, posebno dece i mladih, od presudnog je značaja u prevenciji svih karcinoma kože (53, 56).

- *Solarijumi*

Solarijumi, uređaji za veštačko tamnjenje koji emituju UV zračenje, razvijeni su šezdesetih godina prošlog veka. Osamdesetih godina je omasovljena njihova upotreba, a devedesetih je tamnjenje u solarijumu postao rasprostranjen trend, posebno među mladima u Evropi i SAD (57). U istraživanju iz 2014. godine koje je obuhvatilo studente, 55% njih je prijavilo da su bar jednom posetili solarijum, a 43% je koristilo solarijum u prethodnoj godini (58). Ubrzo je štetnost veštačkog tamnjenja po zdravlje postala očigledna, pa su sprovedene studije kojim je pokazana jasna povezanost između korišćenja solarijuma i nastanka karcinoma kože (53). Istorija bilo kakvog korišćenja solarijuma povezana je sa 16-20% većim rizikom od razvoja melanoma u poređenju sa osobama koje ga nikad nisu posetile. Takođe, duži vremenski period korišćenja i raniji uzrast početka posećivanja solarijuma dodatno povećavaju ovaj rizik (59). Na žalost, informisanje javnosti o štetnosti veštačkog tamnjenja kože UV lampama nije imalo efekta na učestalost korišćenja solarijuma kod mladih odraslih osoba (50). Procenjuje se da godišnje oko 7,8 miliona žena i 1,9 miliona muškaraca koristi solarijum (51). Ovo predstavlja javnozdravstveni problem koji svake godine rezultira sa otprilike pola miliona novih dijagnoza karcinoma kože u SAD, Evropi i Australiji (52). Politika javnog zdravlja i regulacija korišćenja solarijuma igraju ključnu ulogu u smanjenju ovog rizičnog ponašanja, a prema preporukama SZO 40 zemalja je sprovedlo restrikcije ili potpune zabrane upotrebe solarijuma (57).

- *Aparati za zavarivanje*

Profesionalni varioci, koji su izloženi UV zracima proizvedenim tokom procesa zavarivanja metala, imaju povećan rizik od nastanka melanoma oka u poređenju sa opštom populacijom. Za sprečavanje ovog profesionalnog rizika od oboljevanja preporučuje se nošenje zaštitnih naočara na radu (60, 61).

- *Fototerapija*

Izlaganje UV zračenju dešava se i tokom fototerapije (uskospektralne UVB ili PUVA) koja se primenjuje za lečenje određenih kožnih oboljenja poput ekcema, psorijaze, atopijskog dermatitisa i vitiliga. I ovaj vid izlaganja UV zracima povezan je sa povećanim rizikom od razvoja karcinoma kože, pa se sprovodi pod strogom medicinskom kontrolom i broj terapija je ograničen. Pokazano je da se rizik od nastanka melanoma povećava nakon 250 PUVA tretmana (62).

1.1.3.2. Pesticidi

Farmeri i radnici na njivama, koji su izloženi poljoprivrenim hemikalijama, u većem su riziku od razvoja akralnog melanoma na dlanovima i tabanima u odnosu na neizloženu populaciju. Pokazano je da su među najčešćim pesticidima koji povećavaju rizik od ove bolesti propanil, parakvat, dikvat, alahlor, acetohlor i metolahlor (63).

1.1.3.3. Socio-ekonomski status i stil života

Socio-ekonomski status povezan je sa životnim stilom, obrazovanjem, zanimanjem, bračnim statusom, hobijima, navikama, dostupnošću zdravstvenih resursa i nege, što sve direktno utiče na epidemiologiju melanoma (64, 65).

Osobe višeg socio-ekonomskog statusa, sa većim prihodima i obrazovanjem, imaju veći rizik od razvoja melanoma, ali manju smrtnost i manji rizik da će biti dijagnostikovane u kasnim fazama bolesti, za razliku od onih sa nižim socio-ekonomskim statusom (64).

Manje obrazovani pacijenti često imaju smanjenu percepciju rizika od melanoma, pa se kasno javljaju lekaru zbog promena na koži, a imaju i manju sklonost redovnoj upotrebi krema za sunčanje. Prema jednoj američkoj studiji, lošije preživljavanje kod onih sa nižim socio-ekonomskim statusom povezano je i sa lošijim zdravstvenim osiguranjem, dostupnošću redovnih pregleda, adekvatne nege i drugih resursa usled nižih primanja i finansijskih poteškoća (65).

Rizik od nastanka melanoma povećavaju određene navike i stil života kao što su rekreativno sunčanje, upotreba solarijuma, gojaznost, bračni status „nevenčan" ili „udovac", profesionalna izloženost UV zracima i hemikalijama (64). Do sada pušenje nije označeno kao faktor rizika za razvoj melanoma (66). Međutim, u studiji iz 2019. godine pokazano je da pušenje cigareta modulira imunitet smanjujući preživljavanje pacijenata sa melanomom, a u drugoj studiji iz 2017.godine da postoji direktna korelacija između pušenja i metastaza u limfnom čvoru stražaru, ulceracije tumora i debljine po Breslou (67).

1.1.3.4. Genetički faktori

Poslednjih godina se intenzivno radi na razjašnjavanju genetičke osnove melanoma koja je ključna u patogenezi, pa je prilikom utvrđivanja rizika bitno razmotriti individualnu genetičku predispoziciju pacijenta.

Uobičajene genetičke varijacije najmanje 20 gena u populaciji povezane su sa rizikom od razvoja melanoma. Tu spadaju varijacije u fenotipu kože kod ljudi, koje jasno utiču na povećan rizik za oboljevanje od ove bolesti. Tako su pacijenti sa svetlom kožom (Ficpatrikov tip I,II) u većem riziku od melanoma u poređenju sa onima sa tamnijom kožom (Ficpatrikov tip III-VI) (Tabela 3) (65).

Tabela 3. Ficpatrikova klasifikacija 6 fototipova kože sa njihovim karakteristikama.

Fototip kože	Karakteristike
I	Bela koža. Uvek gori i nikad ne tamni.
II	Svetla koža. Uvek gori, a teško tamni.
III	Prosečna boja kože. Ponekad umereno gori, a prosečno tamni.
IV	Svetlo braon koža. Retko gori, lako tamni.
V	Braon koža. Nikad ne gori, a veoma lako tamni.
VI	Crna koža, veoma pigmentovana. Nikada ne gori, veoma lako tamni.

Preuzeto i prilagođeno od Ward et al. (65).

Pozitivna porodična istorija na melanom predstavlja važan faktor rizika zbog mogućnosti nasleđene predispozicije, koja je odgovorna za 5-10% slučajeva ove bolesti. Pacijenti sa familijarnom istorijom melanoma kod jednog prvostepenog srodnika imaju 1.7 puta veći rizik od razvoja ove bolesti u odnosu na običnu populaciju, dok je kod prisutva dva prvostepena srodnika rizik za oboljevanje 9 puta povećan (61). Preporučeno je da se ovi pacijenti testiraju na mutacije dva najčešća gena povezana sa naslednom formom melanoma, *CDKN2A* i *CDK4*, kako bi se preduzele odgovarajuće preventivne mere i smanjila smrtnost (67). Neki od slučajeva javljaju se u okviru genetičkih sindroma kao što su sindrom FAMM (familijarnog atipičnog multiplog mladeža), sindrom DNS (displastičnog nevusa), sindrom CMNS (kongenitalnog melanocitnog nevusa), pigmentna kseroderma (lat. *xeroderma pigmentosum*, XP) i mutacija *BRCA2* gena.

- Sindrom FAMM

Sindrom FAMM nasleđuje se autozomno-dominantno. Povezan je sa mutacijom u *CDKN2A* genu i karakteriše ga veliki broj atipičnih nevusa sa visokim rizikom za malignu transformaciju. Porodice sa sumnjom na dijagnozu FAMM treba da se podvrgnu redovnim dermatološkim pregledima kože i da obave genetičku konsultaciju radi provere *CDKN2A* mutacije, koja je takođe povezana i sa povećanim rizikom od karcinoma pankreasa (64).

- Sindrom DNS

Slično prethodnom, i DNS sindrom se prenosi autozomno-dominantno. Karakteriše se velikim brojem displastičnih nevusa i povećanim rizikom od nastanka melanoma (54).

- Kongenitalni melanocitni nevus

Kongenitalni melanocitni nevus nosi povećan rizik od razvoja melanoma, pri čemu sa povećanjem dijametra raste i rizik. Neophodno je redovno dermatološko praćenje i eventualno preventivno hirurško uklanjanje, što se obično razmatra pre 10. godine života kada je rizik najveći (57).

- Pigmentna kseroderma

Pigmentna kseroderma je autozomno recesivno oboljenje u kome postoji defekt mehanizma popravke DNK kod oštećenja izazvanih UV zračenjem. Kod ovih pacijenata je rizik za razvoj melanoma 1000x veći u odnosu na običnu populaciju, pa su neophodni redovni dermatološki pregledi i zaštita od sunca (63).

- Mutacija *BRCA2* gena

Mutacija *BRCA2* gena, tumorsupresora koji je povezan i sa naslednim karcinomom dojke i jajnika, ali i prostate i pankreasa, gotovo 3 puta povećava rizik za razvoj melanoma. S obzirom da je uzrok nastanka oštećenje mehanizma popravke DNK, neophodni su redovni pregledi kože i genetičke konsultacije ovih porodica (62).

1.1.3.5. Imunosupresivna stanja

Dugotrajna imunodeficijencija povećava rizik od razvoja različitih maligniteta s obzirom da je zaštitna funkcija organizma oslabljena. Pokazano je da transplantirani pacijenti na imunosupresivnoj terapiji imaju 2-4 x povećan rizik za nastanak melanoma, ali i drugih karcinoma kože poput planocelularnog karcinoma. Kod njih sistemsko imunosupresivno dejstvo ciklosporina i sirolimusa dovodi do deaktivacije tumorsupresora poput *p53* i *PTCH*, kao i aktivacije *NRAS* protoonkogeno. Sve to rezultira oštećenjem DNK, akumulacijom genetičkih mutacija, razvojem i evolucijom melanoma (57, 58). Pacijenti sa imunosupresivnom bolestima poput AIDS-a takođe imaju povećan rizik od razvoja planocelularnog i bazocelularnog karcinoma, ali kroz studije nije pokazan povećan rizik od melanoma (50, 59). Svi pacijenti koji su imunosuprimirani trebalo bi da obavljaju godišnje preglede kože kako bi osigurali ranu detekciju i lečenje karcinoma kože.

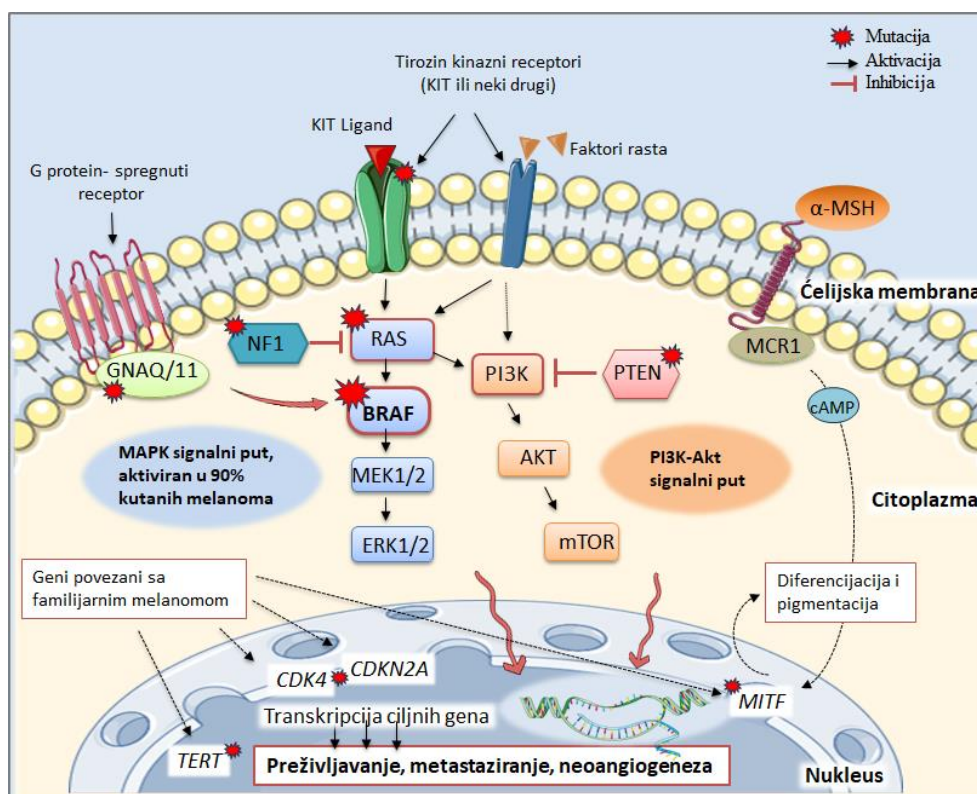
Sem sistemske imunosupresije, pokazano je da niske doze UVA i UVB zračenja takođe smanjuju imunološki nadzor od strane Langerhansovih i dendritičnih ćelija, remete prezentaciju antigena i aktivaciju T-ćelija i NK-ćelija u borbi protiv ćelija melanoma (51).

1.1.3.6. Drugi karcinomi kože

Osobe koje su već imale melanom, u većem su riziku da razviju još jedan ovaj primarni tumor. Takođe, pozitivna istorija na planocelularni i bazocelularni karcinom povećava rizik za razvoj još jednog karcinoma kože, uključujući melanom. Uzrok leži verovatno u genetičkom profilu ovih pacijenata i već prisutnim UV oštećenjima kože (52, 60).

1.1.4. Genetička osnova patogeneze melanoma

Patogeneza melanoma obuhvata kompleksne procese koji su uključeni u inicijaciju i progresiju tumora. Složenim sadejstvom endogenih i egzogenih etioloških faktora dolazi do akumulacije genetičkih mutacija u melanocitima, što dovodi do promene u ekspresiji molekula koji su sastavni deo signalnih puteva uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa, proliferacije, preživljavanja i migracije. Poremećaj normalne celularne regulacije, nekontrolisana proliferacija melanocita i izostanak apoptoze kao normalnog odgovora na oštećenje DNK, dovodi do melanomageneze, a kasnije i do napredovanja bolesti. (Slika 2)



Slika 2. Najvažniji signalni putevi i procesi uključeni u melanomagenezu.

Slika je delimično kreirana korišćenjem Servier Medical Art, od Servier, licencirana pod Creative Commons Attribution 3.0 neprenosnom licencom.

Istraživanja sprovedena tokom proteklih nekoliko decenija identifikovala su više ključnih gena i u okviru njih specifične mutacije koje su pokazale povezanost sa razvojem melanoma. U ovom kontekstu se posebno ističu geni koji imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i ćelijskoj signalizaciji poput *BRAF*, *N-RAS*, *NF1*, *PTEN*, *c-KIT*, *GNAQ/GNA11* i *CDKN2A* (68, 69).

1.1.4.1. Somatske mutacije u genima koji kodiraju važne ćelijske signalne puteve

Povezanost melanoma sa promenama u različitim ćelijskim signalnim putevima je dobro dokumentovana tokom proteklih godina. Najznačajnija povezanost ovog tipa je sa proteinima MAPK putanje koja igra važnu ulogu u ćelijskom rastu, proliferaciji i preživljavanju.

Smatra se da preko 80% melanoma pokazuje mutacije u *BRAF*, *RAS* i *NF1* genima, ključnim članovima RAS/RAF/MAPK signalne kaskade(6). Prema ovome, melanomi se mogu podeliti u četiri grupe:

1. melanomi sa mutacijom u *BRAF* genu (45–50%)
2. melanomi sa mutacijom u *RAS* genu (10-25%)
3. melanomi sa mutacijom u *NF1* genu (8%)
4. „trostruki divlji tip" (engl. *triple-wild-type*) melanomi (14–19%), koji nemaju mutacije ni u jednom od navedenih gena (70).

- Mutacije *BRAF* gena

Mutacije *BRAF* gena predstavljaju najčešću genetičku promenu u melanomu i mogu se naći u više od polovine slučajeva ove bolesti (71). Najčešća promena je varijanta V600E, koja se javlja u približno 90% slučajeva, gde na kodonu 600 dolazi do zamene aminokiseline valina glutaminskom kiselinom. Ova specifična mutacija dovodi do neprirodne i stalne aktivacije MAPK puta i posledično neprekidnih signala za rast i preživljavanje, kao i izostanka odgovora ćelija na normalne signale za regulaciju rasta, starenja i apoptozu. Osim toga, aktivacija ovog puta podržava neoangiogenezu i time rast tumora, kao i aktivaciju proteina odgovornih za migraciju i kontraktilnost ćelija. Sve ovo predstavlja ključne mehanizme koji doprinose razvoju, rastu, invaziji i metastaziranju tumorskih ćelija melanoma (72, 73). Važno je pomenuti i to da se *BRAF* mutacije u tkivu melanoma češće viđaju kod mlađih pacijenata i manje su povezani sa izlaganjem UV zračenju (70), a često se nalaze i u displastičnim nevusima zbog čega se razmatraju kao potencijalne prekursorske lezije.

- Mutacije *RAS* familije gena

Članovi *RAS* familije gena, među kojima su ključni *N-RAS*, *K-RAS* i *H-RAS*, kodiraju membranske proteine sa GTP-aznom aktivnošću koji regulišu nishodne signalne puteve unutar ćelije. Kod melanoma je najčešća mutacija u *N-RAS* genu kod koje dolazi do zamene glutamina za arginin, lizin ili leucin na položaju 61. Ova specifična mutacija, poznata kao Q61R/K/L, dovodi do promene *RAS* proteina, njegove konsektivne hiperaktivnosti i konstitutivne aktivacije nishodnih signalnih puteva. Usled stalnih signala, dolazi do nekontrolisanog rasta, proliferacije ćelija i promene ćelijske morfoligije, što uzrokuje razvoj, rast i širenja melanoma. Ove mutacije dovode i do razvoja rezistencije na terapiju (74). Uglavnom je prisutna kod nodularnog oblika melanoma, sa većom debljinom (>1 mm), koji je izazvan produženim izlaganjem suncu.

- Mutacije *NF1* gena

NF1 gen je tumor supresor koji sprečava nekontrolisan rast ćelija i predstavlja negativni regulator *RAS* puta. Za razliku od mutacija u *BRAF* i *RAS* genima koje se obično javljaju na tipičnim lokusima (engl. *hotspots*) i imaju aktivacioni efekat, mutacije u *NF1* genu rezultuju gubitkom funkcije, a mogu biti različitog tipa (75, 76).

Grupa melanoma poznata kao „trostruki divlji tip“ predstavlja molekularno heterogenu grupu koja nema jasno definisane specifične genske promene ili faktore koji bi bili odgovorni za onkogenezu, i predmet je intenzivnih istraživanja (77).

- Mutacije *KIT* gena

KIT gen₂ kao proto-onkogen, kodira transmembransku tirozin-kinazu. Njegove mutacije se javljaju u približno 3% melanoma, a povezane su s određenim podtipovima ovog tumora- akralnim (koji se razvija na dlanovima, tabanima ili ispod noktiju), lentiginoznim (koji se razvija na delovima kože hronično oštećenim od sunca) i mukoznim (koji se razvija na sluznicama glave i vrata, gastrointestinalnog trakta i urogenitalnih organa). Mutacije u ovom genu izazivaju neprekidnu aktivaciju receptora tirozin-kinaze, koji igra ključnu ulogu u signalnim putevima odgovornim za regulaciju ćelijskog ciklusa (78). Novija istraživanja idu u prilog većoj učestalosti *KIT* mutacija u ćelijama melanoma (5-15%) i stoga neki autori odsustvo mutacija u ovom genu svrstavaju u „trostruko divlji tip“ tumora umesto *NF1* mutacija (77, 79).

- Mutacije *GNA11* i *GNAQ* gena

Mutacije u genima *GNA11* i *GNAQ* povezane su uvealnim melanomom, a prisutne su u 80-90% ove retke forme melanoma oka. Dobro je poznato da ove mutacije igraju ključnu ulogu u onkogenezi melanoma, ali se njihova uloga u progresiji bolesti i tačni mehanizmi još uvek istražuju (80).

- Mutacije *PTEN* gena

Gen *PTEN* (engl. *phosphatase and tensin homolog*) je tumor supresorski gen koji igra važnu ulogu u kontroli ćelijskog rasta, preživljavanja i diferencijacije, regulišući signalne puteve fosfoinozitol 3-kinaze (engl. *phosphoinositide-3-kinase*, PI3K) i serin/treonin kinaze (engl. *serine/threonine-specific protein kinase*, AKT). U melanomu su nađene promene u okviru ovog gena najčešće po tipu inaktivirajućih mutacija ili delecija celog hromozoma 10 gde je gen lociran, što doprinosi nekontrolisanom rastu ćelija, a povezuje se sa agresivnijim fenotipom melanoma (81). Ova mutacija se može naći kod 10-20% pacijenata sa melanomom.

- Mutacije *TERT* gena

Gen *TERT* kodira enzim reverznu transkriptazu telomeraze (engl. *telomerase reverse transcriptase*, TERT). Ovaj enzim ima ključnu ulogu u održavanju dužine telomera, struktura na krajevima hromozoma koje štite genetički materijal od propadanja tokom ćelijskih deoba. Mutacije u *TERT* promotoru predstavljaju prominentne somatske promene u melanomu, koje su pronađene kod 70-80% melanoma sa *BRAF*, *RAS* i *NF1* mutacijama, ali su odsutne u „trostrukom divljem tipu“ melanoma. Uglavnom se javljaju na dva predilekciona mesta i označena su kao mutacije C228T i C250T. Ove varijante *TERT* gena povezuju se sa povećanom aktivnošću telomeraze, što rezultira očuvanjem dužine telomera u ćelijama melanoma i što podržava njihovu neograničenu deobu, nekontrolisan rast i preživljavanje. Pored toga, pokazana je asocijacija sa većom agresivnošću i lošijom prognozom melanoma (82, 83).

- Mutacije *MITF* gena

Gen *MITF* (engl. *Microphthalmia-associated transcription factor*) kodira MITF transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju gena koji su glavni regulatori melanocitne diferencijacije, pigmentacije, distribucije i preživljavanja. Najčešća genetska promena u *MITF* genu je amplifikacija i javlja se u 15–20% slučajeva. Nastaje kasnije u toku progresije bolesti i češće se sreće u metastatskim melanomima (84), utiče na malignost i povezana je sa lošijim petogodišnjim preživljavanjem. Ekspresiju MITF pokreće vezivanje melanokortina (ACTH i α -MSH) za melanokortin 1-receptor (MC1R). To dovodi do aktivacije adenilat-ciklaze i produkcije cAMP, sledstveno aktivacije protein kinaze (PKA) i aktivacije transkripcionog faktora CREB, koji zatim dovodi do produkcije MITF. MITF signalizacija je

usko povezana i regulisana i sa MAPK putem. Mutirani *BRAF* gen reguliše ekspresiju MITF proteina tako da obezbedi nivo potreban za proliferaciju i preživljavanjem melanoma, s obzirom da MITF takođe deluje i kao antiproliferativni transkripcioni faktor koji izaziva zastoj u ćelijskom ciklusu (84, 85).

- Mutacije *p53* gena

Gen *p53* je poznati tumorsupresor koji kodira *p53* protein, ključan za prevenciju tumora. Ovaj protein, poznat još i kao „zaštitnik genoma“, zadužen je za kontrolu ćelijskog ciklusa, proliferacije i održanje stabilnosti i integriteta DNK. Mutacije u *p53* prisutne su kod 50% karcinoma, dok su u melanomu nešto ređe i prema istraživanjima m javljaju se u 1-5% primarnih melanoma i u 11-25% metastatskih melanoma (86). Iako je njegova ekspresija često povećana kod melanoma, funkcija mu je obično narušena usled kompleksnih interakcija između *p53* gena i drugih genetičkih promena u tumoru (87).

1.1.4.2. Nasledna predispozicija

Familijarna predispozicija za melanom prisutna je kod približno 5–10% slučajeva i prenosi se autozomno dominantno sa nepotpunom penetrantnošću. Porodični melanom je definisan prisustvom melanoma kod dva prvostepena srodnika ili tri srodnika u istoj liniji bez obzira na stepen srodstva. Preporučuje se da se ovi pacijenti testiraju na mutacije dva najčešća gena povezana sa naslednom formom melanoma, *CDKN2A* i *CDK4*, kako bi se preduzele odgovarajuće preventivne mere i smanjila smrtnost (67).

Mutacije gena *CDKN2A* (engl. *cyclin-dependent kinase 2A*) uzrok su 20%–40% slučajeva porodičnog melanoma i pokazuju visoku penetrantnost. *CDKN2A* je tumor supresorski gen lociran na 9p21 a kodira dva inhibitorna proteina, p16INK4A (p16) i p14ARF (p14), koji regulišu ćelijski ciklus. P16 inhibira ciklin zavisnu kinazu (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK) sprečavajući rast ćelija i zaustavljajući ih u G1 fazi ćelijskog ciklusa. P14 takođe deluje kao tumor supresor i deluje preko *p53* proteina, indukujući zaustavljanje ćelijskog ciklusa ili apoptozu. Ovaj gen je povezan i sa multiplim primarnim melanomima, melanom u ranom uzrastu i porodičnom predispozicijom za karcinom pankreasa (88).

Nasledna predispozicija za melanom povezuje se i sa mutacijama u visokopenetrantnim genima poput *CDK4* (engl. *cyclin-dependent kinase 4*), *BAP1* (engl. *breast cancer associated protein-1*), *POT1* (engl. *protection of telomeres 1*), *TERT* (engl. *telomerase reverse transcriptase*, TERT), kao i u genima srednjeg stepena penetrantnosti poput *MITF* (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*), *MC1R* (engl. *melanocortin 1 receptor*). Promene u ovim genima prisutne su sve zajedno u 10% slučajeva porodičnog melanoma, tako da osnova nasledne predispozicije ostaje neobjašnjena kod bar polovine porodica (88).

1.1.4.3. UV potpis

Sekvenciranjem kompletnog genoma različitih tumora pokazano je da je melanom, pored bazocelularnog karcinoma, tumor sa najvećim brojem mutacija. Čak 80-90% tih mutacija posledica su štetnog dejstva UV zračenja i taj karakterističan šablon koji se viđa u genomu melanoma poznat je kao mutacije „UV potpisa“. One najčešće podrazumevaju supstituciju citozina timinom na dipirimidinskim mestima, uključujući i zamenu dva citozina sa dva timina. Iako mutacije *BRAF* i *N-RAS*, koje najčešće predstavljaju osnovu za inicijaciju melanoma, nisu tipične za UV potpis, i one se češće javljaju na koži izloženoj suncu (77).

I kratkotalasni UVA(315–400 nm) i dugotalasni UVB (280–315 nm) delovi spektra oštećuju DNK uzrokujući mutacije koje u složenoj interakciji sa ostalim faktorima mogu

dovesti do melanoma. UVA zraci prodiru duboko u kožu i indirektnim putem oštećuju DNK stvaranjem slobodnih kiseoničnih radikala. Ovo oštećenje može dovesti do grešaka u procesu replikacije DNK, što posreduje u razvoju melanoma. S druge strane, iako manje zastupljeni u čovekovoј sredini, UVB zraci su više genotoksični. Oni deluju na površini kože i dovode do direktnih oštećenja DNK, uključujući ciklobutanske pirimidinske dimere (CPD), pirimidin-pirimidon 6-4 fotoprodukte (6-4PP) i Devar valentne izomere (DEWs) (89). Ove mutacije mogu biti prepoznate i popravljene od strane mehanizma nukleotidne eksicione popravke (engl. *nucleotide excision repair*, NER), a kod poremećaja funkcije ovog mehanizma dolazi do melanomageneze. Poznato je da osobe sa pigmentnom kserodermom (lat. *xeroderma pigmentosum*), retkim genetičkim oboljenjem, usled defekta u ovom mehanizmu DNK reparacije imaju veću osetljivost na UV zračenje i veću sklonost za razvoj melanoma čak 1000 puta (90). Melanomi koji nastaju na koži koja je hronično izložena suncu (glava, podlaktice), obično su pokrenuti nekom od mutacija u genima *NRAS*, *NF1* ili *BRAF* non-V600E, pri čemu mogu nastati de novo ili iz intermedijarne prekursorske lezije, kao što su displastični nevus ili lentigo maligna.

1.1.4.4. Fototip kože

Opisano je šest fototipova kože. Osobe sa fototipovima I i II imaju svetlu kožu, plavu ili riđu kosu, mnogo pega i plave oči. Usled nedostatka tamnog pigmenta (eumelanina) ove osobe na suncu slabo tamne, što predstavlja protektivni mehanizam, a lako gore, što ih čini osetljivijim na UV zračenje i imaju veći rizik od razvoja melanoma (91).

Tamnjenje kože usled sunčanja nastaje sintezom eumelanina u melanocitima i predstavlja zaštitu od štetnog dejstva UV zračenja. Ključnu ulogu u ovom mehanizmu ima receptor za melanokortin 1 (MC1R) na melanocitima koji posredstvom cAMP i transkripcionog faktora MITF stimuliše sintezu eumelanina. Genetičke varijante u *MITF* i *MC1R* genima utiču na ravnotežu između eumelanina i feomelanina u koži, kosi i očima, pa tako i povećan rizik od razvoja melanoma (92).

Mutacija *MITF* E318K povezana je sa naslednom predispozicijom za razvoj melanoma. S druge strane, gen *MC1R* pokazuje polimorfizam u populaciji, a kod varijanti gena koje kodiraju receptor MC1R sa smanjenom ili izgubljenom funkcijom, dolazi do sinteze svetlog pigmenta feomelanina, umesto UV protektivnog eumelanina. Ti pojedinci su oni koji imaju svetlu kožu, riđu kosu i povećan rizik od nastanka melanoma. Sem toga, aktivacijom MC1R dolazi do zaštite PTEN od proteazomalne degradacije, što inaktivira Akt i suprimira nastanak melanoma (32). Ovo objašnjava zašto pojedinci sa *MC1R* mutacijom imaju veći rizik od maligne transformacije nevusa, degradacijom PTEN i aktivacijom *BRAF* mutacije.

Varijacije i mutacije u genima *ASIP*, *TYR* i *TYRP1*, koji takođe kontrolišu proizvodnju melanina, utiču na fototip kože i određuju vulnerabilnost na UV zračenje. Istraživanjima je utvrđeno da neke od varijanti ovih gena bez obzira na fototip kože dovode do povećane senzitivnosti na UV zrake (89).

1.1.4.5. Mladeži i intermedijerne lezije

Melanocitni nevusi (pigmentni mladeži) predstavljaju benignu proliferaciju melanocita u koži i mogu biti kongenitalni i stečeni. Obično tokom života ostaju nepromenjeni ili čak nestanu. Ipak, 30% melanoma razvije se iz ovih benignih tumora, uglavnom na koži koja je umereno izložena suncu (npr. ekstremiteti i trup). U oko 80% pigmentnih mladeža prisutna je mutacija *BRAF* V600E, koja je ključna za pokretanje procesa melanomageneze kod više od polovine slučajeva melanoma. Sama po sebi ova mutacije nije

dovoljna za razvoj melanoma, ali postaje značajna usled daljih promena u nevusu, kao što su UV indukovane mutacije i promene usled imunosupresije. Kod nevusa tumor supresori poput *p53* i *PTEN*, a i faktori senescencije poput *p16INK4a*, dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa. Iako se gubitak funkcije *p53* retko nalazi u melanomu, mutacija *PTEN*, sa aktivacijom PI3k/Akt signalnog puta, često je prisutna kod nevusa, što može omogućiti dalju progresiju u displastične nevuse ili melanom. Povećana aktivnost PI3K/Akt prisutna je kod približno 17% pigmentnih nevusa, 43% displastičnih nevusa, 49% primarnih melanoma i 77% metastatskih melanoma. Ovo govori u prilog tome da mutacija u *PTEN* genu može biti ključan faktor maligne transformacije benignih nevusa (93, 94). Rizik od melanoma varira zavisno od tipa, veličine, broja i lokalizacije nevusa. Kod osoba sa 11 do 25 nevusa rizik od razvoja melanoma je za oko 1,5 puta povećan, a udvostručava se na svakih dodatnih 25 nevusa. Slično tome, što je nevus krupniji (za one veće od >5 mm) povezan je sa većim rizikom od nastanka melanoma. Gigantski nevusi (>20 cm) nose značajno povećan rizik od maligne transformacije, te je bitno njihovo redovno praćenje (95). Smernice sugerišu da mladeže treba redovno pregledati klinički, na osnovu ABCDE kriterijuma (asimetrija, nepravilnost ivice, varijacija boje, prečnik >6 mm i evolucija), kao i dermoskopski, i kod postojanja sumnje ekscidirati sa marginama od barem 2 mm (96).

Displastični nevusi su melanocitni nevusi sa klonalnom proliferacijom melanocita i citološkom atipijom, i predstavljaju marker predispozicije za nastanak melanoma. Klasifikovani su kao potencijalne prekursorske lezije, ali nisu obavezni prekursori s obzirom da iz većine ne nastane melanom. Uglavnom se nalaze na područjima tela koja su izložena suncu, ali i onima koja nisu (glava, grudi). Približno dve trećine displastičnih nevusa nosi *BRAF* V600E mutaciju, ali za razliku od benignih nevusa, sadrže i druge mutacije koje dovode do aktivacije MAPK puta, kao i *CDKN2A*, *TERT* i *PTEN* mutacije (34). Relativno su česti kod severnoevropske populacije, sa učestalošću od oko 10%. Povećavaju rizik od nastanka melanoma za 1,5-10 puta, što zavisi od broja prisutnih displastičnih nevusa. Pacijenti sa sindromom FAMM imaju gotovo 100 puta veći rizik, a približno 50% ovih pacijenata oboli od melanoma do 50. godine života (97).

Lentigo maligna, poznata još kao Hačinsonov melanotični pečat i Dubrejova prekancerozna melanoza, korelira sa UV oštećenjem kože i starenjem. Ona predstavlja prekursorsku leziju melanoma *in situ* i nekad je teško razlikovati je od melanocitne hiperplazije na oštećenoj koži. Iako zloćudni melanom *in situ* ima tip lentigo maligna, koji nosi isti naziv kao ova prekancerozna lezija, bitno ih je razlikovati jer joj prekursorska lezija lentigo maligna prethodi i može evoluirati decenijama pre prodora u papilarni derm. Patohistološki prekursorska lezija lentigo maligna ima povećan broj atipičnih melanocitnih ćelija gde dolazi do njihovog pojedinačnog raspoređivanja duž dermalno-epidermalne granice, dok u zloćudnom melanomu *in situ* tip lentigo maligna dolazi do grupisanje duž granice, konfluencije i površnog širenja (98).

1.1.4.6. Genetička heterogenost melanoma

Velika genetička heterogenost melanoma je rezultat akumulacije genetičkih promena tokom nastanka i razvoja tumora. Tačan redosled događaja nije lako prepoznati, ali se smatra da rani razvoj može biti posledica UV indukovane mutageneze, dok kasnija metastatska evolucija obično uključuje dodatne mutacije koje nisu direktno povezane sa UV zračenjem.

Genetička heterogenost melanoma se može podeliti na interhumanu, intertumorsku i intratumorsku. Interhumana heterogenost odnosi se na razlike u genetičkim profilima među melanomima različitih pacijenata. Intertumorska heterogenost opisuje različitost između genotipova različitih melanoma kod istog čoveka, a intratumorska genetička varijabilnost među različitim ćelijama istog tumora.

Istraživanja su pokazala da subklonalna heterogenost, koja se odnosi na subpopulacije ćelija sa različitim genetičkim karakteristikama unutar jednog tumora, može biti prognostički biomarker lošeg ishoda. Ove subklonalne populacije mogu da se razviju tokom evolucije i metastaziranja tumora i utiču na njegovu agresivnost i terapijski odgovor (99).

Razumevanje genetičke heterogenosti melanoma ključno je za unapređenje terapijskih strategija i razvoj personalizovanog pristupa lečenja. Analiza genetičkih profila tumora omogućila je, sem boljeg razumevanja patogenetskih mehanizama, i identifikaciju specifičnih genetičkih biomarkera.

Tabela 4. Učestalost i molekularni mehanizam ključnih gena čije su mutacije povezane sa razvojem melanoma

Gen	Učestalost *	Molekularni mehanizam/ signalni put
<i>BRAF</i>	41%	MAPK signalni put (RAF/MEK/ERK)
<i>N-RAS</i>	16%	MAPK signalni put(RAF/MEK/ERK)
<i>NF1</i>	20%	RAS signalni put
<i>KIT</i>	8%	tirozin kinazni receptor; MAPK, PI3K/AKT/mTOR.
<i>GNAQ/GNA11</i>	<5%	G protein; cAMP; RAS signalni put
<i>PTEN</i>	20-40%	PI3K/AKT/mTOR
<i>TERT</i>	29-71%	MAPK i PI3K/AKT
<i>CDKN2A</i>	10%	p53 i Rb
<i>CDK4</i>	<5%	ciklin D
<i>TP53</i>	26%	tumor supresor
<i>MITF</i>	10-16%	TYRP1, TYRP2
<i>MC1R</i>	15-20%	MC1R receptor, cAMP/PKA

Legenda: * Učestalost mutacija pojedinih gena se značajno razlikuje od lokalizacije melanoma i prisustva/odsustva UV oštećenja; navedeni % se odnose na prosečne vrednosti za kutani melanoma prema najnovijim podacima COSMIC baze podataka (sajtu pristupljeno 20.12.2023.god.)(100).

1.1.5. Dijagnostika, klasifikacija, stadijumi i prognoza melanoma

Dijagnostika i stadiranje melanoma su od ključnog značaja za određivanje prognoze i pravilnog pristupa u lečenju. Dijagnostički postupci uključuju uzimanje anamnestičkih podataka, klinički pregled i dermoskopiju, biopsiju i patohistološku verifikaciju, kao i dodatne postupke radi procene proširenosti tumora. Nakon podataka dobijenih dijagnostičkim postupcima utvrđuje se stadijum i određuje prognoza bolesti.

1.1.5.1. Dijagnostika melanoma

U kliničkoj dijagnostici se kao alat koristi mnemonički ABCDE kriterijum, gde se A odnosi na prisustvo asimetrije (engl. *asymmetry*), B na nepravilnost bordure (engl. *border*), C na koloritet (engl. *color*), D na dijametar veći od 6mm (engl. *diameter*), i E na evoluciju, tj. nedavnu promenu lezije (engl. *evolution*). Ovi kriterijumi koriste se decenijama unazad, a omogućili su tačnost kliničke procene golim okom od 65% (1). Značajan napredak u kliničkom pregledu nastao je uvođenjem dermoskopije i razvojem dermoskopskih kriterijuma za dijagnostiku melanoma (5). Ova neinvazivna procedura izvodi se pomoću dermoskopa, uveličavajućeg instrumenta sa polarizovanim svetlom, koji omogućava analizu boja i struktura kožnih lezija nevidljivih golim okom. Da bi se tumačenje pojednostavilo, razvijeno je nekoliko algoritama za dermoskopsku dijagnostiku melanoma, poput liste od 7 tačaka, Menziesove metode i ABCD obrasca. Međutim, među stručnjacima za dijagnostiku pigmentnih lezija vlada stav da je analiza obrazaca (engl. *pattern analysis*) ipak najpouzdanija metoda (101). Odabir algoritma zavisi od iskustva dijagnostičara, a među najčešćim dermoskopskim karakteristikama spadaju prisustvo atipične pigmentne mreže, negativna pigmentna mreža, polja regresije, atipično distribuirane globule ili tačke, atipična mrlja, atipične pruge, uglaste linije, plavo-beličasti veo i atipična vaskularna mreža (102). Pored ovih opštih, postoje i specifične karakteristike koje su vezane za deo tela ili oblik melanoma. Tako se kod nodularnih oblika često viđa karakteristična crno-plava pigmentacija, a kod amelanotičnih/hipomelanotičnih svetlo-ružičasta. Sumnju na lentigo maligna, koji se najčešće javlja na licu, treba da probudi sivkasta prebojenost, tamne romboidne strukture i asimetrični folikularni otvori. (103). Važno je napomenuti da svaka nova pojava globularnog nevusa kod odrasle osobe zahteva posebnu pažnju i razmatranje oblika *nested* melanoma, jer su ovakvi nevusi karakteristični za raniju dob (104). Takođe, za svaki pigmentni mladež koji u odnosu na ostale mladeže iste osobe ima drugačiju dermoskopsku strukturu (znak ružnog pačeta), indikovana je ekscizija (105).

Kada se kliničkim i dermoskopskim pregledom identifikuje sumnjiva promena, postavlja se indikacija za biopsiju sa patohistološkom analizom, što je jedini način da se definitivno postavi dijagnoza. Uzorkovanje lezije može da se izvrši kompletnom ekscizionom biopsijom ili parcijalnom panč (incizionom) biopsijom. S obzirom da je vertikalna dubina invazije jedan od najvažnijih prognostičkih faktora, kompletna ekscizionna biopsija sa uskim marginama je sigurnija metoda i preporučena je od strane Američke akademije za dermatologiju (engl. *The American Academy of Dermatology*, AAD) (65).

Patohistološka potvrda melanoma podrazumeva opis citološke atipije, invazije i ostalih karakteristika koje govore u prilog malignosti. Neophodno je navesti parametre za stadiranje melanoma kao što su debljina tumora po Breslou, status ulceracije i mikrosatelitoze. Prema smernicama AAD i Nacionalne mreže za sveobuhvatno lečenje raka (engl. *National Comprehensive Cancer Network*, NCCN) preporučuje se da izveštaj patologa sadrži još i kliničke informacije o pacijentu, lokalizaciji lezije, veličini uzorka, statusu resekcionih margina i dermalnoj mitotskoj stopi. Ostali patohistološki parametri nisu

neophodni, ali bi bilo dobro navesti ih zbog njihove prognostičke vrednosti i tu spadaju: limfocitna, vaskularna i perineuralna invazija, nivo invazije po Klarku za lezije <1 mm debljine, prisustvo i obim regresije i prisustvo udružene benigne melanocitne lezije. Opisivanje histološkog podtipa je opcionalno prema AAD i NCCN, ali neophodno prema Evropskom udruženju za onkologiju (engl. *The European Society for Medical Oncology*, ESMO) (106-108).

Nakon postavljanja dijagnoze melanoma, sprovode se dodatne procedure radi procene raširenosti tumora na limfne čvorove i druge organe. To podrazumeva biopsiju limfnog čvora stražara (SLNB) ili disekciju regionalnog limfnog basena, u zavisnosti od toga da li je patohistološkim nalazom potvrđena invazivnost primarnog tumora i da li je ultrazvučnim nalazom detektovana regionalna limfadenopatija. U cilju kompletne dijagnostike sprovodi se radiološka evaluacija koja uključuje rendgenske snimke, ultrazvučne preglede, kompjuterizovanu tomografiju (CT) ili magnetnu rezonancu (MRI) prema smernicama u zavisnosti od stadijuma bolesti. Prema svim smernicama, u metastatskoj bolesti preporučuje se testiranje serumskog LDH (laktat dehidrogenaze) zbog njegove prognostičke vrednosti. Takođe, za praćenje progresije bolesti i odgovora na terapiju, vrše se periodične analize još jednog senzitivnijeg serumskog markera- proteina S100 (107).

Utvrđivanje prisustva genetičkih mutacija je od značaja u višim stadijumima bolesti. ESMO, NCCN i Austalijski komitet za maligne bolesti (engl. *Cancer Council Australia*, CCA) preporučuju testiranje na *BRAF* V600E mutaciju kod pacijenata u III stadijumu bolesti koji bi mogli biti kandidati za ciljanu terapiju, a kod odsustva V600E sledi testiranje na manje uobičajene *BRAF*, *NRAS* i *c-KIT* mutacije redom (65).

1.1.5.2. Stadijumi i prognoza melanoma

Utvrđivanje stadijuma melanoma zasnovano je na kategorizaciji bolesti prema TNM sistemu Američkog udruženog komiteta za maligne bolesti (engl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) iz 2017.godine, gde se uzimaju u obzir sledeće kategorije:

- T- koja označava prisustvo/veličinu tumora;
- N- koja označava status regionalnih limfnih čvorova i
- M- koja se odnosi na prisustvo/odsustvo udaljenih metastaza.

TNM kategorizacija se vrši na osnovu patohistoloških parametara- debljine tumora po Breslou, statusa ulceracije i mikrosatelitoze, kao i laboratorijskog nalaza serumskog LDH za M kategoriju (Tabela 5.)

Tabela 5. TNM sistem za klasifikaciju melanoma

T	Stadijum	Debljina tumora i patohistološki prognostički parametri
	Tx	primarni tumor ne može da se odredi
	T0	nema dokaza postojanja primarnog tumora
	Tis	Melanoma <i>in situ</i>
	T1	<1 mm
	T1a	<0,8 mm i bez ulceracije
	T1b	<0,8 mm sa ulceracijom ili $\geq 0,8$ mm
	T2	>1,0–2,0 mm
	T2a	>1,0–2,0 mm bez ulceracije
	T2b	>1,0–2,0 mm sa ulceracijom
	T3	>2,0–4,0 mm
	T3a	>2,0–4,0 mm bez ulceracije
	T3b	>2,0–4,0 mm sa ulceracijom
	T4	>4,0 mm
	T4a	>4,0 mm bez ulceracije
T4b	>4,0 mm sa ulceracijom	
N	Stadijum	Broj limfnih čvorova sa metastazama
	Nx	regionalni LN ne mogu da se odrede
	N0	odsustvo metastaza u regionalnim LN
	N1	Metastaza u 1 LN/ jedna in transit ili satelitska metastaza bez LN
	N1a	Mikrometastaza u 1 LN (detektovana SLNB)
	N1b	Makrometastaza u 1 LN (detektovana klinički/radiološki)
	N1c	Jedna <i>in transit</i> ili satelitska metastaza, bez zahvaćenog LN
	N2	Metastaza u 2-3 LN/ in transit ili satelitska metastaza sa LN
	N2a	Mikrometastaza u 2–3 LN (detektovana SLNB)
	N2b	Makrometastaza u 2–3 LN (bar 1 klinički/radiološki detektovana)
	N2c	<i>in transit</i> ili satelitske metastaze sa metastazom u 1 LN (SLNB ili klinički/radiološki)
	N3	Metastaze u ≥ 4 LN
	N3a	Mikrometastaze u ≥ 4 LN (detektovane SLNB)
N3b	Makrometastaze u ≥ 4 LN (bar 1 klinički/radiološki detektovana)	
N3c	<i>in transit</i> ili satelitske metastaze sa metastazama u 2 LN (SLNB ili klinički/radiološki)	
M	Stadijum	Tip udaljene metastaze
	Mx	udaljene metastaze ne mogu da se odrede
	M0	bez udaljenih metastaza
	M1a	Udaljene metastaze u koži, potkožnom tkivu i mišiću i/ili neregionalnom LN
	M1a(0)	-II- LDH nije povišen
	M1a(1)	-II- LDH povišen
	M1b	Metastaze u plućima sa ili bez M1a metastazama
	M1a(0)	-II- LDH nije povišen
	M1a(1)	-II- LDH povišen
	M1c	Udaljene metastaze druge lokalizacije (bez CNS) sa ili bez M1a i M1b metastazama
	M1a(0)	-II- LDH nije povišen
	M1a(1)	-II- LDH povišen
	M1d	Metastaze u CNSu sa ili bez M1a, M1b i M1c metastazama
M1a(0)	-II- LDH nije povišen	
M1a(1)	-II- LDH povišen	

Legenda: LN- limfni nodus

Preuzeto i prilagođeno od Jeffrey E et al. (109)

Prema TNM kategorijama, melanom se zatim može klasifikovati u kliničke i patološke prognostičke stadijume. Prvo se pacijenti klasifikuju u jedan od četiri klinička stadijuma na osnovu prvih podataka dobijenih biopsijom tumora, kliničkom i radiološkom procenom. Pomoću kliničkog stadijuma utvđuju se dalji postupci u dijagnostici i lečenju, kao i prognoza bolesti. Klinički stadijum 0 označava melanom na površini kože, tzv. melanom *in situ*. Stadijumi I i II odnose se na lokalizovani melanom koji se proširio na dublje slojeve kože, ali nije zahvatio regionalne limfne čvorove ili udaljene organe. U stadijumu III bolest se proširila na regionalne limfne čvorove, a u stadijumu IV i na udaljene organe (109, 110) (Tabela 6).

Tabela 6. Kliničko stadiranje melanoma prema TNM klasifikaciji sa prognozom petogodišnjeg preživljavanja po stadijumima

Klinički stadijum		T	N	M	*5 GOD
0	0	Tis	N0	M0	>99%
I	IA	T1a	N0	M0	92-97%
	IB	T1b, T2a	N0	M0	
II	IIA	T2b, T3a	N0	M0	53-81%
	IIB	T3b, T4a	N0	M0	
	IIC	T4b	N0	M0	
III	III	bilo koji T	N1,N2, N3	M0	40-78%
IV	IV	bilo koji T	bilo koji N	M1	15-20%

Legenda: 5GOD: odnosi se na petogodišnje preživljavanje
Preuzeto i prilagođeno od William H. et al. (65) i Jeffrey E. et al.(109)

Patološki stadijum se određuje naknadno, s obzirom da su za njegovo klasifikovanje potrebne informacije dobijene dodatnom patološkom analizom široke ekscizije, biopsije limfnog čvora stražara ili kompletne disekcija regionalnih limfnih čvorova (109, 110) (Tabela 7).

Tabela 7. Patološko stadiranje melanoma prema TNM klasifikaciji sa prognozom petogodišnjeg preživljavanja po stadijumima

Patološki stadijum	T	N	M	*5 GOD
0	Tis	N0	M0	>99%
IA	T1a/1b	N0	M0	99%
IB	T2a	N0	M0	97%
IIA	T2b/T3a	N0	M0	94%
IIB	T3b/T4a	N0	M0	87%
IIC	T4b	N0	M0	82%
IIIA	T1a/b, T2a	N1a, N2a	M0	93%
IIIB	T1a/b,T2a T2b/T3a	N1b/c, N2b N1a–N2b	M0	83%
IIIC	T1a-T3a T3b/T4a T4b	N2c, N3a/b/c bilo koji N ≥N1 N1a–N2c	M0	69%
IIID	T4b	N3a/b/c	M0	32%
IV	bilo koji T	bilo koji N	M1	<20%

Legenda: 5GOD: odnosi se na petogodišnje preživljavanje
Preuzeto i prilagođeno od William H. et al. (65) i Jeffrey E et al. (109).

1.1.5.3. Kliničko-patološka klasifikacija melanoma

Prema trenutnoj kliničko-patološkoj klasifikaciji postoje četiri glavna podtipa melanoma: melanom sa površinskim širenjem, nodularni melanom, lentigo maligna i akralni lentiginozni melanom. Uz njih se često opisuju još dva tipa- dezmoplastični i amelanotični melanomi. (Tabela 8.) (65). Iako postoje melanomi koji imaju jasnu histopatološku sliku određenog podtipa, mnogi imaju preklapajuće obrasce (111). Druga mana ove klasifikacije je što ne uključuje prognostičke informacije, već se umesto toga prognostički faktori, u vidu debljine po Breslou i prisustva ulceracija koje diktiraju postupak lečenja, dodaju u patološki izveštaj.

Tabela 8. Kliničko-patološka klasifikacija melanoma sa učešćalošću i karakteristikama pojedinačnih tipova

Tip melanoma	Učestalost	Karakteristike
Melanom sa površnim širenjem	70%	- često potiče iz pigmentnog nevusa
Nodularni melanom	5%	- odsustvo faze radialnog rasta - izražena vertikalna invazija
Lentigo maligna	4-15%	- najčešće ima sporu progresiju - često nastaje na područjima izloženim suncu (npr. glava)
Akralni lentiginozni melanom	5%	- često se javlja na dlanovima, tabanima i ispod noktiju - češći kod pacijenata sa tamnijom kožom
Amelanotični melanom	4%	-veoma retki -odustna pigmentacija
Dezmoplastični melanom	<4%	- veoma retki - javlja se kod starijih odraslih osoba - karakteriše se retkim vretenastim ćelijama i minimalnom ćelijskom atipijom.

Preuzeto i prilagođeno od Ward et al. (65)

Svetska zdravstvene organizacije je 2018. godine izdala klasifikaciju sa 9 podtipova melanoma koja uključuje epidemiološke i genomske informacije, što je prikazano na Tabeli 9 (112).

Tabela 9. Klasifikacija melanoma prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji

Melanom i fotooštećenje kože		Podtipovi	Genetička obeležja
Melanomi povezani sa KSO	1	Melanom sa niskim KSO/ superficijalni melanom	-visoka učestalost <i>BRAF</i> V600mutacija
	2	Melanom sa visokim KSO/ lentigo maligna (+nodulani sa visokim KSO)	-preovlađuju mutacije <i>NF1</i> , <i>NRAS</i> , non-V600E <i>BRAF</i> i možda <i>KIT</i> , koje se međusobno isključuju
	3	Dezmoplastični melanom	-rekurentne deaktivirajuće <i>NF1</i> mutacije, mutacije promotora <i>NFKBIE</i> i nekoliko aktivirajućih mutacija gena u <i>MAPK</i> putanji
Melanomi koji nisu nužno povezani sa KSO	4	Spitz melanom	-mutacije u <i>HRAS</i> -u i fuzije kinaza u <i>ROS1</i> , <i>NTRK1</i> , <i>NTRK3</i> , <i>ALK</i> , <i>BRAF</i> , <i>MET</i> , i <i>RET</i> ; -homozigotne delecije <i>CDKN2A</i> , mutacije promotora <i>TERT</i> -a, i fuzione mutacije <i>MAP3K8</i> -a u agresivnim varijantama.
	5	Akralni melanom (+nodularni na ovoj regiji)	-mutacije <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> i <i>KIT</i> ; -multiple amplifikacije <i>CCND1</i> , <i>KIT</i> , i <i>TERT</i> ; -fuzije kinaza <i>ALK</i> ili <i>RET</i> u nekoliko slučajeva
	6	Mukozni melanom	-brojne varijacije u broju kopija i strukturi; -retko mutacije <i>KIT</i> i <i>NRAS</i>
	7	Melanom nastao iz kongenitalnog nevusa	- <i>NRAS</i> mutacija (veliki i gigantski kongenitalni nevusi); - <i>BRAF</i> mutacije (mali i srednje veliki kongenitalni nevusi)
	8	Melanom nastao iz blue nevusa	-početne mutacije u signalnom putu <i>Gaq</i> (<i>GNAQ/11</i> , <i>CYSLTR2</i> , <i>PLCB4</i>); -monozomija 3 (povezana sa gubitkom <i>BAP1</i>) i dobitak hromozoma 8q u agresivnim slučajevima; -dodatne sekundarne aberacije u broju kopija u <i>SF3B1</i> i <i>EIF1AX</i> .
	9	Uvealni melanom	-međusobno isključive mutacije u signalnom putu <i>Gaq</i> (<i>GNAQ/11</i> , <i>PLCB4</i> , <i>CYSLTR2</i>); -mutacije u <i>BAP1</i> , <i>SF3B1</i> , i <i>EIF1AX</i> tokom progresije.

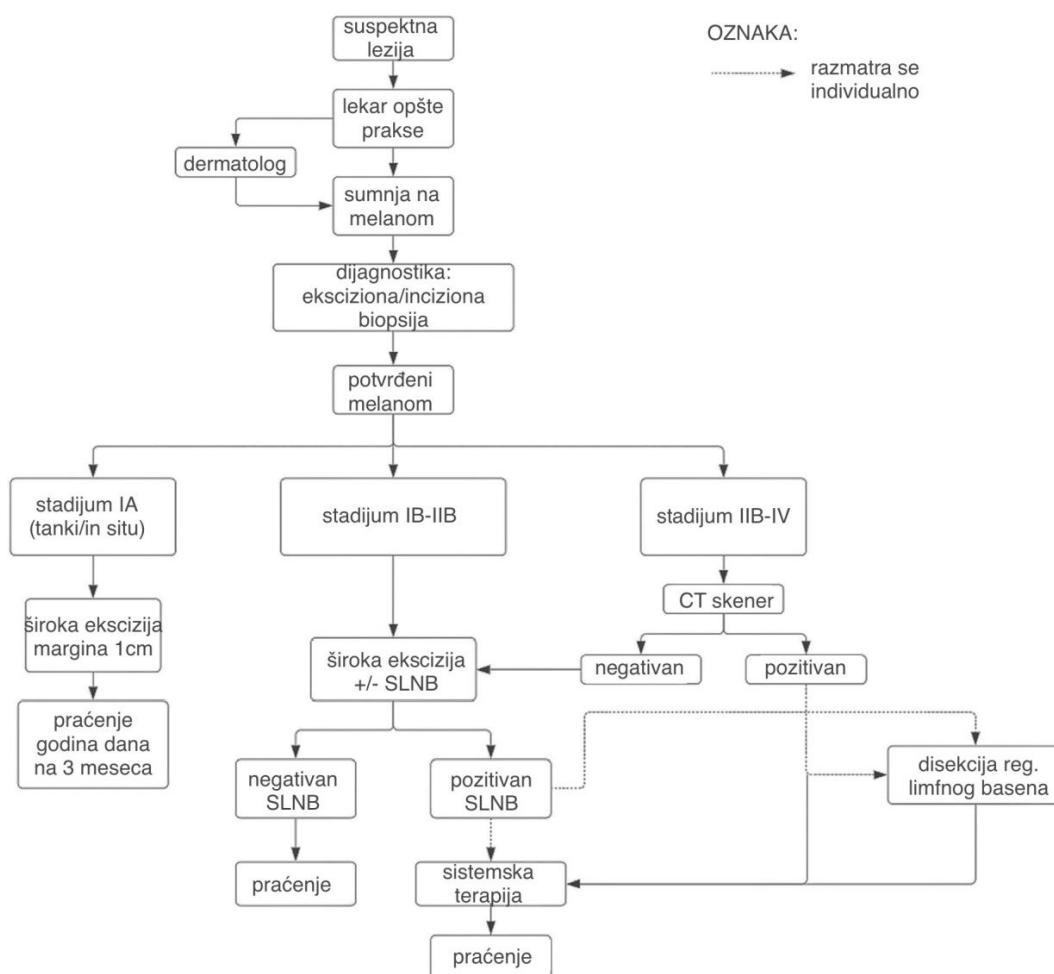
Legenda: *KSO- kumulativno solarno oštećenje
Preuzeto i prilagođeno od Waseh i Lee (5).

1.1.6. Terapija melanoma

Melanom, najmaligniji i za lečenje najizazovniji oblik karcinoma kože, zahteva sveobuhvatan pristup u terapiji, gde se kombinuju hirurški i medikamentni tretmani.

Dijagnostika, praćenje i lečenje agresivne maligne bolesti kakva je melanom su zahtevni postupci koji zahtevaju resurse i kliničke smernice (Slika 3). Pacijenti dobijaju dijagnozu melanoma nakon ekscizione biopsije sa patohistološkom verifikacijom. Tretman svih dijagnostikovanih melanoma podrazumeva široku eksciziju, a u zavisnosti od nalaza patologa može biti indikovano sprovođenje niza daljih procedura kao što su biopsija limfnog čvora stražara, radiološka, biohemijska i genetička ispitivanja, što može proširiti tretman na sistemsku antitumorsku terapiju, sa ili bez hirurgije.

U stadijumu I (lokalizovana bolest) melanom se kompletno leči širokom ekscizijom. Kod pacijenata u stadijumu II (lokalizovana bolest sa rizikom od relapsa) i stadijumu III (regionalna bolest) pored široke ekscizije, može se primeniti i medikamentna terapija kao adjuvantna (nakon hirurgije zbog eventualnih mikrometastaza) ili neoadjuvantna (pre hirurškog lečenja) i/ili disekcija regionalnog limfnog basena. U IV stadijumu (uznapredovala metastatska bolest) uglavnom se primenjuje adjuvantna sistemska imunološka i ciljana terapija, uz eventualne palijativne hirurške tretmane (113, 114).



Slika 3. Smernice za dijagnostiku i lečenje melanoma

Preuzeto i prilagođeno iz Engleskog vodiča za melanom iz 2022.godine (114).

1.1.6.1. Hirurška terapija melanoma

Hirurške procedure su ključne za postavljanje dijagnoze i određivanje stadijuma melanoma, a ostaju zlatni standard i za lečenje primarnog melanoma, lokalnih i regionalnih metastaza (115). Osnovni cilj je postizanje kontrole lokalne i regionalne bolesti, uz minimlano funkcionalno i morfološko oštećenje. Operativna procedura zavisi od dubine invazije primarnog tumora i stadijuma bolesti (116).

- Hirurška terapija primarnog melanoma

Hirurško lečenje primarnog melanoma podrazumeva široku eksciziju i trebalo bi da se izvrši u okviru mesec dana od biopsije i postavljanja dijagnoze. Studija iz 2017.godine pokazala je da odlaganje hirurškog lečenja više od 30 dana nakon biopsije povećava smrtnost kod melanoma u I stadijumu (117).

Za razliku od ekscizione biopsije gde su margine isecanja uske i iznose 1-3mm, široka ekscizija ima za cilj uklanjanje i dela okolnog zdravog tkiva kako bi se sprečio recidiv bolesti, pa margine iznose 5-20mm. Osim toga, široka ekscizija sadrži i potkožno masno tkivo i seže do mišićne fascije/galee aponeurotike. Za sada ne postoje dokazi koji bi govorili u prilog još širim marginama ili eksciziji dubljih struktura (118-120).

Margine široke ekscizije određuju se na osnovu debljine tumora po Breslou. (Tabela 10) (121). Kod manjih melanoma ova procedura može da se obavi ambulantno u lokalnoj anesteziji, dok široka ekscizija većih tumora, posebno na glavi i vratu, može da ostavi tkivni defekt i zahteva hiruršku rekonstrukciju u opštoj anesteziji (122, 123).

Tabela 10. Preporučene margine za hiruršku eksciziju prema debljini tumora po Breslou

Debljina tumora po Breslou (mm)	Margine široke ekscizije (cm)
Melanoma <i>in situ</i>	0,5 cm
<1,00 mm	1 cm
1,00–4,00 mm	1–2 cm
>4,01 mm	2 cm

Preuzeto i adaptirano iz Vodiča za melanom iz 2021. Nacionalne mreže za sveobuhvatno lečenje raka (engl. *NCCN Guidelines Insights: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021*)(114).

Kod akralnih lentiginoznih i subungvalnih melanoma ekscizionna biopsija može biti tehnički izazovna, s obzirom da se nalaze na mestima sa ograničenom površinom kože, što zahteva amputaciju radi potpunog uklanjanja lezije (124).

Mosova mikrografska hirurgija, precizna hirurška tehnika koja omogućava postepeno uklanjanje tumora i detaljan mikroskopski pregled svih hirurških rubova, sem u slučaju uklanjanja lentigo maligna, nije preporučena za lečenje melanoma (125).

- Biopsija limfnog čvora stražara

Biopsija limfnog čvora stražara (engl. *sentinel lymph node biopsy*, SLNB) predstavlja minimalno invazivnu standardizovanu proceduru za otkrivanje klinički okultnih metastaza (nedetektibilnih palpacijom i ultrazvučno) u regionalnim limfnim čvorovima (125). Sentinel ili stražarski limfni čvor je onaj koji se nalazi prvi na putu limfne drenaže određene regije, a za njegovo mapiranje preporučuju se scintigrafija i prebojavanje metilensko plavim (126). Poslednjih godina su razvijene nove tehnike prebojavanja, poput indocianin zelene fluorescencije, koje prema nekim studijama pokazuju bolju efikasnost, i kandidati su da postanu novi standard u obeležavanju (127).

Detekcija okultnih metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod ranih stadijuma melanoma je veoma važna jer predstavlja najbolji prognostički faktor recidiva i preživljavanja. Procenjeno je da je nalaz ove intervencije pozitivan kod 16% bolesnika sa primarnim melanomom srednje debljine (1,2-3,5mm), i u 32,9% kod debljih melanoma (>3,5 mm) (128). Pre uvođenja SLNB sprovedila se profilaktička elektivna limfadenektomija, koja se više ne razmatra kako su studije utvrdile da u odnosu na sentinel biopsiju nema veću stopu preživljavanja, a nosi veći rizik od komplikacija (129, 130). Kroz studije je pokazana visoka stopa senzitivnosti sentinel biopsije od oko 85-94% (131), dok joj je mana visoka stopa lažno negativnih rezultata koja iznosi u proseku 12,5% (132).

Ako nema očiglednih kliničkih dokaza o zahvaćenosti limfnih čvorova, SLNB je indikovana za melanome debljine ≥ 1 mm po Breslou. Takođe, može se razmatrati i kod melanoma debljine 0,8-1mm u slučaju postojanja faktora visokog rizika (limovaskularna invazija, visok mitotički indeks, ulceracija itd.), ali ne postoje indikacije za izvođenje kod melanoma tanjih od 0,8 mm (114, 125). Nalaz SLNB ima dijagnostičko-prognostičku funkciju, kojom se određuje stadijum bolesti i postavlja indikacija za dalju terapiju. Pacijenti sa pozitivnim nalazom su kandidati za kompletnu limfadenektomiju regionalnog basena ili za ultrazvučno praćenje uz adjuvantnu terapiju ili uključivanje u kliničke studije (133). Nedavno je pokazano da kompletna limfadenektomija nakon pozitivnog SLNB, koja je do skoro bila praksa, nema prednost u odnosu na kliničko praćenje u pogledu preživljavanja pacijenata, ali daje bolju kontrolu regionalne bolesti (134). S obzirom na ova istraživanja i napredak u modalitetima lečenja, neki centri su uveli u praksu sistemsku terapiju i redovno praćenje nakon pozitivne SLNB, umesto kompletne limfadenektomije. Pojedine zemlje, poput Velike Britanije, započele su prema ovome i reviziju smernica za lečenje u vodičima za melanom. Međutim, implementacija ovih preporuka za sada nije moguća u svim zemljama i centrima s obzirom na finansijska ograničenja, pa se u tim slučajevima kod pozitivnog SLNB i dalje može preporučiti kompletna limfadenektomija (135).

- **Kompletna limfadenektomija regionalnog basena**

Kompletna limfadenektomija (disekcija limfnih čvorova) regionalnog basena je indikovana kod metastaza koje su detektovane klinički i radiološki, i potvrđene citološki ili patohistološki.

Do nedavno je i mikrometastaski melanom, tj pozitivan nalaz SLNB, bio indikacija za ovu proceduru. Međutim, 2016. i 2017. godine objavljeni su rezultati dva velika multicentrična istraživanja, gde je pokazano da nema razlike u preživljavanju pacijenata koji su posle pozitivne SLNB podvrgnuti kompletnoj limfadenektomiji u odnosu na one koji su samo redovno ultrazvučno praćeni (na 3-6 meseci). U drugom istraživanju pokazano je još da kompletna limfadenektomija ima bolju kontrolu regionalne bolesti (smanjuje regionalne recidive za 69%), da pomaže u izboru adjuvantne terapije, ali i da nosi značajan rizik od komplikacija. Limfedem je zabeležen kod 24% pacijenata posle kompletne disekcije limfnih čvorova (135, 136). Ipak, pokazano je da bi određeni pacijenti, poput onih s melanomom glave i vrata, mogli da imaju korist od ove procedure (135, 137). Takođe, iz aspekta adjuvantne terapije sa kojom je kroz studije pokazano značajno poboljšanje preživljavanja, kompletna disekcija limfnog basena bila je uslov za ulazak u neku od ovih studija (138).

Zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa, kao i broj nodusa sa metastazama, važan su prognostički faktor (139). Deset godina preživi oko 50% pacijenata sa regionalnom bolešću (140). S obzirom da melanom ima visok rizik da zahvati više limfnih čvorova u jednom basenu, lečenje podrazumeva kompletnu limfadenektomiju. U aksilama to znači da se vrši disekcija sva tri sprata, dok se u preponi uklanjaju svi čvorovi femoralnog trougla, a uloga duboke ilioinguinalne disekcije je kontroverzna. Neki hirurzi odlučuju da je uključe u disekciju kada je najviši površinski Kloeov (engl. *Cloquet*) čvor pozitivan (141-143). Kod

disekcije limfnih čvorova vrata, u zavisnosti od mesta primarnog melanoma i drenaže tog područja, mogu se vršiti totalna parotidektomija, funkcionalna radikalna disekcija vrata ili proširena radikalna disekcija vrata (144, 145).

- Hirurgija i lokalna terapija satelitskih i *in transit* metastaza

Satelitske metastaze su depoziti melanoma koji se nalaze do 2 cm udaljenosti od mesta primarnog tumora i treba ih razlikovati od lokalnog recidiva, odnosno resta tumora. *In transit* metastaze obuhvataju sve kožne i potkožne depozite udaljene više od 2 cm od mesta primarnog melanoma, na putu do regionalnog limfnog basena. Terapija izbora je hirurška ekscizija kad god je to moguće (146).

Kod neoperabilnih, rekurentnih slučajeva *in transit* metastaza moguće je primeniti druge terapijske modalitete lokalnog lečenja. Jedna od opcija je intratumorska injekcija talimogen laherparepveca, onkolitičkog atenuisanog herpes simpleks 1 virusa sa insertovanim humanim genom koji kodira GM-CSF (engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), koji stimuliše imunološki odgovor organizma na melanoma. Ovaj lek je odobren od FDA 2015.godine (147). Kod rezistentnih slučajeva može se primeniti regionalna hemioterapija ili palijativna radioterapija (148, 149). Topikalna imunoterapija, kao što je agonista Toll-like receptora imikvimod, trenutno se istražuje (150, 151).

- Hirurško lečenje udaljenih metastaza

Hirurška resekcija udaljenih metastaza melanoma izvodi se pod uslovima da je pacijent dobrog opšteg stanja, da ima ograničenu metastatsku bolest i da je metastaza tehnički operabilna. Odluku donosi konzilijum nakon detaljnog pregleda zajedno sa hirurgom nadležne specijalnosti, a može da se izvodi i u palijativne svrhe radi ublaženja tegoba i morbiditeta. Ovaj pristup lečenja metastatskog melanoma danas se dosta promenio uvođenjem efikasnih sistemskih terapija, ali i dalje ima svoje mesto u lečenju (152).

1.1.6.2. Ciljana terapija i imunoterapija u lečenju melanoma

Zahvaljujući novim modalitetima lečenja u vidu ciljane terapije i imunoterapije, koje su uvedene poslednjih decenija, smanjena je smrtnost od melanoma uprkos neprekidnom porastu svetske incidence. (153).

Standardna terapija koja je obuhvatala hirurgiju, radioterapiju i sistemsku hemioterapiju i dalje se koristi, ali je razvoj novih terapijskih modaliteta, koji zahteva sveobuhvatni pristup i kombinovanje različitih metoda radi postizanja sinergističkih efekata, znatno doprineo kontroli uznapredovale bolesti (154-156). Iako je hirurška terapija zlatni standard za rani stadijum bolesti, nije efikasna u lečenju metastatskog melanoma (157). S druge strane, efikasnost radioterapije generalno je ograničena u lečenju ovog maligniteta i uglavnom se koristi za palijativno lečenje (158). Standardna sistemska hemioterapija kod melanoma takođe ima limitiranu delotvornost, pored ozbiljnih nuspojava, zbog čega se sve manje koristi i rezervisana je uglavnom za kombinovanu terapiju i slučajeve rezistentne na ostale tretmane.

- Ciljana terapija

Istraživanja sprovedena tokom proteklih decenija dovela su do napretka u razumevanju molekularnih pokretača razvoja melanoma, poput mutacija *BRAF*, *NRAS* i *NF1* gena, što je dovelo do razvoja terapija koje ciljaju specifična mesta u signalnim putevima. Primer takve terapije predstavljaju lekovi usmereni na inhibiciju *BRAF* i *MEK* proteina iz *MAPK* signalnog puta, koji je odgovoran za rast i napredovanje tumora.

Ubrzo nakon što je 2002.godine otkrivena *BRAF* V600E kao najčešća mutacija u melanomu, započet je razvoj *BRAF* inhibitora. Prvi među njima, koji se i danas koristi za lečenje *BRAF* mutiranog melanoma, bio je vemurafenib. Primena ovog leka je započeta u Americi 2011. godine kada je dobijena dozvola FDA, a godinu dana kasnije registrovan je i od strane Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) (154). Upravo, razvijani su i MEK inhibitori koji ciljaju MAPK putanju jedan korak nizvodno od *BRAF* gena. Tako su već 2013.godine odobreni sledeći *BRAF* inhibitor dabrafenib, ali i prvi MEK inhibitor trametinib (155). 2015. godine registrovan je za upotrebu i drugi efikasni MEK inhibitor cobimetinib. Uprkos dobrom početnom odgovoru, sekundarna rezistencija na *BRAF* i MEK inhibitore se javlja brzo, posebno kada se primenjuju pojedinačno. Danas se obično primenjuje kombinovana terapija *BRAF* i MEK inhibitora, ili ciljana terapija u kombinaciji sa imunoterapijom (157).

Još uvek su u toku istraživanja terapija koje ciljaju druge molekularne puteve poput *c-KIT*-a i *NRAS*-a. Inhibitor *c-KIT*-a, imatinib, za sada pokazuje obećavajuće rezultate kod pacijenata sa *c-KIT* mutacijom. Za *NRAS* mutacije do sada nije razvijena ciljana terapija, ali ima naznaka da bi pacijenti sa *NRAS* mutiranim melanomom mogli bi da imaju koristi od *BRAF* inhibitora enkorafeniba i MEK inhibitora binimetiniba (156, 158).

Iako je ciljana terapija značajno poboljšala prognozu i kvalitet života pacijenata sa uznapredovalim melanomom, ona ima svoje slabosti kao što su brz razvoj rezistencije i toksičnost. Smatra se da do rezistencije dolazi uglavnom zbog agresivne prirode melanoma, čije maligne ćelije imaju veliku sposobnost promene i prilagođavanja. Toksičnost povezana sa *BRAF* inhibitorima najčešće se ispoljava na koži kao osip ili pojava keratoakantoma, dok su MEK inhibitori povezani sa stomahnim i očnim iritacijama (159, 160). Iako su kombinovane terapije dokazano efikasnije, zajedno imaju i više neželjenih efekata. Stoga, nova istraživanja teže da identifikuju nove mete ciljanih terapija, kao i da istraže različite strategije kombinovanja postojećih (161-164).

- Imunoterapija

Imunoterapija ima za cilj poboljšanje sopstvenog imunološkog odgovora, ili upotrebu modifikovanih ćelija imunskog sistema koje su sposobne da specifično prepoznaju i napadnu maligne ćelije, pa se može posmatrati kao alternativa hemioterapije i radioterapije, samo sa boljom efikasnošću i manje neželjenih dejstava. Iako je imunoterapija značajno unapredila lečenje melanoma, njena uspešnost varira između slučajeva, što ukazuje na potrebu za unapređenjem terapije (160, 165). U tabeli 11. dat je prikaz novih imunoterapijskih lekova koji su odobreni za lečenje melanoma od 2011. godine.

Najznačajnija grupa lekova su inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka (engl. *Immune checkpoint inhibitors*, CPI) koji pojačavaju imunološki odgovor prepoznavanja i eliminacije malignih ćelija iz organizma. Cilj su im dva glavna proteina kontrolnih tačaka: CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) i PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*). Ovi proteini su uključeni u regulaciju imunološkog odgovora i sprečavanje prekomernog aktiviranja imunološkog sistema koji bi mogao da ošteti zdravo tkivo (166). Humanizovano monoklonalno anti-CTLA-4 antitelo, pod nazivom ipilimumab, koristi se u terapiji od 2011. godine. Anti-PD-1 antitelo, pembrolizumab, u upotrebi je od 2014. godine. Oba su pokazala dobre rezultate i poboljšanje preživljavanja pacijenata sa uznapredovalim melanomom primenjeni kao monoterapija ili u kombinovanoj terapiji (167, 168). Rezistencija na inhibitor PD-1 predstavlja izazov u lečenju, a u toku je razvoj terapije za prevazilaženje ove otpornosti (169).

Tabela 11. Imunoterapijski lekovi odobreni za lečenje melanoma od 2011. godine

Vrsta imunoterapije	Generičko ime leka	Fabričko ime leka	Opis	*FDA (god)
Inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka	Ipilimumab	Yervoy (Bristol Myers Squibb)	Anti-CTLA-4 antitelo	2011.
	Pembrolizumab	Keytruda (Merck)	Anti-PD-1 antitelo	2014.
	Nivolumab	Opdivo (Bristol Myers Squibb)		2014.
	Atezolizumab	Tecentriq (Genentech/Roche)	Anti-PD-L1 antitelo	2016.
	Relatlimab	Opdualag (Bristol-Myers Squibb)	Anti-LAG-3 antitelo	2022.
Terapija adoptivnog transfera	Lifileucel	Amtagvi (Iovance Biotherapeutics, Inc.)	Ćelijska terapija-TIL	2024
Onkolitički virusi	Talimogen laherparepvec (T-VEC)	Imlygic (Amgen Inc)	HSV 1, genetski modifikovan da izražava GM-CSF	2015.

*FDA(god)- označava godinu odobrenja leka od FDA

Prva odobrena imunološka terapija uznapredovale bolesti bila je interleukin-2 (IL-2). Ovaj citokin reguliše odgovor citotoksičnih T limfocita, a pokazana je njegova uloga u poboljšanju aktivnosti CD8+ efektorskih T ćelija i prevazilaženju rezistencije na određene imunoterapije kod melanoma (neoadjuvantna anti-CTLA4 i anti-PD-1) (170, 171). Osim toga, IL-2 stimuliše formiranje dendritičnih ćelija i jača antitumorski imunitet (172). Nove modifikovane IL-2 terapije obećavaju duži poluzivot i manju toksičnost, što ukazuje na potencijalno unapređenje lečenja melanoma (173).

U terapiji adoptivnog transfera ćelija imunskog sistema (engl. *Adoptive Cell Transfer*, ACT) prvo se vrši kolekcija ćelija pacijenta, a zatim njihovo modifikovanje kako bi im se pojačao odgovor na ćelije melanoma. Modifikovane T ćelije, uključujući T ćelije sa himeričnim receptorom za antigen (engl. *chimeric antigen receptor T lymphocytes*, CAR-T) ili tumor infiltrišuće limfocite (TIL), vraćaju se pacijentu (174). Primećeno je da TIL terapija smanjuje mutacioni potencijal tumora (175). Lifileucel, kao jednokratna terapija TIL-a odobrena od FDA, pokazuje poboljšanje odgovora kod pacijenata s metastatskim melanomom (174, 175). U pogledu terapije CAR T ćelijama istražuju se brojne strategije vezane za njihovo osnaživanje, uključujući optimizaciju aktivacije, poboljšanje sposobnosti infiltracije tumorskih tkiva i prevazilaženje imunosupresivnih signala (176). Iako terapije adaptivnog transfera ćelija imunskog sistema obećavaju u lečenju melanoma, manje su efikasne kod čvrstih tumora (177).

Inovativni pristup u imunoterapiji za lečenje melanoma predstavlja terapija onkolitičkim virusima (OV), koja koristi modifikovane viruse za ciljanje tumorskih ćelija, a štedi zdrave. OV Pexa-Vec (Pexastimogene Devacirepvec), do sada najistraživaniji lek ovog

tipa, pokazao je efikasnost u lečenju hepatocelularnog karcinoma i metastatskog melanoma (178). Ovi virusi takođe pojačavaju efikasnost terapije sa CAR T ćelijama (179). Međutim, zbog imunološke reakcije koja nastaje kod infekcije tumora OV, neophodno je da se pethodno razmotri opšte stanje pacijenta i druge terapijske opcije. T-VEC (Talimogen laherparecpev) je OV odobren za pacijente u kliničkim stadijumima IIIB-IV, za koji nije pokazano da poboljšava ukupno preživljavanje od melanoma, ali povećava efikasnost tretmana u kombinovanim pristupima (180). Dalja istraživanja su neophodna kako bi se bolje razumeli mehanizmi delovanja OV i optimizovala njihova klinička primena u lečenju melanoma.

1.1.6.3. Perspektiva terapije melanoma

Nova saznanja u medicini oblikovala su savremen pristup lečenja melanoma. Međutim, uprkos postignutim naprecima, i dalje postoje ograničenja usled brzog razvoja rezistencije i neželjenih efekata različitih terapijskih modaliteta. Zato je neophodan razvoj efikasnijih i manje toksičnih opcija lečenja (10).

Klinička ispitivanja koja su u toku rade na pronalasku novih farmakoloških agenasa za ciljanu terapiju i imunoterapiju, kao i na proceni kombinovanih tretmana već postojećih lekova i optimizaciji njihove primene. Istovremeno, istraživanja nastoje da identifikuju nove terapijske ciljeve i strategije. Tako je nedavno sastav gastrointestinalnog mikrobioma privukao pažnju kao prediktivni biomarker ishoda imunoterapije, a više istraživanja potvrdilo je bolji odgovor na imunoterapiju kod sprovedenih intervencija koje modifikuju mikrobiotu, poput transfera fekalne bakterijske flore (181-183).

Razvoj tehnika genetičke analize, naročito sekvenciranja genoma, tokom prethodnih decenija značajno je unapredio razumevanje genetičke osnove i patogeneze melanoma. Međutim, potrebna su dalja istraživanja kako bi se identifikovali novi genetički markeri koji bi unapredili prevenciju, dijagnostiku i terapiju ovog agresivnog tumora. Genetički markeri u onkologiji imaju poseban značaj jer mogu pomoći u identifikaciji pacijenata koji bi bolje odreagovali na određenu terapiju, kao i onih sa većim rizikom za recidiv, što poboljšava efikasnost lečenja i smanjuje neželjene efekte. Pored toga, postoji i potencijal za razvoj personalizovanog pristupa u lečenju, koji bi se temeljilo na specifičnim genetičkim profilima pacijenta i samog tumora (80).

1.2. HEDGEHOG SIGNALNI PUT

Hedgehog (HH) signalni put je intrauterino od velike važnosti u morfogenezi većine tkiva i organa. Poseban značaj ima u razvoju mozga i kičmene moždine, kao i pravilnoj orijentaciji neuralne cevi u dorzo-ventralni položaj (184). U potpuno diferenciranim ćelijama odraslog organizma je inaktivan. Izuzetak su matične i pluripotentne ćelije u nekim tkivima, gde obezbeđuje normalnu diferencijaciju i proliferaciju, učestvujući time u homeostazi, održanju i regeneraciji tkiva (185-188). Kod odraslih organizama aberantna aktivacija HH puta je povezana sa upalnim procesima, malignom transformacijom i sposobnošću invazije i metastaziranja kod različitih vrsta karcinoma, uključujući melanom, bazocelularni karcinom, leukemiju, meduloblastom, karcinom debelog creva, želuca, jetre, pankreasa, pluća, dojke i prostate. Smatra se da ključnu ulogu u onkogenezi ima njegova uloga u regulaciji deobe i diferencijacije ćelija (189-199).

1.2.1. Istorijat *Hedgehog* signalnog puta

Hedgehog su prvi put opisali Erik Višhaus i Kristijana Nuslajn-Volhard, nemački naučnici koji su 1995. godine dobili Nobelovu nagradu iz fiziologije ili medicine za svoja istraživanja genetičke kontrole razvoja embriona kod voćne mušice (lat. *Drosophila melanogaster*). U to vreme malo se znalo o genima i molekularnim mehanizmima koji učestvuju u embriogenezi, odnosno razvoju morfološki složenog višćelijskog organizma iz jedne ćelije. Koristili su EMS (etilmetansulfonat) radi izazivanja nasumičnih mutacija u voćnoj mušici, a zatim posmatrali promene koje su se dešavale u njihovoj segmentnoj morfologiji, kako bi identifikovali gene koji igraju ulogu u embriogenezi. Upravo na osnovu izgleda mutirane larve, većina ovih gena je dobila ime, pa tako i *Hedgehog* (srp. jež) gen (200).

Krajem 20. veka identifikovana su tri homologa *Hedgehog* gena kod vertebrata, uključujući čoveka, čime je pokazano da je HH signalni put evolucijski konzerviran i nije prisutan samo kod insekata. Ovo je dovelo do razumevanja uloge HH puta kod ljudi, uključujući embriogenezu, što je postavilo temelje za dalja istraživanja o njegovoj ulozi u različitim fiziološkim i patološkim procesima u organizmu (201-204).

Uočeno je da HH put igra ključnu ulogu u embriogenezi, a da kod odraslih jedinki učestvuje u održanju polariteta tkiva i matičnih ćelija. Inaktivacija ovog puta je 1996. godine povezana sa naslednim razvojnim poremećajem mozga (holoprosencefalijom), dok je hiperaktivacija nađena u ćelijama različitih maligniteta (184, 205-207). Nakon ovog otkrića usledila su ispitivanja specifičnih inhibitora HH puta u lečenju tumora, a 2009. godine sprovedena je i prva klinička studija koja je pokazala njihovu efikasnost (208-212).

1.2.2. Ključni geni i molekuli *Hedgehog* signalnog puta

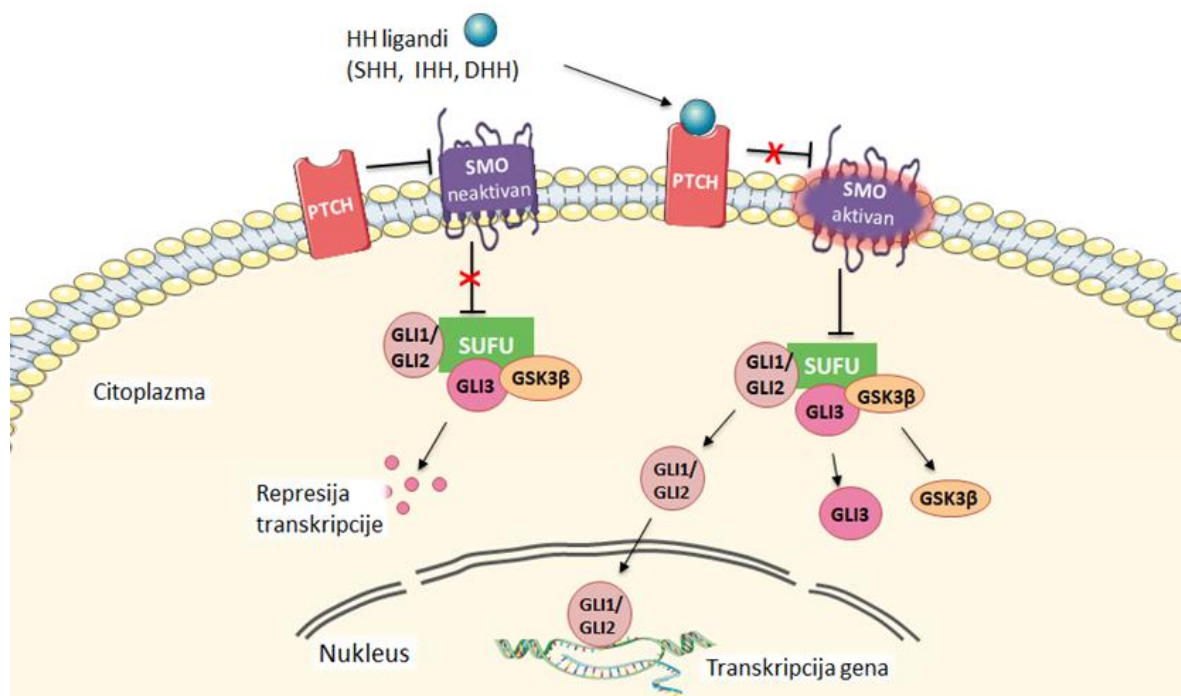
Hedgehog signalni put se sastoji od kompleksne mreže signalnih molekula koje se međusobno regulišu, kako bi kontrolisali različite ćelijske procese. Glavne komponente ovog puta su HH ligandi, transmembranski receptor PTCH (engl. *Patched*), receptor vezan za G

protein SMO (engl. *Smoothened*) i transkripcijski faktori GLI (engl. *Glioma-associated oncogene*).

Tri vezujuća liganda HH puta poznata su kao SHH (engl. *Sonic Hedgehog*), DHH (engl. *Desert Hedgehog*) i IHH (engl. *Indian Hedgehog*), od kojih je najviše proučen SHH. U odsustvu *Hedgehog* liganda, transmembranski receptor PTCH1 inhibira aktivnost SMO proteina dozvoljavajući SUFU (engl. *Suppressor of fused*) proteinu da veže i inaktivira faktor transkripcije GLI1-3 (213-215).

U aktivnom *Hedgehog* putu, vezivanje SHH za PTCH1 ublažava inhibiciju SMO. Aktivni SMO protein transdukuje signale preko citomembrane da bi aktivirao GLI, odvajajući ga od inaktivnog kompleksa SUFU-GLI. GLI proteini su ključni, terminalni faktori transkripcije HH signalizacije i važni medijatori citoplazmatske i nuklearne signalne kaskade. Porodica *GLI* ima domene za vezivanje DNK sa cink-prstima i poseduje i aktivatorske i supresorske sposobnosti. Međutim, za razliku od *GLI2* i *GLI3*, *GLI1* nema domen represora i deluje kao snažan konstitutivni aktivator transkripcije. Nizvodni ciljni geni regulisani *GLI1* obuhvataju gene uključene u regulaciju ćelijskog ciklusa (geni koji kodiraju Ciclin D1/2, E2F1), apoptoze (*BCL2*), epitelno-mezenhimsku tranziciju (*SNAIL1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST2*, *MMP9*), i samoregulaciju puta HH-GLI (*GLI1*, *PTCH1*, *HHIP1*), predstavljajući tako samoodrživu petlju HH puta. (Slika 4) (213-215)

Jedinstvena uloga *GLI1* kao aktivatora brojnih gena dovela je ovaj transkripcijski faktor u središte pažnje u genetičkim istraživanjima ciljanog lečenja maligniteta, stoga bi i genetičke promene u *GLI1* mogle potencijalno da utiču na vijabilnost ćelija, proliferaciju, apoptozu, rast, kao i njihovu migraciju i invaziju (216).



Slika 4. Ključni geni i molekuli *Hedgehog* signalnog puta

Preuzeta i modifikovana od Bhateja et al. (217)

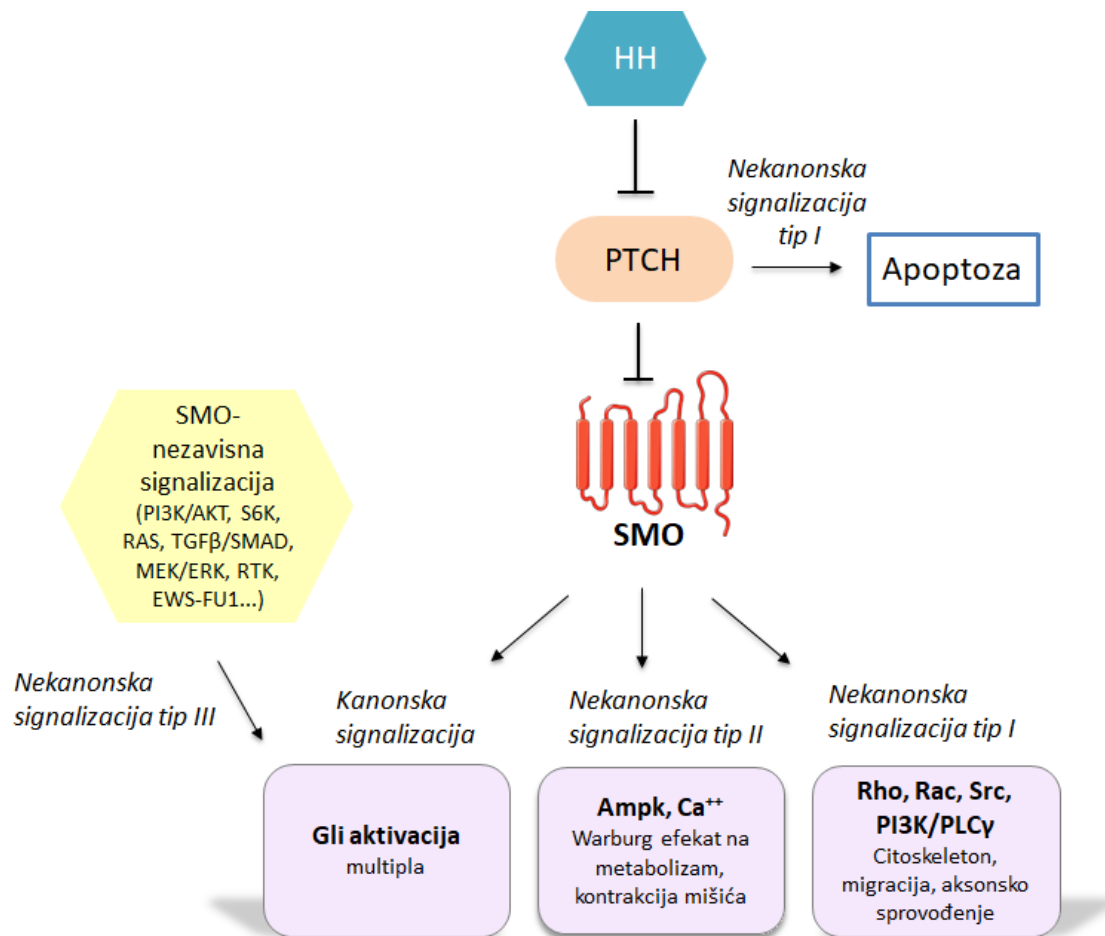
Slika je delimično kreirana korišćenjem Servier Medical Art, od Servier, licencirana pod Creative Commons Attribution 3.0 neprenosnom licencom.

Sem ove standardne signalne transdukcije HH puta koja se prenosi putem lanca SHH-PTCH1-SMO-GLI, zabeleženo je još alternativnih načina prenosa signala koji zaobilaze aktivnost GLI1. Poznati su kao „nekanonska HH signalizacija“ (engl. *non canonical Hedgehog signaling*) i mogu se podeliti u tri grupe:

Tip I- Aktivacija PTCH receptora ligandom koja pokreće signale uključene u proliferaciju i apoptozu;

TipII- GLI nezavisna aktivacija SMO receptora koja pokreće signale uključene u reorganizaciju citoskeleta i migraciju;

TipIII- SMO nezavisna aktivacija GLI (Slika 5) (215, 218, 219).



Slika 5. Klasični i nekanonski put *Hedgehog* signalizacije

Preuzeto i modifikovano od Teperino et al. (218)

Slika je delimično kreirana korišćenjem Servier Medical Art, od Servier, licencirana pod Creative Commons Attribution 3.0 neprenosnom licencom.

1.2.3. *Hedgehog* signalni put i maligniteti

Kako HH signalni put ima važnu ulogu u procesima proliferacije i diferencijacije ćelija, jasno je na koji način poremećaj njegove aktivnosti učestvuje u nastanku i razvoju patoloških stanja kao što su urođene anomalije i karcinomi. Na osnovu dosadašnjih istraživanja procenjeno je da je patološka aktivacija HH puta prisutna kod četvrtine svih maligniteta kod ljudi (184, 220).

Povezanost disregulacije HH puta i maligniteta prvi put je uočena 1987. godine, kada je u ćelijama glioma pronađen gen koji je više desetina puta amplificiran i koji je tada nazvan *GLII* gen (221). Nakon toga su identifikovani i drugi ključni činiooci HH kaskade, kao i da poremećaj u aktivnosti bilo kog od njih dovodi do maligne transformacije, s obzirom da aktivacija ne mora biti uvek ligand zavisna kako je već napomenuto. To uglavnom podrazumeva mutacije gena koji kodiraju komponente ovog puta, kao i njihovu abnormalnu ekspresiju (222).

Aberantna aktivacija HH puta u karcinomima može da se desi na jedan od sledeća tri načina: ligand nezavisno, ligand zavisno autokrino/jukstakrino i ligand zavisno parakrino. Do sad je primećeno da se u bazocelularnom karcinomu, meduloblastomu, karcinomu bešike i ezofagealnom karcinomu najčešće sreće ligand nezavisna aktivacija HH puta. Ovde su mutirani geni za receptor PTCH1 ili protein SMO, pri čemu PTCH1 gubi svoju inhibitornu funkciju, a SMO sposobnost da bude inhibiran, što sve dovodi do konstantne patološke aktivnosti HH puta (223-226). S druge strane u melanomu, karcinomima želuca, kolona, jetre, dojke i prostate, prisutna je ligand zavisna autokrino/jukstakrina aktivacija HH kaskadne signalizacije. Kod njih je zapaženo da sama tumorska ćelija sekretuje ligand, koji zatim deluje na nju samu (autokrino) ili okolne tumorske ćelije (jukstakrino) (223, 227-229). U karcinomu pankreasa i leukemijama javlja se ligand zavisna parakrina aktivacija HH kaskade, gde stromalne ćelije sekretuju ligand koji se zatim vezuje na receptore na tumorskim ćelijama (222, 223, 230-232).

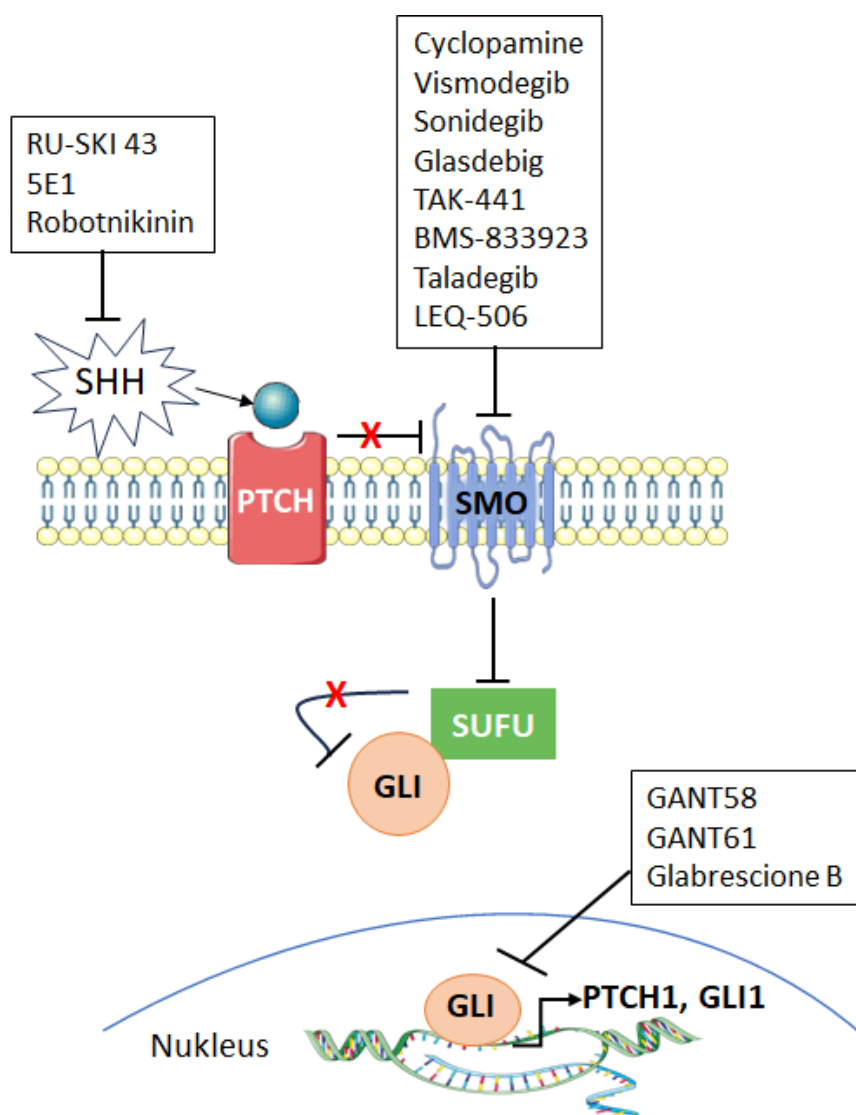
Pored toga što učestvuje u proliferaciji i diferencijaciji ćelija, pokazano je da HH reguliše i njihovu migraciju, što se je od ključne važnosti tokom embriogeneze i regeneracije tkiva, ali i u patološkim procesima invazije i metastaziranja tumora. Ovu funkciju HH ostvaruje u fibroblastima putem aktivacije GTP-aza RhoA i Rac1 i formiranjem lamelopodija, protruzija membrane koje sadrže aktinske filamente i omogućavaju adheziju za podlogu stvarajući silu koja gura ćeliju napred. Takođe, HH put reguliše aktivnost FAK (engl. *focal adhesion kinase*) koja učestvuje u reorganizaciji citoskeleta i aktivaciji transkripcionih faktora gena uključenih u migraciju i invaziju (233, 234).

Na modelu kancerskih matičnih ćelija (engl. *cancer stem cells*, CSC), tumorogenih ćelije sa karakteristikama normalnih matičnih ćelija u pogledu proliferacije i diferencijacije, kod nekoliko tipova maligniteta je pokazana pojačana ekspresija komponenti HH puta. Tako HH put učestvuje u održanju i regeneraciji kako normalnih matičnih/pluripotentnih ćelija, tako i CSC u tkivima dojke, pankreasa, hematopoetskog tkiva i kože (235-238). Kako HH signalizacija kontroliše ekspresiju proteina rezistentnog na više lekova (engl. *multi-drug resistance protein-1*), ove ćelije često pokazuju rezistenciju na hemioterapiju, a ispoljavaju i karakteristike epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT). S obzirom na ovo, inhibitori HH puta mogli bi da postanu potencijalna nova terapijska strategija prevazilaženja rezistencije na lekove kod melanoma, kao i suzbijanje procesa EMT i udaljenih metastaza (239-243).

Pokazano je da HH ima interakciju sa drugim važnim signalnim putevima koji učestvuju u malignoj transformaciji, što dodatno utiče na prognozu bolesti (244, 245). Takođe, putem indukcije faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial*

growth factor, VEGF) u stromalnim perivaskularnim ćelijama, HH igra vodeću ulogu u angiogenezi tumora (246).

S obzirom na ulogu u patogenezi karcinoma, članovi HH putanje, kao i mesta interakcije HH sa drugim signalnim putevima, postali su važna meta razvoja terapija. Do sada su razvijene različite terapijske strategije koje ciljaju ključne činioce ovog puta, uključujući SMO inhibitore, GLI1 inhibitore i antagoniste HH liganda (Slika 6). SMO inhibitori, vizmodegib i sonidegib, 2012. i 2015. godine su odobreni od strane FDA za lečenje lokalno uznapredovalog i metastatskog bazocelularnog karcinoma. Dalja klinička ispitivanja prirodnih i sintetskih jedinjenja koja inhibiraju HH putanju su u toku, i mogla bi dovesti do unapređenja terapije i poboljšanja prognoze pacijenata s karcinomima povezanim s HH signalnim putem, uključujući melanom (243, 247-249).



Slika 6. Farmakološki inhibitori *Hedgehog* signalnog puta

Preuzeto i modifikovano od Booker et al. (249)

Slika je delimično kreirana korišćenjem Servier Medical Art, od Servier, licencirana pod Creative Commons Attribution 3.0 neprenosnom licencom.

1.3. POLIMORFIZMI GENA *HEDGEHOG* PUTA

Genetički polimorfizmi su varijacije koje se u humanom genomu, prema klasičnoj definiciji, javljaju sa učestalošću većom od 1%, za razliku od mutacija, čija je učestalost manja od 1%. Najpoznatiji i verovatno najčešći tip genetičkih polimorfizama su polimorfizmi nukleotidne sekvence (polimorfizmi pojedinačnih nukleotida).

1.3.1. Polimorfizmi nukleotidne sekvence

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphisms*, SNP) su stabilne genetičke promene kod kojih u sekvenci molekula DNK nekog gena dolazi do izmene jednog nukleotida. Zamene mogu da se dese u kodirajućem delu gena - egzonu, u nekodirajućim delovima gena - intronima, u promotorskom regionu ili u intergenskim regionima. Poznavanje i proučavanje polimorfizama predstavlja značajan izvor za razumevanje genetičke osnove velikog broja kompleksnih bolesti, kakav je i karcinom. To je uslovalo razvoj brojnih studija asocijacije pojedinačnih kandidat gena ili studija asocijacije na genomskom nivou, u kojima se ispituje povezanost određenih alelskih varijanti gena sa predispozicijom za razvijanje kompleksnih oboljenja. Kao rezultat toga došlo je do rapidnog rasta biomedicinskih projekata čiji je cilj određivanje polimorfizama koji bi mogli imati ulogu molekularnih, preventivnih, prognostičkih ili prediktivnih markera kod različitih tipova tumora, uključujući i melanom (250).

1.3.2. Polimorfizmi nukleotidne sekvence u genima *Hedgehog* signalnog puta

Alelska varijanta *GLII* rs2228226 kodira promenu glutamina u glutaminsku kiselinu, što dovodi do promene naelektrisanja u evolutivno očuvanom regionu povezanom sa transaktivacionim regionom *GLI1*, što bi moglo da modifikuje sposobnost aktivacije i/ili stabilnost proteina (251). Utvrđeno je da ovaj SNP smanjuje sposobnost *GLII* proteina da aktivira *GLI* zavisnu transkripciju ciljnih gena za 50% u poređenju sa izvornom alelnom varijantom *GLII* gena (engl. *wild type*) (252). U skladu s tim, do sada je pokazano je da je varijanta gena *GLII* rs2228226 povezana sa povećanom predispozicijom za oboljevanje i lošijom prognozom kod karcinoma žučne kese (253), povećanom predispozicijom za nastanak hronične limfocitne leukemije (254) i bila je nezavisni marker loše prognoze kod kolorektalnog karcinoma (255).

Prema dosadašnjim saznanjima polimorfizmi u drugim genima HH signalnog puta su uključeni u inflamatorni odgovor i neoplastičnu transformaciju (251, 252), ali u literaturi za sada nema podataka o njihovoj povezanosti sa predispozicijom za melanomom, kliničko-patološkim karakteristikama obolelih, niti prognozom bolesti. S obzirom na to da su prethodno opisane promene u regulaciji HH kaskadne signalizacije u melanomu, genetičke varijante po tipu SNP u njegovim ključnim genima mogle bi biti povezane sa predispozicijom za razvoj i/ili progresijom ove bolesti. Otkrivanje ove povezanosti moglo bi da bude novo polje istraživanja i polazna tačka razvoja ciljane terapije kod melanoma (256).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti učestalost genotipova polimorfizama gena *PTCH1* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) u grupi od 93 bolesnika sa melanomom i kontrolnoj grupi od 97 zdravih osoba, odgovarajuće polne i starosne distribucije;
2. Odrediti povezanost ispitivanih polimorfizama sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma, poređenjem učestalosti genotipova između grupe bolesnika sa melanomom i kontrolne grupe zdravih ispitanika;
3. Odrediti povezanost ispitivanih polimorfizama sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od melanoma;
4. Odrediti povezanost ispitivanih polimorfizama sa prognozom bolesti kod obolelih od melanoma, ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez recidiva bolesti.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Dizajn studije

Istraživanje je sprovedeno po tipu retrospektivne kohortne studije sa periodom praćenja preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja od minimum 3 godine. Studija je urađena u okviru projekta MFVMA 03/23-25 (Odobrenje #6/4/2023 Etičkog Odbora Medicinskog fakulteta VMA, Univerziteta odbrane u Beogradu) u saradnji sa Institutom za Humanu genetiku MFUB (Etičko Odobrenje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 17/XII-3 od 14.12.2023.). Sve procedure sprovedene u studijama koje su uključivale humane subjekte bile su u skladu sa etičkim standardima institucionalnog i/ili nacionalnog istraživačkog komiteta i sa Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine i njenim kasnijim izmenama ili uporedivim etičkim standardima. Informisani pristanak je dobijen od svih pojedinačnih učesnika uključenih u studiju.

3.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 93 bolesnika sa kožnim melanomom i 97 zdravih ispitanika, oba pola, starijih od 18 godina, a mlađih od 80 godina. Obe grupe su sačinjene od pojedinaca iz populacije Srbije, iste etničke pripadnosti, odgovarajuće starosne i polne distribucije. Svi bolesnici su dijagnostikovani, lečeni i praćeni u Ambulanti za melanom, Klinici za kožne i polne bolesti i Klinici za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Uzorci periferne krvi bolesnika su prikupljeni u periodu od 2013-2014. godine, a genetičke analize su urađene na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Genetičke analize za zdrave osobe iz kontrolne grupe urađene su na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu. Karakteristike studijske grupe obolelih prikazane su prikazane u Tabeli 12.

Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz studije bili su:

1. dijagnoza mukoznog melanoma;
2. dijagnoza uvealnog melanoma;
3. nepoznata lokalizacija primarnog melanoma;
4. istorija drugih karcinoma, izuzev lokalizovanog bazocelularnog i planocelularnog karcinoma kože i *in situ* cervikalnog karcinoma;
5. bilo kakvo sistemsko i maligno oboljenje za grupu zdravih ispitanika.

3.3. Metode

3.3.1. Kliničko-patološki podaci iz grupe obolelih

U grupi bolesnika je dijagnoza melanoma kliničkim i dermoskopskim pregledom konstatovana, a zatim biopsijom i patohistološkom analizom potvrđena. Nakon uklanjanja primarnog melanoma, pacijenti su podvrgnuti biopsiji limfnog čvora sentinela (za pacijente sa debljinom tumora većom od 0,8 mm i prisustvom ulceracije) ili disekciji regionalnih limfnih nodusa, u zavisnosti od toga da li je ultrazvučnim nalazom detektovana regionalna

limfadenopatija. U cilju kompletne dijagnostike pacijentima je urađena radiološka evaluacija bolesti- ultrazvučni pregled regionalnih limfnih basena, abdomena i male karlice, ili kompjuterizovana tomografija grudnog koša, abdomena i karlice u zavisnosti od stadijuma bolesti.

Na osnovu dobijenih pathohistoloških nalaza primarnog melanoma i statusa limfnih čvorova dobijenih SLNB ili disekcijom regionalnog limfnog basena, bolesnicima je određen klinički i patološki stadijum bolesti (I-III stadijuma) prema savremeno prihvaćenom TNM sistemu klasifikacije Američkog združenog komiteta za rak (engl. *The American Joint Committee on Cancer, AJCC*) iz 2017. godine. Smernice AJCC za TNM kategorije uključuju procenu debljine tumora po Breslou, prisustvo ulceracije i status limfnih čvorova koji su utvrđeni patohistološkom analizom. Sem ovih parametara neophodnih za stadiranje, određeni su i drugi prognostički važni patohistološki parametri koji su praćeni- mitotički indeks i procena TIL.

Kod bolesnika je praćeno preživljavanje do pojave recidiva bolesti (engl. *Relapse-free survival, RFS*) i ukupno preživljavanje (engl. *Overall survival, OS*).

3.3.2. Genetički podaci iz grupe obolelih i kontrolne grupe

Genetičkom analizom isipitani su polimorfizmi tri ključna gena *Hedgehog* signalnog puta u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi osoba bez sistemskih i malignih oboljenja: *PTCH1*, *SMO* i *GLII*. U genu *PTCH1*, lociranom na dugom kraku hromozoma 9 (9q22.32), ispitan je nesinonimni polimorfizam sa *misens* efektom rs357564 (G>A, p. P1315L). U genu *SMO*, koji se nalazi na dugom kraku hromozoma 7 (7q32.1), analiziran je sinonimni polimorfizam rs2228617 (C>G, tiha mutacija). Naposljetku, u genu *GLII*, smeštenom na dugom kraku hromozoma u regionu 12q13.3, testirana su dva polimorfizma- rs2228224 (A>G, p. D933G) i rs2228226 (G>C, p. Q1100E), pri čemu su oba kodirajuća i dovode do zamene aminokiselina u GLII proteinu.

3.4. Genetičke analize

3.4.1. Izolacija DNK

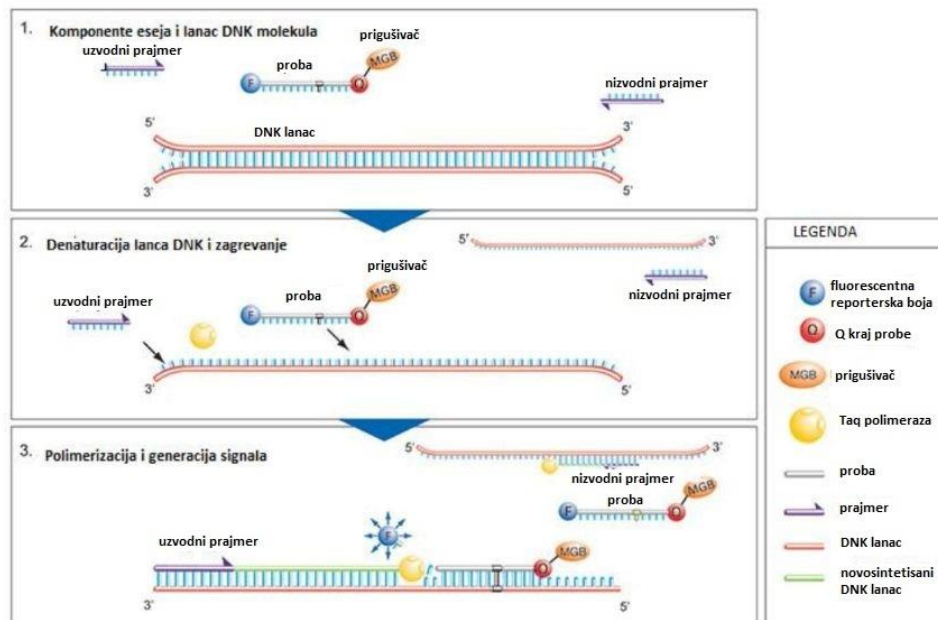
Za analizu polimorfizama u grupi ispitanika genomska DNK je izolovana iz uzoraka periferne krvi sa dodatim antikoagulantom i čuvana na -40°C do dalje upotrebe. Za izolaciju DNK je korišćen komercijalni kit sa kolonama za izolaciju genomske DNK iz krvi, QIAGEN Blood Prep. Kvalitet izolovane DNK je proveren elektroforezom na 2% agaroznom gelu korišćenjem Etidijum Bromida i ECX-F20.M Vilber Lourmat transiluminatora. Koncentracija i čistoća izolovane DNK merene su spektrofotometrijskom metodom na BioTek Epoch 2/Take3 spektrofotometru. Za kontrolnu grupu je korišćena prethodno izolovana DNK metodom isoljavanja i čuvana na 4 °C u Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4.2. Analiza genetičkih polimorfizama

Varijante u genima *PTCH*, *SMO* i *GLII* su odabrane na osnovu baza podataka za polimorfizme nukleotidne sekvence (SNP) sa učestalošću alela iznad 1%, sa potencijalno funkcionalnim efektima na ekspresiju gena i/ili proteina, kao i na osnovu prethodno sprovedenih studija povezanosti u drugim populacijama. Odabrane varijante gena unutar

PTCH1 (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) su genotipizirane korišćenjem komercijalnog eseja, TaqMan® SNP (Applied Biosystems, USA). Prisustvo određene genetičke varijante, odnosno određenog alela polimorfizma, detektovano je metodom alelske diskriminacije pomoću Real-Time PCR 7500 (Applied Biosystems, USA) pod sledećim uslovima: 95°C tokom 10 minuta, 40 ciklusa od 95°C tokom 15 s i 60°C tokom 60 s. Dobijeni rezultati alelne diskriminacije analizirani su SDS softverom (v.2.3).

Komercijalno dostupni esej sa TaqMan® tehnologijom sadrži dve TaqMan probe i dva prajmera, uzvodni (engl. *Forward*) i nizvodni (engl. *Reverse*). TaqMan probe su jednolančane oligonukleotidne sekvence, komplementarne ciljnoj sekvenci koja obuhvata polimorfizam koji se ispituje a koje su na 5' kraju obeležene reporterskom fluorescentnom bojom R (FAM ili VIC). Intaktna proba ne fluorescira jer se na njenom 3' kraju nalazi prigušivač (engl. *Quencher, Q*), koji inhibira fluorescenciju. Ta inhibicija se postiže fluorescentnom rezonancijom (FRET, engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), tj. transferom energije fluorescencije sa fluorescentne boje na prigušivač koji je na maloj udaljenosti. Kada otpočne reakcija lančane polimerizacije, po hibridizaciji prajmera i probe sa ciljnom sekvencom, reporterska boja se izmešta i oslobađa usled egzozonukleaznog dejstva termostabilne Taq polimeraze (Slika 7). Time se fluorescentna boja udaljava od prigušivača i dolazi do pojave fluorescencije koja se može pratiti u realnom vremenu. U okviru optičkog dela Real Time PCR uređaja, osim lasera koji emituje svetlost određene talasne dužine za pobuđivanje reporterske boje, nalazi se i detektor koji beleži fluorescenciju talasne dužine koja odgovara reporterskim bojama VIC ili FAM preko različitih kanala za detekciju. Intenzitet fluorescence odgovara količini DNK prisutne u reakciji nakon amplifikacije. Ukoliko se radi o jednom od dva homozigotna genotipa (dominantan AA ili recesivan aa), detektuje se fluorescentni signal samo jedne reporterske boje specifičan za prisutni alel. U slučaju heterozigotnog genotipa (Aa), detektuju su fluorescentni signali i krive obe reporterske boje, koje detektuju oba prisutna alela.



Slika 7. Alelska diskriminacija polimorfizama nukleotidne sekvence TaqMan tehnologijom. Preuzeto i prilagođeno iz brošure „TaqMan Assays for genetic variation research”, Thermo Fisher Scientific.

Fluorescentne krive su detektovane i analizirane uz pomoć Real Time PCR SDS softvera, v. 3.2 (Applied Biosystems, SAD). Osim uzoraka, u analizu su uključene i negativne kontrole, koje sadrže sve komponente smeše korišćene u reakciji genotipizacije, osim genomske DNK, a koje služe kako bi se isključila potencijalna kontaminacija korišćenih hemikalija.

3.5. Statistička analiza

Proračun potrebne veličine studijske grupe i snage studije je učinjen korišćenjem posebne metodologije za genetičke analize (Sham PC, Purcell SM. Statistical power and significance testing in large-scale genetic studies. *Nat Rev Genet.* 2014;15(5):335-46.). Uz verovatnoću α greške od 0,05, snagu studije 0,80, i dihotomno obeležje posmatranja (χ^2 test) dobijen je minimalni broj ispitanika od 80 (snaga studije 0,80). Zbog istovremene analize više polimorfizama i retkih promena, korišćen je strožiji kriterijum i uključen značajno veći broj ispitanika, 93 u grupi obolelih od melanoma i 97 u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika.

Deskripcija podataka prikazana je kao n (%), aritmetička sredina \pm standardna devijacija ili medijana vrednosti. Učestalosti varijantnih alela u genima HH puta *PTCH1*, *SMO*, *GLII* upoređeni su između grupe pacijenata sa melanomom i kontrolne grupe korišćenjem χ^2 -testa ili Fišerovog egzaktnog testa. Za modelovanje odnosa ishoda i potencijalnih prediktora korišćeni su regresioni modeli. Za analizu preživljavanja obolelih od melanoma primenjena je Kaplan-Meierova metoda, za procenu funkcije preživljavanja ovih pacijenata u zavisnosti od ispitivanih polimorfizama log rank test, a za pronalaženje nezavisnog prediktora smrtnog ishoda univarijantni Coxov regresioni model sa 95% intervalom poverenja. Podaci su cenzorisani ako je ispitanik preživeo celokupan period praćenja ili je izgubljen iz evidencije. Varijable koje su u univarijantnim analizama bile značajne na nivou značajnosti 0,1, naknadno su analizirane u multivarijantnim regresionim modelima. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05. Analiza podataka je obavljena korišćenjem softvera SPSS, verzija 20.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. REZULTATI

4.1. Demografske i kliničko-patološke karakteristike u grupi obolelih od melanoma

Studijsku grupu obolelih od melanoma sačinjavalo je 93 pacijenta, starijih od 18, a mlađih od 80 godina, pri čemu je prosečna starost (medijana godina) bila 61 godina. Mlađih i starijih pacijenata u odnosu na srednju starost bilo je gotovo jednako (49,5% prema 50,5%). Lokalizacija primarnog melanoma bila je najčešća na trupu (40,9%) i donjim ekstremitetima (31,2%). Na glavi i vratu i gornjim ekstremitetima bilo je približno jednako primarnih melanoma (12,9% i 11,8%, respektivno), dok je najmanje dijagnostikovano akralnih melanoma (3,2%). Pacijentima koji su učestvovali u studiji inicijalno je određen klinički stadijum bolesti IB-IIIC, pri čemu je bilo najviše inicijalno dijagnostikovanih pacijenata u stadijumu bolesti IB (35,5%) i IIC (17,2%), dok je u stadijumu IIIA bilo najmanje dijagnostikovanih pacijenata (6,5%). U ostalim kliničkim stadijuma bilo je približno jednako pacijenata (u opsegu 8,6%-11,8%). U skladu sa TNM sistemom za klasifikaciju, pacijenti su prema debljini tumora svrstani u dve grupe- T1/2 i T3/4, u kojoj bilo približno jednako pacijenata (48,4% i 51,6%, respektivno). U grupi bolesnika sa melanomom kojima su detektovane metastaze u regionalnim limfnim čvorovima bilo je manje pacijenata (26,9%), u odnosu na one kod kojih metastaze nisu pronađene (73,1%). Kroz period praćenja od najmanje 3 godine, zabeležena je progresija kod 15% pacijenata. Demografske i kliničko-patološke karakteristike u studijkoj grupi obolelih od melanoma (uključujući starost, godine, lokalizaciju tumora, kliničke stadijume, T i N kategorije, patohistološke parametre tumora prilikom dijagnoze melanoma, kao i zabeleženu progresiju bolesti) prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Demografske i kliničko-patološke karakteristike studijske grupe obolelih od melanoma

Kliničko-patološke karakteristike		Broj pacijenata (%)
Starost (medijana godina)	<61	46 (49,5)
	≥61	47 (50,5)
Godine	Muškarci	50 (53,8)
	Žene	43 (46,2)
Lokalizacija	Glava i vrat	12 (12,9)
	Gornji ekstremiteti	11 (11,8)
	Trup	38 (40,9)
	Donji ekstremiteti	29 (31,2)
	Akralni	3 (3,2)
Klinički stadijum	IB	33 (35,5)
	IIA	8 (8,6)
	IIB	11 (11,8)
	IIC	16 (17,2)
	IIIA	6 (6,5)
	IIIB	11 (11,8)
	IIIC	8 (8,6)
Debljina tumora po Breslou	≥ 4	30 (32,3)
	< 4	63 (67,7)
Ulceracija	0	36 (38,7)
	1	57 (61,3)
Mitoze	-	52 (55,9)
	+	41 (44,1)
TIL	odsutna	11 (11,8)
	non-brisk	56 (60,2)
	brisk	26 (28)
Stadijum	I/II	68 (73,1)
	III	25 (26,9)
Veličina tumora	T1/2	45 (48,4%)
	T3/4	48 (51,6)
Status limfnih čvorova	N -	68 (73,1)
	N +	25 (26,9)
Progresija	-	79 (85)
	+	14 (15)

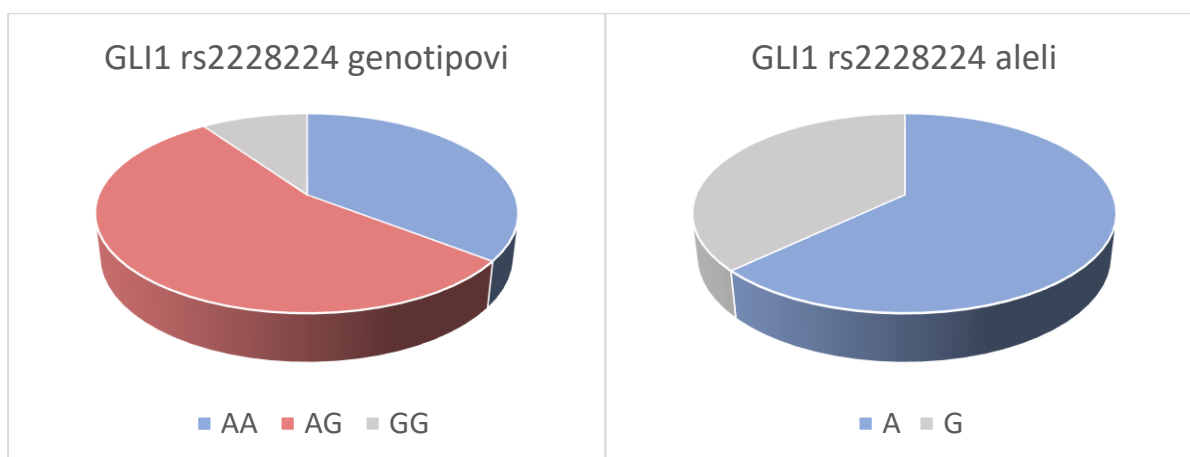
TIL – tumor infiltrišući limfociti (engl. *Tumor Infiltrating Lymphocyte*)

4.2. Učestalost genotipova polimorfizama *PTCH1* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi zdravih osoba

Kod 93 bolesnika sa melanomom i 97 zdravih ispitanika iz kontrolne grupe određena je distribucija genotipova za polimorfizme *PTCH1* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226). Rezultati su prikazani grafički na slikama 8-15.

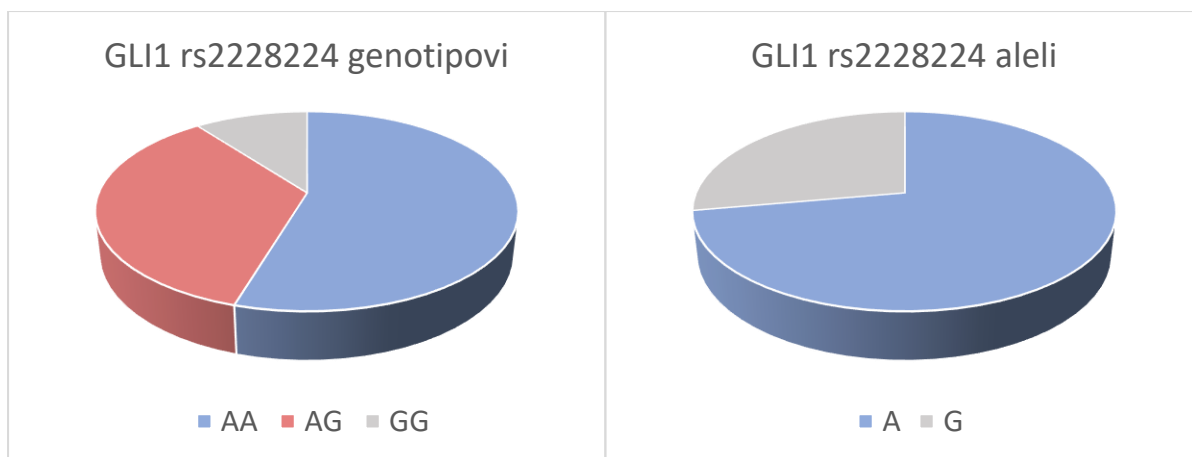
4.2.1. Učestalost genotipova i alela *GLII* rs2228224 polimorfizma u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi

Ispitivanjem polimorfizma rs2228224 u *GLII* genu kod pacijenata sa melanomom, pronašli smo da je najveća zastupljenost heterozigotnog genotipa AG (55%), dok su homozigotni genotipovi (GG i AA) manje zastupljeni (35%, 10%, redom). U ovoj grupi A alel je bio zastupljeniji od G alela (63% naspram 37%), Slika 8.



Slika 8. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *GLII* rs2228224 polimorfizma kod pacijenata sa melanomom.

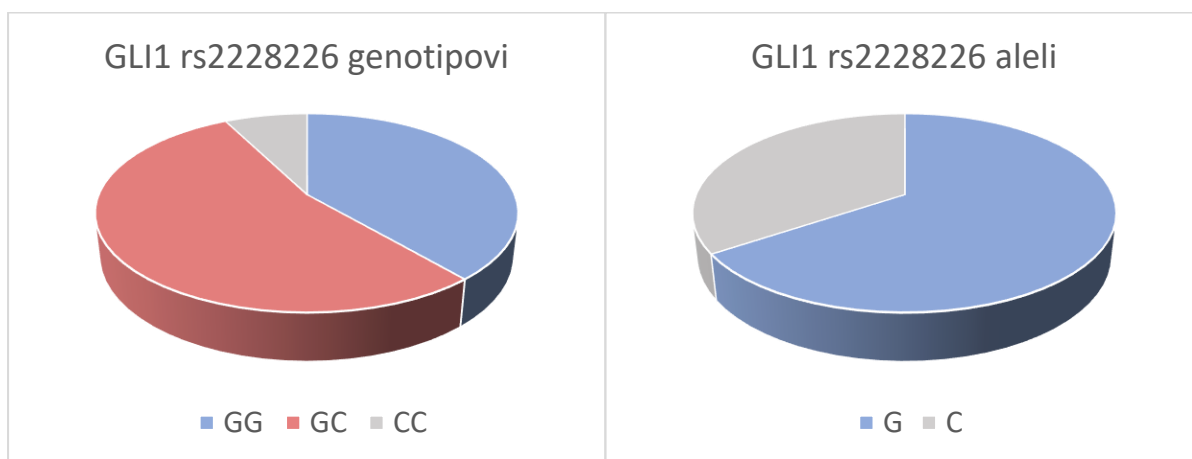
Analizom istog polimorfizma u kontrolnoj grupi zdravih osoba pronađena je sledeća distribucija genotipova: AA-55%, AG- 35%, GG-10%. Za razliku od grupe bolesnika sa melanomom, kod zdravih pojedinaca načešći je bio homozigotni AA genotip. Međutim, A alel i u ovoj grupi je bio zastupljeniji od G alela (72% naspram 28%), Slika 9.



Slika 9. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *GLII* rs2228224 polimorfizma u kontrolnoj grupi.

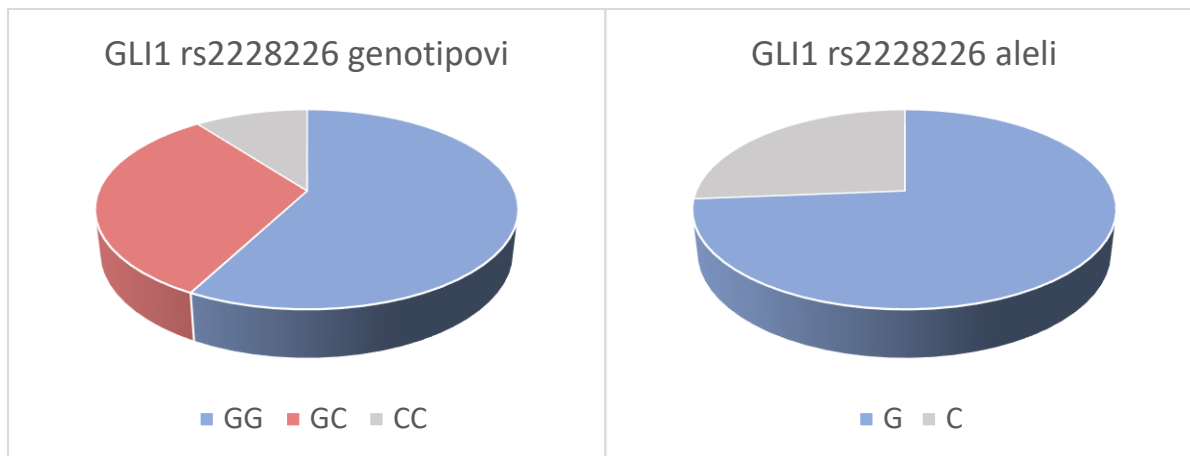
4.2.2. Učestalost genotipova i alela *GLII* rs2228226 polimorfizma u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi

Analizom rs2228226 polimorfizma u *GLII* genu u grupi obolelih od melanoma, ustanovljena je najveća zastupljenost heterozigotnog genotipa GC (54%). Homozigotni genotipovi GG i CC bili su manje zastupljeni (39%, 7%, redom). G alel imao je veću zastupljenost u grupi obolelih nego C alel (66% prema 34%), Slika 10.



Slika 10. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *GLII* rs2228226 polimorfizma kod pacijenata sa melanomom.

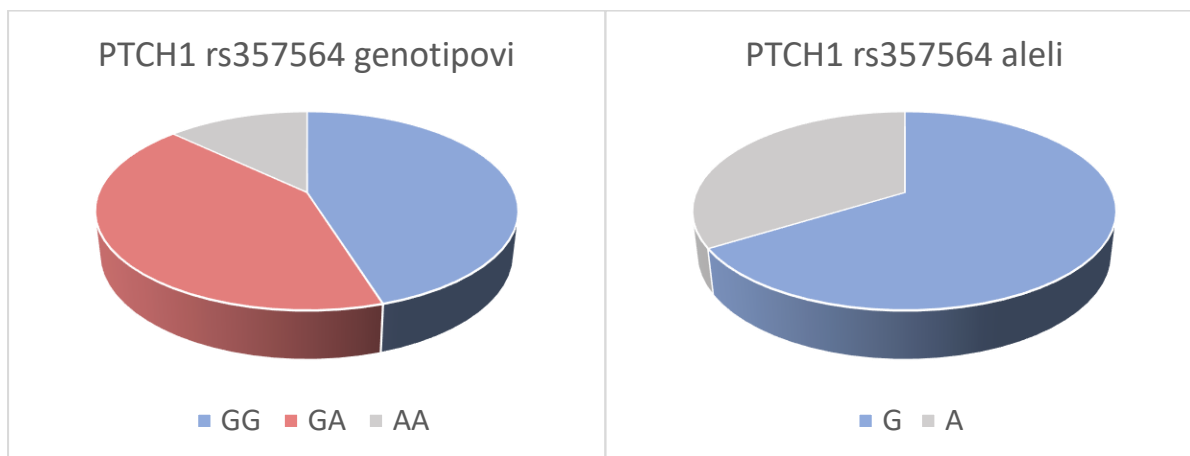
Kada je isti polimorfizam ispitivan u kontrolnoj grupi, za razliku od grupe obolelih nađena je najveća zastupljenost homozigotnog GG genotipa (58%). Rezultati za distribucije za druga dva genotipa bili su: GC- 32% i CC-10%. I u kontrolnoj grupi zdravih G alel polimorfizma rs2228226 bio je zastupljeniji od C alela (74% prema 26%), Slika 11.



Slika 11. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *GLI1* rs2228226 polimorfizma u kontrolnoj grupi.

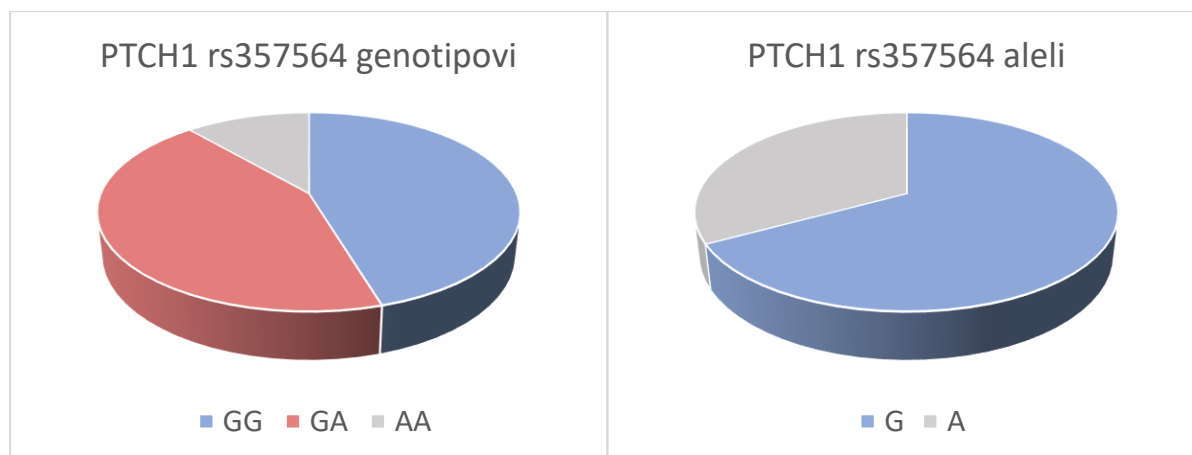
4.2.3. Učestalost genotipova i alela *PTCH1* rs357564 polimorfizma u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi

Ispitivanjem distribucije rs357564 polimorfizma u *PTCH1* genu kod pacijenta sa melanomom, dobijena je približno slična učestalost homozigotnih GG i AA genotipova (45% i 42%), dok je heterozigotni GA genotip bio najređe prisutan (13%). G alel bio je zastupljeniji od A alela (66% prema 34%), Slika 12.



Slika 12. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *PTCH1* rs357564 polimorfizma kod pacijenata sa melanomom.

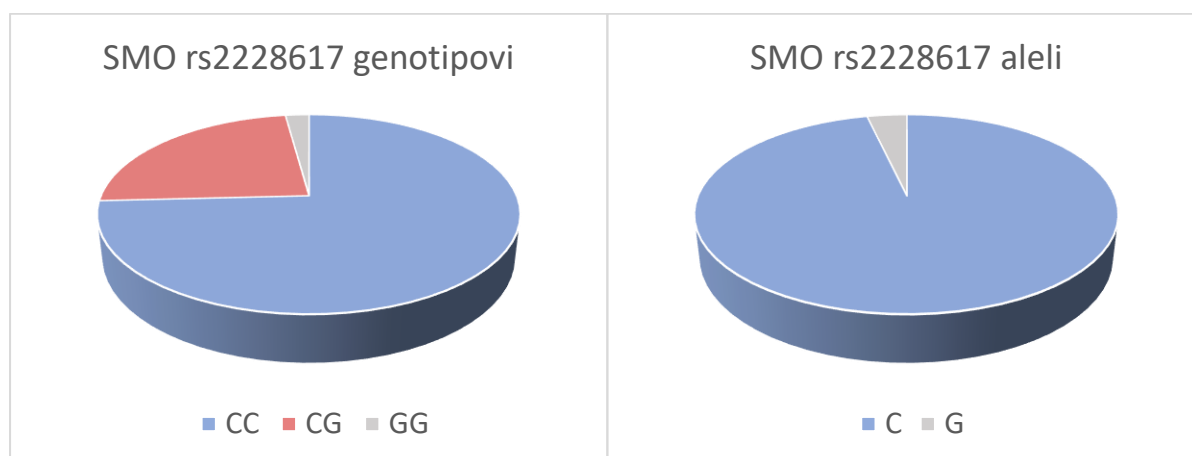
Analizom distribucije istog polimorfizma u kontrolnoj grupi, nađene su gotovo iste učestalosti genotipova i alela kao u grupi bolesnika sa melanomom: GG- 46%, GA- 43%, AA-11%, G alel- 67%, i A alel- 33%, Slika 13.



Slika 13. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *PTCH1* rs357564 polimorfizma u kontrolnoj grupi.

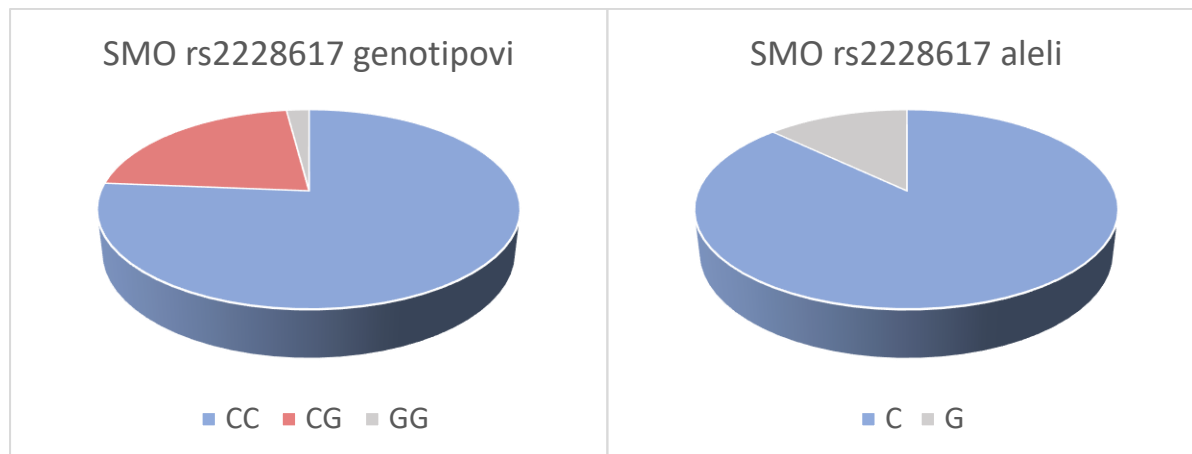
4.2.4. Učestalost genotipova i alela *SMO* rs2228617 polimorfizma u grupi obolelih od melanoma i kontrolnoj grupi

Ispitivanjem polimorfizma *SMO* rs2228617 u grupi obolelih od melanoma, otkriveno je da je homozigotni CC genotip bio najučestaliji (74%). Genotipovi CG i GG bili su manje prisutni (24%, 2%, redom). C alel je bio mnogo zastupljeniji od G alela u ovoj grupi ispitanika (96%, 4%, respektivno), Slika 14.



Slika 14. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *SMO* rs2228224 rs2228617 kod pacijenata sa melanomom.

U kontrolnoj grupi zdravih ispitanika zastupljenost genotipova za ovaj polimorfizam bila je gotovo ista kao u grupi obolelih od melanoma (CC- 76%, CG- 22%, GG-2%), dok je učestalost alela bila veoma slična (C alel- 87% i G alel- 13%), Slika 15.



Slika 15. Distribucija genotipova (levo) i alela (desno) *SMO* rs2228224 rs2228617 u kontrolnoj grupi.

4.3. Povezanost polimorfizama *PTCH1*, *GLII* i *SMO* gena sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma

Poređenjem učestalosti genotipova polimorfizama *PTCH1* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) između grupe bolesnika sa melanomom i kontrolne grupe zdravih ispitanika, određena je povezanost ispitivanih polimorfizama sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma. Analizom odnosa šansi (engl. *Odds ratio*, OR), prilagođenom za pol i starost, dobijeni su rezultati koji ukazuju da su *GLII* polimorfizmi rs2228224 i rs2228226 povezani sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma.

Pokazano je da nosioci mutiranog G alela polimorfizma *GLII* rs2228224 (kombinovani GA+GG genotipovi) imaju značajno veći rizik od pojave melanoma u poređenju sa izvornim (engl. *wild type*) AA genotipom, OR=2,261 (95% CI: 1,251-4,087), p=0,007, Tabela 13.

Tabela 13. Povezanost genotipova rs2228224 polimorfizama *GLII* sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma

<i>Gen/SNP</i>	Genotip	Slučajevi		Kontrole		Prilagođeni OR# [95% CI]	<i>p</i> *
		N=93	%	N=97	%		
<i>GLII</i> <i>rs2228224</i>	AA	33	35	53	55	1,000	<i>Referentno</i>
	AG	51	55	34	35	2,458 [1,322-4,569]	0,004
	GG	9	10	10	10	1,543 [0,559-4,259]	0,403
	AG+GG ^a	60	65	44	45	2,261 [1,251-4,087]	0,007

^a Dominantni model - Kombinovani heterozigotni i mutirani genotipovi naspram genotipa izvornog tipa (engl. *wild type*)

OR označava odnos šansi (engl. *odds ratio*)

CI označava interval poverenja (engl. *confidence interval*)

Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane.

Povećan rizik za nastanak melanoma je takođe primećen i za polimorfizam *GLII* rs2228226 kod nosilaca mutiranog C alela (kombinovani CG+CC genotipovi), u poređenju sa izvornim GG genotipom, OR= 2,176 (95% CI: 1,207-3,921), $p=0,010$, Tabela 14.

Tabela 14. Povezanost genotipova rs2228226 polimorfizama *GLII* sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma

<i>Gen/SNP</i>	Genotip	Slučajevi		Kontrole		Prilagođeni OR# [95% CI]	<i>p</i> *
		N=93	%	N=97	%		
<i>GLII</i> <i>rs2228226</i>	GG	36	39	56	58	1,000	<i>Referentno</i>
	GC	50	54	31	32	2,505 [1,346-4,663]	0,004
	CC	7	7	10	10	1,126 [0,389-3,259]	0,827
	GC+CC ^a	57	61	41	42	2,176 [1,207-3,921]	0,010

^a Dominantni model - Kombinovani heterozigotni i mutirani genotipovi naspram genotipa izvornog tipa (engl. *wild type*)

OR označava odnos šansi (engl. *odds ratio*); CI označava interval poverenja (engl. *confidence interval*);

Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane.

U analizi predispozicije za melanom za druge ispitivane polimorfizame *SMO* (rs2228617) i *PTCH1* (rs357564), poređenjem učestalosti genotipova ovih polimorfizama između grupe bolesnika sa melanomom i kontrolne grupe zdravih ispitanika nije uočena statistički značajna povezanost, Tabele 15 i 16.

Tabela 15. Povezanost genotipova rs357564 polimorfizama *PTCH1* sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma

<i>Gen/SNP</i>	Genotip	Slučajevi		Kontrole		Prilagođeni OR# [95% CI]	<i>p</i> *
		N=93	%	N=97	%		
<i>PTCH1</i> <i>rs357564</i>	GG	42	45	44	45	1,000	<i>Referentno</i>
	GA	39	42	42	43	0,955 [0,518-1,761]	0,883
	AA	12	13	11	11	1,188 [0,470-3,006]	0,716
	GA+AA ^a	51	55	53	55	1,003 [0,564-1,782]	0,992

^a Dominantni model - Kombinovani heterozigotni i mutirani genotipovi naspram genotipa izvornog tipa (engl. *wild type*)

OR označava odnos šansi (engl. *odds ratio*); CI označava interval poverenja (engl. *confidence interval*);

Tabela 16. Povezanost genotipova rs2228617 polimorfizama *SMO* sa predispozicijom za oboljevanje od melanoma

<i>Gen/SNP</i>	Genotip	Slučajevi		Kontrole		Prilagođeni OR# [95% CI]	<i>p</i> *
		N=93	%	N=97	%		
<i>SMO</i> <i>rs2228617</i>	CC	69	74	74	76	1,000	<i>Referentno</i>
	CG	22	24	21	2	1,105 [0,554-2,203]	0,777
	GG	2	2	2	2	0,968 [0,130-7,200]	0,974
	CG+GG ^a	24	26	23	24	1,093 [0,560-2,134]	0,794

^a Dominantni model - Kombinovani heterozigotni i mutirani genotipovi naspram genotipa izvornog tipa (engl. *wild type*)

OR označava odnos šansi (engl. *odds ratio*); CI označava interval poverenja (engl. *confidence interval*)

Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane.

4.4. Povezanost polimorfizama *GLII*, *SMO* i *PTCHI* gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od melanoma

Analizirali smo odnos između polimorfizama *GLII* (rs2228224, rs2228226), *SMO* (rs2228617) i *PTCHI* (rs357564) sa demografskim karakteristikama (starost i pol pacijenata) u grupi obolelih od melanoma. Značajno veća prevalencija varijante A alela polimorfizma *GLII* rs2228224 primećena je kod muških ispitanika u kohorti bolesnika sa melanomom ($p=0,025$). Međutim, nismo uočili statistički značajnu povezanost između drugih analiziranih polimorfizama i demografskih karakteristika pacijenata, Tabela 17.

Tabela 17. Povezanost polimorfizama gena *SHH* puta sa demografskim karakteristikama pacijenata sa melanomom

Varijable		<i>GLII</i> rs2228224			<i>GLII</i> rs2228226			<i>SMO</i> rs2228617			<i>PTCH-1</i> rs357564		
		GG	GA	AA	GG	GC	CC	CC	CG	GG	GG	GA	AA
Starost (medijana godina)	<61	15	27	4	15	28	3	33	12	1	23	18	5
	≥61	18	24	5	21	22	4	36	10	1	19	21	7
	<i>p</i> *	0,760			0,396			0,860			0,627		
Pol	Muškarci	13	29	8	19	26	5	39	10	1	26	17	7
	Žene	20	22	1	17	24	2	30	12	1	16	22	5
	<i>p</i> *	0,025			0,620			0,659			0,241		

* Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane; NS - neznačajno (engl. *non significant*) wt/het/mut - divlji tip/heterozigotni/mutirani genotip

Analizom odnosa između polimorfizama *GLII* (rs2228224, rs2228226), *SMO* (rs2228617) i *PTCHI* (rs357564) sa kliničko-patološkim karakteristikama (klinički stadijumi bolesti, veličina tumora, status limfnih čvorova, progresija bolesti i patohistološke karakteristike-debljina tumora po Breslou, ulceracija, broj mitoza i TIL) u grupi obolelih od melanoma, nismo uočili statistički značajnu povezanost, Tabela 18. Osim kliničko-patoloških karakteristika prikazanih tabeli 18, nije uočena statistički značajna povezanost navedenih polimorfizama ni sa lokalizacijom primarnog tumora u grupi obolelih od melanoma.

Tabela 18. Povezanost polimorfizama gena SHH puta sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa melanomom

Varijable		GLII rs2228224			GLII rs2228226			SMO rs2228617			PTCH-1 rs357564		
		GG	GA	AA	GG	GC	CC	CC	CG	GG	GG	GA	AA
debljina po Breslou	≥ 4	9	17	4	14	14	2	23	6	1	13	11	6
	< 4	24	34	5	22	36	5	46	16	1	29	28	6
	<i>p</i> *	0,602			0,554			0,750			0,358		
Ulceracija	0	16	17	3	14	20	2	24	11	1	17	14	5
	1	17	34	6	22	30	5	45	11	1	25	25	7
	<i>p</i> *	0,357			0,844			0,419			0,892		
Mitoza	-	20	26	6	20	27	5	36	15	1	23	21	8
	+	13	25	3	16	23	2	33	7	1	19	18	4
	<i>p</i> *	0,543			0,684			0,414			0,721		
TIL	odustna	3	8	0	4	7	0	9	2	0	4	7	0
	non-brisk	21	29	6	25	26	5	39	16	1	28	19	9
	brisk	9	14	3	7	17	2	21	4	1	10	13	3
	<i>p</i> *	0,692			0,427			0,649			0,275		
Stadijum	I/II	26	36	6	28	35	5	50	17	1	29	31	8
	III	7	15	3	8	15	2	19	5	1	13	8	4
	<i>p</i> *	0,639			0,721			0,687			0,493		
Veličina tumora	T1/2	20	23	2	19	23	3	34	11	0	20	22	3
	T3/4	13	28	7	17	27	4	35	11	2	22	17	9
	<i>p</i> *	0,097			0,788			0,383			0,162		
Status limfnih čvorova	N -	26	36	6	28	35	5	50	17	1	29	31	8
	N +	7	15	3	8	15	2	19	5	1	13	8	4
	<i>p</i> *	0,639			0,721			0,689			0,493		
Progresija	-	28	44	7	31	43	5	60	18	1	36	33	10
	+	5	7	2	5	7	2	9	4	1	6	6	2
	<i>p</i> *	0,806			0,582			0,317			0,977		

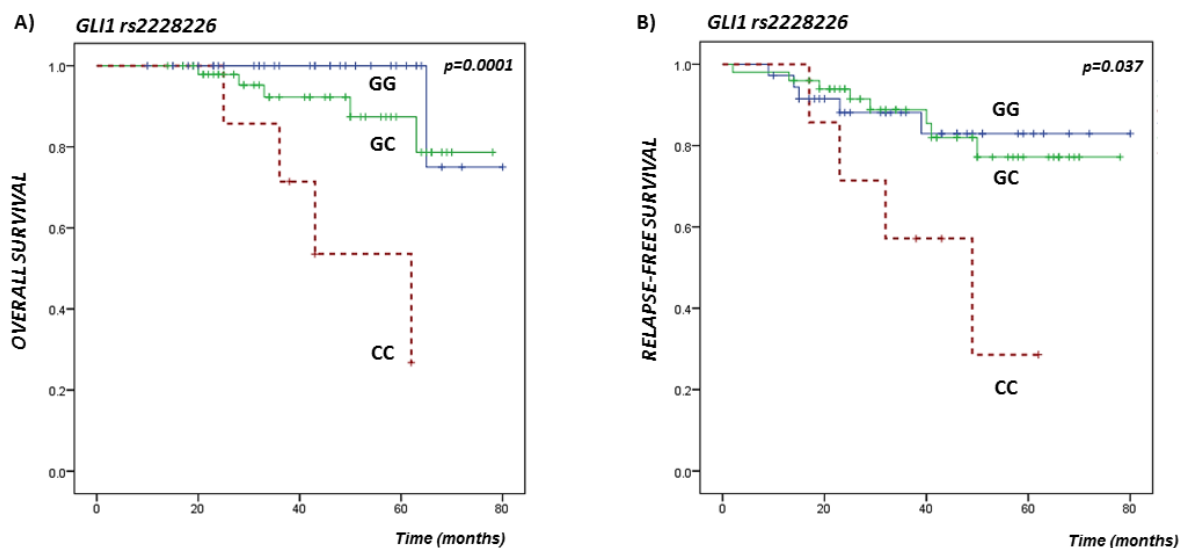
TIL – tumor infiltrišući limfociti (engl. *Tumor Infiltrating Lymphocyte*)

* NS - neznačajno (engl. *non significant*) wt/het/mut - divlji tip/heterozigotni/mutirani genotip

4.5. Procena ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez recidiva bolesti kod pacijenata sa polimorfizmima *GLI1*, *SMO* i *PTCH1* gena

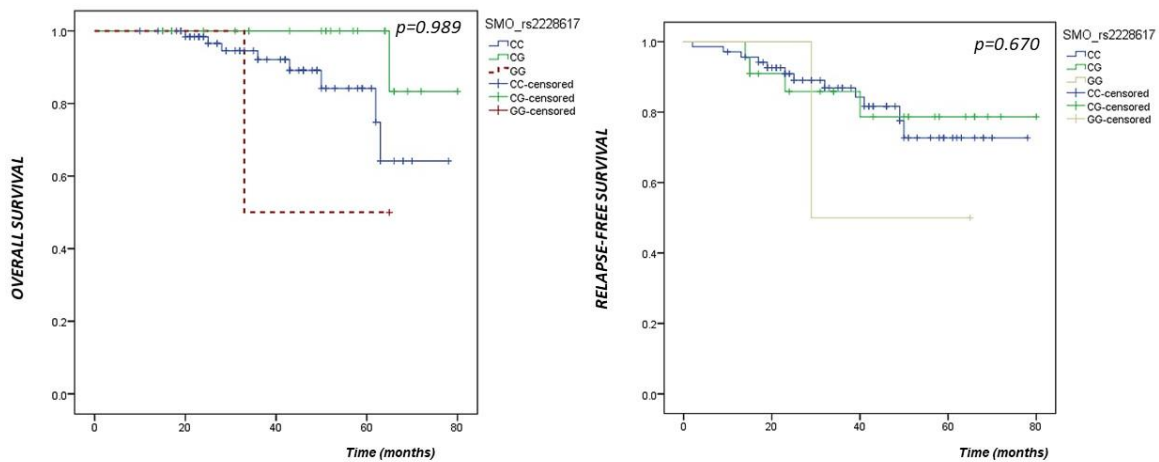
Analizirali smo odnos polimorfizama *GLI1* (rs2228224, rs2228226), *SMO* (rs2228617) i *PTCH1* (rs357564) sa prognozom bolesti kod obolelih od melanoma. Krive ukupnog preživljavanja (engl. *Overall survival*, OS) i preživljavanja bez recidiva bolesti (engl. *Relapse-free survival*, RFS) su procenjene korišćenjem Kaplan-Meier analize, upoređene sa log-rank testom.

Varijantni mutirani genotip CC polimorfizma *GLI1* rs2228226 je pokazao lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti u poređenju sa izvornim (wt) genotipom. ($p=0.0001$ i $p=0.037$, redom), Slika 16.

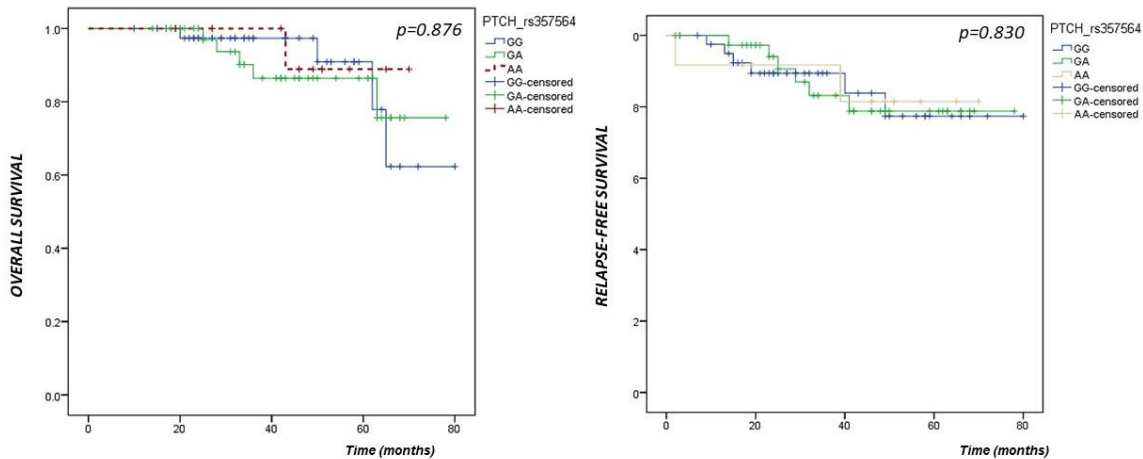


Slika 16. Analiza A. Ukupnog preživljavanja (engl. *overall survival*, OS) i B. Preživljavanje bez recidiva bolesti (eng. *relapse-free survival*, RFS) za polimorfizme gena *GLI1* rs2228226 (Kaplan-Meierove krive, upoređene pomoću log-rank testa).

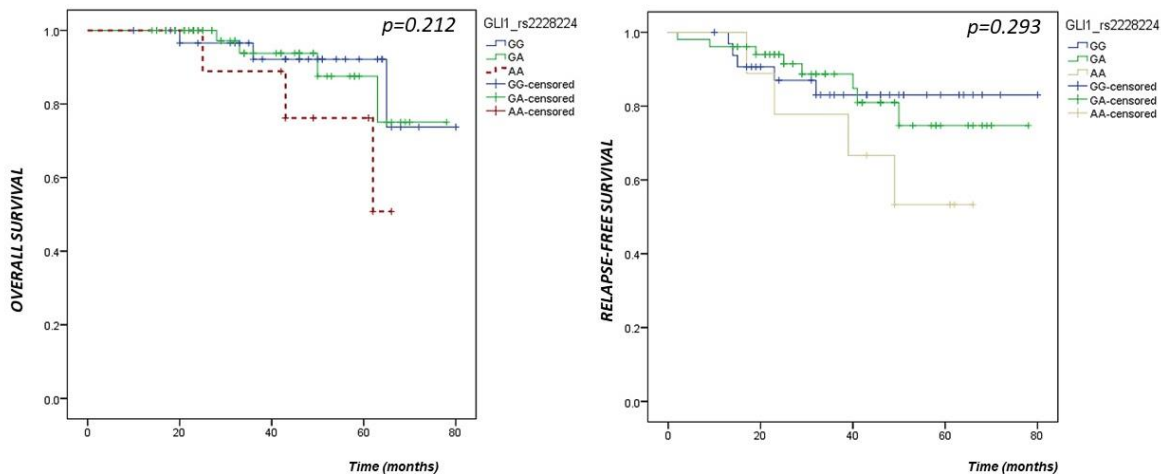
Kod drugih ispitivanih genetičkih polimorfizama, *GLI1* (rs2228224), *SMO* (rs2228617) i *PTCH1* (rs357564), u grupi obolelih od melanoma, nije uočena značajna statistička razlika u ukupnom preživljavanju i preživljavanju bez recidiva, Slika 17, 18, 19.



Slika 17. Analiza ukupnog preživljavanja (engl. *overall survival*, OS) i preživljavanje bez recidiva bolesti (engl. *relapse-free survival*, RFS) za polimorfizme gena *SMO* (rs2228617) (Kaplan-Meierove krive, upoređene pomoću log-rank testa)



Slika 18. Analiza ukupnog preživljavanja (engl. *overall survival*, OS) i preživljavanje bez recidiva bolesti (engl. *relapse-free survival*, RFS) za polimorfizme gena *PTCH1* (rs357564) (Kaplan-Meierove krive, upoređene pomoću log-rank testa)



Slika 19. Analiza ukupnog preživljavanja (engl. *overall survival*, OS) i preživljavanje bez recidiva bolesti (engl. *relapse-free survival*, RFS) za polimorfizme gena *GLI1* (rs2228224) (Kaplan-Meierove krive, upoređene pomoću log-rank testa)

Univarijatna analiza bazirana na Cox-ovoj regresionoj analizi je pokazala da su progresija bolesti (HR=13,420 [1,820-17,482], $p=0,0001$) i genski polimorfizam *GLI1* rs2228226 (HR=5,640 [1,820-17,482], $p=0,003$) visoko povezani sa rizikom od lošijeg ukupnog preživljavanja kod pacijenata sa melanomom, Tabela 18.

Promenljive koje su pokazale statističku značajnost u univarijatnoj analizi, uključujući one sa nivoom značajnosti ispod 20%, analizirane su zatim zajedno u multivarijatnoj Cox-ovoj analizi odnosa rizika (engl. *Cox Proportional Hazards Regression analysis*). Multivarijatna analiza je pokazala da progresija bolesti (HR=14,434 [3,296-63,216], $p=0,0001$) i genetički polimorfizam *GLI1* rs2228226 (HR=4,161 [1,510-11,468], $p=0,006$) ostaju nezavisni prognostički faktori kod pacijenata sa melanomom, Tabela 19.

Tabela 19. Univarijantna i Multivarijantna Cox proporcionalna regresiona analiza odnosa rizika za demografske i kliničko-patološke faktore kod pacijenata sa melanomom.

Cox Regresiona Analiza.	Kliničko-patološki faktori	HR [95% CI]	<i>p</i>
UNIVARIJANTNA ANALIZA	Pol	1,477 [0,411-5,304]	0,550
	Godine	1,759 [0,451-6,857]	0,416
	TIL	0,393 [0,161-0,955]	0,393
	debljina po Breslou	1,672 [0,482-5,802]	0,418
	Mitoze	0,970 [0,244-3,851]	0,966
	Ulceracije	4,050 [0,843-19,459]	0,081
	T	1,881 [0,867-4,089]	0,110
	N	2,690 [0,735-9,842]	0,135
	Stadijum	3,779 [1,070-13,348]	0,039
	Progresija	13,420 [3,436-52,410]	0,0001
	<i>GLII</i> rs2228226	5,640 [1,820-17,482]	0,003
	<i>GLII</i> rs2228224	1,847 [0,752-4,535]	0,181
	<i>SMO</i>	0,618 [0,172-2,228]	0,618
	<i>PTCHI</i>	0,919 [0,376-2,246]	0,852
MULTIVARIJANTNA ANALIZA	PROGRESIJA	14,434 [3,296-63,216]	0,0001
	<i>GLII</i> rs2228226	4,161 [1,510-11,468]	0,006

HR označava odnos rizika (engl. *hazard ratio*);
 CI označava interval poverenja (engl. *confidence interval*)
 Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane.

5. DISKUSIJA

Razvoj novih terapijskih modaliteta, poput ciljane terapije i imunoterapije, značajno je poboljšao šanse za preživljavanje pacijenata koji se suočavaju sa uznapredovalim melanomom. Međutim, uprkos ovim naprecima, u većini slučajeva dolazi do razvoja sekundarne rezistencije na terapiju, što predstavlja izazov u dugoročnom lečenju. Usled toga prognoza uznapredovalog, metastatskog melanoma i dalje ostaje pesimistična. Iako su poslednjih godina sprovedena brojna istraživanja sa ciljem boljeg razumevanja genetičke osnove melanoma, još nije potpuno razjašnjen kompleksan odnos između njegovog genetičkog profila, invazivnosti i napredovanja. Stoga je neophodno nastaviti istraživanja kako bi se identifikovali novi biomarkeri koji bi mogli ne samo da predvide rizik od nastanka melanoma, već i precizno odrede agresivnost tumora, prognozu bolesti i optimalnu terapijsku strategiju za svakog pojedinačnog pacijenta. Individualan pristup pacijentu, koji uzima u obzir genetičku konstituciju pacijenta kao i genetički profil samog tumora, ključan je za napredak u lečenju ove agresivne bolesti i poboljšanje kvaliteta života obolelih.

Svetska incidenca melanoma kontinuirano raste iz godine u godinu, što ističe potrebu identifikacije novih biomarkera predispozicije, pored biomarkera prognoze i potencijalnih meta individualne terapije. Varijante gena po tipu polimorfizma pojedinačnog nukleotida-SNP, predstavljaju odlične kandidate za ova istraživanja. Ovakvi polimorfizmi mogu nastati supstitucijom po tipu tranzicije ili transverzije, kao i delecijom ili insercijom nukleotida. Genom sadrži veliki broj ovakvih genetičkih varijanti, a preko njih možemo da utvrdimo sklonost ka određenoj bolesti, uključujući malignitet. Sve više istraživanja govori u prilog tome da je predispozicija za melanom povezana sa genetičkim polimorfizmima po tipu SNP. Kako postoji verovatnoća da su povezani i s prognozom bolesti, analizom adekvatnih SNP, mogli bi se identifikovati novi biomarkeri predispozicije i prognoze. Pronalazak biomarkera može da unapredi praćenje bolesti, razumevanje različitih odgovora na lekove i formiranje novih, individualnih terapijskih strategija. Analogno rezultatima naše studije gde su polimorfizmi *GLII* rs2228224 i *GLII* rs2228226 identifikovani kao potencijalni novi biomarkeri predispozicije za melanom, u nedavnom istraživanju pokazano je da bi mutirani SNP u genima *BRAF*, *FLG* i *SORLI* mogli biti potencijalni onkogeni biomarkeri, koji bi mogli da posluže za ranu dijagnostiku i u pravljenju personalizovanih strategija lečenja melanoma (257). Takođe, određene varijante gena za vitamin D receptor (*VDR*) mogle bi biti povezane sa predispozicijom za melanom. Sistemskom analizom rezultata 10 studija, sprovedenih od 2000 do 2014.godine, u kojima je testirano 6 genetičkih varijanti za *VDR*-*Bsm1*, *Cdx2*, *Fok1*, *Taq1*, *Apa1*, *EcoRV*, utvrđena je povezanost varijanti *Fok1* i *Bsm1* sa predispozicijom za melanom (258).

Prve opsežne studije asocijacije između genetičkih lokusa i ishoda melanoma objavljene su 2013. godine. Lokusi visokog rizika za melanom identifikovani su pomoću jedne takve studije asocijacije u čitavom genomu (engl. *Genome-wide association analyses*, GWAS). Ispitana je povezanost ukupno 108 SNP od značaja sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez recidiva bolesti na 891 obolelih od melanoma. Najznačajnije asocijacije pronađene su između polimorfizma *RCC2* rs7538876 i preživljavanja bez recidiva bolesti, kao i *DLGAP1* rs9960018 i ukupniog preživljavanja i preživljavanja bez recidiva bolesti. Ovi rezultati koji su pokazali povezanost genetičkih varijanti sa kliničkim ishodom, prvi put su ukazali na potencijal za uvođenje SNP kao prognostičkih genetičkih markera (259).

Prepoznavanje pojedinaca sa predispozicijom i većim rizikom za oboljevanje od melanoma moglo bi da unapredi ranu dijagnostiku, kao i preživljavanje obolelih. *MC1R* gen, zadužen za pigmentaciju kože, veoma je polimorfan u kavkaskoj populaciji i do sada je

opisano preko 200 njegovih varijanti. Ovaj gen je smatran jednim od najbitnijih genetičkih faktora u razvoju sporadičnog melanoma, pa su njegove genetičke varijante najviše i proučavane. Povezanost genetičkih polimorfizama *MC1R* sa rizikom od melanoma višestruko je potvrđena kroz meta-analize i studije asocijacije celog genoma (260, 261). Neke od njegovih varijanti kodiraju receptor sa smanjenom funkcijom, što dovodi do smanjenja sinteze tamnog pigmenta-eumelanina i povećanja svetlog pigmenta-feomelanina, formirajući fenotip sa riđom kosom, svetlom kožom, pegama i izrazitom osetljivošću od sunca. Pokazano je da varijante *MC1R* gena, nevezano za fenotipske karakteristike kože, direktno određuju predispoziciju za melanom. Naime, *MC1R* gen drugim biloškim procesima, nevezano za pigmentaciju kože, može uticati na razvoj melanoma, kao i njegovu rezistenciju na BRAF inhibitore. Takođe, potvrđeno je da dodavanje genotipa *MC1R* dosadašnjim kliničkim faktorima rizika može značajno da unapredi prevenciju i ranu dijagnostiku ove bolesti. Kod identifikovanih podložnih individua, bitno je uvesti kliničko praćenje i edukovati ih o važnosti zaštite od UV zračenja (262).

Poput rezultata u našem istraživanju, gde smo polimorfizam *GLII* rs2228226 identifikovali kao mogući prediktor lošijeg ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez recidiva bolesti, skoro su varijante i u drugim genima identifikovane kao potencijalni prognostički biomarkeri. Varijanta rs12203592 gena *IRF4* (engl. *interferon regulatory factor-4*) mogla bi biti novi pokazatelj lošeg ishoda melanoma, s obzirom da je povezana sa povećanom debljinom tumora po Breslou (263), važnim prediktivnim faktorom melanoma, kao i lošijim specifičnim preživljavanjem od melanoma (engl. *melanoma-specific survival*, MSS) (264, 265). SNP rs12203592 se nalazi u DNK sekvenci koja reguliše ekspresiju *IRF4* gena putem pojačivača, pa se može pretpostaviti da dolazi do funkcionalne promene ekspresije *IRF4*. Povećana ekspresija ovog proteina, koji je važan regulator imunskog odgovora, mogla bi da omogući regulatornim T ćelijama da inhibiraju imunski odgovor i dozvole ubrzani rast tumora i progresiju. Međutim, potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdio tačan mehanizam kojim ovaj SNP utiče na preživljavanje obolelih od melanoma. Takođe, dalja istraživanja će utvrditi kliničku vrednost *IRF4* kao prognostičkog biomarkera (263-265). U još jednom novijem istraživanju koje je obuhvatilo preko 1000 pacijenata obolelih od melanoma u belgijskoj populaciji identifikovana je značajna povezanost polimorfizma rs869330 gena *MTAP* (engl. *methylthioadenosine phosphorylase*) sa specifičnim preživljavanjem od melanoma, kao i preživljavanjem bez recidiva bolesti (266).

Gen *PARP1* (engl. *poly(adenosine diphosphate-ribose)polymerase1*) kodira protein koji u ćeliji obavlja razne funkcije, a uključen je i u proces popravke jednolančane DNK. Retka varijanta gena *PARP1* rs2249844 povezana je sa lošijim ukupnim preživljavanjem i specifičnim preživljavanjem od melanoma. Na osnovu bioinformatičke analize predložen je i mehanizam kojim varijanta *PARP1* rs2249844 ostvaruje svoj efekat, po kojoj se on nalazi u okviru regije sa vezujućim mestima za faktore transkripcije RREB1 i NF- κ B, važne u signalnim putevima melanoma. Uz to su se i viši nivoi ekspresije *PARP1* proteina pokazali povezanim sa ulceracijom tumora i lošijim ukupnim preživljavanjem (267). U drugoj studiji pokazana je povezanost sa progresijom melanoma, pošto je inhibicija PARP suprimirala EM tranziciju, angiogenezu i metastaze u plućima (268).

S obzirom da je melanom visoko imunogen tumor, kako bi se bolje razumela prognoza i razvile nove terapijske strategije, proučavane su i varijante gena koji učestvuju u imunološkom odgovoru. U jednoj studiji ispitana je povezanost 72 polimorfizma gena imunoloških puteva sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez recidiva bolesti. Najznačajnija povezanost uočena je između polimorfizma rs3024493 na hromozomu 1q32.1 koji reguliše sekreciju IL10 (interleukina 10) sa ukupnim preživljavanjem i inhibicijom sekrecije IL10 u CD4+ T limfocitima. Heterozigoti za alel rs3024493- srednji sekretori IL10, pokazali su povezanost s boljom prognozom. Suprotno tome, homozigoti za alel rs3024493-

niži sekretori IL10, povezani su sa lošijim ukupnim preživljavanjem. Zaključeno je da bi IL-10 mogao da ima i antitumorsko i protumorsko dejstvo, u zavisnosti od količine sekretovanog IL-10. Sem ovih, otkrivena je povezanost još nekoliko SNP na 1q32.1 s ukupnim preživljavanjem, što ukazuje na potencijalnu korist od ovog lokusa kao prognostičkog markera za melanom (269).

U našem istraživanju je prvi put ispitana povezanost između polimorfizama u ključnim genima *PTCH1* (rs357564), *SMO* (rs2228617) i *GLII* (rs2228224, rs2228226) *Hedgehog* signalnog puta sa predispozicijom za pojavu melanoma, kliničko patološkim karakteristikama obolelih, kao i prognozom bolesti. Dosadašnja istraživanja su ukazala da je povećana aktivnost *GLII*, kao i drugih ključnih gena u *Hedgehog* signalnom putu, povezana s malignom transformacijom, invazivnošću i sposobnošću metastaziranja u različitim malignitetima, uključujući melanom (256). Osim toga, prethodne studije su pokazale da varijante ovih gena mogu biti povezane s inflamatornim odgovorom i neoplastičnom transformacijom. Međutim, prema dostupnoj literaturi, do sada nije ispitivana njihova uloga u melanomu (253, 254, 270-276). Rezultati naše studije predstavljaju prvi dokaz o povezanosti polimorfizama *GLII* gena sa sklonošću ka oboljevanju od melanoma, kao i ishodom i tokom bolesti. Za ostale ispitivane polimorfizme HH putanje nije pokazana povezanost sa predispozicijom za obolevanje od melanoma, ispitivanim demografskim i kliničko patološkim parametrima, kao i prognozom melanoma kod obolelih. Nalazi naše studije sugerišu da je polimorfizam *GLII* rs2228226 povezan sa lošijim ukupnim preživljavanjem (OS) i lošijim preživljavanjem bez recidiva bolesti (RFS), dok bi polimorfizmi *GLII* rs2228226 i *GLII* rs2228224 mogli biti faktori rizika za povećanu sklonost od nastanka melanoma. Takođe, u grupi obolelih od melanoma primetili smo značajno veću zastupljenost A alela polimorfizma *GLII* rs2228224 kod muških ispitanika.

Poznato je da je melanom učestaliji kod muškog pola u odnosu na ženski (odnos polova 1.6:1), što bi se moglo pripisati i globalno gledano većoj izloženosti muškaraca sunčevom UV zračenju, kao i navikama vezanim za ponašanje na suncu. Međutim, naši nalazi ukazuju i na povezanost polimorfizma *GLII* gena sa muškim polom. Varijantni alel bi mogao biti u vezi sa promenjenom ekspresijom *GLII* gena. Prethodna studija je pokazala polno zavisni dimorfizam u ekspresiji *GLII* gena i povećanu ekspresiju *GLII* u testisima u odnosu na ovarijum, što je ukazalo na potencijalnu ulogu ovog gena u diferencijaciji pola (277). Na osnovu nalaza ove studije, kao i naših rezultata o povezanosti *GLII* sa progresijom melanoma, moglo bi se pretpostaviti da bi *GLII* potencijalno mogao imati značajniju ulogu u pojavi i progresiji ove bolesti kod osoba muškog pola u odnosu na osobe ženskog pola. Buduće studije na većem broju pacijenata, koje bi uključivale i pacijente sa displazijama i stratifikaciju po polu mogle bi razjasniti ove rezultate i pokazati da li osobe muškog pola sa varijantnim alelima *GLII* gena imaju povećani rizik za pojavu i progresiju melanoma u odnosu na osobe ženskog pola sa istim genotipom ili osobe muškog pola sa izvornim genotipom. Takođe, buduće studije, koje bi uključile i analize ekspresije *GLII* gena obolelih od melanoma, mogle bi pokazati da li je ekspresija *GLII* gena kod pacijenata muškog pola povećana u odnosu na obolele ženskog pola.

Značajna povezanost polimorfizama *GLII* sa napredovanjem melanoma, zapažena u našem istraživanju, postavlja veliki broj pitanja koja se odnose na mehanizme delovanja koji se nalaze u osnovi ove asocijacije. Polimorfizmi *GLII* potencijalno mogu da utiču na vitalnost, rast, proliferaciju i preživljavanje ćelija (278), kao i na ćelijsku migraciju i invaziju (216, 279, 280). Nesinonimna varijanta *GLII* gena po tipu polimorfizma nukleotidne sekvence (SNP) rs2228226 (G>C, p. Q1100E) smeštena je na dugom kraku hromozoma 12 u regionu 12q13.3, i dovodi do zamene aminokiseline glutamina sa glutaminskom kiselinom u proteinu *GLII*. Usled toga, u proteinu *GLII* dolazi do promene naelektrisanja u evolutivno očuvanom regionu blizu prepoznatog domena za transaktivaciju, promene strukture

transaktivacijskog domena, smanjenja stabilnosti proteina i njegove sposobnosti za aktivaciju. Procenjeno je da je sposobnost varijante *GLI1* Q1100E da aktivira *GLI1* zavisnu transkripciju gena smanjena za 50% u poređenju sa izvornom alelskom varijantom *GLI1* (engl. *wild type*) u *in vitro* uslovima. Kako *Hedgehog* signalni put igra važnu ulogu u embrionalnom razvoju, homeostazi tkiva, inflamaciji i karcinogenezi, a transkripcioni faktor *GLI1* predstavlja jednu od ključnih komponenti ovog puta, do sad je pokazana povezanost alelske varijante *GLI1* rs2228226 koja kodira protein smanjenje aktivnosti sa brojnim inflamatornim i malignim bolestima (251, 252).

U studiji koja je uključila oko 5000 ispitanika engleske, škotske i švedske populacije ispitana je varijabilnost *GLI1* gena kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD). Sugerisano je da je HH signalni put uključen u normalni razvoj gastrointestinalnog trakta, ali i odgovor creva na inflamatorne supstance, te da smanjena aktivnost *GLI1* proteina koja se dešava u varijanti *GLI1* rs2228226 može biti jedan od okidača za IBD. Tako je ovaj SNP predložen kao faktor rizika za ove bolesti, gde je pokazana značajna asocijacija sa ulceroznim kolitisom, kao i granična asocijacija sa Kronovom bolešću. U animalnom modelu u kojem je dekstran natrijum sulfatom (DSS) provocirana akutna upala creva, miševi koji su bili nosioci varijantnog alela polimorfizma *GLI1* rs2228226 razvili su tešku inflamaciju creva i imali značajno povećanu ekspresiju proinflamatornih i prokancerogenih citokina IL-23 i IL-17 (252). Prethodno je pokazano da IL-23/IL-17/IL-6/STAT3 osovina igra ključnu ulogu u modulaciji tumorske mikrookoline i promovisanju rasta tumora u animalnim modelima melanoma (281, 282). Svi ovi nalazi ukazuju na sinergijsku interakciju putanja HH/GLI-1 i IL-23/IL-17/IL-6/STAT3 u razvoju i napredovanju melanoma.

Nakon ovih istraživanja, alelska varijanta *GLI1* rs2228226 pokazala se i kao nezavisni prognostički marker loše prognoze kod pacijenata u II i III stadijumu kolorektalnog karcinoma, gde je utvrđeno da je genotip varijante *GLI1* rs2228226 CC povezan sa smanjenim vremenom do pojave recidiva tumora (255). U skladu sa nalazima našeg istraživanja kod pacijenata sa melanomom, prethodno je utvrđena veza i između polimorfizma *GLI1* rs2228226 sa predispozicijom za oboljevanje od karcinoma žučne kese, kao i lošijim preživljavanjem kod pacijenata u uznapredovalom stadijumu ove bolesti (253). Takođe, nađeno da je jedan genotip ovog polimorfizma povezan i sa većim rizikom za razvoj hronične limfocitne leukemije (254).

Disregulacija *Hedgehog* signalnog puta prethodno se pokazala značajnom u razvoju bazocelularnog i planocelularnog karcinoma kože. Poput rezultata dobijenih u našem istraživanju, varijante gena *Hedgehog* signalnog puta po tipu SNP takođe su pokazale povezanost sa nastankom karcinoma kože porekla keratinocita, uključujući bazocelularni i planocelularni karcinom. U dvadesetpetogodišnjoj prospektivnoj studiji koja je obuhvatila više od 1600 ispitanika australijske populacije ispitana je povezanost SNP gena HH puta sa rizikom od razvoja različitih tipova karcinoma kože porekla keratinocita, pojedinačno bazocelularnog i pojedinačno planocelularnog karcinoma. Nađeno je da je polimorfizam *GLI2* rs4848627 povezan sa razvojem svih tipova karcinoma kože porekla keratinocita, kao i sa planocelularnim karcinomom pojedinačno, dok je polimorfizam *GLI2* rs3217882 pokazao povezanost sa razvojem isključivo bazocelularnog karcinoma. Varijante *GLI2* rs895485 i rs17050378 povezane su sa razvojem planocelularnog karcinoma (273). Za razliku od naše studije gde je nađena povezanost polimorfizama *GLI1* gena i nastanka melanoma i u kojoj nije ispitivan *GLI2* polimorfizam, u ovoj studiji najviše SNPova povezanih sa razvojem bazocelularnog i planocelularnog karcinoma kože bilo je poreklom *GLI2* gena.

Gen *PTCH1* je deo HH signalne putanje i smatra se tumor supresorom. Lociran je na dugom kraku hromozoma 9 i kodira transmembranski glikoprotein PTCH1. Opisano je više njegovih izoformi, a duža L-izoforna smatra se kanonskim oblikom. Do sada su genske

varijante *PTCH1* povezivane sa više maligniteta, a najviše sa bazocelularnim karcinomom (272, 275, 283-285). Nedavno je sprovedena studija, koja je obuhvatila ispitanike meksičke populacije, u kojoj je ispitivana povezanost polimorfizama gena *PTCH1* rs357564, rs2297086, rs2236405 i rs41313327 sa predispozicijom za razvoj bazocelularnog karcinoma. U skladu sa rezultatima naše studije u kojoj nije pronađena značajna povezanost između ispitivanog polimorfizma gena *PTCH1* rs357564 i predispozicije za razvoj melanoma, ni u ovoj studiji nije pronađena značajna povezanost polimorfizama *PTCH1* gena sa predispozicijom za razvoj bazocelularnog karcinoma (286).

U istraživanju povezanosti polimorfizama gena HH puta sa bazocelularnim karcinomom kože u poljskoj populaciji istaknuta je potencijalna povezanost varijante gena *SHH* rs104894040 sa predispozicijom za razvoj bazocelularnog karcinoma. U ovoj studiji ispitivani su polimorfizmi u četiri gena HH puta: *SHH*, *GLI*, *SMO* i *PTCH1*, ukupno 22 polimorfizma. Među ispitivanim varijantama HH gena, samo jedna se poklapala sa istraženim polimorfizmom u našoj studiji- *GLI1* rs2228226. Za razliku od naše studije gde je nađena povezanost ovog polimorfizma sa predispozicijom za melanom, u poljskoj studiji nije nađena asocijacija sa predispozicijom za razvoj bazocelularnog karcinoma. Oni su sem polimorfizma *SHH* rs104894040 koji je bio povezan s najvećim rizikom za razvoj ovog karcinoma, pronašli još i povezanost s polimorfizmima *SHH* rs104894049, *SHH* rs104894040, *SHH* rs104894049, *SMO* rs41303402 i *SMO* rs41303402. Ostali istraženi polimorfizmi nisu pokazali statistički značajne razlike između pacijenata i kontrola (276).

GLI1 transkripcioni faktor u *Hedgehog* signalizaciji posreduje putem dve svoje varijante- duže *GLI1FL* i kraće *GLI1ΔN*. *GLI1ΔN* predstavlja varijantu *GLI1* proteina sa skraćenim N-terminalnim krajem, koji nastaje preskakanjem egzona 2 i 3. Analizom ekspresije mRNK *GLI1ΔN* kod odraslih zapaža se da je slična ekspresiji mRNK proteina pune dužine *GLI1FL*, dok se u malignitetima zapaža niža ekspresija. *GLI1ΔN* je regulisana uzvodnim molekulima HH puta, ali s druge strane je manje efikasan transkripcioni faktor od duže forme *GLI1FL*. U skladu sa svojom transkripcionom efikasnošću, *GLI1FL* se nalazi uvek u jedru ćelije, za razliku od *GLI1ΔN*. Protein *SUFU*, negativni regulator puta, vezuje se za terminalni domen *GLI1* i zadržava ga u citoplazmi, što je izraženije kod *GLI1FL* (287). S obzirom da su prema našim nalazima polimorfizmi *GLI1* povezani sa nastankom i napredovanjem melanoma, moglo bi se pretpostaviti da su povezani sa većom ekspresijom varijante *GLI1FL*. Buduća istraživanja mogla bi da ispituju uticaj polimorfizama gena *GLI1* na ekspresiju različitih izoformi *GLI1* proteina.

Patološka aktivacija *Hedgehog* signalnog puta povezana je sa nastankom, napredovanjem i širenjem različitih malignih tumora, uključujući melanom. S obzirom na važnost da se što bolje utvrdi i razjasni uloga HH puta u melanomu, nedavno je sprovedeno istraživanje u kome je na ćelijskim linijama melanoma korišćen ciklopamin, inhibitor *SMO* receptora, nizvodnog člana *Hedgehog* signalnog puta. Potom su posmatrani efekti supresije HH signalizacije na preživljavanje, proliferaciju i invazivnost ćelija melanoma, sa ciljem da se utvrdi uključenost ove signalizacije u melanomagenezi, ali i da se pruži podrška za buduće kliničko lečenje melanoma inhibitorima HH puta. Utvrđeno je da pri inhibiciji ove signalne kaskade u ćelijskim linijama melanoma dolazi do suzbijanja proliferacije, migracije i invazije malignih ćelija, a povećanja stope apoptoze. Takođe, ekspresija proteina *Gli1* i *Bcl-2* koja je pre terapije ciklopaminom bila na visokom nivou, nakon terapije pokazala je značajno smanjenje u tumorskim ćelijama. Ovo govori u prilog tome da ciklopamin inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu ćelija melanoma putem smanjenjem transkripcionog faktora *GLI1*. Takođe, HH signalni put potencijalno bi mogao da bude nova meta za razvoj ciljanih terapija melanoma (198). Potrebna su dodatna istraživanja i potvrde pre kliničkog uvođenja ovih lekova u terapiju melanoma, a prema rezultatima naše studije jedan od mogućih

personalizovanih pristupa u lečenju inhibitorima HH putanje mogao bi da se zasniva na SNP varijantama gena *Hedgehog* signalnog puta.

Dobro je poznato da su u melanomu najčešće pokretačke mutacije *BRAF* i *NRAS* gena povezane sa aktiviranjem RAS-RAF-MEK i AKT signalnih puteva. Međutim aktivnost SHH-GLI signalizacije takođe je esencijalna za proliferaciju i preživljavanje melanoma. Kod transgenih miševa primećeno je da melanomi indukovani *NRAS* mutacijom imaju povećanu ekspresiju *GLI1* i da zahtevaju aktivnost HH-GLI1 puta. Takođe, primećeno je da RAS-RAF-MEK i AKT signalizacija reguliše nuklearnu lokalizaciju i transkripcionu aktivnost *GLI1* u melanomu. U animalnim ksenograft modelima miševa utvrđeno je da se lokalnom ili sistemskom inhibicijom HH-GLI1 puta sprečavaju rast, recidivi i metastaze melanoma. Ovi podaci sugerišu da bi u *NRAS* indukovanim melanomima, s obzirom na esencijalnu ulogu *Hedgehog* puta, terapijski pristup trebalo da bude usmeren direktno na *GLI1* ili na oba signalna puta HH-GLI1 i RAS/AKT (288).

Melanom je poznat po svojoj agresivnosti koja se čini da potiče od sposobnosti malignih ćelija da se reverzibilno prebacuju između fenotipa sa neinvazivnim i invazivnim potencijalom, što se naziva fenotipska plastičnost i ujedno je jedan od glavnih uzrok njegove izražene heterogenosti. Reverzibilan proces prebacivanja fenotipa u kome polarizovane epitelne ćelije prelaze u pokretne mezenhimalne ćelije označen je kao epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT). Ovde dolazi do višestrukih molekularnih promena kao što su aktivacija transkripcionih faktora (poput SNAIL, TWIST i ZEB), ekspresija specifičnih proteina i reorganizacija citoskeleta. Faktori uključeni u ove procese mogu se koristiti kao markeri EMT. Usled ovih promena epitelne ćelije preuzimaju fenotip mezenhimalne ćelije, uključujući veću otpornost na apoptozu, produkciju komponenti ekstracelularnog matriksa, migracionu sposobnost i invazivnost. EM se dešava u tri slučaja- u toku embrionalnog razvoja, u regeneraciji tkiva i u malignim procesima, gde se smatra ključnim okidačem invazivnosti. Pokazano je da EMT igra ulogu u napredovanju melanoma. Smatralo se da presudnu ulogu u ovome ima MITF (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*), međutim, potvrđeno je da *GLI1* igra odlučujuću ulogu u održavanju invazivnog fenotipa melanomskih ćelija, nezavisno od MITF. U studiji su ćelijske linije melanoma u kojima je eksperimentalno isključen *GLI1* pokazale značajno smanjene karakteristike invazivnosti, bez uticaja na ekspresiju i aktivnost MITF. Da bi se procenila njihova sposobnost metastaziranja in vivo, ove ćelije su ubrizgane eksperimentalnim miševima, gde su dovele do značajno manjeg broja metastaza u plućima nego kontrolne melanomske ćelije. Pored toga, ćelijske linije melanoma sa utišanim *GLI1* prošle su prebacivanje iz mezenhimalnog u epitelni, tj. manje invazivni tip. To je pratila i manja ekspresija transkripcionih faktora EMT kao što su SNAIL1, ZEB1 i TWIST1, čime je pokazano da ih *GLI1* direktno moduliše (289). Ovim istraživanjem otvoreno je novo poglavlje u razumevanju mehanizama i faktora koji dovode do agresivnosti i napredovanja melanoma, čime bi mogla da se objasni povezanost određenih polimorfizama *GLI1* gena sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez recidiva bolesti nađenim u našem istraživanju. U nekim budućim istraživanjima, moglo bi da se istraži kako polimorfizmi *GLI1* gena utiču na ekspresiju transkripcionih faktora EMT, poput SNAIL1, ZEB1 i TWIST1.

Zanimljivo je da je u melanomu *TP53*, poznati tumor supresor, veoma retko mutiran. Međutim, često se dešava da on nema zaštitnu ulogu po kojoj je poznat, a jedan od uzroka njegove promenjene funkcija mogla bi da bude interakcija sa *GLI1*. Ovo dodatno doprinosi malignosti tumora i rezistenciji na terapiju. Pretpostavlja se da do deaktivacije p53, produkta *TP53* gena, dolazi usled više mogućih mehanizama kao što je mutacija *CDKN2A* gena, aktivacija inhibitora ASPP (engl. *apoptosis-stimulating protein of p53*; iASPP) ili stišavanje epigenetskim mehanizmima. Pored toga poznato je da porodicu p53 čine tri slična proteina- p53, p73 i p63, i da svaki od njih ima različite izoforme koje sve kodira isti gen, što doprinosi

raznolikosti delovanja i uticaja ovih proteina na različite biološke procese. S obzirom da izoforme porodice p53 međusobno intereaguju, ukupna aktivnost ovih proteina zavisi od njihovog međusobnog sadejstva (290). Nađeno je da u melanomu p63 interaguje sa p53 smanjujući njegovu funkciju tumor supresora (291). Međutim, pretpostavlja se da bi funkcija p53 u metastatskom melanomu mogla biti izmenjena interakcijom i sa nekim drugim proteinima, poput GLI1. U studiji u kojoj su analizirani profili ekspresije određenih gena i proteina u ćelijskim linijama metastatskog melanoma i zdravog tkiva, a zatim upoređeni sa kliničkim karakteristikama i ishodom kod obolelih pacijenata, zaključeno je da povećana ekspresija gena *GLI1* ima negativan uticaj na ukupno preživljavanje pacijenata sa melanomom, moguće kroz uticaj na funkcionalnu neaktivnost gena *tp53* čija je ekspresija bila smanjena (292). I pre toga je povećana ekspresija *GLI1*, *GLI2* i *PTCH1* dovedena u vezu sa agresivnijim oblicima melanoma i metastatskim napredovanjem bolesti (288). Takođe, poznato je da HH ima interakcije sa drugim signalnim putevima, a između ostalog pokazana je njegova interakcija i sa p53. U neuralnim matičnim ćelijama primećena je međusobna regulacija gde povećanje p53 inhibira njihovu regeneraciju posredstvom GLI1, i obratno, povećana ekspresija GLI1 suprimira tumor supresorsku aktivnost p53 (293). U budućnosti bi mogla da se istraži aktivnost *TP53* gena u melanomu u odnosu na različite genotipove polimorfizma gena *GLI1* rs2228226, za koji je u našoj studiji pokazano da utiče na lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti.

Istraživanja su pokazala da je za rast melanoma i samoobnavljanje specifične subpopulacije ćelija poznatih kao „ćelije koje započinju razvoj melanoma“ (engl. *melanoma-initiating cells*, MICs) neophodna HH signalizacija, kao i funkcija SOX2 (engl. *sex-determining region Y (SRY)-Box2*). MICs ćelije po svojim karakteristikama podsećaju na matične ćelije, kako imaju neograničenu sposobnost samoregeneracije i mogućnost diferencijacije u različite tipove, a u njima je utvrđena povećana aktivnost transkripcionog faktora SOX2. Ovaj protein je njihov glavni faktor samoobnavljanja, a takođe i važan posrednik HH signalizacije u melanomu. HH reguliše SOX2 posredstvom transkripcionih faktora GLI1 i GLI2, koji se vezuju za proksimalnu promotorsku regiju SOX2. Ispitivanje je pokazalo da utišavanje *SOX2* usporava rast tumora i dovodi do apoptoze u ćelijama melanoma. Takođe, dolazi do smanjenja potencijala za samoobnavljanje MICs in vitro i iniciranja i održanja kontinuiteta rasta tumora in vivo. Kako se SOX2 pokazao kao ključni faktor samoobnavljanja i tumorogenosti MICs, koje su često otporne na konvencionalne i ciljane terapije, nove terapijske strategije bi mogle biti zasnovane na inhibiciji *SOX2* gena, ali i transkripcionih faktora GLI1 i GLI2 kao njegovih regulatora u ćelijama melanoma (294). Dalje bi trebalo proveriti odnos između polimorfizama *GLI1* gena i ekspresije SOX2 transkripcionog faktora, uz mogućnost da se buduća terapija melanoma kod povećane ekspresije SOX2 zasniva na prisustvu ili odsustvu specifične alelske varijante *GLI1* polimorfizama.

Poremećena sijalizacija, oblik glikozilacije, igra ključnu ulogu u tumorogenim i malignim karakteristikama ćelija. Sijalizovani glikokonjugati regulišu rast, pokretljivost, adhezivnost i izbegavanje imunološkog sistema malignih ćelija, stoga su važna komponenta u napredovanju i metastaziranju bolesti. Transkripcioni kompleks GLI1-SOX2 promovise invazivnost melanoma indukcijom enzima ST3GAL1 (beta-galaktozid-alfa-2,3-sijaliltransferaza-1) koji katalizuje prenos sijaline kiseline sa citozin monofosfata-sijalne kiseline na supstrate sa galaktozom. Analizom glikoliziranih proteina, pokazano je da je AXL, receptorska tirozin kinaza, ključni faktor koji podstiče invaziju posredstvom ST3GAL1. Prema ovim istraživanjima osovina GLI1-SOX2-ST3GAL1-AXL inicira metastaziranje melanoma, što sugerise da bi inhibicija ove osovine mogla u budućnosti postati obećavajuća terapijska strategija za metastatski melanom (295).

Ekspresija transkripcionog faktora GLI1, nizvodnog člana HH signalnog puta, progresivno se povećava kako melanom napreduje od lokalizovane ka metastatskoj bolesti. Kao njegov ključni nizvodni efektor otkriven je osteopontin. Primećeno je da pri aktivaciji *Hedgehog* signalizacije SHH ligandom dolazi do povećanja ekspresije osteopontina, a inhibicijom HH puta ciklopaminom nivo ovog proteina opada. Takođe, utišavanje *GLII* gena i smanjenje transkripcije negativno reguliše ekspresiju osteopontina, i dolazi do suzbijanja proliferacije, migracije i invazije melanomskih ćelija kako *in vitro*, tako i u animalnim ksenograft modelima miševa. Sve ove promene su reverzne, te se ponovnom ekspresijom GLI1 i osteopontina mogu obnoviti, što sugeriše da GLI1-posredovano povećanje nivoa osteopontina indukuje malignost u melanomu. Dalja istraživanja mogla bi da ispituju nivo ekspresije osteopontina kod polimorfizama *GLII* gena (296). Takođe i ovde bi potencijalno u budućnosti mogla da se primeni ciljana terapija koja je personalizovana i zasnovana na specifičnim polimorfizmima *GLII*.

Nedavno su nekodirajuće cirkularne RNK prepoznate kao regulatori razvoja i napredovanja mnogih bolesti kod ljudi, uključujući maligna oboljenja. Tako je u ćelijama melanoma primećeno povećanje cirkularne RNK hsa_circ_0027247, koja je izolovana i označena kao circ-GLI1 jer potiče iz GLI1 i za koju se pokazalo da ubrzava metastaziranje melanoma. Otkriven je mehanizam njenog dejstva, gde circ-GLI1 preko transkripcionog faktora MYC povećava ekspresiju proteina CYR61 (engl. *Cysteine-rich angiogenic inducer 61*) odgovornog za indukciju rasta, migraciju, angiogenezu i invaziju melanomskih ćelija. Da bi aktivirao MYC-regulisano ekspresiju CYR61, circ-GLI1 inteeaguje sa p70S6K2, čime se povećava nivo GLI1 i β -katenina i dolazi do aktivacije *Hedgehog/GLII* i *Wnt/ β -katenin* signalnih puteva. Iako je MYC transkripcioni faktor modulisan od strane GLI1 i HH signalizacije, prema dosadašnjim izveštajima moguća je i obrnuta modulacija transkripcije GLI1, pa MYC-GLI1 u melanomu funkcioniše kao povratna petlja (297). Kako circ-GLI1 RNK putem aktivacije HH puta igra ulogu u napredovanju i širenju melanoma, blokiranje komponenti ovog mehanizma, mogla bi da bude potencijalna nova terapijska strategija za sprečavanje napredovanja bolesti. Takođe, circRNK i ostale izoforme cirkularnih RNK poreklom iz *GLII* gena mogle bi biti dodatni mehanizam putem kojeg *GLII* i njegovi polimorfizmi mogu igrati važnu ulogu u patogenezi melanoma. Buduća istraživanja vezana za *GLII* trebalo bi da budu usmerena na mehanizme *GLII* polimorfizama i na razumevanje molekularne osnove delovanja varijanti *GLII* na HH putanju i puteve sa kojima inteeaguje.

Kako je u našem istraživanju pokazano da su određene alelske varijante polimorfizma *GLII* rs2228226 povezane sa lošijom prognozom, postavlja se pitanje da li postoji njihova asocijacija i sa različitim odgovorom na terapiju. Potvrda ove asocijacije bila bi osnova za kreiranje novog personalizovanog terapijskog pristupa u lečenju melanoma inhibitorima HH puta. Do sada su razvijeni određeni sintetički i prirodni lekovi koji inhibiraju *Hedgehog* signalnu putanju. Kvercetin, biljni flavonoid koji cilja SHH signalizaciju mogao bi imati terapijski potencijal za lečenje melanoma. Na animalnim modelima sa pankreatičnim duktalnim adenokarcinomom (PDA) u kome je poremećena HH signalizacija ključna za razvoj i napredovanje bolesti, pokazani su inhibitorni efekti kvercetina na rast i širenje tumora. U studiji je prvo određena aktivnost SHH signalizacije, a zatim praćeno dejstvo kvercetina. Primećeno je da ovaj prirodni lek inhibira proliferaciju malignih ćelija smanjenjem nivoa c-MYC, smanjuje epitelno-mezehimalnu tranziciju (EMT) sniženjem ekspresije TGF- β 1 i indukuje apoptozu malignih ćelija mitohondrijalnim putem ili putem "receptora smrti". S druge strane, kada je rekombinovanim SHH proteinom ponovo povećana HH signalizacija, došlo je do reverzije kvercetinom postignutih efekata i vraćanja bolesti (216). Time se može zaključiti da je ovaj lek potentni inhibitor HH putanje kojim je kod HH posredovanog maligniteta moguće inhibirati rast, migraciju, invaziju i indukovati apoptozu malignih ćelija, pa bi u budućim istraživanjima trebalo utvrditi njegove efekte na melanom.

U HH posredovanoj tumorogenezi, činioci signalne osovine SHH-PTCH1-SMO-GLI1 mogli bi da predstavljaju metu za razvoj ciljanih terapija maligniteta. Najčešće se cilja SMO receptor, a njegov inhibitor Vismodegib odobren je od strane FDA za lečenje bazocelularnog karcinoma. S obzirom na sporedne neželjene efekte koji se javljaju pri terapiji, kao i razvoj sekundarne rezistencije na vismodegib, radi se na razvoju novih efektivnih inhibitora SMO receptora. U mišjem modelu ksenografta melanoma, pokazano je da derivat acil-guanidina veoma uspešno dovodi do smanjenja melanoma, ciljanjem SMO receptora i sledstveno smanjenjem nivoa GLI1 proteina. Ovo dovodi do inhibicije samoobnavljanja melanomskih ćelija, indukuje apoptozu i blokadu ćelijskog ciklusa u G2 fazi sprečavajući prelazak u M fazu ciklusa i indukujući mitotsku katastrofu (298).

Pored inhibitora HH signalnog puta koji ciljaju SMO receptor, proučavaju se i lekovi kojima je centralna meta transkripcioni faktor GLI1. Pokazano je da lek GANT61, inhibitor *GLI1*, dovodi do značajnog smanjenja preživljavanja melanomskih ćelija, primenjen samostalno ili u kombinovanoj terapiji sa inhibitorom familije *BCL2* obatoklaksom. Istraživanje je sprovedeno na 9 melanomskih ćelijskih linija sa nepoznatim statusom *BRAF* i *NRAS* mutacije. Nakon terapije GANT61 zapaženo je smanjeno preživljavanje melanomskih ćelija kroz indukciju apoptoze i fragmentaciju nuklearne DNK. GANT61 se pokazao efikasno kao samostalan lek i u kombinovanoj terapiji, dok je obatoklaks imao ograničene efekte primenjen pojedinačno. Kombinovani tretman pokazao se kao najefikasniji način za suzbijanje rasta melanoma u svim ćelijskim linijama, gde je trebalo do 9 dana za uništenje malignih ćelija. Zaključeno je da bi GANT61 mogao da bude efikasna terapija melanoma posebno u kombinaciji sa obatoklaksom (278).

Terapija *BRAF* inhibitorima (vemurafenibom i dabrafenibom) i *MEK* inhibitorima (trametinibom i selumetinibom) u početku daje obećavajuće i optimistične rezultate u lečenju uznapredovalog metastatskog melanoma, ali gotovo po pravilu dolazi do razvoja sekundarne rezistencije nakon nekoliko meseci. Iako je u studijama pokazano da se mutacije *BRAF* i *NRAS* međusobno isključuju, kombinovanom primenom ovih lekova postiže se najbolji terapijski odgovor i veća efikasnost u smanjenju melanomskih ćelija, iako se potpuno izlečenje retko postiže. Razumevanje molekularnih mehanizama u osnovi ovih vidova terapije je neophodno u istraživanjima koja se bave načinom prevazilaženja rezistencija na lekove. Tako je zapaženo da je jedan od mehanizama rezistencije na *BRAF* inhibitore upravo povećana aktivacija *Hedgehog* signalnog puta. U jednoj studiji je pokazano da ćelijske linije melanoma sa *in vitro* indukovanom rezistencijom na vemurafenib, u poređenju sa kontrolnim ćelijama, imaju povišene nivoe *GLI1* i *GLI2* faktora transkripcije. Na kliničkim uzorcima melanoma, u grupi pacijenata nakon tretmana vemurafenibom, dobijeni su isti nalazi. Povišeni nivoi *GLI1* i *GLI2* povezani su sa nekanonskim putem aktivacije HH signalizacije, odnosno sa *TGFβ/SMAD* (engl. *transforming growth factor-β/Sma- and Mad-related family*) signalizacijom. Nakon što je sprovedena terapija kod vemurafenib-rezistentnih ćelija sa inhibitorom *GLI1*- GANT61, došlo je do povratka osetljivosti na vemurafenib u njima, te do zaustavljanja rasta melanoma. Pokazano je da smanjenjem ekspresije *GLI1* putem inhibitornog leka dolazi do smanjenja invazije melanomskih ćelija, smanjenja ekspresije metaloproteinaza (*MMP2/MMP9*) i povećanja ekspresije faktora mikroftalmije (*MITF*). Primećeno je i da kombinovana terapija vemurafeniba i GANT61 sprečava javljanje otpornosti na *BRAF* inhibitor, što sugerise da ova terapijska kombinacija ima potencijal da u budućnosti postane strategija za prevazilaženje i preveniranje pojave rezistencije na lekove kod pacijenata sa melanomom (299). Buduća istraživanja bi trebalo da razmotre farmakogenetičko testiranje gena HH putanje, a posebno *GLI1*, radi definisanja personalizovanog pristupa terapiji. Strategija lečenja melanoma mogla bi da bude zasnovana na genotipovima gena SHH signalnog puta. Takođe, trebalo bi razmotriti potencijalnu

povezanost mutacije *BRAF* V600E sa genetičkim promenama i aberantnom ekspresijom u HH putanji.

Eksperimentalna inhibicija *Hedgehog* signalizacije koja uključuje GLI1- GANT61, pokazala se efikasnijom u poređenju sa inhibitorima uzvodnih komponenti HH puta poput SMO receptora. Međutim, s obzirom na sposobnost melanoma da posredstvom svojih složenih mehanizama razvije rezistenciju na ciljanu terapiju, potrebno je stalno razvijanje novih terapijskih strategija kojima bi se otpornost na lekove prevazišla. Tako su u nedavnoj studiji izučavani mehanizmi koji dovode do rezistencije na GLI1 inhibitor GANT61 u melanomskim ćelijama. Oformljene su dve ćelijske linije melanoma kod kojih je uspostavljena rezistencija na GANT61, a zatim su posmatrane njihove karakteristike kako bi se uočili potencijalno različiti mehanizmi rezistencije. Jedna ćelijska linija je imala homozigotnu *NRAS* Q61R mutaciju dok je druga bila *wt* kako za *NRAS* tako i za *BRAF* poznate mutacije. Zajedničke karakteristike među GANT61-rezistentnim ćelijskim linijama bile su smanjenje *Hedgehog* signalizacije i povećanje invazivnih karakteristika melanomskih ćelija, poput migracije i epitelo-mezenhimalne tranzicije. S druge strane, rezistentne ćelijske linije razlikovale su se u modulu uspostavljene aktivnosti MAPK signalizacije (RAS/RAF/ERK modul) i formiranju primarnih cilija preko proteina RAB34. Ovo je ukazalo na postojanje potencijalno različitih mehanizama za razvoj otpornosti, te stoga i na potencijalne mogućnosti prevazilaženja iste (300).

Iako je bilo poznato da su i *Hedgehog*-GLI i ERK5 signali neophodni za rast melanoma, tek skoro je potvrđena međusobna interakcija ova dva puta u ovom procesu, gde ERK5 predstavlja važan faktor ishoda *Hedgehog*-GLI signalizacije, a GLI1 pozitivno reguliše ekspresiju ERK5 u ćelijama melanoma. U istraživanju koje je sprovedeno na ćelijskim linijama humanog melanoma otkriveno je da genetska inhibicija negativnog regulatora *Hedgehog* putanje *PATCH1*, dovodi do hiperaktivacije ovog puta i povećane ekspresije ERK5, kako na nivou RNK, tako i proteina. Zatim, pronađena su dva molekularna mehanizma kojima GLI1 moduliše ERK5. Jedan od njih je regulacija transkripcije ERK5 od strane GLI1, tako što se transkripcioni faktor GLI1 direktno vezuje za promotorsku regiju *MAPK7* gena koji kodira ERK5. Drugi mehanizam predstavlja fosforilaciju ERK5 od strane aktiviranog HH-GLI puta. S druge strane, iako je bilo poznato da HH-GLI put reguliše proliferaciju, preživljavanje i samoobnavljanje melanoma, sada je otkriveno da je ERK5 ipak ključni posrednik u ovoj ulozi. Naime, isključivanjem *MAPK7* gena došlo je do smanjenja HH-GLI indukovane proliferacije melanomskih ćelija. Pokazano je i da kombinovana terapija inhibitorima *Hedgehog* puta (GANT61, MRT-92) i inhibitorima MEK5-ERK5 (XMD8-92, JWG-071, BIX02189) dovodi do bolje antitumorske efikasnosti. Takođe, efikasnost ove kombinovane terapije ne zavisi od *BRAF*/*NRAS*/*NF1* mutacionog statusa, pa se može potencijalno koristiti kod svih melanoma sa visokom ekspresijom GLI1 i ERK5 (301).

Bilo da je patološka aktivacija HH putanje koja se dešava u melanomu pokrenuta klasičnim kanonskim putem usled genetičkih promena u nizvodnim članovima, ili nekanonskim putem usled dejstva drugih faktora, krajnji rezultat je povećanje nivoa transkripcionih faktora GLI1 i GLI2. Zato se čini da je GLI idealna meta za inhibiciju HH puta, bilo kojim putem da je pokrenut. Međutim, postoje izazovi u razvoju klinički efikasnih GLI inhibitora zbog njihove metaboličke nestabilnosti, slabe rastvorljivosti u vodi i visoke hidrofobnosti. Nakon identifikacije dva obećavajuća GLI inhibitora na bazi kinolina putem virtuelnog skrininga, sproveden je proces optimizacije što je rezultiralo razvojem jedinjenja 4-metoksi-8-hidroksikinolin JC19. Ovaj derivat je dalje testiran u ćelijskim modelima gde je pokazao efikasnost u inhibiciji aktivnosti GLI1 i GLI2, sprečavajući vezivanje ovih transkripcionih faktora za DNK. Takođe, *in vitro* je pokazana njegova efikasnost u smanjenju proliferacije i indukciji apoptoze malignih ćelija. Ono što je bitno, u odnosu na prethodne GLI inhibitore ima visoku metaboličku stabilnost, a najzanimljivije je što u animalnom

modelu efikasno suzbija rast melanoma bez sporednih neželjenih efekata. Rezultati ovog istraživanja ističu potencijal JC19 kao novog antikancerogenog agensa koji cilja GLI1 i GLI2 transkripcione faktore HH puta (302).

Na osnovu prethodno iznetih saznanja vezanih za ulogu *Hedgehog* signalnog puta u nastanku, napredovanju i metastaziranju melanoma, može se zaključiti da bi inhibicija HH signalnog puta korišćenjem prirodnih i sintetičkih jedinjenja mogla da predstavlja novi pristup u lečenju melanoma. Za definisanje personalizovanog terapijskog pristupa, o kome se sve više govori i kojem se sve više teži, buduća klinička istraživanja trebalo bi da razmotre farmakogenetičko testiranje gena *Hedgehog* putanje, a posebno *GLI1* gena. Na osnovu rezultata naših istraživanja, postoji perspektiva da bi terapija melanoma inhibitorima *Hedgehog* signalnog puta mogla da se bazira na personalizovanom terapijskom pristupu na osnovu genotipa pacijenata za gene HH puta. Buduća istraživanja takođe bi trebalo da razmotre potencijalnu povezanost mutacije *BRAF* V600E sa genetičkim varijantama i aberantnom ekspresijom u HH putanji.

Zaključno, u našem istraživanju polimorfizmi *GLI1* rs2228226 i *GLI1* rs2228224 su identifikovani kao novi biomarkeri predispozicije za nastanak melanoma, a polimorfizam *GLI1* rs2228226 kao prognostički marker lošeg ishoda, uključujući i lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti. Da bi *GLI1* polimorfizmi mogli da se široko prihvate i klinički primene kao biomarkeri predispozicije i prognoze za melanom, neophodno je da se ovi rezultati potvrde na većem broju ispitanika i u različitim populacionim grupama. Rezultati našeg istraživanja bi se mogli reflektovati i na lečenje ove bolesti. Svedoci smo aktuelnih istraživanja mogućnosti lečenja melanoma lekovima usmerenim na SHH-PTCH1-SMO/GLI1 signalnu kaskadu, sa fokusom na GLI1 koji je ključni modulator HH signalizacije. Različite genetičke varijante koje kodiraju ovaj transkripcioni faktor mogu biti polazna osnova za kreiranje personalizovanih lekova.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci ovog istraživanja:

1. Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova ispitivanih polimorfizama GLI1 gena između ispitivane i kontrolne grupe. Oboleli od melanoma su značajno češće bili nosioci mutiranog G alela (kombinovani GG+AG genotip) za polimorfizam rs2228224, odnosno mutiranog C alela (CC+GC genotip) za rs2228226. Ovi rezultati ukazuju na to da su polimorfizmi GLI1 rs2228226 i GLI1 rs2228224 značajni biomarkeri predispozicije za nastanak melanoma.
2. Varijantni mutirani genotip CC polimorfizma GLI1 rs2228226 je pokazao lošije ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva. Na osnovu ovog nalaza možemo reći da je polimorfizam GLI1 rs2228226 značajan marker loše prognoze kod pacijenata sa melanomom.
3. Nije nađena povezanost GLI1 ispitivanih polimorfizama sa kliničko-patološkim karakteristikama u ispitivanoj grupi.
4. Distribucija genotipova PTCH1 rs357564 i SMO rs2228617 nije se značajno razlikovala između dve ispitivane grupe.
5. PTCH1 rs357564 i SMO rs2228617 polimorfizmi *Hedgehog* signalnog puta nisu pokazali značajnu povezanost sa predispozicijom za oboljevanje, ispitivanim kliničko-patološkim faktorima i prognozom melanoma.

7. LITERATURA

1. Strashilov S, Yordanov A. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(12).
2. Davey MG, Miller N, McInerney NM. A Review of Epidemiology and Cancer Biology of Malignant Melanoma. *Cureus*. 2021;13(5):e15087.
3. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Molecular and cellular pharmacology*. 2014;6(3):228.
4. Melanoma of the Skin. [Internet]. SEER web site Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> (Accessed March 9, 2024) 2024.
5. Waseh S, Lee JB. Advances in melanoma: epidemiology, diagnosis, and prognosis. *Frontiers in medicine*. 2023;10:1268479.
6. Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F, et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA dermatology*. 2022;158(5):495-503.
7. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Medical sciences*. 2021;9(4).
8. Australia. CC. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma. V1.0 Available at <https://app.magicapp.org/#/guideline/Lkk3pL>; [
9. Patel H, Yacoub N, Mishra R, White A, Long Y, Alanazi S, et al. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers*. 2020;12(2).
10. Natarelli N, Aleman SJ, Mark IM, Tran JT, Kwak S, Botto E, et al. A Review of Current and Pipeline Drugs for Treatment of Melanoma. *Pharmaceuticals*. 2024;17(2).
11. Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966;19(5):607-10.
12. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma research*. 2012;22(2):114-22.
13. Gorantla VC, Kirkwood JM. State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2014;28(3):415-35.
14. Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laennec (1781-1826): the man behind the stethoscope. *Clinical medicine & research*. 2006;4(3):230-5.
15. Kraemer K. Dysplastic nevi as precursors to hereditary melanoma. *The Journal of dermatologic surgery and oncology*. 1983;9(8):619-22.
16. Eckerle Mize D, Bishop M, Resse E, Sluzevich J. Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome. In: Riegert-Johnson DL, Boardman LA, Hefferon T, Roberts M, editors. *Cancer Syndromes*. Bethesda (MD)2009.
17. Norris W. Case of Fungoid Disease. *Edinburgh medical and surgical journal*. 1820;16(65):562-5.
18. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6199-206.
19. Breslow A, Macht SD. Optimal size of resection margin for thin cutaneous melanoma. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1977;145(5):691-2.
20. Faries MB, Donald L. Morton Memorial Lecture: the legacy of Donald Morton: past, present and future. *Clinical & experimental metastasis*. 2022;39(1):101-7.
21. Morton DL. Current management of malignant melanoma. *Annals of surgery*. 1990;212(2):123-4.

22. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2006;355(13):1307-17.
23. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Archives of surgery*. 1992;127(4):392-9.
24. Lancaster HO, Nelson J. Sunlight as a cause of melanoma; a clinical survey. *The Medical journal of Australia*. 1957;44(14):452-6.
25. Lancaster HO. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. *The Medical journal of Australia*. 1956;43(26):1082-7.
26. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer research*. 2006;66(20):9818-28.
27. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(3):1311-5.
28. Padua RA, Barrass N, Currie GA. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature*. 1984;311(5987):671-3.
29. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
30. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(26):4340-6.
31. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457(7229):599-602.
32. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, et al. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer research*. 2004;64(7):2338-42.
33. Yang AS, Chapman PB. The history and future of chemotherapy for melanoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2009;23(3):583-97, x.
34. Bodenham DC. A study of 650 observed malignant melanomas in the South-West region. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 1968;43(4):218-39.
35. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
36. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2507-16.
37. Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(3):201-9.
38. Kurtansky NR, Dusza SW, Halpern AC, Hartman RI, Geller AC, Marghoob AA, et al. An Epidemiologic Analysis of Melanoma Overdiagnosis in the United States, 1975-2017. *The Journal of investigative dermatology*. 2022;142(7):1804-11 e6.
39. Welch HG, Mazer BL, Adamson AS. The Rapid Rise in Cutaneous Melanoma Diagnoses. *The New England journal of medicine*. 2021;384(1):72-9.
40. Glasziou PP, Jones MA, Pathirana T, Barratt AL, Bell KJ. Estimating the magnitude of cancer overdiagnosis in Australia. *The Medical journal of Australia*. 2020;212(4):163-8.
41. Whiteman DC, Olsen CM, MacGregor S, Law MH, Thompson B, Dusingize JC, et al. The effect of screening on melanoma incidence and biopsy rates. *The British journal of dermatology*. 2022;187(4):515-22.

42. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(1):7-33.
43. Brodersen J, Schwartz LM, Heneghan C, O'Sullivan JW, Aronson JK, Woloshin S. Overdiagnosis: what it is and what it isn't. *BMJ evidence-based medicine*. 2018;23(1):1-3.
44. Zheng S, Schrijvers JJA, Greuter MJW, Kats-Ugurlu G, Lu W, de Bock GH. Effectiveness of Colorectal Cancer (CRC) Screening on All-Cause and CRC-Specific Mortality Reduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*. 2023;15(7).
45. Harris E. HPV Screening Could Cut Cervical Cancer Deaths by Up to Two-Thirds. *Jama*. 2024;331(5):384.
46. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(2):260-76.
47. Society. AC. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer.: Available at:<https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>
- [
48. Olsen CM, Thompson JF, Pandeya N, Whiteman DC. Evaluation of Sex-Specific Incidence of Melanoma. *JAMA dermatology*. 2020;156(5):553-60.
49. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2006;355(1):51-65.
50. Omland SH, Ahlstrom MG, Gerstoft J, Pedersen G, Mohey R, Pedersen C, et al. Risk of skin cancer in patients with HIV: A Danish nationwide cohort study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2018;79(4):689-95.
51. Gonzalez Maglio DH, Paz ML, Leoni J. Sunlight Effects on Immune System: Is There Something Else in addition to UV-Induced Immunosuppression? *BioMed research international*. 2016;2016:1934518.
52. Ricci F, Paradisi A, Fania L, Pallotta S, G DIL, Sobrino L, et al. High melanoma risk in non-melanoma skin cancer patients under age 40: a large retrospective cohort study. *Italian journal of dermatology and venereology*. 2021;156(2):240-3.
53. Vuong K, Armstrong BK, Espinoza D, Hopper JL, Aitken JF, Giles GG, et al. An independent external validation of melanoma risk prediction models using the Australian Melanoma Family Study. *The British journal of dermatology*. 2021;184(5):957-60.
54. Conforti C, Zalaudek I. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatology practical & conceptual*. 2021;11(Suppl 1):e2021161S.
55. Society. AC. Risk Factors for Melanoma Skin Cancer.: Available at <https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>; [
56. Kinsler VA, O'Hare P, Bulstrode N, Calonje JE, Chong WK, Hargrave D, et al. Melanoma in congenital melanocytic naevi. *The British journal of dermatology*. 2017;176(5):1131-43.
57. Rizvi SMH, Aagnes B, Holdaas H, Gude E, Boberg KM, Bjortuft O, et al. Long-term Change in the Risk of Skin Cancer After Organ Transplantation: A Population-Based Nationwide Cohort Study. *JAMA dermatology*. 2017;153(12):1270-7.
58. Kearney L, Hogan D, Conlon P, Roche M, O'Neill JP, O'Sullivan JB. High-risk cutaneous malignancies and immunosuppression: Challenges for the reconstructive surgeon in the renal transplant population. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2017;70(7):922-30.
59. Yanik EL, Hernandez-Ramirez RU, Qin L, Lin H, Leyden W, Neugebauer RS, et al. Brief Report: Cutaneous Melanoma Risk Among People With HIV in the United States and Canada. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2018;78(5):499-504.

60. Banan P, Marvi SK, McMeniman E, De'Ambrosis B. An Australian cohort of 210 patients with multiple invasive squamous cell carcinomas: risk factors and associated increased risk of melanoma and internal malignancies. *The Australasian journal of dermatology*. 2016;57(1):29-32.
61. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *International journal of dermatology*. 2010;49(4):362-76.
62. Gumaste PV, Penn LA, Cymerman RM, Kirchoff T, Polsky D, McLellan B. Skin cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers. *The British journal of dermatology*. 2015;172(6):1498-506.
63. Brambullo T, Colonna MR, Vindigni V, Piaserico S, Masciopinto G, Galeano M, et al. Xeroderma Pigmentosum: A Genetic Condition Skin Cancer Correlated-A Systematic Review. *BioMed research international*. 2022;2022:8549532.
64. Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, Banks KC, Asgari MM, Bergman W, et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009;61(4):677 e1-14.
65. Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane (AU)2017.
66. Clinical Practice Guidelines for Management of Melanoma in Australia and New Zealand 2018. Available from : <https://wiki.cancer.org.au/australia/Guidelines:Melanoma> [
67. Rossi M, Pellegrini C, Cardelli L, Ciciarelli V, Di Nardo L, Fargnoli MC. Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. *Dermatology practical & conceptual*. 2019;9(1):10-6.
68. Pons M, Quintanilla M. Molecular biology of malignant melanoma and other cutaneous tumors. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2006;8(7):466-74.
69. Abdo JF, Sharma A, Sharma R. Role of Heredity in Melanoma Susceptibility: A Primer for the Practicing Surgeon. *The Surgical clinics of North America*. 2020;100(1):13-28.
70. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-96.
71. Castellani G, Buccarelli M, Arasi MB, Rossi S, Pisanu ME, Bellenghi M, et al. BRAF Mutations in Melanoma: Biological Aspects, Therapeutic Implications, and Circulating Biomarkers. *Cancers*. 2023;15(16).
72. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2018;31(1):24-38.
73. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine*. 2012;10:85.
74. Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, Hayward NK. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2016;29(3):266-83.
75. Krauthammer M, Kong Y, Bacchicchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nature genetics*. 2015;47(9):996-1002.
76. Palmieri G, Colombino M, Casula M, Manca A, Mandala M, Cossu A, et al. Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Current oncology reports*. 2018;20(11):86.

77. Pipek O, Vizkeleti L, Doma V, Alpar D, Bodor C, Karpati S, et al. The Driverless Triple-Wild-Type (BRAF, RAS, KIT) Cutaneous Melanoma: Whole Genome Sequencing Discoveries. *Cancers*. 2023;15(6).
78. Pham DDM, Guhan S, Tsao H. KIT and Melanoma: Biological Insights and Clinical Implications. *Yonsei medical journal*. 2020;61(7):562-71.
79. Gong HZ, Zheng HY, Li J. The clinical significance of KIT mutations in melanoma: a meta-analysis. *Melanoma research*. 2018;28(4):259-70.
80. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*. 2021;10(9).
81. Zuo Q, Liu J, Huang L, Qin Y, Hawley T, Seo C, et al. AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene*. 2018;37(24):3275-89.
82. Bai X, Kong Y, Chi Z, Sheng X, Cui C, Wang X, et al. MAPK Pathway and TERT Promoter Gene Mutation Pattern and Its Prognostic Value in Melanoma Patients: A Retrospective Study of 2,793 Cases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(20):6120-7.
83. Guo Y, Chen Y, Zhang L, Ma L, Jiang K, Yao G, et al. TERT Promoter Mutations and Telomerase in Melanoma. *Journal of oncology*. 2022;2022:6300329.
84. Ballesteros-Alvarez J, Dilshat R, Fock V, Moller K, Karl L, Larue L, et al. MITF and TFEB cross-regulation in melanoma cells. *PLoS one*. 2020;15(9):e0238546.
85. Du J, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Ross K, Huber WE, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer cell*. 2004;6(6):565-76.
86. Avery-Kiejda KA, Bowden NA, Croft AJ, Scurr LL, Kairupan CF, Ashton KA, et al. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC cancer*. 2011;11:203.
87. Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Kulp AN, Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, et al. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer research*. 2007;67(1):209-17.
88. Zocchi L, Lontano A, Merli M, Dika E, Nagore E, Quaglino P, et al. Familial Melanoma and Susceptibility Genes: A Review of the Most Common Clinical and Dermoscopic Phenotypic Aspect, Associated Malignancies and Practical Tips for Management. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(16).
89. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2018;34(1):13-24.
90. Khan AQ, Travers JB, Kemp MG. Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2018;59(5):438-60.
91. Trakatelli M, Bylaite-Bucinskiene M, Correia O, Cozzio A, De Vries E, Medenica L, et al. Clinical assessment of skin phototypes: watch your words! *European journal of dermatology : EJD*. 2017;27(6):615-9.
92. Swope VB, Abdel-Malek ZA. MC1R: Front and Center in the Bright Side of Dark Eumelanin and DNA Repair. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9).
93. Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*. 2017;36(42):5771-92.
94. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *The New England journal of medicine*. 2015;373(20):1926-36.

95. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinic proceedings*. 2007;82(3):364-80.
96. Terushkin V, Ng E, Stein JA, Katz S, Cohen DE, Meehan S, et al. A prospective study evaluating the utility of a 2-mm biopsy margin for complete removal of histologically atypical (dysplastic) nevi. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;77(6):1096-9.
97. Sung WW, Chang CH. Nevi, dysplastic nevi, and melanoma: Molecular and immune mechanisms involving the progression. *Tzu chi medical journal*. 2022;34(1):1-7.
98. Franke JD, Woolford KM, Neumeister MW. Lentigo Maligna. *Clinics in plastic surgery*. 2021;48(4):669-75.
99. Ng MF, Simmons JL, Boyle GM. Heterogeneity in Melanoma. *Cancers*. 2022;14(12).
100. Sondka Z, Dhir NB, Carvalho-Silva D, Jupe S, Madhumita, McLaren K, et al. COSMIC: a curated database of somatic variants and clinical data for cancer. *Nucleic Acids Research*. 2023;52(D1):D1210-D7.
101. Holmes GA, Vasantachart JM, Limone BA, Zumwalt M, Hirokane J, Jacob SE. Using Dermoscopy to Identify Melanoma and Improve Diagnostic Discrimination. *Fed Pract*. 2018;35(Suppl 4):S39-S45.
102. Marghoob NG, Liopyris K, Jaimes N. Dermoscopy: A Review of the Structures That Facilitate Melanoma Detection. *J Am Osteopath Assoc*. 2019;119(6):380-90.
103. Bollea-Garlatti LA, Galimberti GN, Galimberti RL. Lentigo Maligna: Keys to Dermoscopic Diagnosis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(6):489-97.
104. Petkovic M, Jurakic Tonic R. Nested Melanoma, a New Morphological Variant of Superficial Spreading Melanoma with Characteristic Dermoscopic Features. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2017;25(1):80-1.
105. Gaudy-Marqueste C, Wazaefi Y, Bruneu Y, Triller R, Thomas L, Pellacani G, et al. Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. *JAMA dermatology*. 2017;153(4):279-84.
106. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer biology & therapy*. 2019;20(11):1366-79.
107. Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U, clinicalguidelines@esmo.org EGCEa. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1884-901.
108. Swetter SM, Thompson JA, Albertini MR, Barker CA, Baumgartner J, Boland G, et al. NCCN Guidelines(R) Insights: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(4):364-76.
109. 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. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(6):472-92.
110. Bobos M. Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: a 2021 update. *Italian journal of dermatology and venereology*. 2021;156(3):300-21.
111. Hurt MA. Types of melanoma? *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;58(6):1059-60.
112. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2020;144(4):500-22.
113. Lakshmi A, Shah R, Begaj A, Jayarajan R, Ramachandran S, Morgan B, et al. NICE 2022 guidelines on the management of melanoma: Update and implications. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2023;85:401-13.

114. Swetter SM, Thompson JA, Albertini MR, Barker CA, Baumgartner J, Boland G, et al. NCCN Guidelines® Insights: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021;19(4):364-76.
115. Wollina U. Melanoma surgery-An update. *Dermatologic therapy*. 2022;35(12):e15966.
116. Orme SE, Moncrieff MD. A Review of Contemporary Guidelines and Evidence for Wide Local Excision in Primary Cutaneous Melanoma Management. *Cancers*. 2024;16(5).
117. Conic RZ, Cabrera CI, Khorana AA, Gastman BR. Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2018;78(1):40-6 e7.
118. Gillgren P, Drzewiecki KT, Niin M, Gullestad HP, Hellborg H, Mansson-Brahme E, et al. 2-cm versus 4-cm surgical excision margins for primary cutaneous melanoma thicker than 2 mm: a randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378(9803):1635-42.
119. Doepker MP, Thompson ZJ, Fisher KJ, Yamamoto M, Nethers KW, Harb JN, et al. Is a Wider Margin (2 cm vs. 1 cm) for a 1.01-2.0 mm Melanoma Necessary? *Annals of surgical oncology*. 2016;23(7):2336-42.
120. Hunger RE, Seyed Jafari SM, Angermeier S, Shafiqhi M. Excision of fascia in melanoma thicker than 2 mm: no evidence for improved clinical outcome. *The British journal of dermatology*. 2014;171(6):1391-6.
121. Kunishige JH, Brodland DG, Zitelli JA. Surgical margins for melanoma in situ. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;66(3):438-44.
122. Karanetz I, Stanley S, Knobel D, Smith BD, Bastidas N, Beg M, et al. Melanoma Extirpation with Immediate Reconstruction: The Oncologic Safety and Cost Savings of Single-Stage Treatment. *Plastic and reconstructive surgery*. 2016;138(1):256-61.
123. Quimby AE, Khalil D, Johnson-Obaseki S. Immediate versus delayed reconstruction of head and neck cutaneous melanoma. *The Laryngoscope*. 2018;128(11):2566-72.
124. Dugan MM, Perez MC, Karapetyan L, Zager JS. Management of acral lentiginous melanoma: current updates and future directions. *Frontiers in oncology*. 2024;14:1323933.
125. Ward WH FJ. Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy. Chapter 7, *Surgical Management of Melanoma*. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017.
126. Morrison S, Han D. Re-evaluation of Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma. *Current treatment options in oncology*. 2021;22(3):22.
127. Rocco N, Velotti N, Pontillo M, Vitiello A, Berardi G, Accurso A, et al. New techniques versus standard mapping for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Updates in surgery*. 2023;75(6):1699-710.
128. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2014;370(7):599-609.
129. Cascinelli N, Morabito A, Santinami M, MacKie RM, Belli F. Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. *WHO Melanoma Programme. Lancet*. 1998;351(9105):793-6.
130. Hein DW, Moy RL. Elective lymph node dissection in stage I malignant melanoma: a meta-analysis. *Melanoma research*. 1992;2(4):273-7.
131. Harrison C, Rodrigues JN, Cassell O. Inter-operator variability in the sensitivity of sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2018;71(12):1816-34.
132. Valsecchi ME, Silbermins D, de Rosa N, Wong SL, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: a meta-analysis. *Journal of*

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011;29(11):1479-87.

133. Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, Agarwala SS, Akhurst TJ, Ariyan C, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy and Management of Regional Lymph Nodes in Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(4):399-413.
134. Baecher H, Gerken M, Knoedler L, Knoedler S, Alfertshofer M, Klinkhammer-Schalke M, et al. Complete lymph node dissection in cutaneous melanoma patients with positive sentinel lymph node: Outcome and predictors in a retrospective cohort study over 16 years. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2024;92:33-47.
135. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2017;376(23):2211-22.
136. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):757-67.
137. 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? *Annals of surgical oncology*. 2013;20(9):3089-97.
138. Brancaccio G, Briatico G, Scharf C, Colella G, Docimo G, Docimo L, et al. The Role of Sentinel Node Biopsy in the Era of Adjuvant Therapy for Melanoma. *Dermatology practical & conceptual*. 2024;14(1).
139. Rossi CR, Mozzillo N, Maurichi A, Pasquali S, Quaglino P, Borgognoni L, et al. The number of excised lymph nodes is associated with survival of melanoma patients with lymph node metastasis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(1):240-6.
140. Garbe C, Keim U, Suci U, Amaral T, Eigentler TK, Gesierich A, et al. Prognosis of Patients With Stage III Melanoma According to American Joint Committee on Cancer Version 8: A Reassessment on the Basis of 3 Independent Stage III Melanoma Cohorts. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(22):2543-51.
141. Jakub JW, Terando AM, Sarnaik A, Ariyan CE, Faries MB, Zani S, Jr., et al. Safety and Feasibility of Minimally Invasive Inguinal Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma (SAFE-MILND): Report of a Prospective Multi-institutional Trial. *Annals of surgery*. 2017;265(1):192-6.
142. Spillane AJ, Cheung BL, Stretch JR, Scolyer RA, Shannon KF, Quinn MJ, et al. Proposed quality standards for regional lymph node dissections in patients with melanoma. *Annals of surgery*. 2009;249(3):473-80.
143. Delman KA, Kooby DA, Ogan K, Hsiao W, Master V. Feasibility of a novel approach to inguinal lymphadenectomy: minimally invasive groin dissection for melanoma. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(3):731-7.
144. Geltzeiler M, Monroe M, Givi B, Vetto J, Andersen P, Gross N. Regional control of head and neck melanoma with selective neck dissection. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*. 2014;140(11):1014-8.
145. Klop WM, Veenstra HJ, Vermeeren L, Nieweg OE, Balm AJ, Lohuis PJ. Assessment of lymphatic drainage patterns and implications for the extent of neck dissection in head and neck melanoma patients. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(8):756-60.

146. Read RL, Haydu L, Saw RP, Quinn MJ, Shannon K, Spillane AJ, et al. In-transit melanoma metastases: incidence, prognosis, and the role of lymphadenectomy. *Annals of surgical oncology*. 2015;22(2):475-81.
147. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(25):2780-8.
148. Speicher PJ, Meriwether CH, Tyler DS. Regional therapies for in-transit disease. *Surgical oncology clinics of North America*. 2015;24(2):309-22.
149. Wright FC, Kellett S, Hong NJL, Sun AY, Hanna TP, Nessim C, et al. Locoregional management of in-transit metastasis in melanoma: an Ontario Health (Cancer Care Ontario) clinical practice guideline. *Current oncology*. 2020;27(3):e318-e25.
150. Read T, Webber S, Thomas J, Wagels M, Schaidler H, Soyer HP, et al. Protocol for the TIDAL Melanoma Study: topical imiquimod or diphenylcyclopropenone for the management of cutaneous in-transit melanoma metastases—a phase II, single centre, randomised, pilot study. *BMJ open*. 2017;7(10):e016816.
151. Shi VY, Tran K, Patel F, Leventhal J, Konia T, Fung MA, et al. 100% Complete response rate in patients with cutaneous metastatic melanoma treated with intralesional interleukin (IL)-2, imiquimod, and topical retinoid combination therapy: results of a case series. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2015;73(4):645-54.
152. Leung AM, Hari DM, Morton DL. Surgery for distant melanoma metastasis. *Cancer journal*. 2012;18(2):176-84.
153. Sood S, Jayachandiran R, Pandey S. Current Advancements and Novel Strategies in the Treatment of Metastatic Melanoma. *Integrative cancer therapies*. 2021;20:1534735421990078.
154. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(11):873-86.
155. 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(9839):358-65.
156. Jenkins RW, Fisher DE. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *The Journal of investigative dermatology*. 2021;141(1):23-31.
157. Lazaroff J, Bolotin D. Targeted Therapy and Immunotherapy in Melanoma. *Dermatologic clinics*. 2023;41(1):65-77.
158. Najem A, Krayem M, Perdrix A, Kerger J, Awada A, Journe F, et al. New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions. *Anticancer research*. 2017;37(11):5941-53.
159. Villani A, Potestio L, Fabbrocini G, Troncone G, Malapelle U, Scalvenzi M. The Treatment of Advanced Melanoma: Therapeutic Update. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(12).
160. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, Angeletti D, Fiore M, Marchetti P, et al. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *Journal of immunology research*. 2020;2020:9235638.
161. Vellano CP, White MG, Andrews MC, Chelvanambi M, Witt RG, Daniele JR, et al. Androgen receptor blockade promotes response to BRAF/MEK-targeted therapy. *Nature*. 2022;606(7915):797-803.
162. Thiem A, Mashhadiakbar P, Cussigh C, Hassel JC, Grimmelmann I, Gutzmer R, et al. Immune checkpoint inhibition and targeted therapy for melanoma: A patient-oriented cross-

- sectional comparative multicentre study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2023;37(5):884-93.
163. Gutzmer R, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, et al. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAF(V600) mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2020;395(10240):1835-44.
164. Pala L, De Pas T, Pagan E, Minucci S, Catania C, Digiacoimo N, et al. Improved outcomes in women with BRAF-mutant melanoma treated with BRAF/MEK-targeted therapy across randomized clinical trials. A systematic review and meta-analysis. *Seminars in oncology*. 2023;50(1-2):34-9.
165. Shimu AS, Wei HX, Li Q, Zheng X, Li B. The new progress in cancer immunotherapy. *Clinical and experimental medicine*. 2023;23(3):553-67.
166. Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet*. 2021;398(10304):1002-14.
167. Specenier P. Ipilimumab in melanoma. Expert review of anticancer therapy. 2016;16(8):811-26.
168. Rizzetto G, De Simoni E, Molinelli E, Offidani A, Simonetti O. Efficacy of Pembrolizumab in Advanced Melanoma: A Narrative Review. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(15).
169. Sun Y, Revach OY, Anderson S, Kessler EA, Wolfe CH, Jenney A, et al. Targeting TBK1 to overcome resistance to cancer immunotherapy. *Nature*. 2023;615(7950):158-67.
170. Kaptein P, Jacobberger-Foissac C, Dimitriadis P, Voabil P, de Bruijn M, Brokamp S, et al. Addition of interleukin-2 overcomes resistance to neoadjuvant CTLA4 and PD1 blockade in ex vivo patient tumors. *Science translational medicine*. 2022;14(642):eabj9779.
171. Davar D, Ding F, Saul M, Sander C, Tarhini AA, Kirkwood JM, et al. High-dose interleukin-2 (HD IL-2) for advanced melanoma: a single center experience from the University of Pittsburgh Cancer Institute. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2017;5(1):74.
172. Raeber ME, Rosalia RA, Schmid D, Karakus U, Boyman O. Interleukin-2 signals converge in a lymphoid-dendritic cell pathway that promotes anticancer immunity. *Science translational medicine*. 2020;12(561).
173. Overwijk WW, Tagliaferri MA, Zalevsky J. Engineering IL-2 to Give New Life to T Cell Immunotherapy. *Annual review of medicine*. 2021;72:281-311.
174. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8.
175. Levi ST, Copeland AR, Nah S, Crystal JS, Ivey GD, Lalani A, et al. Neoantigen Identification and Response to Adoptive Cell Transfer in Anti-PD-1 Naive and Experienced Patients with Metastatic Melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2022;28(14):3042-52.
176. Mo F, Yu Z, Li P, Oh J, Spolski R, Zhao L, et al. An engineered IL-2 partial agonist promotes CD8(+) T cell stemness. *Nature*. 2021;597(7877):544-8.
177. Bear AS, Fraietta JA, Narayan VK, O'Hara M, Haas NB. Adoptive Cellular Therapy for Solid Tumors. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*. 2021;41:57-65.
178. Samson A, West EJ, Carmichael J, Scott KJ, Turnbull S, Kuszlewicz B, et al. Neoadjuvant Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. *Cancer immunology research*. 2022;10(6):745-56.
179. Evgin L, Kottke T, Tonne J, Thompson J, Huff AL, van Vloten J, et al. Oncolytic virus-mediated expansion of dual-specific CAR T cells improves efficacy against solid tumors in mice. *Science translational medicine*. 2022;14(640):eabn2231.

180. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F, Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers*. 2021;13(6).
181. McCulloch JA, Davar D, Rodrigues RR, Badger JH, Fang JR, Cole AM, et al. Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nature medicine*. 2022;28(3):545-56.
182. Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM, Morrison RM, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021;371(6529):595-602.
183. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 2021;371(6529):602-9.
184. Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell*. 2008;15(6):801-12.
185. Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, et al. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron*. 2011;71(2):250-62.
186. Abe Y, Tanaka N. Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Epidermal and Hair Follicle Development, Homeostasis, and Cancer. *Journal of developmental biology*. 2017;5(4).
187. Peng YC, Levine CM, Zahid S, Wilson EL, Joyner AL. Sonic hedgehog signals to multiple prostate stromal stem cells that replenish distinct stromal subtypes during regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(51):20611-6.
188. Shin K, Lee J, Guo N, Kim J, Lim A, Qu L, et al. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature*. 2011;472(7341):110-4.
189. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(12):1026-33.
190. Bakshi A, Chaudhary SC, Rana M, Elmets CA, Athar M. Basal cell carcinoma pathogenesis and therapy involving hedgehog signaling and beyond. *Molecular carcinogenesis*. 2017;56(12):2543-57.
191. Gu D, Schlotman KE, Xie J. Deciphering the role of hedgehog signaling in pancreatic cancer. *Journal of biomedical research*. 2016;30(5):353-60.
192. Abraham A, Matsui W. Hedgehog Signaling in Myeloid Malignancies. *Cancers*. 2021;13(19).
193. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(7):13979-4007.
194. Velcheti V, Govindan R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2007;2(1):7-10.
195. Wu C, Zhu X, Liu W, Ruan T, Tao K. Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer: function, mechanism, and therapy. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:3249-59.
196. Wang H, Lai Q, Wang D, Pei J, Tian B, Gao Y, et al. Hedgehog signaling regulates the development and treatment of glioblastoma. *Oncology letters*. 2022;24(3):294.
197. Riobo-Del Galdo NA, Lara Montero A, Wertheimer EV. Role of Hedgehog Signaling in Breast Cancer: Pathogenesis and Therapeutics. *Cells*. 2019;8(4).
198. Peng ZP, Huang SF, Li JJ, Tang XK, Wang XY, Li HM. The Effects of Hedgehog Signaling Pathway on the Proliferation and Apoptosis of Melanoma Cells. *Journal of oncology*. 2022;2022:4984866.

199. Xu Y, Song S, Wang Z, Ajani JA. The role of hedgehog signaling in gastric cancer: molecular mechanisms, clinical potential, and perspective. *Cell communication and signaling* : CCS. 2019;17(1):157.
200. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795-801.
201. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 1993;75(7):1431-44.
202. Roelink H, Augsburger A, Heemskerk J, Korzh V, Norlin S, Ruiz i Altaba A, et al. Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*. 1994;76(4):761-75.
203. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993;75(7):1401-16.
204. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993;75(7):1417-30.
205. Roessler E, Muenke M. How a Hedgehog might see holoprosencephaly. *Human molecular genetics*. 2003;12 Spec No 1:R15-25.
206. Xie J. Hedgehog signaling in prostate cancer. *Future oncology*. 2005;1(3):331-8.
207. Xie J. Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;624:241-51.
208. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2009;361(12):1164-72.
209. Athar M, Li C, Tang X, Chi S, Zhang X, Kim AL, et al. Inhibition of smoothed signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. *Cancer research*. 2004;64(20):7545-52.
210. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes & development*. 2002;16(21):2743-8.
211. Sanchez P, Ruiz i Altaba A. In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. *Mechanisms of development*. 2005;122(2):223-30.
212. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science*. 2002;297(5586):1559-61.
213. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Uden AB, Sandstedt B, et al. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nature cell biology*. 1999;1(5):312-9.
214. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Annals of neurosciences*. 2014;21(1):28-31.
215. Briscoe J, Therond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(7):416-29.
216. Guo Y, Tong Y, Zhu H, Xiao Y, Guo H, Shang L, et al. Quercetin suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma progression via inhibition of SHH and TGF-beta/Smad signaling pathways. *Cell biology and toxicology*. 2021;37(3):479-96.
217. Bhateja P, Cherian M, Majumder S, Ramaswamy B. The Hedgehog Signaling Pathway: A Viable Target in Breast Cancer? *Cancers*. 2019;11(8).

218. Teperino R, Aberger F, Esterbauer H, Riobo N, Pospisilik JA. Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;33:81-92.
219. Brennan D, Chen X, Cheng L, Mahoney M, Riobo NA. Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitamins and hormones*. 2012;88:55-72.
220. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature medicine*. 2013;19(11):1410-22.
221. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. 1987;236(4797):70-3.
222. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2018;18(1):8-20.
223. Sari IN, Phi LTH, Jun N, Wijaya YT, Lee S, Kwon HY. Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. *Cells*. 2018;7(11).
224. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996;272(5268):1668-71.
225. McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene*. 1998;17(9):1167-72.
226. Maesawa C, Tamura G, Iwaya T, Ogasawara S, Ishida K, Sato N, et al. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* patched gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998;21(3):276-9.
227. Datta S, Datta MW. Sonic Hedgehog signaling in advanced prostate cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(4):435-48.
228. Huang S, He J, Zhang X, Bian Y, Yang L, Xie G, et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*. 2006;27(7):1334-40.
229. Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, et al. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer research*. 2004;64(17):6071-4.
230. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 2008;455(7211):406-10.
231. Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, Darbonne WC, Ahn CP, Scales SJ, et al. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4254-9.
232. Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nature medicine*. 2007;13(8):944-51.
233. Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(22):19589-96.
234. Chen JS, Huang XH, Wang Q, Huang JQ, Zhang LJ, Chen XL, et al. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(1):10-9.
235. Song L, Chen X, Gao S, Zhang C, Qu C, Wang P, et al. Ski modulate the characteristics of pancreatic cancer stem cells via regulating sonic hedgehog signaling

- pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016.
236. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer research*. 2006;66(12):6063-71.
237. Santini R, Vinci MC, Pandolfi S, Penachioni JY, Montagnani V, Olivito B, et al. Hedgehog-GLI signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Stem cells*. 2012;30(9):1808-18.
238. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009;458(7239):776-9.
239. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KS. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene*. 2007;26(38):5674-9.
240. Quint K, Tonigold M, Di Fazio P, Montalbano R, Lingelbach S, Ruckert F, et al. Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition. *International journal of oncology*. 2012;41(6):2093-102.
241. P DIF, Montalbano R, Quint K, Alinger B, Kemmerling R, Kiesslich T, et al. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat modulates the expression of epithelial-mesenchymal transition markers in hepatocellular carcinoma models. *Oncology letters*. 2013;5(1):127-34.
242. Kiesslich T, Mayr C, Wachter J, Bach D, Fuereder J, Wagner A, et al. Activated hedgehog pathway is a potential target for pharmacological intervention in biliary tract cancer. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;396(1-2):257-68.
243. Nguyen NM, Cho J. Hedgehog Pathway Inhibitors as Targeted Cancer Therapy and Strategies to Overcome Drug Resistance. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(3).
244. Ding M, Wang X. Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity. *Oncology letters*. 2017;14(6):6327-33.
245. Pelullo M, Zema S, Nardoza F, Checquolo S, Screpanti I, Bellavia D. Wnt, Notch, and TGF-beta Pathways Impinge on Hedgehog Signaling Complexity: An Open Window on Cancer. *Frontiers in genetics*. 2019;10:711.
246. Chen W, Tang T, Eastham-Anderson J, Dunlap D, Alicke B, Nannini M, et al. Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(23):9589-94.
247. Habashy S, Jafri A, Osman HO, Thomas NE, Udekwe S, Heindl SE. Hedgehog Pathway Inhibitors: Clinical Implications and Resistance in the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Cureus*. 2021;13(3):e13859.
248. Jamieson C, Martinelli G, Papayannidis C, Cortes JE. Hedgehog Pathway Inhibitors: A New Therapeutic Class for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Blood cancer discovery*. 2020;1(2):134-45.
249. Booker BE, Steg AD, Kovac S, Landen CN, Amm HM. The use of hedgehog antagonists in cancer therapy: a comparison of clinical outcomes and gene expression analyses. *Cancer biology & therapy*. 2020;21(10):873-83.
250. Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, Lasham A, Blenkiron C, Laking G, et al. Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2010;2(2):125-48.
251. Huntzicker EG, Estay IS, Zhen H, Lokteva LA, Jackson PK, Oro AE. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes & development*. 2006;20(3):276-81.

252. Lees CW, Zacharias WJ, Tremelling M, Noble CL, Nimmo ER, Tenesa A, et al. Analysis of germline *GLI1* variation implicates hedgehog signalling in the regulation of intestinal inflammatory pathways. *PLoS medicine*. 2008;5(12):e239.
253. Yadav A, Gupta A, Yadav S, Rastogi N, Agrawal S, Kumar A, et al. Association of Wnt signaling pathway genetic variants in gallbladder cancer susceptibility and survival. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(6):8083-95.
254. Li YY, Tian T, Zhang R, Wang L, Xu J, Fan L, et al. Association between polymorphism of *GLI1* gene SNP rs2228226 and chronic lymphocytic leukemia in Chinese population. *Medical oncology*. 2014;31(12):294.
255. Szkandera J, Pichler M, Absenger G, Stotz M, Weissmueller M, Samonigg H, et al. A functional germline variant in *GLI1* implicates hedgehog signaling in clinical outcome of stage II and III colon carcinoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(6):1687-97.
256. Zhu H, Lo HW. The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (*GLI1*) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. *Current genomics*. 2010;11(4):238-45.
257. Wang B, Liu F, Li Y, Chen N. Role of Single Nucleotide Polymorphism-Related Genes in Tumour Immune Cell Infiltration and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *BioMed research international*. 2023;2023:3754094.
258. Hou W, Wan X, Fan J. Variants Fok1 and Bsm1 on VDR are associated with the melanoma risk: evidence from the published epidemiological studies. *BMC genetics*. 2015;16:14.
259. Rendleman J, Shang S, Dominianni C, Shields JF, Scanlon P, Adaniel C, et al. Melanoma risk loci as determinants of melanoma recurrence and survival. *Journal of translational medicine*. 2013;11:279.
260. Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *International journal of cancer*. 2008;122(12):2753-60.
261. Amos CI, Wang LE, Lee JE, Gershenwald JE, Chen WV, Fang S, et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Human molecular genetics*. 2011;20(24):5012-23.
262. Tagliabue E, Gandini S, Bellocco R, Maisonneuve P, Newton-Bishop J, Polsky D, et al. MC1R variants as melanoma risk factors independent of at-risk phenotypic characteristics: a pooled analysis from the M-SKIP project. *Cancer management and research*. 2018;10:1143-54.
263. Gibbs DC, Ward SV, Orlow I, Cadby G, Kanetsky PA, Luo L, et al. Functional melanoma-risk variant *IRF4* rs12203592 associated with Breslow thickness: a pooled international study of primary melanomas. *The British journal of dermatology*. 2017;177(5):e180-e2.
264. Ward SV, Gibbs DC, Orlow I, Thomas NE, Kanetsky PA, Luo L, et al. Association of *IRF4* single-nucleotide polymorphism rs12203592 with melanoma-specific survival. *The British journal of dermatology*. 2020;183(1):163-5.
265. Potrony M, Rebollo-Morell A, Gimenez-Xavier P, Zimmer L, Puig-Butille JA, Tell-Marti G, et al. *IRF4* rs12203592 functional variant and melanoma survival. *International journal of cancer*. 2017;140(8):1845-9.
266. Marasigan V, Guvenc C, van den Oord JJ, Stas M, Boecxstaens V, Bechter O, et al. Melanoma susceptibility variant rs869330 in the *MTAP* gene is associated with melanoma outcome. *Melanoma research*. 2019;29(6):590-5.

267. Davies JR, Jewell R, Affleck P, Anic GM, Randerson-Moor J, Ozola A, et al. Inherited variation in the PARP1 gene and survival from melanoma. *International journal of cancer*. 2014;135(7):1625-33.
268. Rodriguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, Rodriguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A, Majuelos-Melguizo J, et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS genetics*. 2013;9(6):e1003531.
269. Rendleman J, Vogelsang M, Bapodra A, Adaniel C, Silva I, Moogk D, et al. Genetic associations of the interleukin locus at 1q32.1 with clinical outcomes of cutaneous melanoma. *Journal of medical genetics*. 2015;52(4):231-9.
270. Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, Majewski RR, Konicek BA, Nobrega MA, et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(7):5548-55.
271. Fu X, Wang Q, Chen X, Huang X, Cao L, Tan H, et al. Expression patterns and polymorphisms of PTCH in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Experimental and molecular pathology*. 2008;84(3):195-9.
272. Zhang T, Chen M, Lu Y, Xing Q, Chen W. A novel mutation of the PTCH1 gene activates the Shh/Gli signaling pathway in a Chinese family with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;409(2):166-70.
273. Rodriguez-Acevedo AJ, Antonsson A, Liyanage UE, Hughes MC, Gordon S, van der Pols J, et al. Associations of keratinocyte cancers with snp variants in the sonic hedgehog pathway. *BMC cancer*. 2022;22(1):490.
274. Chen M, Hildebrandt MA, Clague J, Kamat AM, Picornell A, Chang J, et al. Genetic variations in the sonic hedgehog pathway affect clinical outcomes in non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer prevention research*. 2010;3(10):1235-45.
275. Musani V, Sabol M, Car D, Ozretic P, Kalafatic D, Maurac I, et al. PTCH1 gene polymorphisms in ovarian tumors: potential protective role of c.3944T allele. *Gene*. 2013;517(1):55-9.
276. Lesiak A, Sobolewska-Sztychny D, Majak P, Sobjanek M, Wodz K, Sygut KP, et al. Relation between sonic hedgehog pathway gene polymorphisms and basal cell carcinoma development in the Polish population. *Archives of dermatological research*. 2016;308(1):39-47.
277. Mamsen LS, Ernst EH, Borup R, Larsen A, Olesen RH, Ernst E, et al. Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Sci Rep*. 2017;7(1):15961.
278. Vlckova K, Reda J, Ondrusova L, Krayem M, Ghanem G, Vachtenheim J. GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclax. *International journal of oncology*. 2016;49(3):953-60.
279. Xu M, Wang J, Li H, Zhang Z, Cheng Z. AIM2 inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration through suppression of Gli1. *Aging*. 2020;13(1):1017-31.
280. Xu H, Dun S, Gao Y, Ming J, Hui L, Qiu X. TMEM107 inhibits EMT and invasion of NSCLC through regulating the Hedgehog pathway. *Thoracic cancer*. 2021;12(1):79-89.
281. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2009;15(2):114-23.
282. Tang Q, Li J, Zhu H, Li P, Zou Z, Xiao Y. Hmgb1-IL-23-IL-17-IL-6-Stat3 axis promotes tumor growth in murine models of melanoma. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:713859.
283. Chang-Claude J, Dunning A, Schnitzbauer U, Galmbacher P, Tee L, Wjst M, et al. The patched polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between

- use of oral contraceptives and breast cancer risk. *International journal of cancer*. 2003;103(6):779-83.
284. Dong J, Gailani MR, Pomeroy SL, Reardon D, Bale AE. Identification of PATCHED mutations in medulloblastomas by direct sequencing. *Human mutation*. 2000;16(1):89-90.
285. Begnini A, Tessari G, Turco A, Malerba G, Naldi L, Gotti E, et al. PTCH1 gene haplotype association with basal cell carcinoma after transplantation. *The British journal of dermatology*. 2010;163(2):364-70.
286. Zambrano-Roman M, Padilla-Gutierrez JR, Valle Y, Munoz-Valle JF, Guevara-Gutierrez E, Lopez-Olmos PA, et al. PTCH1 Gene Variants, mRNA Expression, and Bioinformatics Insights in Mexican Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Patients. *Biology*. 2024;13(3).
287. Shimokawa T, Tostar U, Lauth M, Palaniswamy R, Kasper M, Toftgard R, et al. Novel human glioma-associated oncogene 1 (GLI1) splice variants reveal distinct mechanisms in the terminal transduction of the hedgehog signal. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(21):14345-54.
288. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(14):5895-900.
289. Gunarta IK, Li R, Nakazato R, Suzuki R, Boldbaatar J, Suzuki T, et al. Critical role of glioma-associated oncogene homolog 1 in maintaining invasive and mesenchymal-like properties of melanoma cells. *Cancer science*. 2017;108(8):1602-11.
290. Joruz SM, Bourdon JC. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(8).
291. Matin RN, Chikh A, Chong SL, Mesher D, Graf M, Sanza P, et al. p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(3):581-603.
292. Ozretic P, Hanzic N, Proust B, Sabol M, Trnski D, Radic M, et al. Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. *Scientific reports*. 2019;9(1):12470.
293. Stecca B, Ruiz i Altaba A. A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *The EMBO journal*. 2009;28(6):663-76.
294. Santini R, Pietrobono S, Pandolfi S, Montagnani V, D'Amico M, Penachioni JY, et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene*. 2014;33(38):4697-708.
295. Pietrobono S, Anichini G, Sala C, Manetti F, Almada LL, Pepe S, et al. ST3GAL1 is a target of the SOX2-GLI1 transcriptional complex and promotes melanoma metastasis through AXL. *Nature communications*. 2020;11(1):5865.
296. Das S, Harris LG, Metge BJ, Liu S, Riker AI, Samant RS, et al. The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(34):22888-97.
297. Chen J, Zhou X, Yang J, Sun Q, Liu Y, Li N, et al. Circ-GLI1 promotes metastasis in melanoma through interacting with p70S6K2 to activate Hedgehog/GLI1 and Wnt/beta-catenin pathways and upregulate Cyr61. *Cell death & disease*. 2020;11(7):596.
298. Pietrobono S, Santini R, Gagliardi S, Dapporto F, Colecchia D, Chiariello M, et al. Targeted inhibition of Hedgehog-GLI signaling by novel acylguanidine derivatives inhibits melanoma cell growth by inducing replication stress and mitotic catastrophe. *Cell death & disease*. 2018;9(2):142.
299. Faias-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente AL, Scapulatempo-Neto C, et al. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2

restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene*. 2017;36(13):1849-61.

300. Pitesa N, Kurtovic M, Bartonicek N, Gkotsi DS, Conkas J, Petric T, et al. Signaling Switching from Hedgehog-GLI to MAPK Signaling Potentially Serves as a Compensatory Mechanism in Melanoma Cell Lines Resistant to GANT-61. *Biomedicines*. 2023;11(5).

301. Tusa I, Gagliardi S, Tubita A, Pandolfi S, Menconi A, Lulli M, et al. The Hedgehog-GLI Pathway Regulates MEK5-ERK5 Expression and Activation in Melanoma Cells. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(20).

302. Maresca L, Crivaro E, Migliorini F, Anichini G, Giammona A, Pepe S, et al. Targeting GLI1 and GLI2 with small molecule inhibitors to suppress GLI-dependent transcription and tumor growth. *Pharmacological research*. 2023;195:106858.

Biografija autora

Dr Marija Dunjić je rođena 04. jula 1988. godine u Nišu. Osnovnu školu „Svetozar Marković" u Beogradu je završila 2003. godine, a Treću beogradsku gimnaziju 2007. godine sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je završila marta 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,30, a u toku studija je učestvovala u nastavi kao demonstrator na dva predmeta, usavršavala se na međunarodnoj razmeni studenata, uz pisanje i publikovanje studentskih naučnih radova. Po završetku osnovnih akademskih studija, iste godine je upisala doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, modul Fiziološke nauke.

Pripravnički staž obavila je u Kliničkom centru Srbije. Nakon položenog državnog stručnog ispita, dalje se stručno usavršavala na Klinici za plastičnu hirurgiju i opekotine Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Specijalizaciju iz plastične, rekonstruktivne i estetske hirurgije započela je 2016. godine na istoj klinici, na kojoj je bila i u radnom odnosu do kraja 2021. godine. Za to vreme je pasivno i aktivno učestvovala na stručnim i naučnim skupovima, kao i u pisanju i publikovanju naučnih radova. Specijalistički ispit pred stručnom komisijom je položila 2021. godine sa ocenom „odličan" i time stekla zvanje specijaliste plastične, rekonstruktivne i estetske hirurgije.

Trenutno je zaposlena u firmi „Guard Plus" kao medicinski saradnik, a hirurške veštine i iskustvo iz oblasti plastične hirurgije svakodnevno stiče i usavršava u „Centru za estetsku hirurgiju Georgijev" u Beogradu. Redovno posećuje brojne domaće i međunarodne kongrese, seminare i edukacije, gde kontinuirano unapređuje znanje i stručnost. Član je Srpskog udruženja za plastičnu, rekonstruktivnu i estetsku hirurgiju.

Publikovani radovi iz teze:

Dunjic M, Lukic N, Djordjevic B, Uzelac B, Ostojic N, Supic G. GLI-1 polymorphisms of Hedgehog pathway as novel risk and prognostic biomarkers in melanoma patients. *Melanoma Res.* 2022 Feb 1;32(1):11–7. doi: 10.1097/CMR.0000000000000789. (M22, IF 2.2)

Dunjić M, Perović D, Šupić G. Genetičke promene u melanomu. *Medicinski podmladak.* Vol. 76 Br. 1 (2025) DOI: 10.5937/mp76-48374

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Марија Дуњић

Број индекса: ФН 04/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Повезаност полиморфизама *GLI-1*, *PTCH1* и *SMO* гена *Hedgehog* сигналног пута са ризиком обољевања, клиничко-патолошким факторима и прогнозом меланома“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора: Марија Дуњић

Број индекса: ФН 04/14

Студијски програм: Физиолошке науке

Наслов рада: „Повезаност полиморфизама *GLI-1*, *PTCH1* и *SMO* гена *Hedgehog* сигналног пута са ризиком обољевања, клиничко-патолошким факторима и прогнозом меланома”

Ментор I: доц. др Дијана Перовић

Ментор II: проф. др Гордана Шупић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Повезаност полиморфизама *GLI-1*, *PTCH1* и *SMO* гена *Hedgehog* сигналног пута са ризиком обољевања, клиничко-патолошким факторима и прогнозом меланома“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____